



HAL
open science

Étude de la régulation pharmacologique des canaux ioniques ASIC par des toxines animales

Thomas Besson

► **To cite this version:**

Thomas Besson. Étude de la régulation pharmacologique des canaux ioniques ASIC par des toxines animales. Sciences agricoles. Université Côte d'Azur, 2016. Français. NNT : 2016AZUR4139 . tel-01489724

HAL Id: tel-01489724

<https://theses.hal.science/tel-01489724>

Submitted on 14 Mar 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.

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS – UFR Sciences

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

T H E S E

Présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR en SCIENCES
de l'Université de Nice-Sophia Antipolis
Mention : « Interactions moléculaires et cellulaires »

Présentée et soutenue par :

Thomas BESSON

UMR 7275 CNRS / UNS - IPMC - Sophia Antipolis

Etude de la régulation pharmacologique des
canaux ioniques ASIC par des toxines
animales

Codirigée par le Dr Eric LINGUEGLIA et le Dr Miguel SALINAS

Soutenue le 12 décembre 2016 devant le jury, composé de :

Prof. Laurent COUNILLON
Prof. Jan TYTGAT
Dr. Michel DE WAARD
Dr. Nicolas GILLES
Dr. Miguel SALINAS
Dr. Eric LINGUEGLIA

Président de jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

Remerciement

Par ces quelques lignes, je tiens à exprimer mes remerciements aux personnes qui m'ont permis d'arriver au bout de ma thèse.

Tout d'abord, Merci au docteur Eric Lingueglia, mon directeur de thèse, qui a su me faire confiance et m'accorder beaucoup de liberté durant ces trois années. Peu de directeurs d'équipes auraient autorisés leur étudiant à amener un serpent à l'institut ou encore à démonter la moitié des équipements du laboratoire. Je vous suis reconnaissant de m'avoir accordé votre confiance.

Lors de l'obtention de mon diplôme de Master, Je n'étais pas le meilleur des étudiants ni semble-t-il, le plus facile à vivre. Je tiens donc tout particulièrement à remercier le docteur Miguel Salinas, également mon directeur de thèse, d'avoir cru en moi en me demandant d'être son étudiant en thèse. Il n'a jamais renoncé à m'encadrer et a su me faire partager sa connaissance et sa passion pour la biologie structurale. Je lui adresse toute mon affection car il a été et restera mon mentor pour de nombreuses années.

J'adresse également toute ma reconnaissance au docteur Sylvie Diochot pour partager la même ~~forte~~ passion que moi, pour les animaux venimeux. Sa connaissance des toxines, sa passion pour son travail et sa bonne humeur m'ont permis de vivre pleinement ce pour quoi je me suis initialement inscrit à la faculté des sciences.

Bien sûr, ce travail de thèse n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux de l'ensemble des membres de l'équipe et tout particulièrement Valérie pour sa disponibilité, son soutien et les multiples discussions culinaires et variées que nous avons eues durant ces trois années.

J'adresse également toute mon affection à mes ami(e)s qui vont me manquer après mon départ et je pense notamment à Seb Mo, Malika, Céline², Jenny, Sandy, Sonia et Nath, ainsi que toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées par le biais de l'IPMC.

Il est aussi très important à mon sens, de remercier toutes les personnes dans l'ombre qui m'ont permis de travailler sur ce projet mais aussi de soutenir ma thèse. Je remercie donc l le CNRS et le Labex ICST de m'avoir financé durant ces trois années, l'IPMC de m'avoir accueilli ainsi que l'université de Nice de m'avoir formé tout au long de ma scolarité. Sans oublier bien sûr, l'ensemble des membres de mon jury de thèse d'avoir évalué ce travail et permis son aboutissement.

Enfin, le plus important pour moi, je tiens à remercier l'ensemble des membres de ma Famille. Mes parents, qui ont toujours cru en moi depuis ma naissance, ils m'ont donné et continuent à me donner la force de réaliser mes rêves sans y mettre aucune limite, mais au contraire en y apportant leur soutien et leur force morale. Ma sœur, qui compte énormément pour moi et qui sait toujours se rendre disponible et chaleureuse envers moi. Mes grands-parents dont je suis très fier et qui m'ont transmis énormément d'amour. Ma marraine, qui fut mon premier lien avec la science et avec qui je partage cette passion dévorante et enfin Delphine, qui en plus de supporter mon caractère et mes méthodes de rangements atypiques remplie de bonheur mon quotidien.

Sommaire

Liste des abréviations	5
Table des illustrations	7
Introduction	9
1. Histoire de la découverte des toxines animales et de l'utilisation des venins :	10
2. Rôle et fonction des venins :	12
3. Les différentes classes et groupes d'animaux venimeux ou vénéneux (contenant du poison): ...	13
3.1 Les vertébrés venimeux :	14
3.1.1 Généralités dans la classe des reptiles (Reptilia) :	14
3.1.2 Généralités dans la classe des poissons :	14
3.1.3 Généralités dans la classe des mammifères (Mammalia) :	15
3.2 Les vertébrés contenant du poison:	15
3.2.1 Généralités dans la classe des amphibiens (Amphibia) :	15
3.2.2 Généralités dans la classe des oiseaux (Avia) :	16
3.3 Les venins des invertébrés :	16
3.3.1 Généralités dans la classe des insectes:	16
3.3.2 Généralités dans le sous-embanchement des Chélicérates:	17
3.3.3 Généralités dans le sous-embanchement des myriapodes :	17
3.3.4 Généralités dans le sous-embanchement des crustacées :	17
3.3.5 Généralités dans l'embanchement des cnidaires :	18
3.3.6 Généralités dans l'embanchement des Echinodermes:	18
3.3.7 Généralités dans l'embanchement des mollusques :	18
3.3.8 Généralités dans l'embanchement des céphalopodes :	19
4. Composition des venins :	19
5. Effets nocifs des venins et poisons sur les organismes :	20
5.1 Effets neurotoxiques :	21
5.2 Effets hémotoxiques :	21
5.3 Effets cytotoxiques :	22
5.4 Effets sur le système immunitaire :	22
6. Effets bénéfiques de l'utilisation des toxines animales comme remèdes :	22
7. Découverte de nouvelles cibles pharmacologiques, les canaux ioniques :	23
8. Utilisation des toxines pour comprendre la douleur :	47
9. Les Canaux ASIC :	27
9.1 Fonctions biologiques des canaux ASIC :	27
9.1.1 Les canaux ASIC dans le système nerveux central:	27
9.1.2 Les canaux ASIC dans la douleur inflammatoire et la nociception :	28
9.1.3 Les canaux ASIC et la mécanosensibilité :	29
9.1.4 Les canaux ASIC dans l'homéostasie cardiovasculaire:	30
9.2 Structure des canaux ASIC:	31
9.2.1 Organisation structurale du canal :	31
9.2.2 Les différents états des canaux ASIC:	32
9.2.3 Pore des canaux ASIC :	32
9.2.4 Les senseurs de protons des canaux ASIC :	33

9.3 Propriétés pharmacologiques:	34
9.3.1 Dépendance au pH :	67
9.3.2 Les modulateurs des canaux ASIC :	35
Les ions:	35
Toxines animales:	36
Autres substances naturelles :	38
Petites molécules :	39
Autres molécules :	40
Problématiques et méthodes de recherche.....	41
Première partie : Recherche de nouvelles toxines ciblant les canaux ASIC	44
1. Le prélèvement de venin dans la nature :	45
1.1 Article 1 : Conception d'un extracteur de venin à faible coût pour l'extraction électrique de venin d'arthropodes et autres petits animaux.	45
1.1.1 Analyse des besoins:	46
1.1.2 Choix des matériaux et de l'ergonomie :	46
1.1.3 Extraction du venin de <i>Zoropsis spinimana</i> :	47
1.1.4 Conclusion :	47
ARTICLE 1: Low cost venom extractor based on Arduino® board for electrical venom extraction from arthropods and other small animals.....	49
1.2 Extraction de venin d'Anémone de mer :	53
1.2.1 Récolte et prélèvement des échantillons :	53
1.2.2 Extraction et purification :	54
1.2.3 Caractérisation biochimique du venin d' <i>Actinia schmidti</i> :	54
1.2.4 Conclusion :	55
2. Utilisation de venins commerciaux :	55
2.1 Le fractionnement du venin de <i>Pandinius imperator</i> semble affecter son activité inhibitrice sur les canaux ASIC1a :	56
2.2 Le fractionnement des venins d' <i>Heterometrus mysorensis</i> et d' <i>Heterometrus laoticus</i> révèle une activité inhibitrice des premières fractions (non peptidiques) :	56
2.3 L'inhibiteur de Zinc N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl) éthylènediamine bloque les effets inhibiteurs des fractions 1 de <i>Heterometrus mysorensis</i> et <i>Heterometrus laoticus</i> :	57
2.4 Conclusion :	113
Seconde partie : Etude du mécanisme d'ouverture des canaux ASIC et de leur régulation par des toxines.....	59
1. Article 2 : Etude du site d'action et du mécanisme d'inhibition de la mambalgine-2 sur les canaux ASIC1a :	60
1.1 Contexte de l'étude :	60
1.2 Résultats :	61
ARTICLE 2 : Binding site and inhibitory mechanism of the mambalgin-2 pain-relieving peptide on acid-sensing ion channel 1a.....	64
2. Article 3: Identification des domaines fonctionnels de la Mambalgine-1 permettant l'inhibition des canaux ASIC1a	71
2.1 Contexte de l'étude :	71
2.2 Résultats :	72

ARTICLE 3: Mambalgin-1 pain-relieving peptide, stepwise solid-phase synthesis, crystal structure, and functional domain for acid-sensing ion channel 1a inhibition	75
3. Article 4 : Une nouvelle approche basée sur la pharmacologie pour analyser le mécanisme d'ouverture des canaux ASIC.....	91
3.1 Contexte de l'étude :	91
3.2 Résultats :.....	92
ARTICLE 4: A pharmacology-based approach to analyze the pH-dependent gating of Acid-Sensing Ion Channels	97
Conclusions générales et perspectives	116
Annexes	120
1. Méthodes chirurgicales de prélèvement d'ovocytes de <i>Xenopus laevis</i> par Ovariectomie	121
1.1 L'anesthésie :.....	121
1.2 Chirurgie :.....	122
1.3 Réveil :.....	123
2. Préparation et conservation des ovocytes de <i>Xenopus laevis</i> :.....	123
Références bibliographiques.....	124

Liste des abréviations

μM:	micro molaire
3D :	Tridimensionnelle
Å :	Angström
Acsh :	<i>Actinia Shmidt</i>
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
APETx2 :	Toxine 2 de <i>Anthopleura elegantissima</i>
ASIC :	Acid-Sensing Ion Channels
ATP :	Adénosine Triphosphate
AVC :	Accident Vasculaire Cérébral
cASIC1 :	Canal ASIC1 de poulet
CEA :	Commissariat à l'Energie Atomique
CITES :	Convention on International Trade of Endangered Species
Da :	Dalton
Deg/ENaC :	Dégénérine/ canaux sodiques épithéliaux
Domaine P:	Domaine Paume
Domaine T:	Domaine Pouce
GAS :	Glycine, Arginine, Sérine
GMQ :	2-guanidine-4-methylquinazoline
Hela :	<i>Heterometrus laoticus</i>
Hemy :	<i>Heterometrus mysorensis</i>
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography
Hz :	Hertz
I :	Intensité en Ampère
IC2 :	Inter-integrated Circuit
IC50 :	Concentration Inhibitrice médiane
IP55 :	Indice Protection (poussières et jets d'eau de toutes directions)
LCD :	Liquid Crystal Display
LPA :	Low Protein Absorption
Mamb :	Mambalgine

mg :	Milligramme
MitTx :	Toxine de <i>Micrurus tener tener</i>
ms :	Millisecondes
N/TM/C :	Terminaison aminée/ segments transmembranaires / terminaison carboxyle
NaV1.7 :	Canaux sodiques voltages dépendants type 1.7
NaV1.8 :	Canaux sodiques voltages dépendants type 1.8
Paim :	<i>Pandinus imperator</i>
PcTx1 :	Psalmotoxine-1 ou oxine 1 de <i>Psalmopeus cambridgei</i>
pH :	Potentiel hydrogène
pH_{0.5act}	Potentiel hydrogène de demi-activation
pH_{0.5inact}	Potentiel hydrogène de demi-inactivation
pHi :	Potentiel hydrogène intracellulaire
PLA2 :	Phospholipase A2
R :	Résistance en Ohm
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
SNC :	System nerveux central
TFA :	Acide Trifluoroacétique
TM1 :	Segment transmembranaire 1
TM2 :	Segment transmembranaire 2
TTL :	Transistor-transistor logic
U :	Tension en Volt
UART :	Universal Asynchronous Receiver Transmitter
Urg9-1 :	Toxine de <i>Urticina grebelnyi</i>
USB :	Universal serial bus
V :	Volt
Z :	Zeta
ΔG :	Energie libre
$\Delta\Delta G$:	Variation d'énergie libre

Table des illustrations

Tableau 1: Ordres ou familles de la classe des insectes présentant des venins ou des poisons	3016
Tableau 2: Médicaments actuellement utilisés en clinique dont les principes actifs ont été élaborés à partir de toxines de venins ou de poisons	22
Tableau 3: Autres molécules connues pour avoir des effets directs ou indirects sur les canaux ASIC. (D'après (Baron and Lingueglia 2015))	40
Figure 1: Structure des canaux ASIC	31
Figure 2: Représentation schématique d'un canal ASIC en coupe.	32
Figure 3: Senseur de pH des canaux ASIC	34
Figure 4: Schéma des connections de l'extracteur de venin et des simplifications possibles.	47
Figure 5: Caractérisation du venin d' <i>Actinia schmidtii</i>	54
Figure 6: Caractérisation du venin de <i>Pandinus imperator</i>	10855
Figure 7: Caractérisation du venin de <i>Heterometrus mysorensis</i> (Hemy)	56
Figure 8: Caractérisation du venin de <i>Heterometrus laoticus</i> (Hela).....	11257
Figure 9: L'utilisation de l'inhibiteur de zinc N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) annule les effets du venin d' <i>Heterometrus mysorensis</i> (Hemy) et d' <i>Heterometrus laoticus</i> (Hela).....	58
Figure 10: Modèle de l'inhibition d'ASIC1a par la mambalgine	63
Figure 11: Représentation schématique des différentes chimères réalisées à partir des canaux ASIC1a et ASIC3.....	92

Figure 12: Modèle simplifié des relations complexes entre les mécanismes d'activation et d'inactivation dans la boucle d'ASIC1a en présence de différents agents pharmacologiques..... 96

Introduction

1. Histoire de la découverte des toxines animales et de l'utilisation des venins :

L'histoire des toxines est vaste et semble intimement liée à l'histoire de l'humanité. On retrouve des traces de l'utilisation de drogues, de poisons ou de remèdes élaborés à partir de substances naturelles dans toutes les grandes civilisations et sur tous les continents. Il n'est donc pas surprenant que de nos jours, nous cherchions encore à exploiter les formidables ressources que la nature nous offre.

Dès la préhistoire, les premiers hominidés ont entrepris l'inventaire des composés toxiques d'origine naturelle que nous utilisons encore aujourd'hui. Bien entendu cet inventaire n'était probablement pas destiné à la médecine, à la guerre ou à la recherche mais plutôt à l'alimentation, qui était une activité essentielle pour les sociétés de chasseurs cueilleurs. La principale méthode utilisée à l'époque pour déterminer si un aliment était comestible ou dangereux était l'apprentissage par « l'essai-erreur ». Pour savoir si un aliment était dangereux, il était nécessaire de le tester, le goûter et s'il n'entraînait aucun problème visible sur l'organisme, il pouvait être consommé. A l'inverse, si l'aliment engendrait des problèmes de santé, il était considéré comme impropre à la consommation. Cette méthode empirique a perduré au fil des générations et représente le fondement de la recherche actuelle. Il n'est donc pas improbable que dès le néolithique quelques hominidés précurseurs aient eu recours à des substances naturelles pour se soigner après avoir constaté des effets bénéfiques de la consommation de certains aliments. En revanche, bien que des archéologues aient découverts des plantes « médicinales » proches de certains ossements datant de la préhistoire, il est difficile de prouver qu'ils aient utilisé ces plantes à des fins purement médicales.

Les premières traces de l'utilisation de médicaments élaborés à partir de substances naturelles remontent à l'époque mésopotamienne (1750 ans av. J.-C.) avec la découverte du Code d'Hammourabi (1901 av. J.-C.). Ce code est un texte juridique babylonien antique écrit en cunéiforme qui relate les lois mésopotamiennes. On y trouve les textes se référant aux médecins ou chirurgiens appelés « *asûm* » ainsi que les sanctions encourues en cas d'erreurs graves commises au cours d'opérations réalisées sur des patients. Il est à noter tout de même que certains textes de lois font référence à d'autres types de médecins nommés « *ašīpum* », qui soignaient les malades par des incantations et toutes sortes de rituels ésotériques. A cette période, il était nécessaire de purger l'âme avant de soigner le corps et sans cela la guérison était impossible.

Plus tard, pendant le nouvel empire de l'Égypte antique, 1500 ans av. J.-C., un papyrus nommé « *papyrus d'Ebers* » découvert par Edwin Smith à Louxor en 1862, fait référence à des remèdes utilisés à l'époque pour des pathologies diverses telles que l'asthme ou encore les douleurs intestinales. Ce document avait été écrit à la base pour traiter les blessures de guerre (*La Médecine égyptienne au temps des Pharaons*). D'après les anthropologues ce manuscrit serait en fait une copie de parties d'autres documents dont l'auteur original serait le médecin et architecte Imhotep (3000 ans avant notre ère). On y retrouve une grande majorité de traitements élaborés à base de plantes et principalement l'opium extrait du pavot (*Papaver somniferum*). D'autres plantes telles que la coriandre, l'oignon, l'ail ou encore l'acacia étaient également utilisées dans les traitements courants. L'utilisation de substances issues des animaux était aussi très répandue mais les principales parties utilisées étaient les graisses pour la préparation des baumes, la viande pour la cicatrisation des plaies, le miel comme antiseptique local ou encore les excréments d'animaux tels que l'âne, le crocodile ou l'hippopotame, auxquels on attribuait des vertus curatives. Bien que les berges du Nil regorgent d'animaux venimeux présentant des substances actives intéressantes, très peu d'entre elles ont été utilisées pour prodiguer des soins. La richesse et la complexité des venins les rendent difficiles à exploiter pour l'époque, mais on trouve néanmoins des recettes à base de cantharidine, extraite d'un diptère du nom de *Lytta vesicatoria*, utilisée couramment comme aphrodisiaque. Nous savons aujourd'hui que la poudre issue des insectes broyés entraîne en plus des effets sur l'érection, des brûlures de la peau et lorsqu'elle est absorbée, des douleurs abdominales, des vomissements et des hémorragies. De plus, 50 à 100 mg suffisent pour tuer un homme et elle ne constitue donc pas un traitement efficace lorsqu'elle est utilisée comme aphrodisiaque. Il faudra attendre l'avènement de la Grèce antique, et les recherches d'Aristote (384-322 av. J.-C.) pour trouver les premières traces d'utilisation de venins dans la médecine. Aristote était persuadé que la ruche était une véritable pharmacie. Plus tard (134 - 63 av. J.-C.), le roi Mithridate VI Eupator, réussit à accoutumer son organisme à des poisons mortels de l'époque, en buvant chaque jour des doses croissantes de poisons élaborés à partir de toutes les sortes de plantes toxiques connues à l'époque. Ce procédé permettant une immunité acquise progressivement, porte le nom de Mithridatisation. Les Grecs ont élaboré une réelle culture des poisons et certaines plantes toxiques telles que l'Aconit étaient réputées pour guérir des piqûres de scorpions.

Avec le moyen âge, arrivent les premières études sur les venins. En 1424, le Magister Santes de Ardoynis écrivit le « livre des venins » qui relate les effets et usages des venins et les probables traitements des envenimations. Puis en 1492, Christophe Colomb découvre l'Amérique, sa flore et sa faune remarquables. Il y a tant de choses à découvrir des plantes du nouveau monde que peu de personnes s'intéressent à la richesse des animaux venimeux.

Mais cela permet tout de même au médecin Paracelse (1493 – 1541) de fixer les bases de la toxicologie actuelle : « *tout est poison, rien n'est sans poison, ce qui fait le poison c'est la dose* ». Les premières études de toxicologie sérieuses apparaissent à partir du XVIII^{ème} siècle. Un espagnol du nom de Mateo José Buenaventura Orfila (1787-1853), mit au point une technique pour déterminer si une personne décédée avait été empoisonnée ou non. Plus tard, L'abbé Felice Fontana écrivit en 1781 son « *traité sur le venin de la vipère* ». Ce traité décrit l'appareil vulnérant de l'animal mais aussi les effets du venin sur l'organisme. Les techniques scientifiques permettant l'étude des composés complexes s'améliorent peu à peu et en 1948, Charles-Lucien Bonaparte, neveu de Napoléon I^{er}, isole dans le venin de *Vipera aspis*, la vipérine qui reproduit à elle seule les effets hépatotoxiques du venin complet. A ce moment-là il était admis qu'un venin ne renfermait qu'une seule toxine responsable des propriétés toxiques du venin. Ce n'est qu'à partir des années 1960 que la toxinologie, qui étudie les toxines naturelles, fut réellement développée permettant de montrer qu'un venin est un mélange complexe de composés appelés toxines. Depuis cette époque, nous n'avons pas cessé de découvrir de nouvelles molécules dans les venins d'animaux grâce à la mise au point de techniques de séparation et d'analyse plus efficaces telles que la chromatographie liquide ou la spectrométrie de masse, permettant des avancées importantes dans la recherche mais aussi en médecine.

2. Rôle et fonction des venins :

Dans le règne animal, les venins sont largement utilisés par de nombreux organismes qui ont développé des appareils inoculateurs variés à des fins offensives ou défensives. La niche écologique occupée par un animal peut apporter des réponses sur l'utilisation de son venin, mais c'est son type d'alimentation et son mode de vie qui nous renseigne en général sur l'utilité du venin qu'il a développé au cours du temps. Certains exemples nous permettent d'observer la diversité des utilisations du venin. Des organismes marins tels que les poissons, utilisent leurs venins à des fins purement défensives mais ce n'est pas le cas pour tous les organismes marins, les cnidaires se servent de leurs cnidocytes à la fois pour capturer des proies et pour se défendre contre des prédateurs. Dans certains cas on observe des variations qualitatives du venin au sein d'une même espèce et il a été récemment montré que les cônes marins utilisent des compositions de venin différentes pour la défense ou pour la prédation (Dutertre, Jin et al. 2014, Prashanth, Dutertre et al. 2016). Chez les animaux terrestres, en plus de la prédation et de la défense, certains arthropodes utilisent leur venin pour la reproduction. Les scorpions mâles injectent une faible dose de venin à leur partenaire pour la calmer puis entament une « promenade à deux » permettant de l'entraîner dans un terrain propice à la reproduction.

Chez certains hyménoptères tels que *Zatypota percontatoria*, le venin est utilisé pour contrôler un hôte. Ces guêpes parasites pondent leurs œufs dans des araignées et injectent un venin capable de modifier les habitudes comportementales de celles-ci afin qu'elles protègent les larves qui les dévorent petit à petit (Korenko and Pekar 2011). On dénombre donc une grande diversité de fonctions associées à l'utilisation des venins et de nombreuses restent probablement à découvrir.

3. Les différentes classes et groupes d'animaux venimeux ou vénéneux (contenant du poison):

Il est difficile de classer précisément les différents animaux venimeux car ils sont présents dans de nombreux embranchements du règne animal. L'évolution des venins des vertébrés et des invertébrés n'est probablement pas passée par les mêmes chemins phylogénétiques, il est donc nécessaire pour les classer de bien définir le terme « venimeux ». Le mot venin est employé pour définir « **une sécrétion produite par des cellules spécialisées d'un animal, délivrée à des animaux ciblés au travers d'une blessure réalisée à l'aide d'un appareil inoculateur et qui perturbe les processus physiologiques ou biochimiques de l'animal recevant le venin, afin de faciliter l'alimentation, la défense ou la compétition des animaux producteurs** » (Fry, Roelants et al. 2009, Fry, Casewell et al. 2012). Cette définition permet la distinction entre « venin » et « poison ». Le poison, lorsqu'il est utilisé pour décrire un animal, se réfère à une sécrétion défensive délivrée de manière passive. Le terme « animaux vénéneux » est aussi utilisé pour ces dernières espèces telles que les grenouilles tropicales du genre *Dendrobates* et *Phyllobates*. Pour les études de pharmacologie, les venins ainsi que les poisons sont pris en compte. Il y a différentes façons de classer les animaux venimeux. Pour avoir un aperçu de cette diversité et des méthodes utilisées pour extraire leurs composés actifs, j'ai choisi de distinguer deux grands groupes. D'une part les animaux « *vertébrés venimeux* » et d'autre part, les « *invertébrés venimeux* ».

3.1 Les vertébrés venimeux :

3.1.1 Généralités dans la classe des reptiles (*Reptilia*) :

Les reptiles venimeux comptent sans doute parmi les plus populaires des animaux venimeux. Chez les serpents, on dénombre quatre types de mâchoires différentes dont trois possèdent un système permettant l'inoculation de venin. Les glandes à venin se trouvent sur le maxillaire supérieur et on observe une grande variété de symptômes lors des envenimations. On estime actuellement qu'il existe 3567 espèces de serpents dont seulement un cinquième serait venimeux (Uetz 2010). Chez les lézards, trois familles présentent des espèces venimeuses, les Lanthanotidae, les Helodermatidae et certains représentants de la famille des Varanidae. L'appareil venimeux des lézards est situé à l'opposé des serpents sur les bords antérieurs latéraux de la mandibule. La collecte des venins de reptiles s'effectue de manière mécanique par un maintien de la tête suivi d'une pression manuelle des glandes à venin.

3.1.2 Généralités dans la classe des poissons :

L'appareil venimeux des poissons est utilisé comme arme défensive. Les chondrichthyens venimeux tels que certaines raies appelées « raies armées » disposent d'un ou plusieurs aiguillons situés sur la partie distale et dorsale de la queue et le venin est contenu dans un tissu glandulaire qui recouvre l'aiguillon (Rajeshkumar, Vennila et al. 2015). Pour les requins épineux, l'appareil venimeux est situé à l'avant des nageoires dorsales et relié à une glande à venin (Ziegman and Alewood 2015). Les Chimères quant à elles possèdent une aiguille érectile dentelée au niveau de la nageoire dorsale, recouverte d'un tissu glandulaire qui produit du venin (Ziegman and Alewood 2015). Les Ostéichthyens venimeux possèdent en général plusieurs aiguillons qui selon les espèces peuvent être disposés sur une ou plusieurs nageoires. Plusieurs familles de poissons osseux (*Trachinidae spp*, *Echiichtys spp*) présentent des épines operculaires recouvertes ou non de tissus glandulaires (Ziegman and Alewood 2015). D'autres, tels que les « poissons coffres » produisent des sécrétions toxiques qui proviennent de glandes cutanées. Pour les animaux présentant des glandes internes, la collecte du venin s'effectue directement dans les glandes à l'aide d'une seringue. Pour les aiguillons recouverts de tissus glandulaires il convient de prélever directement l'aiguillon au complet. De nombreux venins de poissons étant thermolabiles il est important de les placer rapidement dans un espace réfrigéré après leur prélèvement pour éviter leur dégradation.

3.1.3 Généralités dans la classe des mammifères (Mammalia) :

Le nombre de mammifères venimeux est dérisoire et leurs venins sont peu étudiés. Néanmoins, ils n'en restent pas moins intéressants. L'ornithorynque mâle (*Ornithorhynchus anatinus*) qui fait partie de l'ordre des Monotrèmes, possède un éperon corné creux et articulé, situé sur les bords internes des membres postérieurs (Whittington, Koh et al. 2009). Les éperons sont reliés à des glandes à venin qui se développent considérablement en période de rut. Le venin de ces animaux est prélevé de manière manuelle et nécessite des autorisations spécifiques. Certains mammifères de l'ordre des Soricomorpha tels que le Crossope aquatique (*Neomys fodiens*) ou les musaraignes du genre *Blarina*, possèdent des incisives sillonnées et injectent par morsure des neurotoxines issues des glandes sous maxillaires (Dufton 1992). La collecte des toxines de ces mammifères s'effectue par prélèvement des glandes (Kita, Nakamura et al. 2004). Certaines espèces de primates des genres *Loris* et *Nycticebus* secrètent un venin au niveau de glandes brachiales puis mélangent cette sécrétion à leur salive pour former un venin actif (Grow, Wirdateti et al. 2015, Rode-Margono and Nekaris 2015). Il est donc nécessaire de prélever les deux sécrétions pour l'étude complète de ces toxines de primates. Enfin certaines familles de l'ordre des Chiroptères, les chauves-souris dites « vampires », secrètent des protéines qui affectent la vasodilatation et l'agrégation plaquettaire. Ces molécules sont produites par les glandes salivaires et il est facile de les récupérer par le prélèvement de la salive (Low, Sunagar et al. 2013).

3.2 Les vertébrés contenant du poison:

3.2.1 Généralités dans la classe des amphibiens (Amphibia) :

Les amphibiens sont à classer parmi les animaux contenant des poisons car ils ne présentent pas d'appareils vulnérants spécialisés. Un récent article montre que deux espèces de grenouilles brésiliennes (*Corythomantis greeningi* et *Aparasphenodon brunoi*) présentent des excroissances osseuses au niveau de la mâchoire permettant de faciliter la pénétration du venin présent dans les glandes cutanées (Jared, Mailho-Fontana et al. 2015). Ce mécanisme reste pour le moment anecdotique et les amphibiens sont encore considérés comme des vertébrés produisant des poisons. La classe des amphibiens compte trois ordres : les Anoures, les Urodèles et les Gymnophiones. Aucune donnée n'est connue sur les sécrétions cutanées des Gymnophiones, en revanche chez les Anoures comme chez les Urodèles de nombreuses espèces secrètent des toxines cutanées, par le biais de glandes sécrétrices spécialisées comme les crapauds et certains tritons, ou elles ne sont pas directement produites par l'animal mais

Sous ordre Ou Famille	Stade présentant des toxines	type	Appareil vulnérant	Méthode de prélèvement	Références
Blattaria (blattes)	Adulte	Défensif	Aucun	chocs électriques, récupération des sécrétions des glandes défensives	(Patel and Meher 2016)
Rhyncota	Adulte	Défensif	Aucun	Prélèvement des glandes à venin	(Aryeetey and Kumar 1973)
Coleoptera (scarabées)	Adulte	Défensif	Aucun	Provocation électrique ou manuelle, trempage dans solvant, dissection des glandes sécrétrices	(Bettini 2013)
Lepidoptera (Papillons)	Larvaire et adulte	Défensif	Larves : soies et spicules	Adulte : extraction manuelle à partir des antennes et articulations, larves : trempage dans solvant	(Bettini 2013)
Apidae (abeille)	Adulte	défensif	Dard dentelé abdominal	Extraction électrique	(Li, Zhang et al. 2013)
Sphecidae (guêpe ampulex)	Adulte	Offensif	Dard lisse abdominal	Stimulation mécanique	(Gnatzy, Michels et al. 2015)
Pompilidae (guêpes)	Adulte	Offensif	Dard lisse abdominal	Prélèvement des glandes à venin	(Konno, Hisada et al. 2001)
Mutillidae (mutille)	Adulte	Offensif	Dard lisse abdominal	Prélèvement des glandes à venin	(Bettini 2013)
Bethylidae	Adulte	Offensif	Dard lisse abdominal	Prélèvement des glandes à venin	(Howard and Baker 2003)
Vespidae (frelons)	Adulte	Défensif	Dard lisse abdominal	Prélèvement des glandes à venin	(Rungsa, Incamnoi et al. 2016)
Braconidae	Adulte	Offensif	Dard lisse abdominal	Prélèvement des glandes à venin	(Rossi, Salvador et al. 2014)
Formicidae (fourmis)	Adulte	Défensif /offensif	Dard lisse abdominal	trempage dans solvant, prélèvement glande pour les grandes espèces, extraction manuelle	(Goncalves Paterson Fox, Russ Solis et al. 2013)

Tableau 1: Ordres ou familles de la classe des insectes présentant des venins ou des poisons

prélevées dans l'alimentation et s'accumulent dans la peau (Daly, Myers et al. 1980). Les deux types de sécrétions peuvent être prélevées en utilisant un stimulateur électrique transcutané (Smith and Burgoyne 2004).

3.2.2 Généralités dans la classe des oiseaux (Avia) :

Au moins six espèces d'oiseaux du genre *Pitohui* contiennent du poison et présentent des niveaux de toxicité variables (Dumbacher, Spande et al. 2000). Un autre oiseau de Nouvelle Guinée du genre *Ifrita*, semble posséder dans sa peau les mêmes toxines que celles du genre *Pitohui*. Ces toxines seraient de la famille des batrachotoxines (Bartram and Boland 2001) et bien que les deux genres, *Pitohui* et *Ifrita* ne possèdent pas de cellules spécialisées pour la production de ces toxines, il semblerait qu'ils puissent métaboliser et stocker les batrachotoxines à partir de précurseurs présents dans leur alimentation (Dumbacher, Spande et al. 2000). D'autres oiseaux comme la caille européenne sont considérés comme toxiques durant les périodes de migration car ce sont des accumulateurs de métabolites secondaires issus de plantes toxiques (Bartram and Boland 2001). Les toxines d'oiseaux étant présentes dans les tissus, il est nécessaire d'effectuer des biopsies pour leur étude.

3.3 Les venins des invertébrés :

3.3.1 Généralités dans la classe des insectes:

La classe des insectes est à elle seule la plus vaste du règne animal. Ils sont présents dans tous les types de milieux et de manière surprenante peu de familles d'insectes présentent du venin. Le corps des hexapodes est divisé en trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen. Avant d'atteindre leur forme adulte, les insectes passent par différents stades immatures. Ce sont généralement les formes adultes qui présentent du venin mais certaines formes larvaires peuvent également contenir des composés nocifs. De nombreuses chenilles possèdent des soies irritantes destinées à les protéger des prédateurs, elles sont dites phanerotoxiques. D'autres présentent des liquides organiques toxiques et sont dites cryptotoxiques. Pour les phases adultes des insectes, les appareils vulnérants se situent au niveau de la tête ou de l'abdomen. Le tableau 1 présente les différents ordres ou familles de la classe des insectes présentant des venins ou des poisons.

3.3.2 Généralités dans le sous embranchement des Chélicérates:

Avec les serpents, ces animaux sont les premiers évoqués lorsque l'on parle de venin. L'embranchement des chélicérates comporte trois classes : les Arachnides, les Mérostomes et les Pycnogonides. Parmi ces trois classes, seuls les arachnides sont venimeux. Chez les arachnides, les ordres les plus étudiés présentant du venin sont les Araneae (araignées) et les Scorpiones (scorpions). Les araignées possèdent des chélicères reliées à des glandes à venin au niveau du céphalothorax. Le prélèvement du venin des araignées s'effectue de manière manuelle ou électrique selon la taille du spécimen (Palagi, Koh et al. 2013, Garb 2014). L'ordre des scorpions possède un appareil vulnérant au niveau du metasoma (post-abdomen), appelé telson, qui renferme également les glandes à venins. L'extraction du venin de scorpion s'effectue en général de manière électrique pour prélever une plus grande quantité de venin mais la méthode manuelle est aussi utilisée (Oukkache, Chgoury et al. 2013). D'autres ordres tels que les opilions ou les ricinuleis possèdent des chélicères mais sont peu étudiés et aucun venin n'a été trouvé à ce jour.

3.3.3 Généralités dans le sous-embranchement des myriapodes :

Chez les myriapodes, la famille des Scolopendridae est très étudiée en toxicologie car leur contact avec l'Homme est fréquent et les envenimations douloureuses. Ces animaux présentent deux forcipules au niveau de l'appareil buccal qui contiennent chacun une glande venimeuse. Lors de la morsure, une contraction musculaire de la glande permet l'éjection du venin. Certains spécimen peuvent mesurer jusqu'à 20 cm et sont de nature agressive. Il est donc recommandé de les anesthésier avant d'extraire le venin. L'extraction se fait le plus souvent de manière électrique (Cooper, Fox et al. 2014).

3.3.4 Généralités dans le sous embranchement des crustacées :

Ce n'est que récemment que le premier crustacé venimeux a été découvert (*Speleonectes tulumensis*). Cette découverte a été révélée grâce à l'étude transcriptomique de l'animal suite à des observations de son comportement de prédateur (von Reumont, Blanke et al. 2014). Il n'y a, à ce jour, aucune méthode d'extraction de venin connue.

3.3.5 Généralités dans l'embranchement des cnidaires :

L'appareil venimeux de l'embranchement des cnidaires (anémones de mer, méduses..) est caractérisé par l'existence de cellules spécialisées uniques dans le règne animal, qui sont représentées par les nématocystes ou cnidocystes. Les nématocystes représentent l'appareil vulnérant des cnidaires. Ils sont formés d'une capsule globuleuse terminée par un opercule à l'intérieur duquel se trouve un filament enroulé sur lui-même et relié à une fléchette. Tout contact avec ces cellules ou changement de pression osmotique déclenche l'exocytose du nématocyste qui libère alors la fléchette par un mécanisme de dévagination. Cette fléchette pénètre toute surface à sa portée et permet au nématocyste de rester ancré et de libérer le venin qu'il contient de manière prolongée. Il est possible de récupérer le venin des cnidaires par des chocs osmotiques qui vont libérer les nématocystes ou par chocs électriques pour les anémones plus sensibles aux variations de pression osmotique. (Marchini, De Nuccio et al. 2004).

3.3.6 Généralités dans l'embranchement des Echinodermes:

Les épines calcaires des échinodermes présentent un réel danger pour l'homme. Bien que la plupart de ces animaux soient inoffensifs, certaines espèces d'étoiles de mer comme *Acanthaster planci* possèdent un tissu glandulaire sécrétant des toxines. Il est fréquent que des individus marchent sur ces animaux et soient affectés par leur venin. Certaines espèces d'oursins possèdent de longs piquants dont l'extrémité est recouverte d'un réservoir entouré de tissus musculaires. Lorsque les pointes pénètrent l'épiderme, le venin sécrété par un tissu glandulaire est injecté de manière passive. D'autres genres présentent des pédicellaires globifères entre les piquants, constitués de trois valves se terminant en crochet. Le venin est également sécrété par un tissu glandulaire et est injecté lors de la piqûre. Ces animaux sont peu étudiés et l'extraction du venin se fait par un broyat des tissus (Burnett, Fenner et al. 1996).

3.3.7 Généralités dans l'embranchement des mollusques :

Dans l'embranchement des mollusques, la famille des cônes est connue pour causer des envenimations graves chez l'homme. Les venins de ces animaux sont complexes et de plus en plus étudiés car ils présentent une grande diversité de composés susceptible d'interagir avec de nombreuses cibles pharmacologiques chez les mammifères. Les envenimations chez l'homme sont provoquées par la pénétration de dents radulaires dans l'épiderme. Ces dents radulaires sont éjectées lors de la dévagination du proboscis. Il a été récemment montré que les cônes

injectent des venins de compositions différentes en réponse à une attaque envers une proie ou à un acte défensif face à un prédateur (Dutertre, Jin et al. 2014). C'est par diverses méthodes de stimulations manuelles des cônes que cette composition de venin différente a été révélée. Néanmoins il n'est pas toujours évident d'effectuer un prélèvement manuel du venin c'est pourquoi, la récolte par prélèvement des glandes à venin est souvent privilégiée.

3.3.8 Généralités dans l'embranchement des céphalopodes :

Les céphalopodes sont présents dans tous les océans et ont la particularité de présenter des bras puissants équipés de ventouses. Au centre de convergence de ces bras deux mâchoires forment un bec de perroquet qui leur permet de broyer les petits animaux. Seulement deux espèces du genre *Hapaloclaema* sont connues pour présenter de réels dangers pour l'homme. Ces poulpes possèdent des glandes salivaires qui produisent des composés toxiques, la salive est ensuite injectée de manière passive lors de la morsure. La principale toxine présente chez ce genre de poulpe, responsable de la mort des animaux de laboratoire lors des tests de toxicité est la maculotoxine, qui provoque des paralysies respiratoires (Freeman 1970). Chez les espèces européennes, seuls quelques composés hypotenseurs et vasodilatateurs ont été isolés. Le prélèvement du venin s'effectue par dissection des glandes salivaires.

4. Composition des venins :

Les venins sont des cocktails de molécules bioactives qui peuvent être séparées par des techniques de biochimie. Certaines molécules qui les composent sont appelées toxines car elles peuvent altérer les processus biologiques. La majorité des composants d'un venin est représentée par des protéines ou des peptides (Fry, Roelants et al. 2009). On trouve également d'autres composés tels que des acides aminés, des sels, des composés organiques ou encore des neurotransmetteurs qui ne sont pas dangereux à des concentrations normales mais qui peuvent devenir nocifs lorsqu'ils sont accumulés dans les venins en grande quantité (Escoubas and King 2009). La composition des venins et leurs cibles moléculaires semblent refléter la fonction qui leur est destinée. Les venins défensifs des poissons ou des hyménoptères par exemple sont simples et très conservés au cours de l'évolution. Lors des envenimations le premier symptôme est généralement une douleur localisée et extrême (Church and Hodgson 2002, de Graaf, Aerts et al. 2009). Le venin des prédateurs en revanche est plus complexe, il présente une grande variabilité de composition et d'effets physiologiques liée à l'environnement, ou à la nourriture

(Fry, Roelants et al. 2009). Parfois, cette variabilité peut entraîner des différences extrêmes de toxicité pour des individus de la même espèce (Sasa 1999). Ces variations de toxicité intra-espèces peuvent s'expliquer par la pression de sélection qui agit sur la composition des venins. Certains reptiles dépensent un fort coût énergétique pour produire un venin et pourtant, ils injectent une quantité cent fois supérieure à la dose létale nécessaire pour tuer une proie en laboratoire (Mebs 2001). Cela s'explique par le fait que les proies sauvages évoluent et deviennent résistantes à l'action d'un venin au cours du temps, ce qui n'est pas le cas des modèles de laboratoire (Biardi and Coss 2011). L'adaptation des proies couplée au fort coût énergétique nécessaire pour produire un venin favorisent des mutations rapides des glandes sécrétrices pour s'adapter à l'évolution constante du métabolisme des proies et réduire les coûts énergétiques de la création d'un venin qui ne serait pas adapté. Certains crotales modulent la quantité de venin injectée en fonction de la taille de la proie ce qui démontre une adaptation pour économiser le venin (Hayes 1995). Bien que ces mécanismes ont été très étudiés chez les reptiles, certains organismes tels que les arachnides semblent montrer des adaptations similaires pour réduire les coûts énergétiques liés à la production du venin. Les araignées injectent des doses croissantes de venin en fonction de l'intensité et de la durée des mouvements de la proie capturée dans leur toile. Cela permet de n'injecter que le venin nécessaire à la neutralisation de sa proie et permet la réduction des coûts énergétiques. Certains scorpions ont évolué de manière à créer un « pré-venin » qui présente un coût énergétique de fabrication faible. Il est utilisé de manière défensive et est secrété en premier lorsque le scorpion est menacé. Contrairement au venin utilisé pour la prédation qui est trouble et chargé de peptides, le pré-venin est translucide et riche en molécules inductrices de douleur (Inceoglu, Lango et al. 2003). Il est possible que d'autres organismes aient mis en place des mécanismes similaires au cours de l'évolution ce qui rend l'étude des venins encore plus complexe.

5. Effets nocifs des venins et poisons sur les organismes :

Pour pouvoir parler des effets nocifs d'un venin, il est important de préciser quel organisme est ciblé par celui-ci. Par exemple le serpent des palétuviers, *Boiga dendrophila*, produit une toxine (denmotoxin) qui inhibe fortement et de manière irréversible l'activité neuromusculaire postsynaptique des oiseaux. Lorsque cette toxine est injectée à des souris les effets sont réversibles et non dangereux (Pawlak, Mackessy et al. 2006). Bien que les venins soient des mélanges de molécules avec de nombreux effets croisés, ils sont généralement classés en

fonction des symptômes qu'ils induisent chez l'homme ou le mammifère (rongeur de laboratoire) lors des envenimations.

5.1 Effets neurotoxiques :

De nombreux animaux venimeux ont besoin de neutraliser rapidement une proie. Pour cela ils produisent des toxines qui agissent sur les centres nerveux en bloquant la transmission de l'influx électrique au niveau des synapses. Les venins neurotoxiques peuvent agir sur des cibles présynaptiques ou postsynaptiques et entraîner deux grands type d'effets : une hyperexcitabilité (hyper sécrétions, convulsions, hypertension, contractions musculaires, etc...) ou une hypoexcitabilité (dépression respiratoire, paralysie musculaire, hypotension, etc...). Ils sont très étudiés en pharmacologie pour leurs effets sur une multitude de canaux ioniques et de récepteurs et sont souvent utilisés comme des outils moléculaires pour étudier leur fonctionnement.

5.2 Effets hémotoxiques :

Ces toxines qui agissent sur le système sanguin au sens large (au niveau des facteurs de coagulation et au niveau cellulaire) entraînent souvent des complications secondaires d'ordre neurologiques (déclenchements d'accidents vasculaires cérébraux) ou même immunitaires (syndrome inflammatoire). Certaines agissent de manière indirecte comme des vasodilatateurs par inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 1 puis une augmentation des bradykinines et prostaglandines engendrant une chute de la pression artérielle et favorisant un syndrome hémorragique, d'autres ont des actions directes sur l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, l'activation de la « Protéine C » ou sont capables d'hydrolyser le fibrinogène et la fibrine entraînant également des problèmes de coagulation sanguine. De nombreux venins de serpents induisant à l'inverse, la formation de caillots sanguins par l'agrégation plaquettaire, ce qui forme un « clou hémostatique ». Les effets coagulants provoquent souvent des complications tissulaires telles que des nécroses.

SPECIALITE (principe actif)	Origine de la molécule	Mode d'action	Indication thérapeutique
Captopril®	<i>Bothrops jararaca</i>	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC)	Hypertension artérielle.
Aggrastat® (Tirofiban)	<i>Echis carinatus</i>	Inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire	Anticoagulant : association avec l'héparine et l'acide acétylsalicylique chez l'adulte souffrant d'un syndrome coronaire aigu.
Integrilin® (Eptifibatide)	<i>Sistrurus miliarius barbouri</i>	Agent antithrombotique (inhibiteur de l'agrégation plaquettaire)	Prévention d'un infarctus du myocarde précoce chez les patients souffrant d'angor instable.
Prialt® (Ziconotide)	<i>Conus magus</i>	Inhibe le courant calcique voltage-dépendant dans les terminaisons afférentes nociceptives primaires des couches superficielles de la corne postérieure de la moelle épinière	Traitement des douleurs intenses, chroniques chez les patients nécessitant une analgésie intrarachidienne.
Byetta® (Exénatide)	<i>Heloderma suspectum</i>	Agoniste du récepteur du glucagon-like peptide-1 (GLP-1)	Traitement du diabète de type 2.
Reptilase® (Hemocoagulase)	<i>Bothrops atrox</i>	Liberation de fibrinopeptides A	Traitement des hémorragies chirurgicales
Canthacur® ou Cantharone® (cantharidine)	<i>Lytta vesicatoria</i>	Non renseigné	Traitement des verrues
Iprivask® Désirudine (derivé de l'hirudine)	<i>Hirudo medicinalis</i>	Inhibiteur sélectif de la thrombine	Prévention de thrombose veineuse profonde pendant certaines chirurgies
Helicidine®	<i>Helix pomatia</i>	Non renseigné	Traitement de la toux sèche
A usage de diagnostique			
Protac®	<i>Agkistrodon contortrix</i>	Enzyme activatrice de la protéine C	Permet la mesure enzymatique de la conversion de Protéines C
Botrocetin®	<i>Bothrops jararaca</i>	Se fixe au facteur de von Willebrand et interagit ensuite avec les plaquettes pour former un complexe ou agrégat	Permet la détermination du temps d'agrégation plaquettaire

Tableau 2: Médicaments actuellement utilisés en clinique dont les principes actifs ont été élaborés à partir de toxines de venins ou de poisons

5.3 Effets cytotoxiques :

Beaucoup de venins d'animaux ont des effets plus ou moins importants sur les cellules. La piqûre de certains cnidaires entraîne des œdèmes locaux et des brûlures de la peau plus ou moins graves. La morsure de certains serpents provoque la formation de phlyctènes. D'autres encore produisent une nécrose extensive favorisant la pénétration du venin dans le membre touché. Ces mécanismes peuvent être directs par l'action des enzymes d'un venin (protéases, sphingomyelinases, etc...) sur les membranes cellulaires (hydrolyse des mucopolysaccharides, etc...) ou indirects suite à une réponse inflammatoire provoquée par une cascade de réactions combinées (augmentation de la quantité d'acide arachidonique, augmentation des leucotriènes etc...).

5.4 Effets sur le système immunitaire :

Les venins des hyménoptères sont connus pour provoquer des réactions inflammatoires importantes. Le potentiel allergique de ces venins les rend encore plus dangereux et peut provoquer des réactions anaphylactiques fatales. L'effet de certaines toxines sur les mécanismes inflammatoires peut augmenter la perméabilité des capillaires sanguins et entraîner la formation d'œdèmes induisant la libération massive d'histamine et de bradykinines. La libération de cytokines induite par l'action de certains venins stimule aussi la synthèse de protéines inflammatoires.

6. Effets bénéfiques de l'utilisation des toxines animales comme remèdes :

Il pourrait paraître étrange de parler d'effet bénéfique lors de l'utilisation de toxines et pourtant comme le disait Paracelse, « *Tout est poison, rien n'est sans poison, ce qui fait le poison c'est la dose* ». Avec les moyens d'analyse et de dosage performant dont nous disposons aujourd'hui cette doctrine s'avère d'autant plus vraie. Comme nous l'avons vu précédemment, les venins sont constitués de tout un arsenal de molécules dont les actions indépendantes sont très spécifiques. En suivant le principe de Paracelse, et grâce aux technologies actuelles, il est maintenant possible de tirer profit de ces molécules et de les utiliser de manière contrôlée pour résoudre un grand nombre de pathologies. Le Tableau 2 liste de façon non exhaustive les

médicaments actuellement sur le marché dont les principes actifs ont été élaborés à partir de toxines de venins ou de poisons.

7. Découverte de nouvelles cibles pharmacologiques, les canaux ioniques :

C'est à partir du XIX^{ème} siècle que des physiciens se sont intéressés à l'électricité du vivant. En 1827 Georg Simon Ohm établit la loi qui porte son nom, *Loi d'Ohm*: la différence de potentiel (U) entre deux points d'un conducteur est proportionnelle à l'intensité du courant (I) et la constante de proportionnalité est appelée résistance (R) ($U=R \cdot I$). A Partir de 1832, Michael Faraday montre que la loi d'Ohm s'applique aux électrolytes et que sous l'influence d'un champ électrique créé par l'application d'une différence de potentiel suffisante entre deux électrodes, les ions se mettent en mouvement, les cations dans le sens du champ, c'est-à-dire vers la cathode et les anions dans le sens inverse, vers l'anode. A cette époque de nombreux scientifiques travaillent sur les phénomènes électriques observés sur les cellules et beaucoup pensent que la membrane cellulaire est une enveloppe imperméable renfermant un noyau permettant de générer de l'électricité. Un certain Julius Bernstein inventa en 1878 une machine qui lui permit de mesurer l'onde électrique se propageant le long d'un nerf, le potentiel d'action ainsi que le potentiel de repos. Par la suite en 1889 Walther Nernst définit l'équation qui permet la mesure du potentiel d'équilibre d'un ion au travers d'une membrane perméable ce qui permit à Julius Bernstein en 1902 de démontrer que l'intérieur de la cellule avait une composition d'électrolytes différente de celle de l'extérieur de la cellule et que le potentiel de repos, pour lui, était dû à une perméabilité sélective de la membrane plasmique au potassium, couplé à un gradient de concentration. Le potentiel d'action quant à lui est dû à une augmentation de la perméabilité membranaire à tous les ions, ce qui provoque une diminution de la polarité membranaire. Parallèlement à cela, de nombreux chercheurs travaillent sur la toxicité du poisson globe qui est connu depuis l'antiquité pour causer de violentes intoxications lors de sa consommation. Les personnes qui ingèrent ce poisson présentent après quelques heures une paralysie flasque et aréflexique alors qu'ils sont pleinement conscients. En 1910, un chercheur japonais du nom de Yoshizumi Tahara isole pour la première fois la toxine responsable de ces envenimations dans les ovaires du « Fugu », un poisson globe de la famille des tétrodons et lui donne le nom de « Tetrodotoxine ». Quarante-deux ans après, Andrew Fielding Huxley et Alan Lloyd Hodgkin, qui travaillent conjointement sur la genèse des potentiel d'actions utilisent cette toxine sur l'axone

géant de calamar qui est leur modèle d'étude. Ils parviennent grâce à cela à bloquer le courant sodique et démontrent que l'initiation du potentiel d'action est provoquée par l'activation de conductances sélectives au sodium puis au potassium. Par la suite, ils émettent l'hypothèse de l'existence de canaux ioniques sélectifs à certains ions, pouvant rendre perméable la membrane plasmique. L'existence de ces canaux ioniques sera définitivement établie à l'échelle moléculaire en 1976 par Erwin Neher et Bert Sakmann, qui parviennent à enregistrer pour la première fois le courant traversant un seul canal grâce à l'invention de la technique du patch clamp. Il est évident que sans l'utilisation de la tétrodothoxine, il aurait été impossible à l'époque de décrypter le mécanisme cellulaire de déclenchement d'un potentiel d'action. Peu de temps après de nombreuses études sur le mécanisme d'inhibition sélective des canaux sodiques de l'axone géant de calmar par la tétrodothoxine furent effectuées et l'utilisation de cette toxine devint un outil pharmacologique pour comprendre l'implication des canaux sodiques dans les processus cellulaires.

8. Utilisation des toxines pour comprendre la douleur :

Après les travaux de Hodgkin et Huxley et l'amélioration des techniques d'électrophysiologie permettant l'enregistrement des courants ioniques cellulaires réalisés par Neher et Sakmann, de nombreux canaux ioniques ont été découverts. Ils sont présents dans tous les types cellulaires et sont à la base de nombreux processus biologiques tels que la neurotransmission, la fonction cardiovasculaire, la contraction musculaire, la sécrétion d'hormones et la signalisation sensorielle incluant la perception de la douleur. Au cours du temps, les venins ont évolué de manière à perturber le fonctionnement normal de ces processus biologiques. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, des toxines comme la tétrodothoxine ont été utilisées pour discerner les différents acteurs moléculaires impliqués dans la genèse des potentiels d'actions. Il n'est donc pas surprenant que d'autres toxines ciblant ces processus biologiques puissent être utilisées pour comprendre la fonction précise de certains canaux ioniques dans la physiologie.

Dans certains cas, le blocage d'un seul type de canal ionique permet l'arrêt total du fonctionnement de tout un système au sein d'un organisme. Par exemple, les personnes qui possèdent une mutation entraînant la perte de fonction du canal sodique voltage dépendant Nav1.7 sont incapables de percevoir la douleur (Cox, Reimann et al. 2006 , Goldberg, MacFarlane et al. 2007). La pharmacologie des canaux Nav a été largement étudiée grâce à de nombreuses

neurotoxines d'origines naturelles et notamment des peptides issus de venins (Aguilar, Luna-Ramirez et al. 2008, Kalia, Milesco et al. 2015). Des toxines de cônes (μ -conotoxines, μ -O-conotoxines (Dutertre and Lewis 2010, Green, Bulaj et al. 2014) etc...), de scorpions (CN-11 (Rowe, Xiao et al. 2013), OD1 (Maertens, Cuypers et al. 2006) ou encore d'araignées (hainantoxin IV4 (Liu, Li et al. 2012), famille des NaSpTx, protoxin-2 (Sokolov, Kraus et al. 2008) etc...) ont notamment contribué à prouver l'implication des canaux Nav1.7, Nav1.8 et Nav1.9 dans des voies de la douleur. Certaines d'entre elles se sont révélées avoir une forte affinité et une excellente sélectivité (Klint, Smith et al. 2015) mais néanmoins insuffisante pour pouvoir être utilisées comme outil thérapeutique. Récemment encore, le venin d'une autre araignée (*Heteroscodra maculata*) a été utilisé pour mettre en évidence l'implication des canaux Nav1.1 dans la douleur mécanique (Osteen, Herzig et al. 2016). Les venins d'animaux ont contribué à identifier et comprendre le rôle de bien d'autres canaux impliqués dans la douleur, comme par exemple les canaux calciques de type N (Cav2.2) présents dans le système nerveux et en particulier dans les neurones sensoriels. Dans les venins de certains cônes, ont été découvertes les premières toxines inhibant les courants calciques des Cav2.2 permettant ainsi leur étude fonctionnelle, puis la création du seul antidouleur commercialisé élaboré grâce à des molécules issues de venin. Il s'agit du Prialt® dont le principe actif est le ziconotide, un dérivé de l' ω -conotoxine M.VIIA de *conus magus* (Malmberg and Yaksh 1995, Pope and Deer 2013).

De manière intéressante, beaucoup de venins génèrent de fortes douleurs. Cette douleur, n'est que la résultante de divers mécanismes biologiques activés par les constituants du venin. Des composants présents dans certains venins et dont des analogues endogènes existent aussi chez d'autres espèces animales, telles que les phospholipases, les protéases et les porines (Fry, Roelants et al. 2009) peuvent directement endommager ces terminaisons nerveuses. Ces molécules déclenchent également la libération intracellulaire d'agents pro-algiques comme l'ATP à partir de cellules voisines subissant une lyse. Les kallibréines par exemple, issues du venin de cobra, perturbent la régulation de la pression artérielle en clivant le kininogène en deux molécules, la kallidine et la bradykinine. Il y a quelques années, elles ont joué un rôle central dans la découverte de voies de signalisation pro-algique, en montrant que la bradykinine était bien un médiateur clé de la douleur inflammatoire (Hawgood 1997). Mais certains venins peuvent s'avérer très douloureux sans pour autant dégrader les tissus. Les terminaisons nerveuses nociceptives expriment de nombreux récepteurs et canaux ioniques capable de signaler des changements de température, de pression, d'oxydation, de pH, mais également de détecter la présence de molécules de signalisation spécifique de l'inflammation. De nombreuses substances naturelles sont capables d'interagir directement avec ces canaux et de déclencher de la douleur (Basbaum, Bautista et al. 2009). La capsaïcine présente dans le piment et le menthol que l'on retrouve dans la menthe, ont par exemple été utilisés pour identifier les canaux ioniques

TRP qui détectent habituellement les changements de température (Caterina, Schumacher et al. 1997, McKemy, Neuhausser et al. 2002). Pour découvrir de nouvelles cibles pharmacologiques, certains laboratoires ont alors mis en place des stratégies de criblage de molécules se basant sur les symptômes observés lors des envenimations afin de découvrir des nouvelles cibles pharmacologique.

La morsure de certains animaux venimeux comme la mygale *Psalmopoeus cambridgei*, est connue pour provoquer une sensation de brûlure très intense et douloureuse lors des envenimations. Il a été émis l'hypothèse que des toxines présentes dans ce venin d'araignée pouvaient interagir avec les canaux TRP pour induire cette sensation de brûlure. Cela a été confirmé en 2006 par une équipe de chercheurs de l'université de Californie qui ont découvert dans ce venin, trois toxines homologues capables d'activer les canaux TRPV1 (Siemens et al, 2006). Elles ont été appelées vanillotoxines (VaTx1 à 3) car elles miment les effets de molécules appartenant au groupe des vanilloïdes, tout comme la capsaïcine par exemple.

De manière intéressante le venin de *Psalmopoeus cambridgei* avait déjà été criblé auparavant et une toxine inhibitrice, la psalmotoxine-1 (PcTx-1) (Escoubas, De Weille et al. 2000) présentait de puissants effets inhibiteurs sur les canaux ASIC, qui appartiennent à la super famille des canaux sodiques DEG/ENaC. PcTx-1 a notamment contribué à démontrer l'implication de ces canaux dans la douleur (Mazzuca, Heurteaux et al. 2007). La co-cristallisation de cette toxine avec le canal ASIC1, puis la co-cristallisation d'une toxine du serpent corail qui active certains canaux ASIC (Bohlen, Chesler et al. 2011, Bacongus, Bohlen et al. 2014) ont également contribué à décrire la structure de certains états de ces canaux que je détaillerai plus tard au chapitre « *structure des canaux ASIC* ».

L'utilisation de toxines comme outil pharmacologique est donc un point de départ important pour comprendre la fonction physiologique de certains canaux ioniques et apporter des réponses sur leur mode de fonctionnement. Durant ma thèse je me suis principalement intéressé aux toxines ou agents pharmacologiques ciblant les canaux ASIC afin de comprendre leur fonctionnement.

9. Les Canaux ASIC :

Ce fut au départ par une erreur d'expérimentation que pour la première fois, des canaux sensibles à des changements d'acidité ont été découverts (Krishtal and Pidoplichko 1981). Les premières observations avaient été faites sur des neuroblastomes, mais peu de temps après, des observations similaires ont été réalisées sur des neurones sensoriels isolés de ganglions rachidiens (Krishtal and Pidoplichko 1980), aboutissant à l'hypothèse que ces canaux sensibles à l'acidification, pouvaient jouer un rôle de senseurs. A l'époque, de nombreuses études montraient déjà que des perturbations du fonctionnement normal d'un tissu pouvaient entraîner des acidoses locales et conduire à un message douloureux. Cette hypothèse a été renforcée par le fait que l'application prolongée d'une solution à un pH acide entraînait des courants lents et soutenus (Krishtal and Pidoplichko 1981). Le premier membre de la famille ASIC a été identifié en 1997 (Waldmann, Champigny et al. 1995). Actuellement, six sous-unités encodées par quatre gènes ont été identifiées et sont principalement exprimées dans le système nerveux. Quatre d'entre elles nommées ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC3 peuvent s'associer en homotrimères ou en hétérotrimères pour former un canal fonctionnel. Une cinquième, ASIC2b, ne forme pas de canal fonctionnel seule mais est capable de moduler les propriétés et la régulation des canaux dans lesquels elle est présente (Lingueglia, de Weille et al. 1997). L'absence d'expression fonctionnelle d'ASIC4, chez les mammifères, n'a pour l'instant pas permis l'étude du rôle physiologique de cette sixième sous-unité.

9.1 Fonctions biologiques des canaux ASIC :

9.1.1 Les canaux ASIC dans le système nerveux central:

Au sein du système nerveux central, on retrouve essentiellement les sous-unités ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b (Price, Gong et al. 2014). Chacune de ces sous-unités a des propriétés pharmacologiques différentes mais des études ont montré qu'elles sont colocalisées dans les cellules et s'associent en hétérotrimères avec une stœchiométrie qui dépend de leur niveau d'expression (Alvarez de la Rosa, Zhang et al. 2002, Sherwood, Lee et al. 2011, Bartoi, Augustinowski et al. 2014). Ces canaux étant présents au niveau synaptique (Du, Reznikov et al. 2014), l'hypothèse a été rapidement émise que les protons pouvaient avoir un rôle de neurotransmetteurs par l'intermédiaire de ces canaux. Cela a été confirmé en 2014 lors de travaux sur la plasticité synaptique (Du, Reznikov et al. 2014, Kreple, Lu et al. 2014). Une étude a montré que rendre non fonctionnel les canaux ASIC1a chez les modèles murins, augmente la

densité des épines dendritiques du noyau *acumbens* et altère la fonction du récepteur au glutamate, ce qui a pour effet de modifier la plasticité cérébrale lors de la prise de drogues (Kreple, Lu et al. 2014).

Les niveaux d'expression des canaux ASIC1a et ASIC2 sont très élevés au niveau des structures spécialisées dans la peur telles que l'amygdale ou le noyau de la strie terminale (Coryell, Ziemann et al. 2007). De plus, les souris « ASIC1-Knock-Out (KO) » présentent une altération du comportement vis-à-vis de leur conditionnement à la peur (Malmberg and Yaksh 1995) et la restauration de l'expression des canaux ASIC1a dans l'amygdale de ces souris KO rétablit le comportement acquis motivé par la peur (Coryell, Wunsch et al. 2008). Bien que les canaux ASIC1a soient également présents au niveau de l'hippocampe, qui est une structure importante impliquée dans la mémorisation ou l'apprentissage, ces canaux ne semblent pas agir sur ces processus. (Wu, Huang et al. 2013). Des études ont également montré que l'inhibition de ces canaux pourrait réduire les décharges épileptiques au niveau de l'hippocampe (Xiong, Pignataro et al. 2008, Ievglevskiy, Isaev et al. 2016). Ces résultats sont controversés car d'autres études montrent que l'activation des canaux ASIC1a par acidose diminue les crises épileptiques (Ziemann, Schnizler et al. 2008). En revanche, ces canaux pourraient avoir un rôle dans la dépression. Les souris ASIC1a-KO ou les souris sauvages dont les canaux ASIC1a ont été inhibés par la toxine PcTx1, présentent des effets antidépresseurs (Coryell, Wunsch et al. 2009). La restauration de l'expression d'ASIC1a dans l'amygdale élimine le phénotype, ce qui suggère que l'amygdale joue un rôle clé dans ces effets antidépresseurs induits par la suppression ou l'inhibition d'ASIC1a (Coryell, Wunsch et al. 2009).

Enfin, lors de pathologies telles que les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou les traumatismes de la moelle, on observe souvent une diminution du pH suffisante pour activer les canaux ASIC. Chez les modèles murins, l'inhibition des canaux ASIC contribue à diminuer la sévérité des lésions suites aux AVC ou aux traumatismes de la moelle (Hu, Duan et al. 2011, Yin, Lindley et al. 2013).

9.1.2 Les canaux ASIC dans la douleur inflammatoire et la nociception :

Les canaux ASIC sont également largement exprimés dans toutes les voies de la douleur aussi bien au niveau central que périphérique. Chez les rongeurs, une augmentation de l'expression d'ASIC3 est observée dans les ganglions rachidiens dorsaux lors d'une inflammation. Cette expression est limitée par l'utilisation d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (Voilley, de Weille et al. 2001, Mamet, Baron et al. 2002). De nombreux acteurs de l'inflammation tels que la

bradykinine ou encore la sérotonine agissent de manière indirecte sur les canaux ASIC au travers de voies de signalisations intracellulaires (Deval, Salinas et al. 2004, Qiu, Qiu et al. 2012). Des stimuli inflammatoires tels que l'ATP (Birdsong, Fierro et al. 2010), l'acide lactique (Immke and McCleskey 2001) ou l'acide arachidonique (Smith, Cadiou et al. 2007) sont capables d'augmenter la sensibilité aux protons des canaux ASIC et renforcent l'idée qu'ils se comportent comme des senseurs de l'inflammation. Lors de migraines, les canaux ASIC pourraient également jouer un rôle de senseurs de l'acidité au niveau de la dure-mère (Yan, Edelmayer et al. 2011). Au niveau des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, on observe la présence de courants caractéristiques des sous-unités ASIC1a homomériques et ASIC1a/2b hétéromériques (Baron, Voilley et al. 2008). Ces sous-unités seraient capables de moduler l'excitabilité neuronale à des gammes de pH différentes en réponse à des stimuli douloureux provenant de neurones sensoriels périphériques (Baron, Voilley et al. 2008). Chez l'homme, une étude menée chez des volontaires a montré que l'amiloride, qui est l'inhibiteur le plus connu des canaux ASIC mais peu spécifique, bloque la douleur provoquée par l'injection (Ugawa, Ueda et al. 2002) ou l'infusion (Jones, Slater et al. 2004) d'un produit acide sur et dans la peau. En outre, la morsure du serpent *Micrurus tener* provoque d'intenses douleurs chez l'homme (Morgan, Borys et al. 2007). Une toxine isolée de ce serpent nommée MitTx active majoritairement les canaux ASIC1 et suggère l'implication des canaux ASIC1a dans la nociception au niveau périphérique chez l'homme (Bohlen, Chesler et al. 2011). De manière étonnante, les canaux ASIC présents au niveau du tractus digestif se situent essentiellement dans des neurones sensoriels, en revanche peu d'informations sont disponibles sur leur expression dans les cellules épithéliales gastriques ou œsophagiennes (Akiba, Mizumori et al. 2008, Yuan, Bo et al. 2012). Il y a donc peu de chance qu'ils soient liés au processus de digestion. Néanmoins, les sous-unités ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b et ASIC3 pourraient être impliquées dans la perception de l'acidité au niveau des papilles gustatives chez l'homme (Huque, Cowart et al. 2009). Au niveau des fibres sensorielles du tractus, les canaux ASIC semblent avoir un rôle de senseur de l'excédent d'acide dans la lumière de l'œsophage ou lors de lésions du tractus digestif (Akiba, Mizumori et al. 2008).

9.1.3 Les canaux ASIC et la mécanosensibilité :

La contribution des canaux ASIC à la mécanosensibilité est maintenant assez bien établie mais reste encore mal comprise (Omerbasic, Schuhmacher et al. 2015). Ils participent à la régulation des mécanorécepteurs et à celle des nocicepteurs impliqués dans la détection des stimuli mécaniques chez l'animal (Price, McIlwrath et al. 2001, Moshourab, Wetzal et al. 2013). La délétion d'un ou plusieurs gènes codant ces canaux entraîne des conséquences directes sur la

fonction des neurones sensoriels. En effet, chez le rongeur, la délétion des gènes codants les canaux ASIC1a, ASIC2 ou ASIC3 augmente la sensibilité aux stimuli mécaniques au niveau du côlon et de l'œsophage (Page, Brierley et al. 2005). De plus, les canaux ASIC appartiennent à la même famille que les canaux mécanosensibles exprimés dans les mécanosenseurs des nématodes (Chen and Wong 2013). On retrouve également certaines isoformes des canaux ASIC exprimées dans les cellules de Merkel ou les corpuscules de Ruffini qui sont des terminaisons nerveuses spécialisées de la peau participant à la mécanosensibilité. Certains articles montrent aussi que ces canaux peuvent intervenir dans l'hypersensibilité des parois de l'intestin lors de distension et pourraient donc avoir une fonction de mécanosenseurs dans le système digestif (Jones, Otsuka et al. 2007).

9.1.4 Les canaux ASIC dans l'homéostasie cardiovasculaire:

Les canaux de type ASIC2b et ASIC3 sont fortement exprimés dans les ganglions inférieurs du nerf vague. L'isoforme ASIC2b n'est pas fonctionnelle par elle-même, cependant son altération chez la souris rend insensible les cellules des ganglions inférieurs du nerf vague aux stimuli mécaniques (Lu, Ma et al. 2009). Des études chez le rongeur ont confirmé que les canaux ASIC2 sont essentiels aux barorécepteurs et à la régulation de la pression sanguine. La baisse d'expression de ces canaux dans les barorécepteurs a des répercussions sur le système sanguin telles que l'hypertension, la tachycardie ou encore l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (Lu, Ma et al. 2009). Au sein des artères, les cellules du glomus possèdent des chémorécepteurs capables de détecter des changements dans les gaz du sang (hypoxie, hypercapnie) mais aussi du changement de pH. Ces chémorécepteurs dépolarisent les cellules et permettent l'activation synaptique des nerfs proches et une hyperventilation. Des études montrent que les canaux ASIC agissent comme senseurs de protons dans les cellules du glomus et seraient impliqués lors d'acidoses métaboliques (Rausch, Whipp et al. 1991, Kobayashi, Sakakibara et al. 1996, Prabhakar and Peng 2004). De plus, la réduction de l'expression des isoformes ASIC3 chez la souris réduit la sensibilité aux pH des cellules du glomus lors d'une hypoxie (Lu, Whiteis et al. 2013). Les chémorécepteurs et barorécepteurs agissent communément pour réguler la fonction cardiovasculaire, par conséquent la modification de l'expression des isoformes ASIC2 ou ASIC3 pourrait avoir des répercussions sur l'ensemble du système.

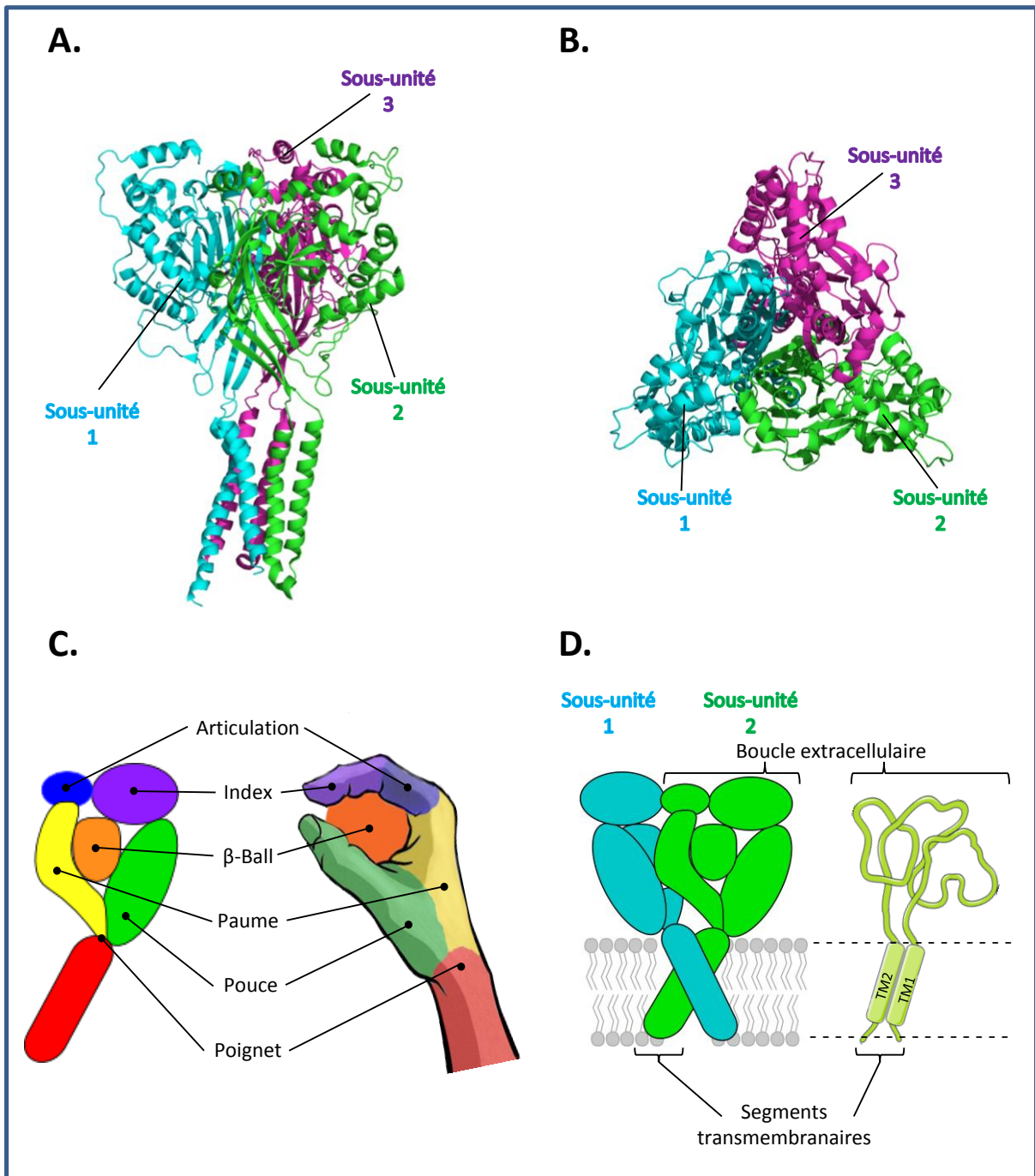


Figure 1 : Structure des canaux ASIC

- A.** Structure trimérique en 3D du canal ASIC1 de poulet vue de face et coloré par sous-unité.
- B.** Structure trimérique en 3D du canal ASIC1 de poulet vue de dessus et coloré par sous-unité.
- C.** Représentation schématique des différents sous-domaines d'une sous-unité par analogie avec la forme d'une main.
- D.** Schématisation d'un canal ASIC avec seulement deux sous-unités et représentation d'une sous-unité simplifiée permettant de visualiser la boucle extracellulaire et les segments transmembranaires.

9.2 Structure des canaux ASIC:

9.2.1 Organisation structurale du canal :

Les différentes structures cristallographiques du canal ASIC1 de poulet (cASIC1) montrent que trois sous unités sont nécessaires pour former un canal fonctionnel (Jasti, Furukawa et al. 2007, Gonzales, Kawate et al. 2009, Bacongus and Gouaux 2012, Dawson, Benz et al. 2012, Bacongus, Bohlen et al. 2014). La modélisation du canal cASIC1 est observable figure 1 A et B. Chacune de ces sous-unités, dont la taille varie entre 500 et 560 acides aminés, est composée de deux segments transmembranaires encadrant une large boucle extracellulaire d'environ 350 acides aminés (figure 1.D). Les extrémités amino- et carboxy-terminales sont situées du côté intracellulaire (Canessa, Merillat et al. 1994). C'est principalement la boucle extracellulaire qui régule et contrôle l'activité de ces canaux mais les segments transmembranaires participent également à ce mécanisme pour former un pore sélectif aux ions sodium essentiellement. Les domaines situés du côté cytosolique influencent également indirectement le mécanisme d'ouverture de ces canaux (Salinas, Lazdunski et al. 2009). Pour nommer les différents sous-domaines formant chaque sous-unité une analogie avec la forme d'une main serrant une balle a été faite (figure 1C). Les différentes structures qui composent la boucle extracellulaire ont ainsi été nommées: le pouce, l'index, l'articulation de l'index, la β -balle et la paume (Jasti, Furukawa et al. 2007). Les segments transmembranaires sont connectés aux domaines paume et pouce de la boucle extracellulaire via une région flexible appelée le poignet. L'articulation du doigt et la β -balle sont situées proche de la paume formant l'axe central du canal. L'index est situé dans la partie la plus externe de la boucle et le pouce, rigidifié par plusieurs ponts disulfures, est connecté à la paume dans sa partie basse par un élément structural nommé le β -turn. L'ensemble de la structure contient quatre cavités alignées le long de l'axe central du canal : le vestibule supérieur, le vestibule central (qui est fermé par la partie basse du domaine Paume), le vestibule extracellulaire situé au-dessus de l'entrée du pore et enfin le vestibule intracellulaire (Figure 2). La surface des vestibules central et extracellulaire est chargée négativement pour pouvoir capter les cations (Jasti, Furukawa et al. 2007, Gonzales, Kawate et al. 2009). La cristallisation du canal ASIC1 de poulet (cASIC1) a permis de révéler la structure de l'état inactivé (Jasti, Furukawa et al. 2007) et sa co-cristallisation avec différentes toxines a révélé sa structure à l'état ouvert (Gonzales, Kawate et al. 2009, Goehring, Lee et al. 2014) et seule la détermination de la structure à l'état fermé est manquante. Le canal cASIC1 présente 90% d'identité avec les séquences ASIC1a humain ou de rat, il est donc probable que la plupart de ces éléments structuraux soient conservés chez les mammifères ce qui nous permet donc de nous baser sur ces structures pour comprendre les mécanismes d'activation et d'inactivation des canaux de rongeurs ou humains.

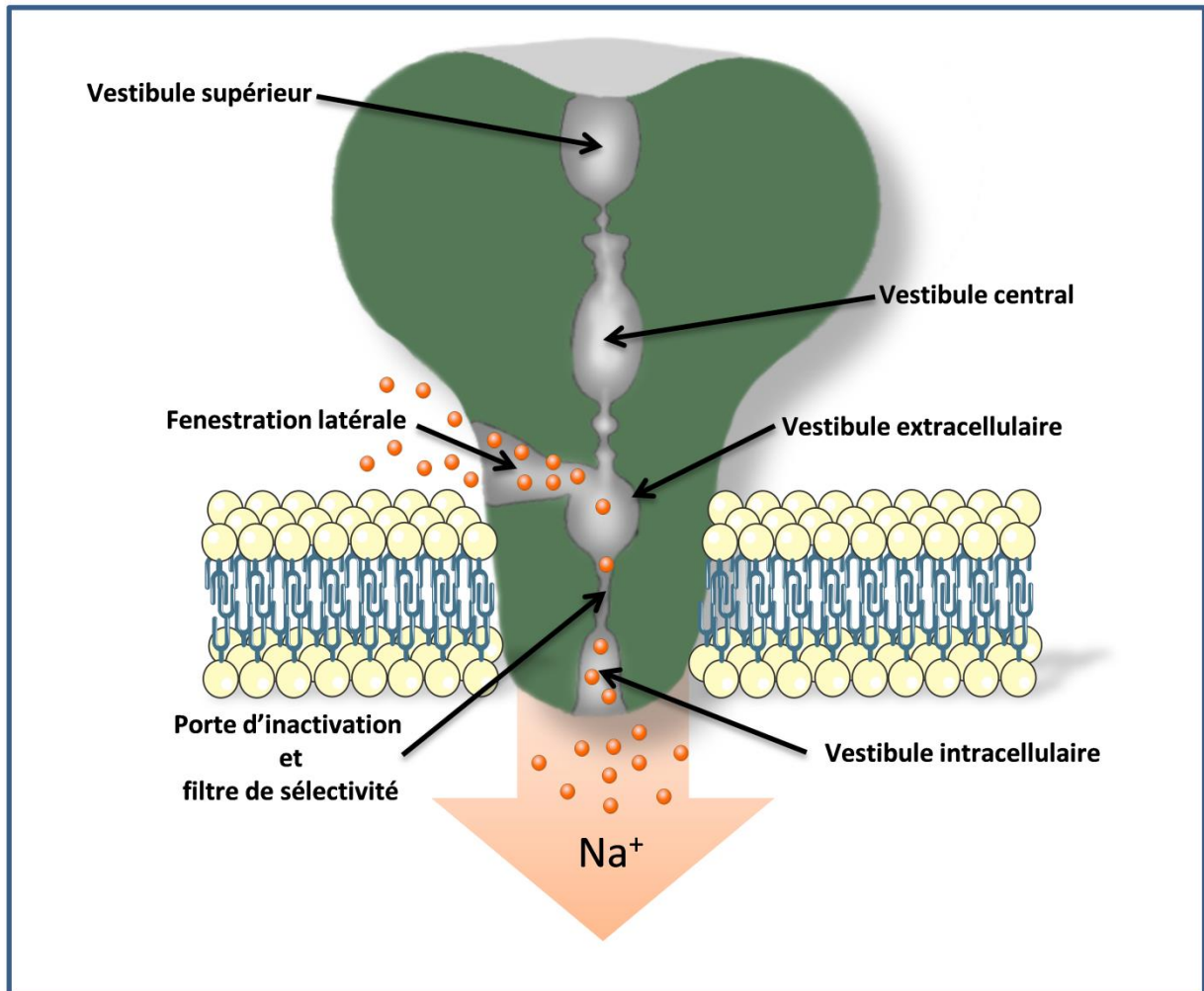


Figure 2 : Représentation schématique d'un canal ASIC en coupe.

Les différents vestibules le long de l'axe central de symétrie sont mentionnés. Une seule des trois fenestrations latérales est visible sur cette coupe. D'après Gonzales et al (Gonzales, Kawate et al. 2009).

9.2.2 Les différents états des canaux ASIC:

Dans deux des structures cristallisées à pH acide (Jasti, Furukawa et al. 2007, Gonzales, Kawate et al. 2009) l'écartement des domaines transmembranaires ne permet pas le passage des ions. Il a été conclu que ces structures étaient probablement le reflet de l'état inactivé du canal cASIC1. Pour parvenir à déterminer la structure de l'état ouvert, il a été nécessaire de co-cristalliser le canal cASIC1 avec les toxines, PcTx1, issue du venin de la mygale *Psalmopoeus cambridgei* (Baconguis and Gouaux 2012) ou MitTx, du venin de *Micrurus tener* (Baconguis, Bohlen et al. 2014). Ces toxines sont capables de stabiliser différents états ouverts du canal et ainsi de révéler leurs structures aux rayons X. Dans la forme ouverte du canal, le vestibule extracellulaire est plus large comparé à l'état fermé (Baconguis and Gouaux 2012, Grunder and Augustinowski 2012, Baconguis, Bohlen et al. 2014) en raison d'une rotation du poignet et du bas du domaine paume qui a pour effet de créer un élargissement du vestibule extracellulaire par lequel les ions accèdent au pore. La co-cristallisation en présence de la toxine MitTx a montré que le segment transmembranaire TM2 est divisé en deux parties au niveau de la séquence du filtre de sélectivité (Gly-Ala-Ser) permettant un alignement de ce demi-TM2 avec celui de la sous-unité voisine. Rétrospectivement, les auteurs se sont aperçus que cette particularité était également présente sur l'une des structures cristallisées sans toxine (Gonzales, Kawate et al. 2009), mais ne semble pas présente dans la structure ouverte obtenue avec la toxine PcTx1. La structure déterminée en présence de la MitTx a une meilleure résolution et montre également une meilleure symétrie, elle semble donc être la plus plausible. Seule la structure de l'état fermé n'a pas encore été élucidée.

9.2.3 Pore des canaux ASIC :

Bien que les canaux ASIC soient perméables majoritairement aux ions sodium, certaines isoformes permettent également le passage d'autres cations (K^+ et parfois Ca^{2+}). Les canaux ASIC1a homomériques ou ASIC1a/2b hétéromériques présentent une grande perméabilité aux ions calcium (Kellenberger and Schild 2002). Il est intéressant de constater qu'ASIC1a est perméable aux protons mais leur implication sur les courants générés est négligeable au regard de la concentration d'ions sodium (Chen and Grunder 2007). Contrairement aux canaux sodiques épithéliaux ENaC qui filtrent les ions déshydratés, les canaux ASIC semblent avoir une faible sélectivité due à un port plus large. Il a été récemment montré que des cations plus larges tels que l'ion NH_4^+ ou des composés tels que le guanidinium peuvent passer au travers du pore des canaux ASIC1a (Yang and Palmer 2014).

En absence de sodium, la perméabilité au potassium est supérieure, en revanche, en condition normale le sodium est favorisé par sa fixation sur un site de liaison ce qui n'est pas le cas pour les autres cations (Yang and Palmer 2014). La mutation d'un aspartate, le plus proche de la partie extracellulaire du second segment transmembranaire (TM2), réduit de manière drastique l'affinité aux ions Na^+ et il a été proposé que le vestibule extracellulaire contribue à la discrimination ionique en accumulant les ions Na^+ . En plus de la structure générale du canal, la co-cristallisation de cASIC1 avec la MitTx a révélé que le TM2 est coudé perpendiculairement par trois acides aminés (GAS). Ce motif de trois acides aminés répété trois fois dans un canal fonctionnel, forme une ceinture triangulaire entourant le pore. La cristallographie faite en présence d'ions césium (Cs^+) a montré un alignement de cet ion avec l'oxygène de la liaison peptidique de la glycine 443 (Kellenberger, Gautschi et al. 1999). De plus, la distance entre ces atomes d'oxygène et le centre du pore est de 3.6 Å ce qui correspond à peu près à la taille d'un ion sodium mono-hydraté (3.8 Å) permettant de conclure que le mécanisme de sélectivité se fait principalement par la taille (Bacongus and Gouaux 2012) et non pas par un mécanisme de déshydratation des ions.

9.2.4 Les senseurs de protons des canaux ASIC :

Les boucles extracellulaires du canal trimérique forment des poches acides à leurs interfaces. Une poche acide est formée par des contacts intra-sous-unitaires entre le pouce, l'index et la β -balle, ainsi qu'avec la paume de la sous-unité adjacente (figure 3). Dans cette poche, chargée très négativement, trois paires d'acides aminés de nature acide, interagissant par une liaison de type carboxyl-carboxylate, ont été identifiées. La mutation de ces résidus entraîne un décalage important de la courbe d'activation pH-dépendante. Il a donc été proposé que cette « poche acide » puisse former le senseur de protons capable de contrôler l'ouverture des canaux ASIC (Jasti, Furukawa et al. 2007, Li, Yang et al. 2009, Sherwood, Franke et al. 2009). Dans une modélisation de la forme fermée du canal, les paires d'acides aminés semblent plus distantes les unes des autres que dans les états ouverts et inactivés déterminés par cristallographie. La protonation de la poche pourrait rapprocher l'index et la β -balle, et entraîner un déplacement du pouce qui est connecté au TM1 via le « poignet ». Cela a pour effet d'induire l'activation du canal mais aussi son inactivation (Yang, Yu et al. 2009). La fixation de protons au niveau de la poche acide n'explique pas à elle seule les mécanismes d'ouverture et de fermeture du pore. Les ions calcium semblent affecter l'affinité des protons pour les canaux ASIC et stabiliser l'état fermé en faisant compétition aux protons dans la poche acide. Dans ASIC3, il a également été supposé que le Ca^{2+} pouvait bloquer le pore du canal sans changement de conformation apparent.

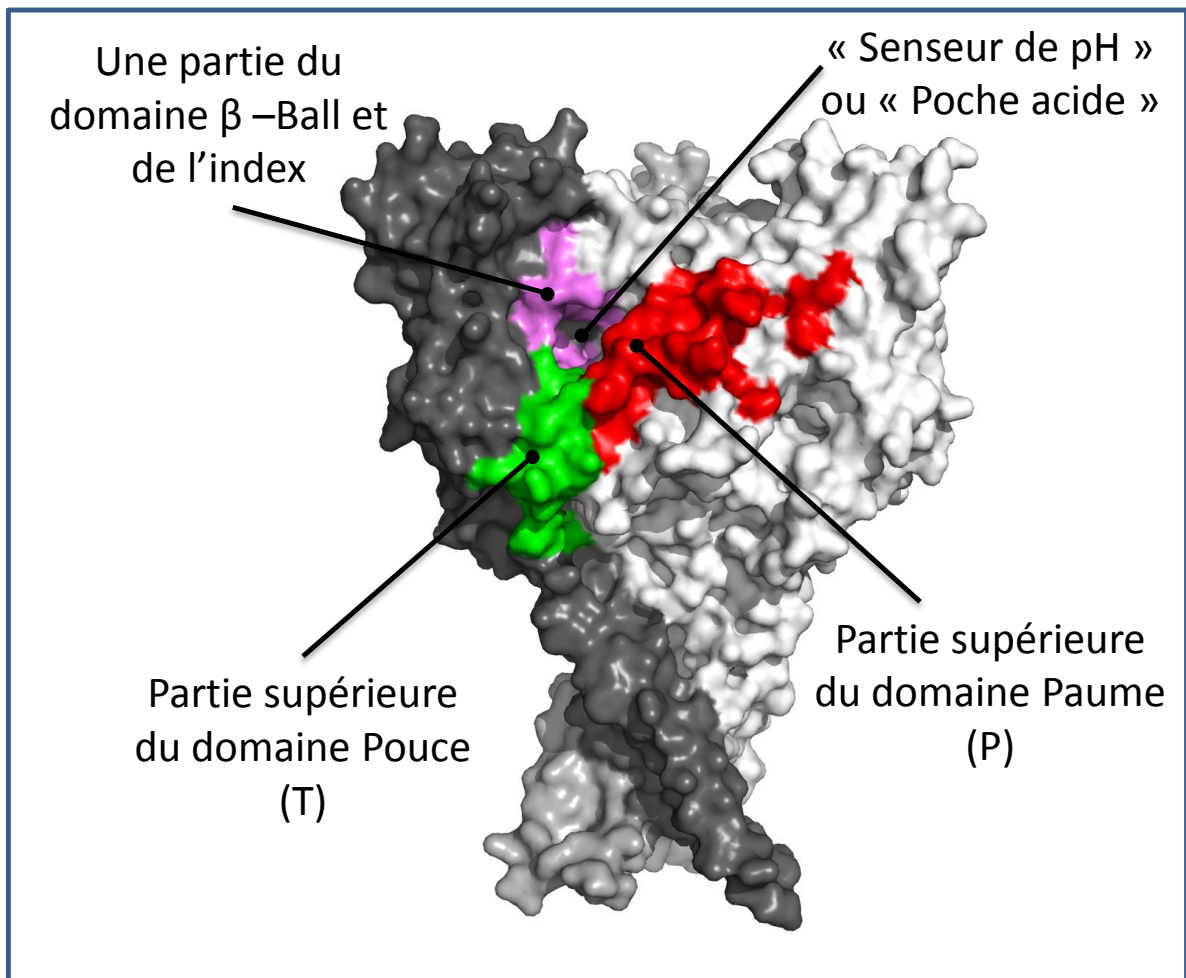


Figure 3: Senseur de pH des canaux ASIC

Modèle en trois dimensions du canal ASIC1a de rat. Le « senseur de pH » est une poche d'acides aminés aux propriétés acides, située à l'interface de deux sous-unités. Cette cavité est bordée, entre autre, par les domaines Pouce, Paume et β -Ball. Les domaines P, T et b utilisés dans nos études de structures sont respectivement indiqués en rouge, vert et rose. Un seul des trois senseurs de pH est visible sur cette représentation.

Cependant, les mutations des résidus D432 et E425 fixant le Ca^{2+} au niveau du vestibule extracellulaire permettent d'empêcher le blocage du pore mais ne favorisent pas une ouverture constitutive du canal, réfutant ainsi ce modèle. D'autres études sur la titration potentielle d'autres sites de fixation des protons ont mis en évidence que les Histidines 72 et 73 participent également aux changements de conformation (Immke and McCleskey 2003). Ces histidines sont très conservées au cours de l'évolution et pourraient être impliquées préférentiellement dans l'inactivation du canal.

9.3 Propriétés pharmacologiques:

Comme nous l'avons vu précédemment, ces canaux sont impliqués dans de nombreux processus biologiques. Connaître les propriétés pharmacologiques d'un canal ionique permet d'étudier par la suite son implication au sein des différents processus biologiques et l'utilisation d'outils sélectifs modulant l'activité des canaux ASIC tels que des peptides issus de venin d'animaux a permis notamment de leur attribuer un rôle dans la nociception chez le rongeur.

9.3.1 Dépendance au pH :

A partir des courbes d'activation et d'inactivation établies avec des variations de pH, il est possible d'évaluer un pH de demi-activation ($\text{pH}_{0.5}$ activation) et de demi-inactivation ($\text{pH}_{0.5}$ inactivation) propre à chaque canal ASIC. Ces valeurs pour les canaux homomériques sont reportées dans le tableau ci-dessous.

Isoformes	$\text{pH}_{0.5}$ activation	$\text{pH}_{0.5}$ inactivation
ASIC 1a	6,2 – 6,6	~ 7,2
ASIC 1b	5,9 – 6,3	~ 6,7
ASIC 2a	4,0 – 4,9	~ 5,6
ASIC 3	6,4 – 6,7	~ 7,1

Si ces canaux sont exposés à des concentrations modérées de protons, ils peuvent passer directement de l'état fermé à inactivé sans même avoir été ouverts (Waldmann, Champigny et al. 1997). Ce mécanisme est comparable à celui observé pour les canaux sodiques voltage-dépendants. De la même manière, le chevauchement des courbes d'activation et d'inactivation d'ASIC3 est à l'origine d'un courant soutenu à pH 7,0, dit « de fenêtre ». En effet à ce pH le canal commence à s'activer mais n'est pas encore complètement inactivé d'où l'apparition d'un courant continu (Yagi, Wenk et al. 2006).

Le pH du milieu intracellulaire (pHi) peut également moduler l'activité de ces canaux. Il a été montré que l'amplitude des courants ASIC peut être augmentée par une alcalinisation intracellulaire qui favorise l'ouverture de ces canaux en décalant leur courbe d'activation vers des pH plus alcalins et leur courbe d'inactivation vers des pH plus acides (Wang, Chu et al. 2006).

9.3.2 Les modulateurs des canaux ASIC :

La découverte de molécules régulatrices est une étape importante dans la caractérisation *in vivo* et *in vitro* de canaux ioniques. On connaît peu de molécules endogènes qui ciblent les canaux ASIC, en revanche depuis leur découverte de nombreux régulateurs issus de la chimie ou de substances naturelles, ont permis de mieux comprendre la fonction et la structure de ces canaux.

Les ions:

En plus des protons, qui restent les principaux activateurs endogènes connus de ces canaux, différents cations régulent leur activité. Les ions métalliques sont les composés les plus simples bloquant l'activité des canaux ASIC. Le zinc (Sluka, Winter et al. 2009), le cuivre (Gao, Wu et al. 2004), le plomb (Wang, Yu et al. 2007), le nickel (Wang, Duan et al. 2006) et le cadmium (Wang, Duan et al. 2006) sont notamment connus dans la littérature pour inhiber les canaux ASIC1a.

Le zinc affecte l'ouverture des canaux homomériques ASIC1a et hétéromériques ASIC1a/2a à des concentrations de l'ordre du nanomolaire sans modifier les courants générés par les autres sous-unités. Le comportement des hétéromères est néanmoins différent car il présente des effets variables en fonction de la dose de zinc. A faible concentration, le zinc inhibe les courants ASIC en se fixant sur un site à forte affinité présent sur les sous-unités ASIC1a (la lysine 133 du domaine extracellulaire) alors que de fortes concentrations (supérieure à 100 μ M) potentialisent ASIC2a par le biais de deux histidines (H162 et H339).

Le plomb bloque réversiblement toutes les isoformes contenant ASIC1a avec un $IC_{50} \approx 5\mu M$. Ces concentrations de plomb *in vivo* entraînent une importante neurotoxicité.

Le calcium est un important modulateur de l'activité des canaux ASIC. Différentes études montrent que les ASIC sont régulés par le Ca^{2+} extracellulaire avec un double effet d'inhibition et de stimulation (de Weille and Bassilana 2001, Baron, Diochot et al. 2013) impliquant deux sites de liaisons différents avec des affinités différentes (Paukert, Babini et al. 2004). Les ions Na^+ peuvent accéder au pore au travers de trois fenêtres situées à la base du domaine extracellulaire près de la jonction avec les domaines transmembranaires. Au cours de l'acidification, le déplacement par les protons des ions Ca^{2+} liés au canal à l'état fermé, semble également être un élément important du mécanisme d'ouverture des canaux ASIC (Babini, Paukert et al. 2002, Immke and McCleskey 2003, Paukert, Babini et al. 2004, Zhang, Sigworth et al. 2006, Jasti, Furukawa et al. 2007, Sherwood, Franke et al. 2009).

Enfin, le cuivre inhibe les courants ASIC de neurones en culture avec un $IC_{50} \approx 50 \mu M$, le nickel ou le cadmium avec un $IC_{50} \approx 1mM$. Le nickel à ces concentrations, inhibe les sous-unités ASIC1a homomériques et ASIC1a/2a hétéromériques alors que le cadmium n'affecte que les hétéromères.

Toxines animales:

Ce sont les plus spécifiques des outils moléculaires permettant l'étude des canaux ioniques. Pour les canaux ASIC, elles ont été découvertes dans des organismes tels que des serpents, des mygales ou encore des anémones de mer. La polyvalence de ces organismes laisse penser que d'autres toxines spécifiques pourraient être découvertes par des techniques de «criblage» et nous permettraient d'apporter des réponses sur le mode de fonctionnement de ces canaux et le rôle de leurs différentes isoformes dans les différents processus physiologiques ou physiopathologiques

- *Psalmotoxine 1 :*

La psalmotoxine 1 (PcTx1) est un polypeptide de 40 acides aminés purifié au laboratoire à partir du venin de mygale *Psalmopoeus cambridgei* (Escoubas, De Weille et al. 2000). Chez le rat, PcTx1 bloque les isoformes ASIC1a homomériques ($IC_{50} \approx 0,9 nM$), ASIC1a/2b et dans certaines conditions ASIC1a/2a (Joeres, Augustinowski et al. 2015). En revanche, elle peut agir en tant qu'activateur sur les isoformes ASIC1b de rat et ASIC1 de poulet (Escoubas, De Weille et al. 2000, Bacongus and Gouaux 2012). PcTx1 inhibe les canaux ASIC1a en stabilisant leur état inactivé mais est capable dans le même temps de potentialiser légèrement leur activation. Sur ASIC1b, cette toxine stabilise en revanche uniquement son état ouvert. PcTx1 se fixe au niveau

de la poche acide des canaux ASIC1a, au niveau du domaine pouce et favorise l'inactivation via le domaine β -balle de la même sous-unité ainsi que le domaine paume de la sous-unité adjacente (voir le chapitre 9.3 structure des canaux ASIC) (Salinas, Rash et al. 2006). Lorsque l'un des domaines (paume ou β -balle) est non reconnu par cette toxine comme c'est le cas sur le canal ASIC1b, cette toxine n'est plus capable de favoriser l'inactivation ce qui permet de révéler un effet potentialisateur qui passe par le domaine pouce et mime en quelque sorte l'effet des protons.

- *La MitTx:*

Cette toxine purifiée à partir du venin du serpent corail *Micrurus tener* est un activateur puissant des canaux ASIC1a. Cet effet activateur passe par une fixation de la toxine sur le domaine pouce. La MitTx se présente sous la forme de deux sous-unités différentes de nature protéique, nommées MitTx- α et MitTx- β , associées de façon non covalente. La MitTx- α appartient au groupe structural de type kunitz alors que la MitTx- β est de type phospholipase A2 (PLA2). De manière intéressante, l'action de cette molécule sur les canaux ASIC a été mise en évidence par le fait que la morsure de ce serpent provoque d'intenses douleurs chez l'homme (Bohlen, Chesler et al. 2011). En plus de ces effets activateurs sur les canaux ASIC1, elle potentialise fortement l'activation par les protons des canaux ASIC2a à pH 5,0.

- *Les mambalgines:*

Les mambalgines sont des toxines présentes dans le venin des serpents du genre *Dendroaspis* (Mambas). Les mambalgines-1 et -2 ont été découvertes dans le venin de *Dendroaspis polylepsis* alors que la mambalgine 3 (Baron, Diochot et al. 2013) a été découverte dans le venin de *Dendroaspis angusticeps*. Ce sont toutes des isotoxines de 57 acides aminés ayant une structure à trois doigts, qui inhibent spécifiquement les homomères ASIC1a, ASIC1b ou les hétéromères ASIC1a/2. Lorsqu'elles sont administrées par voie centrale (i.t. ou i.c.v.) à des rongeurs (Diochot, Baron et al. 2012) ou par voie intraveineuse (Diochot, Alloui et al. 2016), elles provoquent une analgésie similaire à celle observée avec de la morphine mais majoritairement résistante à l'effet de la naloxone (antagoniste des récepteurs aux opiacés) suggérant que ces effets ne passent pas par la voie des opiacées. La mambalgine cible *in vivo* les canaux de type ASIC1a, ASIC1a/2 dans le système nerveux central et les canaux de type ASIC1b dans le système nerveux périphérique. Sur les canaux ASIC, cette toxine agit comme un modulateur de l'ouverture du canal et non pas comme un pore bloqueur (Diochot, Baron et al. 2012).

- *APETx2:*

Cette toxine peptidique de 42 acides aminés est issue du venin d'anémone de mer *Anthopleura elegantissima* (Diochot, Baron et al. 2004). Elle cible les canaux de type ASIC3 (IC50 \approx 63nM) mais aussi les canaux Nav1.8 (IC50 \approx 55 nM – 2 μ M) (Peigneur, Béress et al. 2012) (Blanchard, Rash et al. 2012) et hERG (IC50 \approx 1.2 μ M) (Jensen, Cristofori-Armstrong et al. 2014) à des concentrations plus élevées. Bien que le mécanisme par lequel APETx2 inhibe le canal ASIC3 ne soit pas encore connu, de nombreux articles montrent qu'elle a de puissants effets analgésiques lorsqu'elle est administrée par voie périphérique (Deval, Noel et al. 2008, Karczewski, Spencer et al. 2010).

- *Peptides issus de l'anémone Urticina grebelnyi :*

Parmi les peptides découverts dans cette anémone, seul Ugr 9-1 a des effets sur les canaux ASIC3. Bien qu'ils proviennent d'organismes similaires, Ugr 9-1 ne présente pas d'homologie de séquence avec la toxine APETx2 (Osmakov, Kozlov et al. 2013). Ce peptide a une séquence de 29 acides aminés et bloque le courant transitoire ainsi que le courant soutenu des homomères ASIC3 dans l'ovocyte de xénope (IC50 transitoire \approx 10 μ M, soutenu \approx 1 μ M). Le mécanisme d'action de ce peptide est encore peu décrit par contre il présente des effets analgésiques sur un modèle de douleur (Osmakov, Kozlov et al. 2013).

Autres substances naturelles :

La plupart des médicaments que nous connaissons sont issus des plantes. Il n'est donc pas surprenant de retrouver des substances végétales qui affectent le fonctionnement des canaux ASIC. De plus en plus de composés issus de la médecine traditionnelle sont étudiés pour leurs activités sur ces canaux. Le servanol, isolé à partir du thym (*Thymus armeniacus*) est capable d'inhiber les courants soutenus et transitoires des canaux ASIC3 humains (IC50 \approx 300 μ M) ainsi que les courants ASIC1a (Dubinnyi, Osmakov et al. 2012). L'acide chlorogénique, un des plus abondants polyphénols présents dans l'alimentation et produit par certaines plantes (café, pomme de terre), inhibe les courants ASIC natifs des neurones sensoriels de rats (IC50 \approx 0.2 μ M) ce qui a pour effet de rendre ces cellules moins sensibles aux variations de pH (Qu, Liu et al. 2014). La gastrodine, issue d'une orchidée (*Gastrodia elata*), qui est connue pour ses propriétés analgésiques, est également capable d'inhiber les courants ASIC natifs des neurones sensoriels de rats (IC50 \approx 0.2 μ M) (Qiu, Liu et al. 2014). La médecine traditionnelle chinoise utilise de nombreuses substances naturelles, et parmi celles-ci, la paeoniflorine issue des racines de *Paeonia lactiflora* qui possède de nombreuses propriétés (sédatif, anticonvulsif, analgésique

anti-inflammatoire etc...]). Il a été montré que cette molécule est capable d'inhiber les canaux ASIC1a natifs de certaines cellules tumorales (Sun, Cao et al. 2011). Quelques flavonoïdes sont également connus pour inhiber les courants ASIC. La puerarine, constituant principal des racines de kudzu (*Pueraria Montana*) inhibe le courant natif ASIC1a présent dans les neurones de l'hippocampe.

Petites molécules :

Certaines petites molécules n'ont pas été découvertes à l'origine pour leur action spécifique sur les canaux ASIC mais présentent néanmoins des effets intéressants.

- *Amiloride:*

L'amiloride est une substance utilisée comme médicament chez l'homme avec des effets diurétiques, natriurétiques et antihypertensives modérés. En bloquant les canaux sodiques épithéliaux au niveau des reins, l'amiloride empêche la réabsorption du sodium et donc de l'eau tout en épargnant les pertes de potassium chez les patients soumis à des traitements diurétiques. Elle présente également des effets non spécifiques et est connue pour interagir avec les canaux ASIC. Elle inhibe les courants transitoires ASIC3 ($IC_{50} \approx 10-100\mu M$) en obstruant le pore de ces canaux mais n'affecte pas son courant soutenu qui peut même être paradoxalement potentialisé dans certaines conditions (Waldmann, Bassilana et al. 1997, Biardi and Coss 2011). Pour l'ensemble des canaux ASIC, cette molécule agit comme pore bloqueur à des concentrations élevées. La localisation de son site de liaison, responsable de l'effet potentialisateur reste encore controversée.

- *2-guanidine-4-methylquinazoline (GMQ):*

Cette petite molécule, présente un effet activateur sur les canaux ASIC3 à pH 7,4 ($EC_{50} \approx 1$ mM). Elle a la particularité d'avoir une structure proche de l'amiloride car elles possèdent toutes deux un groupement guanidinium. Il a été récemment montré que le GMQ altère la dépendance au pH des canaux ASIC1a et ASIC3 de différentes manières. A une concentration de 1mM, le GMQ tend à diminuer les courants ASIC1a et ASIC1b en entraînant un décalage de leur courbe d'activation vers des pH plus acides, inversement le GMQ potentialise ASIC3 en diminuant fortement son inactivation et en augmentant son activation. Le GMQ a également un effet pore bloqueur sur les ASIC à très forte concentration (Alijevic and Kellenberger 2012).

Molécules	Canaux ASIC touchés	Concentration effective (IC50)	effet	Références
4-Aminopyridine (4AP)	Tous sauf ASIC3	≈ 760 μM	Inhibiteur	(Friese, Craner et al. 2007, Kweon and Suh 2013)
Aminoglycosides	Tous les ASIC	≈ 32-44 μM	inhibiteur	(Garza, Lopez-Ramirez et al. 2010)
Anti-inflammatoires non stéroïdiens dont le piroxicam	ASIC1a	≈ 350 μM	inhibiteur	(Voilley 2004, Qiu, Qiu et al. 2012)
Aspirine et salicylates	ASIC3, ASIC2a	≈ 90-260 μM	inhibiteur	(Gong, Zhang et al. 2008, Qiu, Qiu et al. 2012, Sun, Jin et al. 2014)
Chloroquine	ASIC1a	≈ 600 μM	inhibiteur	(Ettaiche, Guy et al. 2004, Li, Fei et al. 2014)
Corticostéroïdes	ASIC1a	≈ 1-10 μM	potentialisateur	(Xiong, Liu et al. 2013)
Dynorphines	ASIC1a	≈ 1μM	potentialisateur	(Sherwood and Askwith 2009)
Insuline	ASIC1a	≈ 1.7 μM	Expression du canal	(Chai, Li et al. 2010)
Piroxicam	ASIC1a	≈ 30 μM	Inhibiteur par diminution NO (AINS)	(Bhattacharya, Pandey et al. 2012)
Anesthésiques (Tétracaine, lidocaïne, Propofol)	ASIC1a, ASIC3, ASIC1b	≈ 3-12 mM	inhibiteur	(Lin, Chu et al. 2011, Leng, Lin et al. 2013, Lei, Li et al. 2014)
Spermine	ASIC1a	≈ 2 mM	potentialisateur	(Duan, Wang et al. 2011)
Stomatine	ASIC1a	Non renseigné	inhibiteur	(Kozlenkov, Lapatsina et al. 2014)
Sérotonine	ASIC3	≈ 41 μM	Potentialisateur	(Qiu, Qiu et al. 2012)

Tableau 3 : Autres molécules connues pour avoir des effets directs ou indirects sur les canaux ASIC. (D'après (Baron and Lingueglia 2015))

La molécule endogène analogue au GMG est l'agmatine, un métabolite de l'arginine qui intervient dans la synthèse des polyamines. Bien que beaucoup moins efficace, l'agmatine présente des effets similaires au GMQ sur les canaux ASIC (Biardi and Coss 2011, Duan, Wang et al. 2011, Alijevic and Kellenberger 2012).

- *Les peptides de type RF-amides :*

Les neuropeptides de type RF-amides sont présents chez la plupart des organismes. Découverts à l'origine chez *Mercenaria mercenaria*, une espèce de mollusque bivalve (Lopez-Vera, Aguilar et al. 2008), ils semblent jouer un rôle important dans la régulation de l'activité cardiaque. Plusieurs de ces peptides sont également connus pour posséder des propriétés anti-opiacés (Lopez-Vera, Aguilar et al. 2008). Les neuropeptides de type RF-amides sont capables de ralentir la cinétique d'inactivation des canaux ASIC1a et ASIC3 ce qui améliore leur activité (Lingueglia, Deval et al. 2006, Aguilar, Luna-Ramirez et al. 2008). Lors des processus inflammatoires et dans les tumeurs, on observe une augmentation de la libération de peptides de la famille des RF-amides qui agissent sur les canaux ASIC et régulent ces processus (Xu and Xiong 2007).

Autres molécules :

Beaucoup d'autres molécules sont connues pour avoir des effets directs ou indirects sur les canaux ASIC. Ces molécules sont listées dans le tableau 3.

Problématiques et méthodes de recherche

Au cours de mes trois années de doctorat, je me suis consacré à l'étude de deux projets en parallèle. L'un de ces projets a été la recherche de nouvelles toxines permettant de moduler l'activité des différentes isoformes des canaux ASIC, l'autre de comprendre le fonctionnement de molécules déjà connues agissant sur ces canaux.

Bien que certaines toxines soient déjà connues pour activer ou inhiber l'activité des canaux ASIC, nous ne connaissons pas la fonction biologique de chacune des sous-unités qui forment ces canaux. Découvrir de nouveaux outils ciblant spécifiquement certaines isoformes permettrait d'une part d'étudier le rôle physiologique ou pathologique de ces sous unités mais aussi leurs propriétés pharmacologiques. Lorsque l'on travaille sur du criblage de molécules et notamment avec des substances naturelles telles que les venins d'animaux, plusieurs problèmes surgissent. La principale problématique est quel venin choisir ? Plusieurs facteurs entrent en jeu dans ce choix : la disponibilité du venin, la quantité exploitable et bien entendu le prix. Ce dernier est étroitement lié à la quantité, et les venins des petits animaux comme les scorpions ou certaines araignées peuvent dépasser les 400 euros pour 10 mg. De plus, les listings commerciaux présentent des venins d'animaux qui posent des problèmes pour la santé humaine et pour la plupart, ils servent en grande partie à la fabrication de sérums anti-venins. Lors des criblages, seules de petites quantités de venins d'animaux sont testés sur plusieurs cibles cellulaires (récepteurs et canaux ioniques). Si des molécules intéressantes sont découvertes et leurs structures identifiées, elles pourront être synthétisées pour continuer les études, ce qui est peu rentable pour une société d'extraction de venin. Plutôt que de présenter à leur catalogue une grande diversité de venins pour la recherche, les intérêts financiers de la société favorisent la commercialisation de venins d'importance clinique pour la santé humaine qui entreront dans la fabrication des sérums anti-venins. Pour avoir la chance de découvrir de nouvelles molécules d'intérêt pour la recherche fondamentale, quelques laboratoires spécialisés prélèvent donc directement de petites quantités de venins dans la nature en fonction de leurs besoins sur des espèces clairement identifiées d'un point de vue taxonomique. Il est évident que certains pays disposent de nombreuses espèces à étudier à portée de main, mais la France possède également un nombre important d'animaux venimeux peu étudiés et dont le venin n'est pas commercialisé car il présente peu d'effet toxique sur l'homme. Etudier ces animaux pourrait augmenter la probabilité de trouver de nouveaux outils pharmacologiques. Pour parvenir à cela il est nécessaire d'acquérir le matériel spécifique à l'extraction de ces venins, mais aussi d'étudier en parallèle les venins commerciaux disponibles

Une autre partie de mon travail a consisté en l'étude de la dynamique moléculaire des canaux ASIC en utilisant des outils pharmacologiques découverts au laboratoire. Les mambalgines décrites précédemment dans l'introduction, ont la capacité d'inhiber l'activité des homomères ASIC1a mais aussi des hétéromères ASIC 1a/2. Le site de fixation ainsi que le mécanisme d'action de cette molécule sur les canaux ASIC n'étaient pas connus à mon arrivée au laboratoire. Nous avons donc entrepris de découvrir le site de fixation de la molécule sur le canal mais aussi les zones d'interaction entre la mambalgine et le canal. Cette étude *in vitro* a eu pour but la compréhension des mécanismes d'ouverture et de fermeture des canaux ASIC dans un environnement contrôlé. D'autres molécules peuvent interagir avec les canaux ASIC et notamment des molécules telles que l'amiloride, un médicament utilisé pour l'épargne de potassium chez les patients soumis à des traitements diurétiques, ou le 2-guanidine-4-méthylquinazoline (GMQ). Les études du site d'action de l'amiloride et du GMQ sur les canaux ASIC sont ambiguës car les avis des chercheurs divergent. Nous avons donc entrepris lors de cette seconde partie de mon projet de thèse, de mieux comprendre d'une part, le mécanisme d'action de certaines toxines comme les mambalgines et de petites molécules comme l'amiloride et le GMQ et d'autre part d'interpréter les interactions possibles entre ces mécanismes.

Première partie :
Recherche de nouvelles
toxines ciblant les canaux
ASIC

1. Le prélèvement de venin dans la nature :

Pour favoriser la découverte de nouvelles toxines ciblant les canaux ASIC, nous avons décidé d'étudier les venins d'animaux locaux mais aussi ceux provenant de sociétés commerciales. D'après la bibliographie, les toxines connues pour bloquer ou activer ces canaux proviennent d'organismes différents. PcTx1 provient d'un venin d'araignée, la MitTx et les mambalgines quant à elles, sont issues de venins de serpents et enfin on trouve quelques molécules comme APETx-2, Ugr 9-1 qui proviennent de venins d'anémones de mer. Il est intéressant d'observer que de nombreuses espèces d'araignées ou d'anémones de mer sont présentes sur le territoire français et leurs venins sont peu exploités dans la recherche. Nous avons donc entrepris de collecter le venin de certains de ces organismes afin de tester leurs effets sur les canaux ASIC.

1.1 Article 1 : Conception d'un extracteur de venin à faible coût pour l'extraction électrique de venin d'arthropodes et autres petits animaux.

Il n'y a pas à proprement parler d'extracteur de venins universel disponible dans le commerce. Lorsque l'on consulte la bibliographie, il y a une grande diversité d'appareils créés de toute pièce par des chercheurs allant de la simple pile de 9 V connectée en court-circuit à des boîtiers commerciaux complexes et onéreux tels que le SD9 STIMULATOR (Garb 2014). Pour les plus simples, les résultats d'analyses des venins sont souvent aléatoires car il y a de grandes variations de tension dans des générateurs connectés en court-circuit. Cela entraîne également des lésions cellulaires de la glande à venin qui contaminent le venin. Le SD9 STIMULATOR est le plus utilisé par les laboratoires faisant de l'extraction régulière car il permet de générer un signal carré dont le temps de stimulation et le temps de repos sont réglables. Il est possible de choisir précisément une tension de travail entre 0 et 100 V. En revanche, de nombreuses fonctions sont inutilisées, par exemple il est possible de connecter jusqu'à quatre électrodes simultanément, de synchroniser les impulsions via des entrées « *Transistor-Transistor Logic* » (TTL) ou encore de choisir la polarité. Un tel appareil est très performant dans de nombreux domaines tels que la stimulation musculaire ou nerveuse mais n'est pas conçu pour l'extraction de venins. De plus, Le prix proche des 3000 euros reste conséquent pour une simple extraction.

De nos jours il est possible de trouver une multitude de composants électroniques bon marché et on peut facilement créer des équipements adaptés aux besoins des manipulations de manière très simple. Connaître nos besoins a donc été le point de départ de la conception de cet extracteur à faible coût.

1.1.1 Analyse des besoins:

Nous avons choisi de nous inspirer des fonctionnalités utilisées du « SD9 simulator » pour la base de notre extracteur et il était donc important de comprendre son fonctionnement pour reproduire les options essentielles. L'appareil permet de générer des impulsions carrées avec un temps de travail réglable de 0,2ms à 200ms et un temps de repos entre chaque impulsion, également réglable de 0,2ms à 200ms. La tension de travail est ajustable de 0 à 100V bien que la plupart des utilisateurs ne dépassent pas les 10V pour des animaux de petite taille.

Les glandes à venin sont recouvertes de tissus musculaires et comme pour tous les muscles, l'application d'un courant électrique entraîne leur contraction. Il est important de pouvoir contrôler le courant ainsi que la tension pour ne pas blesser l'animal et prélever un venin le plus pur possible. Nous avons donc choisi pour notre extracteur de conserver la possibilité d'ajuster ces paramètres. Le temps d'application de l'impulsion électrique est également important. Le « SD9 simulator » permet de générer des impulsions de 5Hz à 500Hz. Lors de l'utilisation d'un extracteur basé sur une simple pile, le manipulateur applique une tension continue durant un temps variable allant de 1 à 5 secondes. Bien que le venin ne soit pas pur sur ce type d'extraction, à cause d'une tension trop importante, cela indique qu'il est possible d'extraire du venin sans avoir recours à de la modulation d'impulsions. De plus il a été montré que les muscles agissent comme des filtres « passe-bas » et des impulsions de basse fréquence sont mieux transmises. Nous avons donc choisi pour notre extracteur de pouvoir régler une fréquence minimum de 1 Hz. Enfin la machine devait être relativement simple et peu coûteuse pour pouvoir être reproduite dans n'importe quel laboratoire.

1.1.2 Choix des matériaux et de l'ergonomie :

Nous avons choisi d'utiliser une carte de développement de type Arduino® qui est programmable via un logiciel open source pour contrôler notre extracteur. Cette carte comporte un microcontrôleur Atmega256, un régulateur de tension qui permet d'alimenter la carte avec des tensions de 5V à 12V et un convertisseur USB/ UART pour l'injection du code source dans le

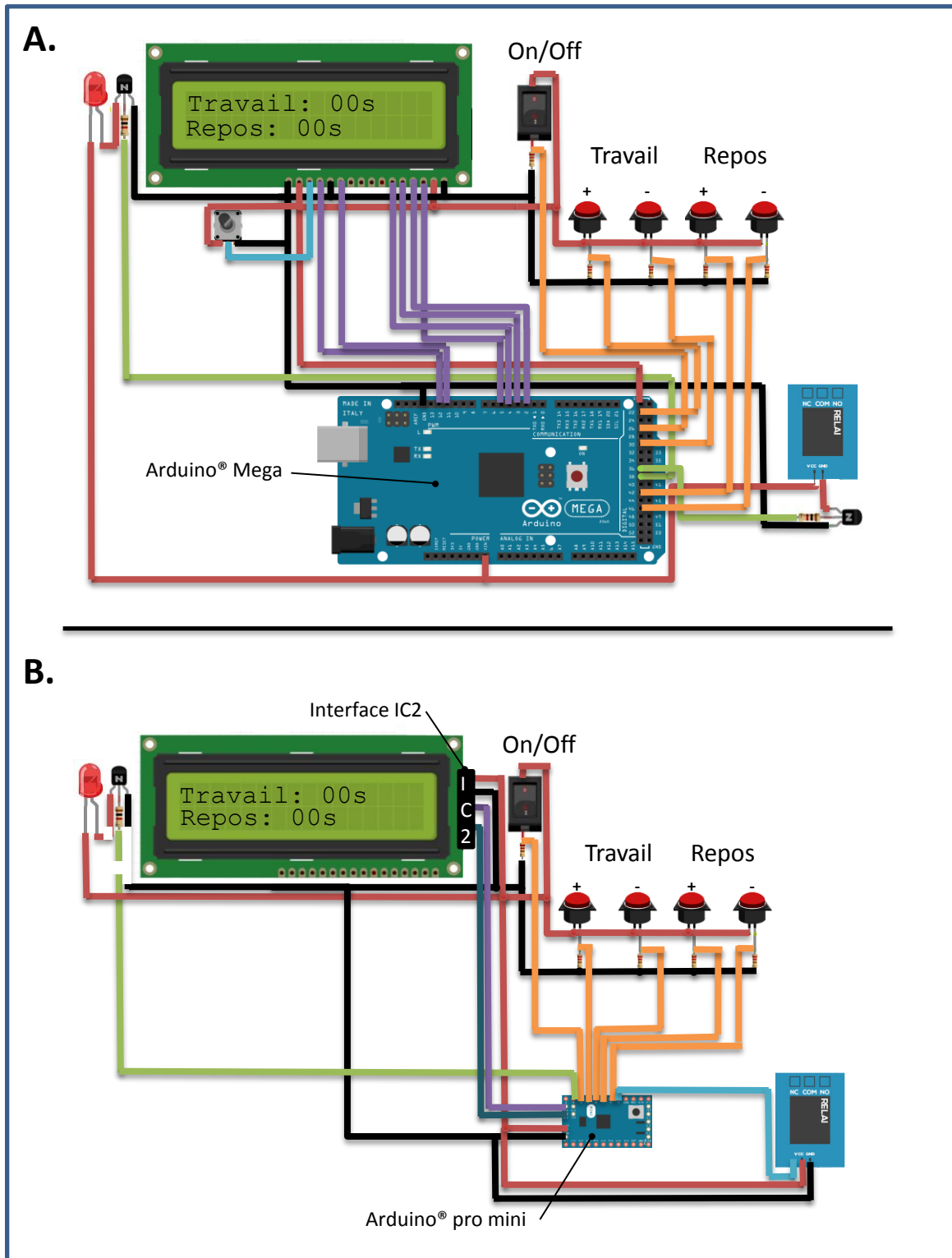


Figure 4: Schéma des connexions de l'extracteur de venin et des simplifications possibles.

A. Schéma simplifié des connexions à réaliser avec une carte Arduino[®] Mega, sans interface IC2

B. Schéma simplifié des connexions à réaliser avec une carte Arduino[®] pro mini et un écran LCD possédant une interface IC2

microcontrôleur. Le programme exécuté par la carte Arduino permet une sélection du temps de travail (minimum 1s) et du temps de repos (minimum 1s) à l'aide de 4 boutons poussoirs. Un écran LCD permet de visualiser les temps sélectionnés. L'ensemble du circuit électronique a été placé dans un boîtier étanche (IP55). Une fois le bouton de départ enclenché, l'extracteur génère un signal carré avec les temps de travail et de repos définis. Pour ajuster la tension et l'intensité, nous avons utilisé une alimentation de laboratoire linéaire « classique » (0V-30V / 0A-8A). Un relais permet de contrôler l'alimentation à l'aide de l'extracteur. Pour maintenir les araignées de petites tailles, nous avons utilisé une pince ultrasouple spécialement prévue pour ce type de contention. Cette pince est reliée à la borne positive de l'alimentation. A l'extrémité de la borne négative se trouve le stimulateur que nous avons créé à l'aide de connecteurs carrés de 6 mm.

1.1.3 Extraction du venin de *Zoropsis spinimana* :

Pour valider l'extracteur nous avons décidé de prélever le venin de l'araignée *Zoropsis spinimana*, une espèce commune dans le sud de la France. Sa petite taille ($\approx 13\text{mm}$) et sa disponibilité à toutes les saisons en font un excellent animal pour tester notre extracteur. De plus le venin de cet animal n'a jamais été caractérisé auparavant et seules quelques études de toxicité sur l'homme sont présentes dans la littérature (Gnadinger, Nentwig et al. 2013, Nentwig, Gnadinger et al. 2013). Avant de stimuler notre animal, nous avons observé à l'oscilloscope que les courants générés par l'extracteur étaient bien de forme carrée et que les réglages de voltage étaient bien respectés. Le venin obtenu était translucide et contenait, après analyse par spectrométrie de masse, 635 peptides avec des masses variant de 1kDa à 10kDa (Article 1).

1.1.4 Conclusion :

Nous sommes donc parvenus à concevoir un extracteur à faible coût (moins de 150 euros), assez précis pour permettre de collecter le venin des araignées de petites tailles. Il peut également être utilisé sur d'autres arthropodes tels que des scorpions ou des scolopendres en adaptant les électrodes de contention et de stimulation. Cet appareil est simple d'utilisation et a été créé avec des composants électroniques très communs et faciles à se procurer dans la plupart des pays. Nous avons fait le choix d'utiliser une carte Arduino méga 256 qui possède 54 entrées/sorties digital pour pouvoir ajouter d'autres stimulateurs sans avoir à changer de carte mais il est possible de réduire considérablement la taille et le prix du système en remplaçant celle-ci par une carte « nano ou pro mini. Une interface IC2 peut également être utilisée pour le

raccordement de l'écran LCD ce qui a pour effet de diminuer le nombre de connections vers la carte. Une représentation des modifications possibles est observable sur la figure 4.

D'après les données de la littérature, les venins d'araignées étudiés par analyse protéomique et transcriptomique présentent environ 200 à 300 peptides chez les Aranéomorphes (araignées se distinguant morphologiquement des mygales). Ces peptides sont communément distribués en deux groupes, le premier allant de 2 kDa à 5 kDa et le second de 6 kDa à 8 kDa. Les résultats obtenus sur le venin de *Zoropsis spinimana* montrent que 51 % des peptides sont présents dans la gamme de 2 à 5 kDa et 22 % entre 6kDa et 8 kDa. La distribution majeure des peptides de cette araignée étant comprise entre 1kDa et 9 kDa confirme que nos résultats sont en accord avec la littérature. Ce système est une alternative efficace et peu onéreuse à l'utilisation d'extracteurs commerciaux et permet de collecter des venins d'araignées ou d'autres animaux de petite taille.

ARTICLE 1:

**Low cost venom extractor based on Arduino®
board for electrical venom extraction from
arthropods and other small animals**

Besson T, Debayle D, Diochot S, Salinas M, Lingueglia E.

Toxicon. 2016



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Low cost venom extractor based on Arduino® board for electrical venom extraction from arthropods and other small animals



Thomas Besson^{a, b, c}, Delphine Debayle^{a, b}, Sylvie Diochot^{a, b, c}, Miguel Salinas^{a, b, c},
Eric Lingueglia^{a, b, c, *}

^a CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, 06560 Valbonne, France

^b Université de Nice Sophia Antipolis, UMR 7275, 06560 Valbonne, France

^c LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, UMR 7275, 06560 Valbonne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 March 2016

Received in revised form

28 April 2016

Accepted 3 May 2016

Available online 6 May 2016

Keywords:

Venom

Extractor

Spiders

Small animals

Zoropsis spinimana

Instruments

ABSTRACT

Extracting venom from small species is usually challenging. We describe here an affordable and versatile electrical venom extractor based on the Arduino® Mega 2560 Board, which is designed to extract venom from arthropods and other small animals. The device includes fine tuning of stimulation time and voltage. It was used to collect venom without apparent deleterious effects, and characterized for the first time the venom of *Zoropsis spinimana*, a common spider in French Mediterranean regions.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Animal venoms are a rich source of biologically active molecules, but tools to extract and properly investigate them remain inappropriate for many species, and have for instance limited the study of venoms from small animals.

Several manual or electrical venom extraction methods have been already described, which are often associated with differences regarding the quality and/or quantity of venom collected (Li et al., 2013; Oukkache et al., 2013). Electrical stimulation has emerged as the preferred method for most investigators, especially for small animals (Meadows and Russell, 1970), that leads to the development of different techniques in the last 50 years. The choice of the venom extracting method is actually guided by the animal size and how easy it is to access venom glands. For small species, it is difficult to extract venom without removing the venom gland, which could be a problem for scarce and precious animals. It is therefore important to preserve them from injury and keep them

alive as far as possible. Electrical extraction methods classically involve the contraction with electrodes of specific muscles located around the venom gland (Lowe and Farrell, 2011; Garb, 2014; Nagaraj et al., 2015). It requires fine, precise and calibrated instrumentation. Among the crucial parameters are the voltage and the current used, which depend on animal size and generally correlate with its resistance. Duration and shape of the electrical pulse are also important, with electrical square waves being less deleterious for the animal.

In essence, venom extraction needs simple and affordable equipment. In this regard, microcontroller boards such as Arduino®, Raspberry pi® and other boards, have recently emerged as interesting tools to control lab equipment in biology (D'Ausilio, 2012; Kornuta et al., 2013). These boards are able to record different types of events associated with electrical (Sheinin et al., 2015), optical (Anzalone et al., 2013) or mechanical signals (Grenez et al., 2013; Schubert et al., 2013). We used here an Arduino® board to create a simple and low cost system for extracting venoms from spiders and other small animals, which includes fine tuning of stimulation time and voltage. This device was exploited to extract the venom of *Zoropsis spinimana* that was subsequently characterized by liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

* Corresponding author. CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, 06560 Valbonne, France.

E-mail address: lingueglia@ipmc.cnrs.fr (E. Lingueglia).

2. Materials and methods

2.1. Arduino® mega 2560 development board

Arduino® mega 2560 development board is a printed circuit allowing the use of a microcontroller ATMEGA2560 16AU. This microcontroller controls 54 digital Input/Output pins, 15 Pulse-width modulation pins, 16 analog pins, and is able to automate any system. Using an Arduino development board is more expensive compared with other boards, but it guarantees greater stability of electronic components. It's easy to connect many sensors, screen, or other interface through the connector pins on the Arduino® board, which enables a quick prototyping of different projects. Documentation and software are open source and available at the Arduino website. The programming software is based on the C/C++ language; therefore Java programs may be used, allowing to create simple functions quickly and easily. Programs can be adapted to the evolution of the project. The power supply of this development board can be done through USB or main supply from 5 V to 12 V. Choice of the power mode is mainly based on the connected consumer device for mega card, and output voltage is stabilized at 5 V.

2.2. Variable power supply

Use of a Lab Mains Adapter is required to operate the system. The Arduino® venom extractor is able by itself to modulate the frequency of positive or negative impulses, but the current and the voltage are both driven by a BaseTech Lab Mains Adapter. This linear variable power supply can generate both controllable output voltage (0–30 VDC) and controllable output current (0–5 A).

2.3. Venom extractor assembly

A circuit diagram of the Arduino® venom extractor is shown in Fig. 1. The key component of this printed circuit is the Arduino® mega 2560 R3 prototyping board, which coordinates inputs and outputs of the device. Four push buttons are connected in “Pull down”, with, for each of them, a 10 kOhm resistor (R1 to R4) to bring the contact to a low logic level. Two of them, “T1+” and “T1-”, allow adjustment of the “working time”, and two others, “T2+” and “T2-”, are used to set the length of the “rest time”. An “On/Off” switch, which is also connected in “Pull down” with a 10 kOhm resistor (R5), starts the device. Visualization of the

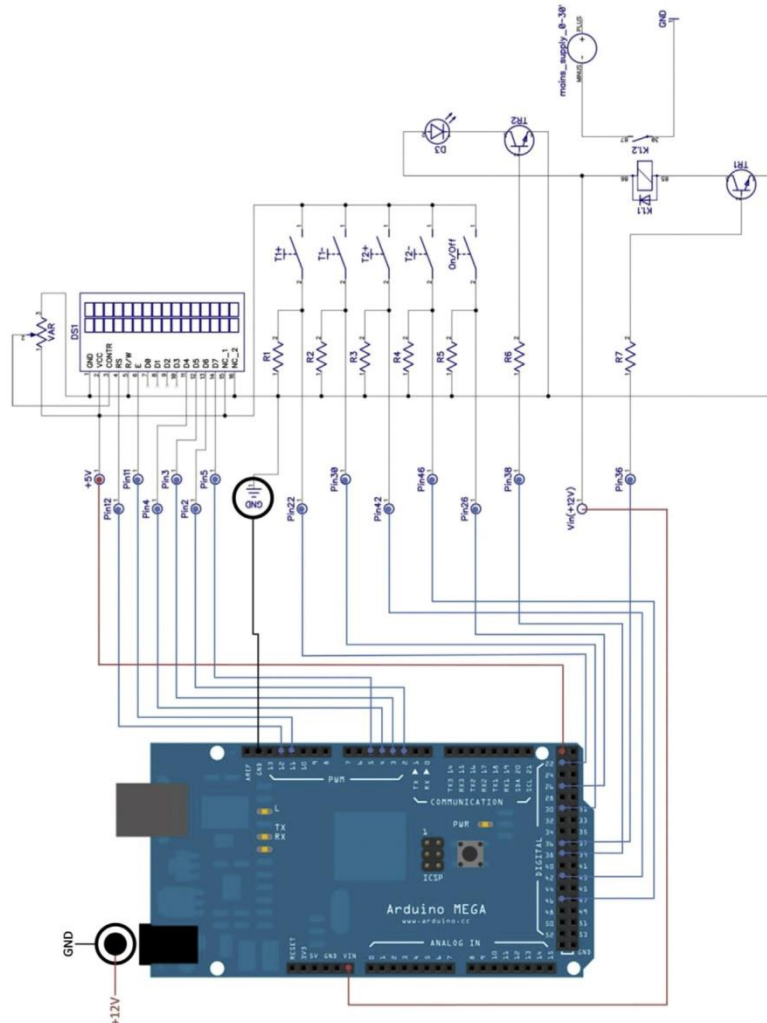


Fig. 1. Schematic electronic circuit of the venom extractor constructed from an Arduino® mega 2560 board.

“working time” and the “rest time” is done with an alphanumeric display (DS1), which was added to the venom extractor with a 10 kOhm rotary potentiometer (VAR) to adjust the screen contrast. The system is electrically powered by a 12 V/1 A power supply, used to operate two transistors, “TR1” controls a red operation lamp (D3), which allows the visualization of working time, and “TR2” operates the relay controlling part (K1.1) able to switch 8 A/230 V in the power contactor (K1.2).

For easy assembly of the electronic components, and to reduce the total volume of the venom extractor, the circuit was constructed on a Stripboard protoshield and mounted into a Plexo[®] box IP55 protection rating (Fig. 2A). Finally, two standard stackable lead cables were used to connect the stimulatory needle and the retaining forceps at the main supply. Details of components are shown in Table 1. The open source code of the Arduino[®] venom

extractor (www.ipmc.cnrs.fr/pages/venom_extractor_source_code.c) can be downloaded to the Arduino[®] mega 2560 board with the official Arduino[®] software (<https://www.arduino.cc/en/Main/Software>).

2.4. Forceps and stimulatory needle

Entomological Storkbill Fine Pointed Forceps (EuroNexia, France) connected to the Lab Mains Adaptor are used to maintain the spider during venom extraction. They are specifically designed for safe handling of fragile specimens. To facilitate current conduction, a wool yarn soaked with KCl solution (3 mM) is wrapped on the forceps.

Stimulatory needles used in venom extractors are often made based on medical needles, with different sizes adapted to the

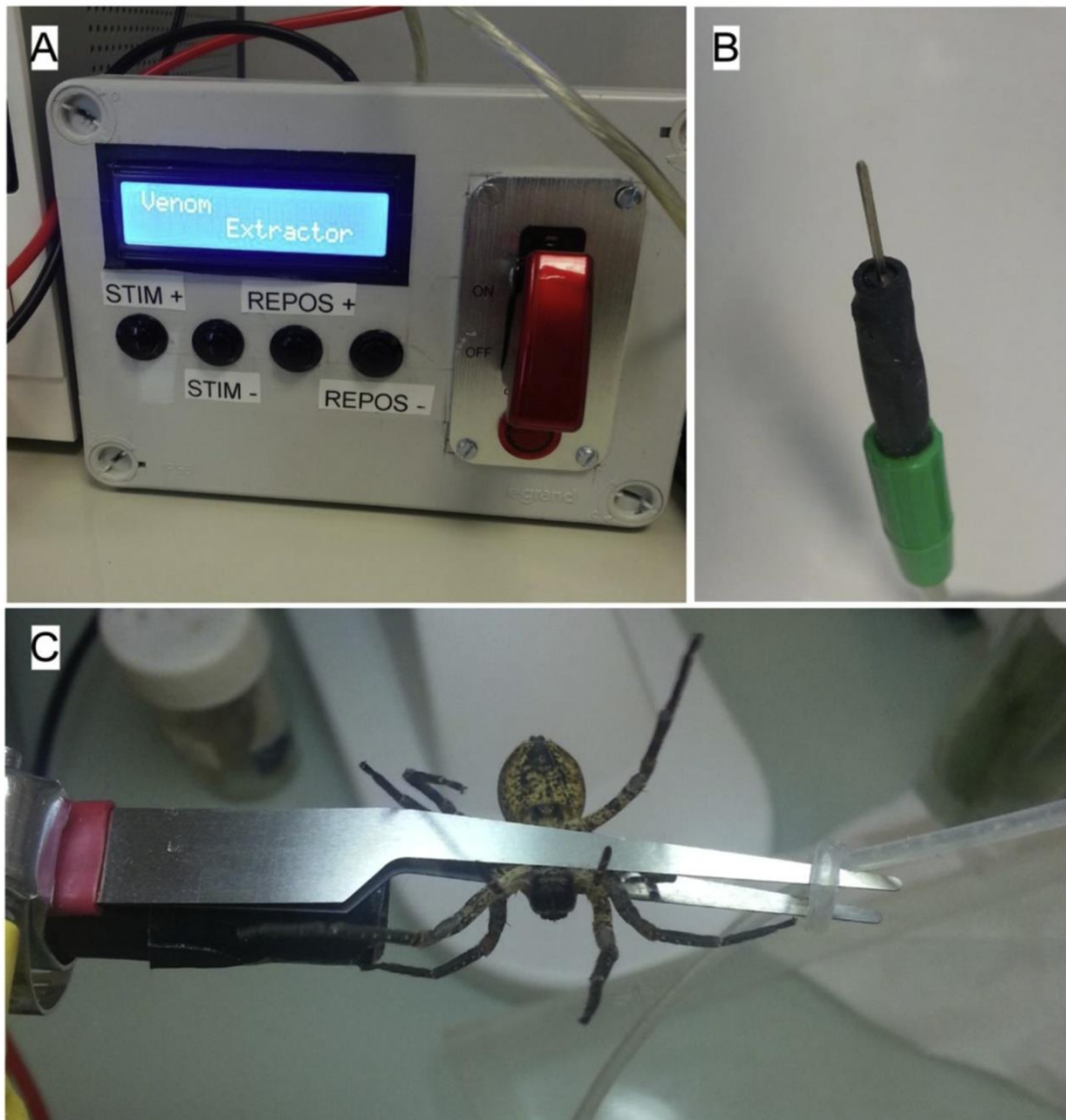


Fig. 2. *Zoropsis spinimana* venom collect with the Arduino[®] venom extractor A) Front view of the Arduino[®] venom extractor showing the different setup buttons. B) Stimulator tip made with a 2.54 mm square Pin Header Connector. C) *Z. spinimana* immobilized in dorsal position into low pressure forceps before venom milking.

Table 1
Circuit components, electrical parameter values and approximate costs.

Components	Values	Cost (€)
Alphanumeric display (DS1)	16 × 2	2.09
Pin Header Connector (stimulatory needle)	/	1.90
Forceps	/	11.2
mega 2560 R3 board	/	49.95
Plexo™ box IP55	/	10.00
Power supply	12 V/1 A	10.00
Push buttons (T1 ± and T2±)	/	1.00 (×4)
Relay (K1.1 and K1.2)	12 V/220 V–8 A	1.00
Resistor (R1 to R7)	10 kOhm	0.15 (×7)
Rotary potentiometer (VAR)	10 kOhm	0.50
Stackable Lead Cables (X2)	/	2.5
Stripboard protoshield	/	4.09
Switch (on/off) and red operation lamp (D3)	SCI R18-P1A	10.99
Transistor (TR2 and TR2)	2N2222A	2.22 (×2)
Total approximate cost		113.71

different spider specimens. However, these medical needles are made of alloys that are difficult to solder, and cause a significant loss of venom by capillarity retention because of their hollow piercing. To avoid these problems, we designed a rigid stimulator tip with a 2.54 mm square Pin Header Connector (Fig. 2B) made in partially gilded copper alloy, which is much easier to solder and with low fluid retention properties.

2.5. Spider preparation and handling

Female *Zoropsis spinimana* are 12–21 mm in body length. They are found under tree bark or hidden in the bedding or in silk lined retreats in gardens, and often take refuge in country houses during winter. Poisoning symptoms have been described in humans

(Gnadinger et al., 2013; Nentwig et al., 2013). Female spiders collected in Valbonne, France, were placed on ice for 2 min or treated 5 min with 5% CO₂, then maintained in a dorsal position with the storkbill forceps connected to the ground of the Arduino® venom extractor (Fig. 2C). Electrical pulses (5–7 V) were used to extract the venom with 2 s of “working time” and 3 s of “rest time” (0 V). The crude venom was collected in a glass capillary by aspiration then transferred in 1.5 ml Eppendorf® tubes. It is important to not feed the spiders at least 1 week before the venom collection to limit evacuation of stomach content during collection.

2.6. Peptide separation and mass spectrometry (μ UPLC-ESI-Qexactiveplus analysis)

Liquid chromatography coupled to mass spectrometer equipped with an ESI (Electro Spray Ionisation) source was used to analyse the *Z. spinimana* venom. HPLC was performed using a Thermo Scientific Dionex U3000 Instrument. Fifty microliters of an aqueous solution containing 5% acetonitrile and 0.1% formic acid were added to the crude venom. The injection volume was 5 μ l of diluted venom. Separation was performed using a Synchronis aQ column (150 mm × 2.1 mm i.d. × 5 μ m) from Thermo-Scientific operated at a 300 μ l/min flow rate. The mobile phase considered on water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), which both contain 0.1% formic acid (v/v). Gradient elution starts with 5% B and linear increase until 70% B during 45 min, increase to 90% B for 5 min and return to initial condition for 10 min. The Q-exactive plus spectrometer (Thermo Scientific) controlled by the Xcalibur software (Thermo Scientific) was operated in positive ion mode. Typical ESI conditions were as follows: electrospray voltage 4 kV; capillary temperature 320 °C, and Sheath gas flow 30U. We operated in full scan condition in the range of m/z 150–2000. Data analysis was

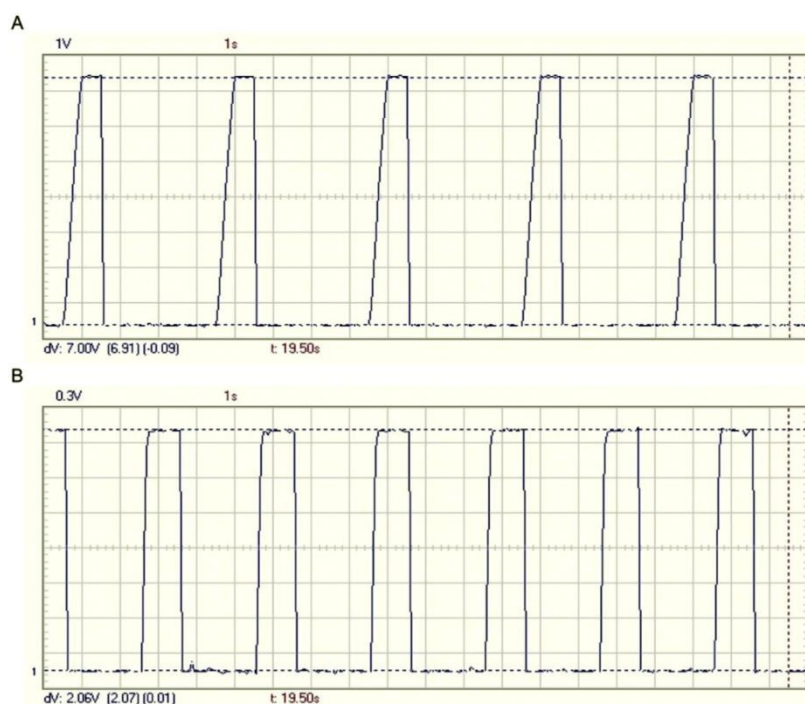


Fig. 3. Analysis of the signal generated by the Arduino® venom extractor. A) Oscilloscope trace of a 7 V/1 s “working time” and 3 s “rest time” signal. The image was captured with a USB Velleman PCSGU250 oscilloscope in transient recorder mode. B) Oscilloscope trace of a 2 V/1 s “working time” and 2 s “rest time” signal.

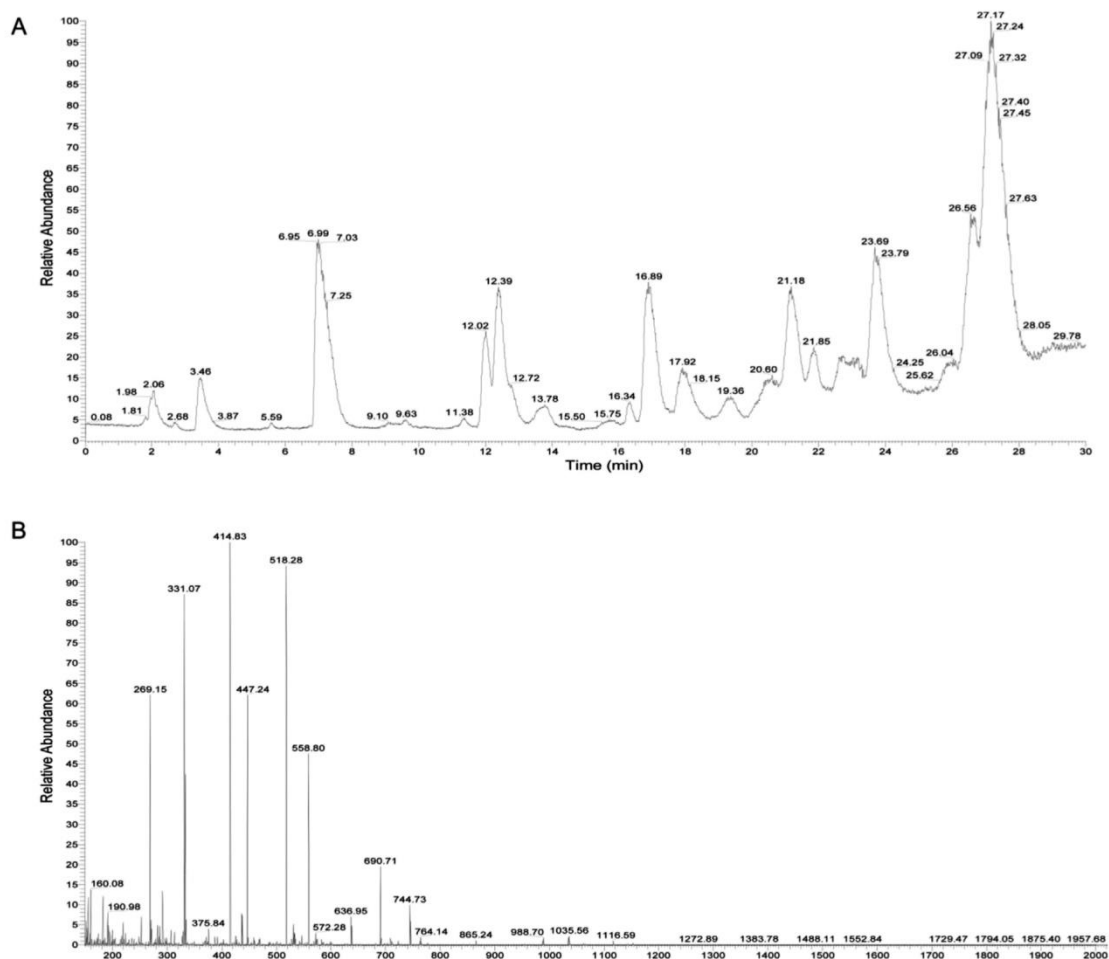


Fig. 4. Characterization of *Zoropsis spinimana* venom. A) Total Ion Chromatogram (TIC) of crude venom showing the distribution of all molecules, eluted with a gradient of 5–48% acetonitrile for 30 min, B) Example of mass spectrum from 10 min to 15 min.

performed with Protein Deconvolution 4.0 (Thermo Fisher Scientific Inc).

3. Results and discussion

This work describes a new affordable device designed to extract venom not only from spiders, but also from other arthropods such as scorpions and centipedes, and brings the proof-of-concept of its efficiency by collecting and characterizing the venom of *Z. spinimana* (Araneomorph, Zoropsidae), a common spider in French Mediterranean regions. It is a good alternative to more expensive devices and is expected to provide more qualitative and reproducible results than basic methods.

The Arduino[®] venom extractor is simple and easy to use, it only necessitates one person to operate, and just a basic expertise in electronic and programming is necessary to assemble it. Simple Arduino[®] Uno Board or Arduino[®] Pro Mini board would have been sufficient for this extractor and could have allowed an even better miniaturization of the device because the actual source code takes only 1% of the total programming memory, and we only used 13 inputs/output out of the 55 available in the Arduino[®] Mega 2560 Board. However, we used this board because it is much more flexible and allows addition of new options if necessary.

Programmers can therefore easily modify the source code and add options or modifications to the extractor, such as, for instance, replacement of the “T1+, T1–” and “T2+, T2–” push buttons by two rotary digital encoders if it is desired for add extra ergonomics to this device.

To first test and validate the system, the waveform generated by the Arduino venom extractor has been visualized and recorded with a numeric oscilloscope (PCSU-1000 Velleman[®]) using a “working time” of 1 s at 2 V, and a “rest time” of 2 s (Fig. 3B). The signal shows low electrical noise despite the use of unshielded cables. The signal generated by a “working time” of 7 V/2 s and a “rest time” of 3 s shows the waveform used to extract *Z. spinimana* venom (Fig. 3A). The difference between rising edge and falling edge is due to the linear type of the laboratory main power supply. The curvature of the “rising edge” is more or less visible depending on the type and the quality of the power supply. Although the rising edge presents a delay of 280 ms to arrive at the maximum voltage, it does not seem to affect contraction of the venom glands nor venom extraction results. We chose this type of power supply because it is common in laboratories, but any type of “direct current” power supply can be connected to the venom extractor, including power supplies for electrophoresis.

The square voltage waveform we use maintains a stable level of

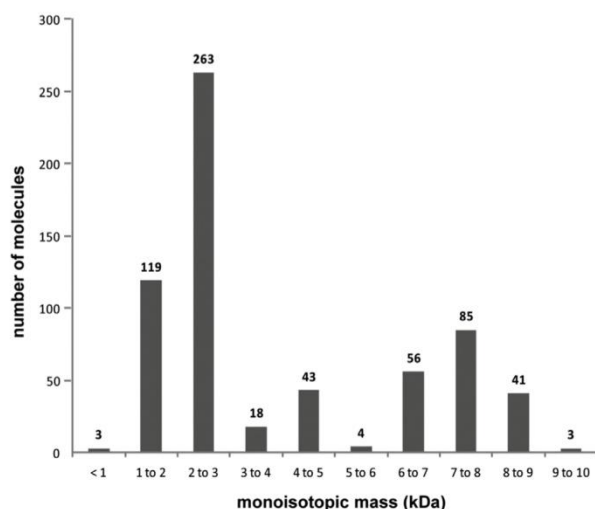


Fig. 5. Distribution of the molecules detected from *Zoropsis spinimana* venom according to their monoisotopic mass (kDa) with their respective abundances indicated above the bar graphs.

venom gland muscle contraction for a selective voltage, with sufficient rest time for muscle recovery. The minimum frequency for the stimulation is 1 Hz because the muscles act like “low pass filters” and a long pulse is better transmitted. Our protocol allows us collection of similar quantities of venom (1–2 μ l) from different specimens of *Z. spinimana* ($n = 4$, not shown), without apparent deleterious effects. The precision of venom collection achieved with the Arduino venom extractor helps to control the risk of contamination by stomach content and to avoid possible confusion between venom and gastric juice.

Commonly, spider venoms contain disulfide rich peptides between 2 and 8 kDa and proteins between 10 and 130 kDa, which may have enzymatic functions (e.g., serine-protease, metalloproteases, hyaluronidases, phospholipases), as well as organic molecules with low molecular mass under 1 kDa (e.g., nucleotides, biogenic amines and polyamines). Previous publications using proteomic and transcriptomic approaches revealed the presence of up to 800 peptides in Mygalomorph and up to 200–300 peptides in Araneomorph venoms, which are mainly distributed in two groups based on their molecular mass: from 2 to 5 kDa and from 6 to 8 kDa (Kozlov et al., 2014; Palagi et al., 2013; Trachsel et al., 2012; Zhang et al., 2010). Our results are consistent with this distribution since among the 635 molecules detected by Orbitrap mass spectrometry coupled to liquid chromatography (Fig. 4), 51% of them are between 2 and 5 kDa and 22% between 6 and 8 kDa. These data demonstrate a major distribution of peptides from 1 to 9 kDa (Fig. 5), in good agreement with previous publications. These results also suggest that small molecules like polyamines (MW < 700Da), which are common in Argiopidae family, seem to be absent in this venom. In addition, the 635 molecules detected represent an unexpected value for an Araneomorph spider that usually reaches only 200–300 molecules (Kozlov et al., 2014; Trachsel et al., 2012; Zhang et al., 2010).

The system is sufficiently flexible to be adapted to other small animals like scorpions and centipedes, or to larger spiders like tarantulas. A simple forceps modification and an adaptation of the electric potential allow such versatility. For bigger animals, the SMD/SMT Chip Pince can be used to directly maintain the fang, and the automated electrical impulsion generated by the Arduino

venom extractor allows the researcher to keep a free hand to maintain the animal. For marine animals like medusa or sea anemone, it is possible to modify the system by directly soaking the electrodes in artificial sea water containing the animal.

In conclusion, the Arduino venom extractor is a low cost versatile device that can be used to collect venom from arthropods and other small animals, as illustrated by the first *Z. spinimana* venom extraction and subsequent characterization by mass spectrometry.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank M. Bordes for comments and help with making the source code available online, as well as members of the Lingueglia team for discussions. This work was supported by CNRS, INSERM and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV4-0009).

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.001>.

References

- Anzalone, G.C., Glover, A.G., Pearce, J.M., 2013. Open-source colorimeter. *Sensors* Basel 13, 5338–5346.
- D'Ausilio, A., 2012. Arduino: a low-cost multipurpose lab equipment. *Behav. Res. Methods* 44, 305–313.
- Garb, J.E., 2014. Extraction of venom and venom gland microdissections from spiders for proteomic and transcriptomic analyses. *J. Vis. Exp.* e51618.
- Gnadinger, M., Nentwig, W., Fuchs, J., Ceschi, A., 2013. Swiss prospective study on spider bites. *Swiss Med. Wkly.* 143, w13877.
- Grenez, F., Viqueira Villarejo, M., Garcia Zapirain, B., Mendez Zorrilla, A., 2013. Wireless prototype based on pressure and bending sensors for measuring gait [corrected] quality. *Sensors* Basel 13, 9679–9703.
- Kornuta, J.A., Nipper, M.E., Dixon, J.B., 2013. Low-cost microcontroller platform for studying lymphatic biomechanics in vitro. *J. Biomech.* 46, 183–186.
- Kozlov, S.A., Lazarev, V.N., Kostryukova, E.S., Selezneva, O.V., Ospanova, E.A., Alexeev, D.G., Govorun, V.M., Grishin, E.V., 2014. Comprehensive analysis of the venom gland transcriptome of the spider *Dolomedes fimbriatus*. *Sci. Data* 1, 140023.
- Li, R., Zhang, L., Fang, Y., Han, B., Lu, X., Zhou, T., Feng, M., Li, J., 2013. Proteome and phosphoproteome analysis of honeybee (*Apis mellifera*) venom collected from electrical stimulation and manual extraction of the venom gland. *BMC Genomics* 14, 766.
- Lowe, R.M., Farrell, P.M., 2011. A portable device for the electrical extraction of scorpion venom. *Toxicon* 57, 244–247.
- Meadows, P.E., Russell, F.E., 1970. Milking of arthropods. *Toxicon* 8, 311–312.
- Nagaraj, S.K., Dattatreya, P., Boramuthi, T.N., 2015. Indian scorpions collected in Karnataka: maintenance in captivity, venom extraction and toxicity studies. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21, 51.
- Nentwig, W., Gnadinger, M., Fuchs, J., Ceschi, A., 2013. A two year study of verified spider bites in Switzerland and a review of the European spider bite literature. *Toxicon* 73, 104–110.
- Oukkache, N., Chgoury, F., Lalaoui, M., Cano, A.A., Ghalim, N., 2013. Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 19, 5.
- Palagi, A., Koh, J.M., Leblanc, M., Wilson, D., Dutertre, S., King, G.F., Nicholson, G.M., Escoubas, P., 2013. Unravelling the complex venom landscapes of lethal Australian funnel-web spiders (Hexathelidae: Atracinae) using LC-MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Proteom.* 80, 292–310.
- Schubert, T.W., D'Ausilio, A., Canto, R., 2013. Using Arduino microcontroller boards to measure response latencies. *Behav. Res. Methods* 45, 1332–1346.
- Sheinin, A., Lavi, A., Michalevski, I., 2015. StimDuino: an Arduino-based electrophysiological stimulus isolator. *J. Neurosci. Methods* 243, 8–17.
- Trachsel, C., Siegemund, D., Kampfer, U., Kopp, L.S., Buhr, C., Grossmann, J., Luthi, C., Cunningham, M., Nentwig, W., Kuhn-Nentwig, L., Schurch, S., Schaller, J., 2012. Multicomponent venom of the spider *Cupiennius salei*: a bioanalytical investigation applying different strategies. *FEBS J.* 279, 2683–2694.
- Zhang, Y., Chen, J., Tang, X., Wang, F., Jiang, L., Xiong, X., Wang, M., Rong, M., Liu, Z., Liang, S., 2010. Transcriptome analysis of the venom glands of the Chinese wolf spider *Lycosa singoriensis*. *Zool. Jena* 113, 10–18.

1.2 Extraction de venin d'Anémone de mer :

On retrouve de nombreuses espèces d'anémones de mer en méditerranée. Par le passé, seul le venin d'espèces possédant des neurotoxines excitatrices chez les crustacés ou les mammifères et pouvant entraîner une certaine neurotoxicité ont été testés sur l'activité des canaux ASIC au laboratoire (*Anthopleura sp*; *Anemonia sp*, *Stichodactyla*, *Condylactis...*). Malheureusement comme beaucoup d'études sur les animaux venimeux, les espèces ne présentant que peu ou pas de toxicité envers l'homme ont été écartées des études sur les canaux ioniques. Nous avons donc envisagé de mettre au point un protocole permettant d'extraire et de purifier des composés peptidiques susceptibles d'avoir un intérêt dans nos recherches à partir d'anémones de mer dans notre environnement sur la Côte d'Azur. De plus, certaines espèces françaises sont soumises à une protection. Pour mettre au point notre protocole, nous avons donc choisi d'extraire le venin de manière non létale.

1.2.1 Récolte et prélèvement des échantillons :

Il n'est pas nécessaire de plonger très profondément en mer pour observer des anémones de mer. Certaines espèces comme *Actinia schmidtii*, la tomate de méditerranée, sont présentes très proches de la surface et parfois même émergées. Cette espèce d'anémone est commune sur les côtes françaises et ne dispose pas de statut de protection particulier. Cette espèce solitaire est fixée solidement aux rochers par son pied musclé et bien que l'*Actinia schmidtii* soit inoffensive pour l'homme, elle est carnivore, présente des tentacules courts disposés en six rangées concentriques et possède des cellules urticantes.

Pour prélever ces animaux sans les blesser il suffit d'appliquer un glaçon durant quelques secondes à la base du pied. L'anémone se décroche alors sans difficulté. Cette anémone est par nature soumise à différents stress dans la nature, elle se rétracte sur elle-même et secrète un mucus destiné à la protéger. Ce mucus peut être prélevé en laissant à l'air libre les anémones durant trente minutes (Stabili, Schirosi et al. 2015). En revanche pour prélever le contenu des nématocystes il est nécessaire d'exposer l'anémone à un choc osmotique. Nous avons donc placé les anémones dans 500ml d'eau osmosée durant dix minutes. Après seulement trois minutes on peut observer la sécrétion d'une substance blanche translucide au niveau des tentacules. Une fois les dix minutes écoulées, les animaux ont été relâchés sur leur lieu de prélèvement et ne montraient pas de signes de traumatismes particuliers. Deux minutes après les animaux étaient de nouveau fixés aux rochers. Pour des anémones plus sensibles, il aurait été préférable d'utiliser une méthode d'extraction basée sur des chocs électriques.

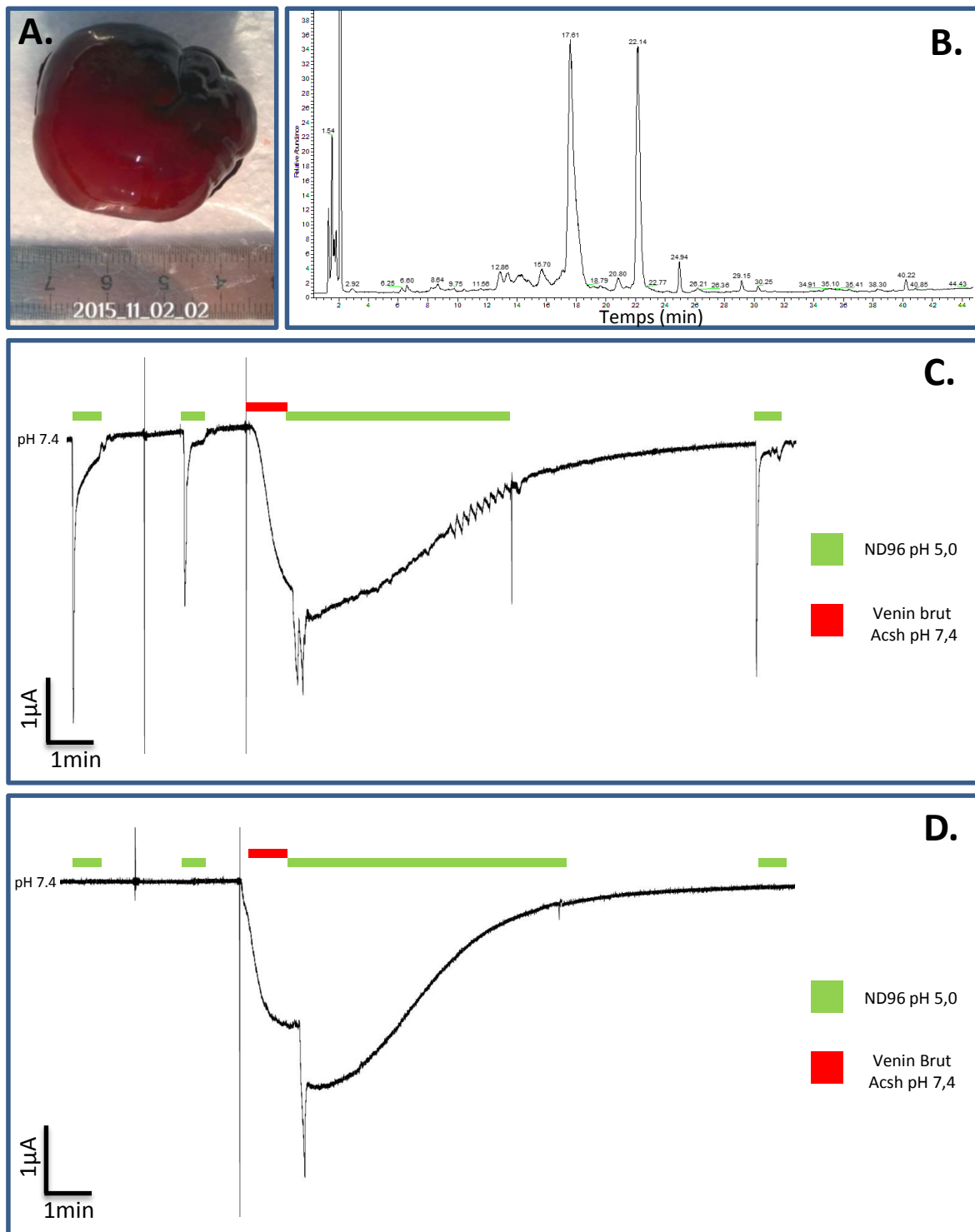


Figure 5: Caractérisation du venin d' *Actinia schmidtii*

A. Photo d'un spécimen d'*Actinia schmidtii* vu de dessus. L'anémone est repliée sur elle-même pour éviter sa déshydratation.

B. Chromatogramme des ions totaux (TIC) du venin brut d'*Actinia schmidtii* montrant la distribution de l'ensemble des molécules éluées avec un gradient de 5 à 70 % d'acétonitrile en 45 minutes.

C. Trace représentative de courant, enregistrée en double électrodes intracellulaires (TEVC) sur des ovocytes de *Xenopus laevis* exprimant les canaux ASIC1a de rat. Les canaux sont stimulés par des sauts de pH de 30 secondes à pH5,0, à partir d'un pH de conditionnement de 7,4. Le venin brut est appliqué à pH7,4 durant 30 secondes avant la stimulation à pH5,0

D. Protocole identique à (C), effectué sur des ovocytes n'exprimant pas les canaux ASIC1a. L'absence de courant pH sensible est vérifiée par des sauts de pH (passage de pH 7,4 à pH 5,0) pendant 30 secondes.

1.2.2 Extraction et purification :

Il a été montré dans la littérature que le mucus d'*Actinia equina*, qui est très proche d'*Actinia schmidti* est thermolabile (Stabili, Schirosi et al. 2015). Pour ne pas risquer de perdre l'activité de peptides d'intérêt, nous avons donc placé les échantillons à basse température (maximum 4°C) durant toutes les phases, du prélèvement à la purification. La solution a d'abord été filtrée (0.45µm) pour éliminer les résidus de matières organiques présents sur le corps de l'anémone. Les 500 ml d'eau osmosée contenant les sécrétions ont ensuite été congelés rapidement dans de l'azote liquide (-180°C) puis placés dans un lyophilisateur (*Virtis advantage*) jusqu'à élimination totale du liquide (environ 2 jours). Le ballon de verre contenant les sels a été rincé avec 25ml l'acétonitrile 100 % contenant 0.1% d'acide trifluoroacétique (TFA) puis dans 25 ml d'eau osmosée. Les deux solutions ont ensuite été mélangées et placées dans des tubes LPA (Low Protein Absorption) puis dans de l'azote liquide pour être à nouveau lyophilisées 24 heures. Après resuspension dans 10ml d'eau osmosée, la solution a été placée dans un boudin de dialyse (*Spectra/Prot® 1kD*) que nous avons lui-même placé dans un volume d'eau correspondant à 500 fois le volume de l'échantillon afin d'éliminer les sels. Nous avons effectué trois changements d'eau (à 30 min, 3 heures et 24 heures) afin de garantir une dialyse complète. Le contenu du boudin de dialyse a ensuite été lyophilisé une dernière fois afin de concentrer l'échantillon puis suspendu dans 1 ml d'eau osmosée.

1.2.3 Caractérisation biochimique du venin d'*Actinia schmidti* :

Nous avons analysé 5 µL de venin brut par chromatographie liquide à haute performance (HPLC Thermo Scientific Dionex U3000) sur une colonne synchronis aQ (150 mm x 2,1 mm i.d x 5 µm) de chez Thermo Scientific avec un débit de 300µL/min. En parallèle nous avons testé l'effet de ce venin sur les courants ioniques natifs de l'ovocyte de *Xenopus laevis* et sur les courants ASIC exprimés après injection de l'ADNc dans le noyau.

Les enregistrements électrophysiologiques réalisés sur les ovocytes exprimant les canaux ASIC3 (5ng/µL d'ADN injecté manuellement) montrent une dépolarisation rapide de la membrane plasmique suite à l'application du venin, suivie d'un retour au potentiel de repos très lent lors du rinçage. Nous avons observé les mêmes résultats lors de l'application du venin sur des ovocytes natifs n'exprimant pas les canaux ASIC. Le chromatogramme et les résultats observés sur les ovocytes de xénopes sont visibles sur la figure 5.

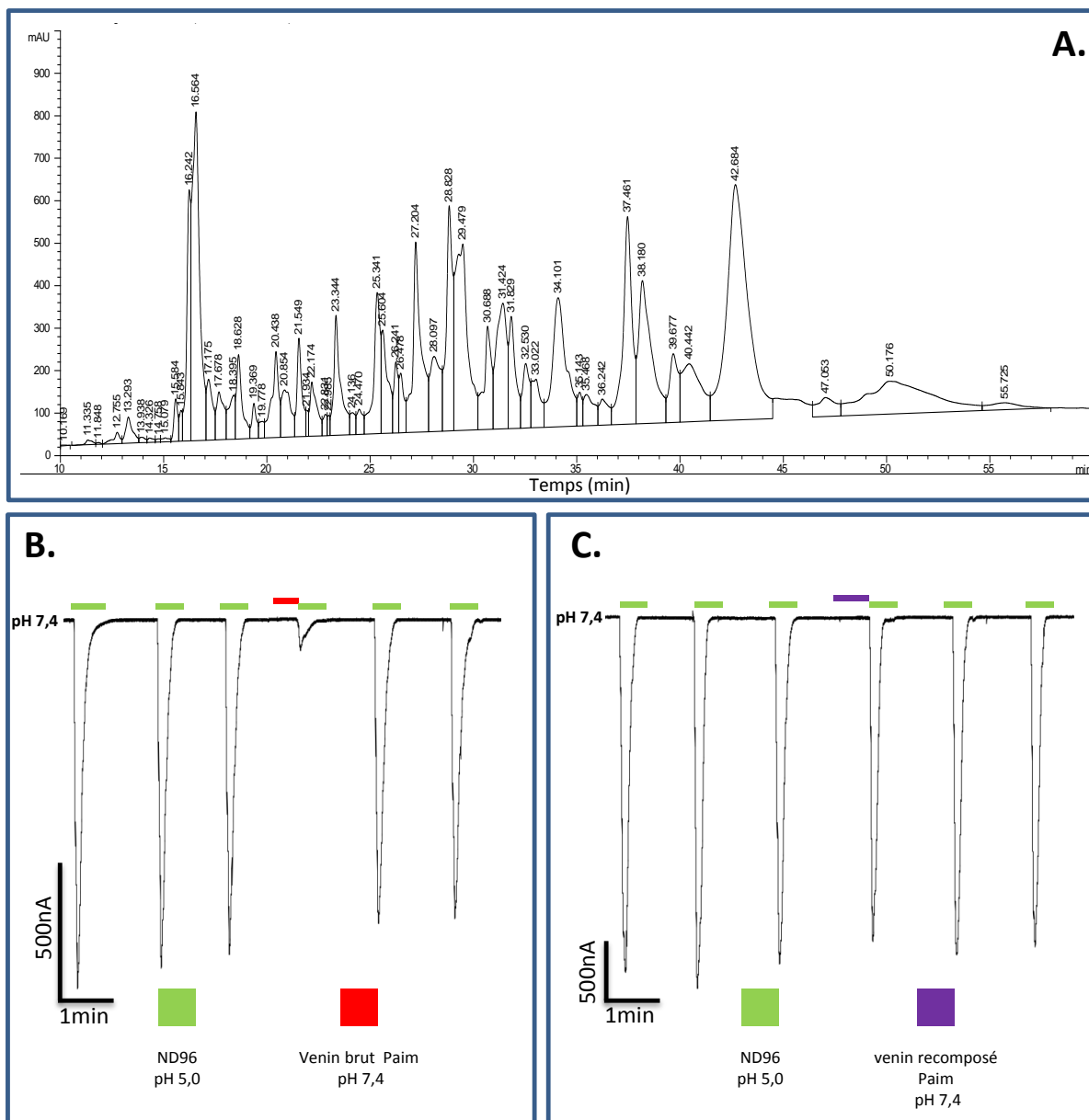


Figure 6: Caractérisation du venin de *Pandinus imperator*.

A. Chromatogramme du venin brut de *Pandinus imperator* montrant la distribution de l'ensemble des molécules éluées avec un gradient de 5 à 60 % d'acétonitrile en 55 minutes (HPLC phase inverse sur colonne C18).

B. Trace représentative de courant généré par rASIC1a, enregistrée en double électrodes intracellulaires (TEVC) sur des ovocytes de *Xenopus laevis*. Les canaux sont stimulés par des sauts de pH de 30 secondes entre pH 7,4 à pH 5,0. Le venin brut (0,1 mg/ml) est appliqué à pH 7,4 durant 30 secondes avant le saut de pH.

C. Protocole identique à (B). Le venin, recomposé après HPLC, est appliqué 30 secondes à pH 7,4 avant le changement de pH.

1.2.4 Conclusion :

La méthode mise au point pour extraire le venin d'anémone de mer semble être efficace sur les anémones *Actinia schmidt* et ne semble pas être nocive pour ces organismes. Lors de l'extraction et de la purification nous avons limité la taille des peptides extraits à un minimum de 1 kDa car APETx2 possède un poids moléculaire de 4.5 kDa. Il est possible que des peptides ou d'autres petites molécules issues d'anémone de mer ayant un poids moléculaire inférieur à 1 kDa puissent avoir un effet sur les canaux ASIC et il serait intéressant d'adapter le protocole de manière à conserver plus de peptides.

Les enregistrements électrophysiologiques réalisés sur les ovocytes de xénopes ont révélé que ce venin affecte le courant natif de l'ovocyte et n'est malheureusement pas actif sur les canaux ASIC. L'objectif de ma thèse étant la découverte de nouveaux modulateurs de ces canaux, nous n'avons pas continué l'étude de ce venin plus en détail.

Bien que les essais du venin d'*Actinia schmidt* sur les canaux ASIC se soient révélés inefficaces, le protocole mis au point sur cette espèce va permettre au laboratoire d'extraire le venin d'autres anémones et d'augmenter la probabilité de découvrir de nouvelles molécules d'intérêt pour l'étude des canaux ioniques.

2. Utilisation de venins commerciaux :

La plupart des venins que j'ai testés sur les canaux ASIC proviennent de fournisseurs spécialisés dans l'élevage d'animaux venimeux (Latoxan, Alphabiotoxine). Après avoir criblé un grand nombre de venins, nous avons sélectionné des venins de scorpions présentant une activité inhibitrice sur les canaux ASIC1a. Le premier venin de scorpion qui a présenté une telle activité provenait du scorpion *Pandinius imperator*, une espèce d'Afrique centrale de la famille des Scorpionidae protégé par la convention de Washington (CITES) mais qui par chance est très facile à reproduire en captivité. Ce scorpion est le plus large du monde et peut atteindre une taille de 20 cm. En revanche il présente une toxicité modérée sur l'homme et n'est pas considéré comme dangereux. De plus, il montre de grandes similarités avec certaines espèces de Scorpionidae asiatiques du genre *Heterometrus*. Les *Heterometrus* sont également reproduits depuis de nombreuses années en captivité car ils sont consommés et comptent parmi les mets de choix en Asie. Nous nous sommes procurés le venin de six espèces d'*Heterometrus* (Alpha biotoxine) et nous avons testé leur effet sur les canaux ASIC.

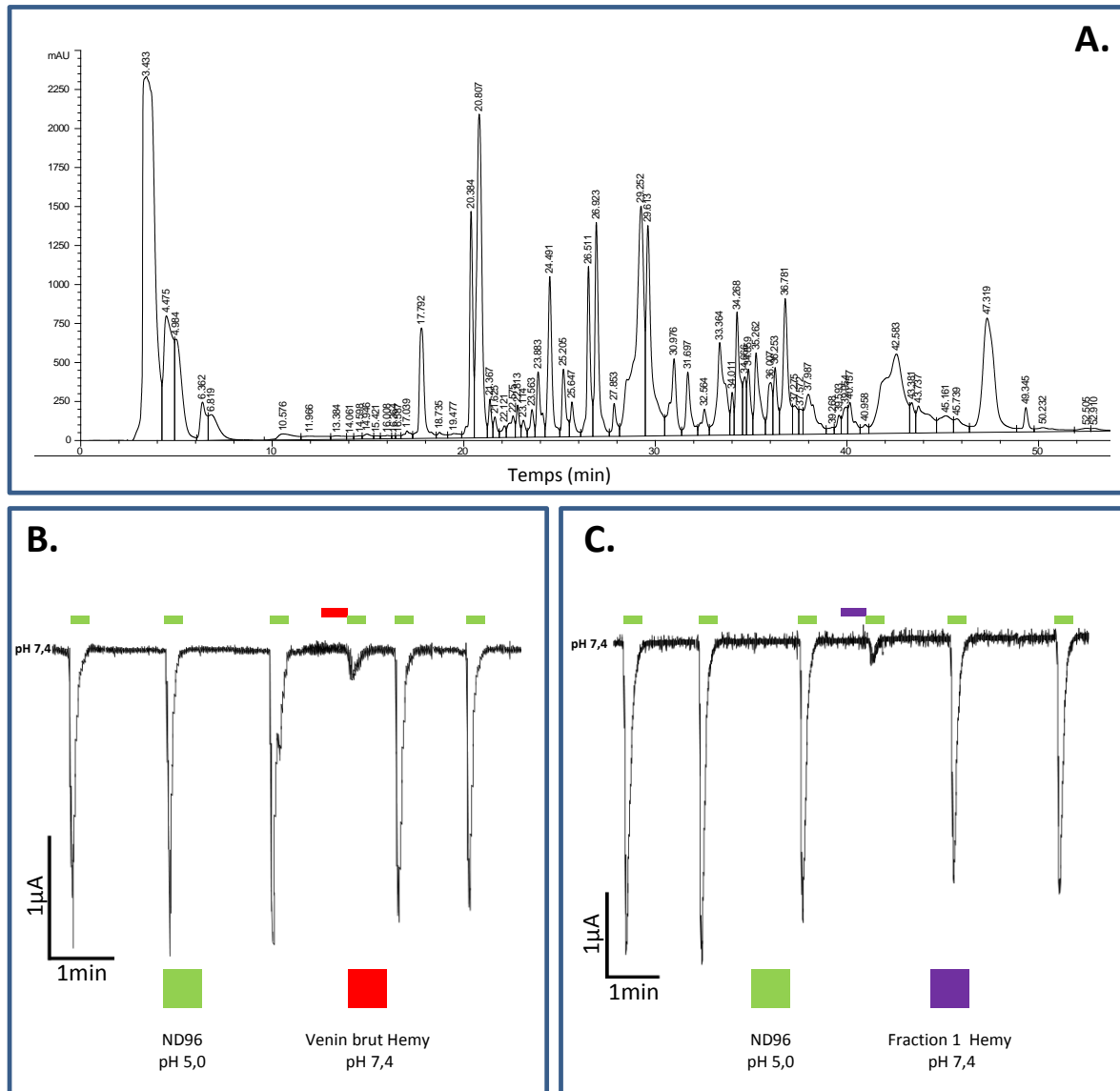


Figure 7:Caractérisation du venin de *Heterometrus mysorens* (Hemy)

A. Chromatogramme du venin brut de *Heterometrus mysorens* montrant la distribution de l'ensemble des molécules, éluées avec un gradient de 5 à 60 % d'acétonitrile en 55 minutes (HPLC phase inverse sur colonne C18).

B. Trace représentative de courant généré par rASIC1a, enregistrée en double électrodes intracellulaires (TEVC) sur des ovocytes de *Xenopus laevis*. Les canaux sont stimulés par des sauts de pH pendant 30 secondes. Le venin brut est appliqué à pH 7,4 durant 30 secondes avant le saut de pH.

C. Même protocole que (B), la fraction 1 du venin d'*Heterometrus mysorens* (Hemy) est appliquée à pH 7,4 durant 30 secondes avant le saut de pH.

Parmi ces venins, ceux provenant d'*Heterometrus laoticus* et d'*Heterometrus mysorensis* ont présenté des effets inhibiteurs puissants (environ 80% d'inhibition du courant ASIC1a). Nous avons donc tenté de caractériser plus en détail les éventuelles toxines présentes dans ces venins et responsables de ces effets.

2.1 Le fractionnement du venin de *Pandinius imperator* semble affecter son activité inhibitrice sur les canaux ASIC1a :

Les observations réalisées précédemment au laboratoire, montraient des effets inhibiteurs de ce venin sur des canaux homomériques ASIC1a exprimés dans l'ovocyte de xénope, pour des concentrations de venin brut de 0.1 mg/ ml. Après le fractionnement par HPLC sur une colonne de phase inverse (C18) nous avons séparé 18 fractions puis analysé leurs effets sur les courants ASIC1a exprimés dans des ovocytes de xénope.

Nous avons constaté rapidement qu'aucune des fractions ne permettait de reproduire les effets observés avec le venin brut. Dans l'hypothèse que certaines molécules puissent former un dimère aux propriétés inhibitrices, nous avons réassemblé les fractions 1 à 18. Nous ne sommes pas parvenus à restaurer l'effet inhibiteur de ce venin, suggérant la perte ou la dégradation du composé d'intérêt. Ces résultats sont présentés figure 6.

2.2 Le fractionnement des venins d'*Heterometrus mysorensis* et d'*Heterometrus laoticus* révèle une activité inhibitrice des premières fractions (non peptidiques) :

Nous avons étudié les activités inhibitrices des venins d'*Heterometrus laoticus* et d'*Heterometrus mysorensis* sur les canaux ASIC1a. Ces venins présentaient une activité de 80 % à 100% d'inhibition des courants ASIC1a exprimés dans l'ovocyte de Xénope. Après fractionnement par HPLC sur une colonne en phase inverse (C18) nous avons séparé en 54 fractions le venin d'*Heterometrus laoticus* et 49 fractions le venin d'*Heterometrus mysorensis*.

Dans les deux cas, l'analyse des fractions montre que les effets inhibiteurs de ces venins sont présents uniquement dans la fraction 1 qui correspond à un temps de rétention de 0 à 4 minutes. Cette fraction contient les composés non retenus par la colonne de chromatographie tels que des sels et des ions qui pourraient être à l'origine des inhibitions des canaux ASIC1a. Ces résultats sont présentés sur les figures 7 et 8.

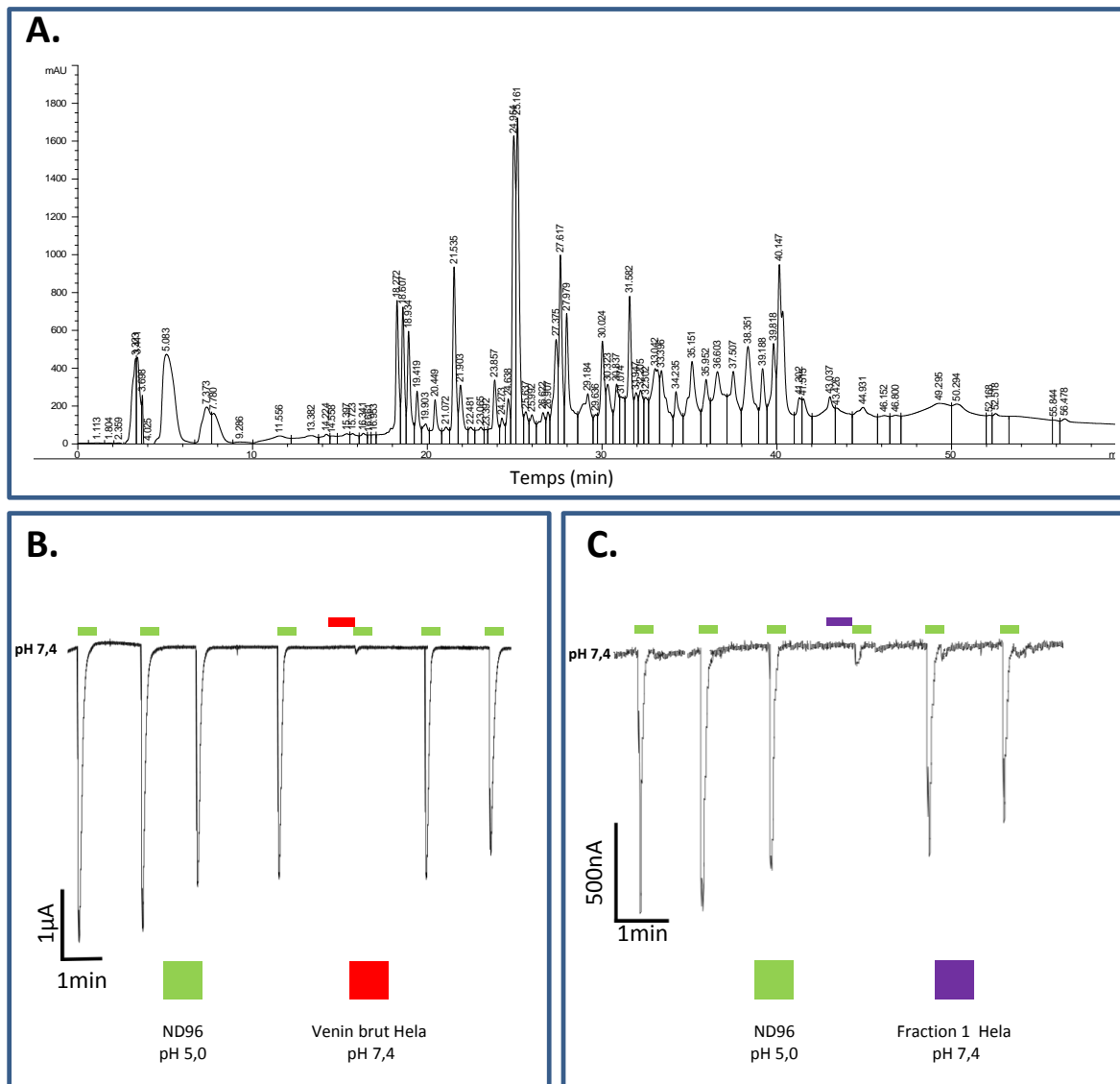


Figure 8: Caractérisation du venin de *Heterometrus laoticus* (Hela)

A. Chromatogramme du venin brut de *Heterometrus laoticus* montrant la distribution de l'ensemble des molécules, éluées avec un gradient de 5 à 60 % d'acétonitrile en 55 minutes (HPLC phase inverse sur colonne C18).

B. Trace représentative de courant généré par rASIC1a, enregistrée en doubles électrodes intracellulaires (TEVC) sur des ovocytes de *Xenopus laevis*. Les canaux sont stimulés par des sauts de pH pendant 30 secondes. Le venin brut est appliqué à pH 7,4 pendant 30 secondes avant le saut de pH.

C. Même protocole que (B), la fraction 1 du venin d'*Heterometrus laoticus* (Helo) est appliquée à pH 7,4 pendant 30 secondes avant le saut de pH.

2.3 L'inhibiteur de Zinc N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl) éthylènediamine bloque les effets inhibiteurs des fractions 1 de *Heterometrus mysorensis* et *Heterometrus laoticus* :

Nous utilisons les colonnes de chromatographie en phase inverse C18 pour séparer les composés organiques. Les sels et les ions qui sont solubles dans l'eau ne sont pas retenus et sont élués rapidement après l'injection du venin dans la colonne. Ils se retrouvent dans la première fraction. Le venin de *Pandinus* est connu pour posséder des quantités de zinc de l'ordre de 0,2µM/mg de venin brut (Pappone and Cahalan 1987). Les scorpions du genre *Heterometrus* appartenant à la même famille, nous avons tenté de savoir si les venins d'*Heterometrus mysorensis* et d'*Heterometrus laoticus* contenaient du zinc, connu pour inhiber les homomères ASIC1a (Sluka, Winter et al. 2009).

Pour tester cette hypothèse nous avons utilisé un inhibiteur de Zinc, le N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl) éthylènediamine (TPEN) à une concentration de 10 µM en présence du venin brut (0,1 mg/ml) d'*Heterometrus mysorensis* ou d'*Heterometrus laoticus*. Les résultats présentés sur la figure 9 montrent que la présence de N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl) éthylènediamine bloque les effets inhibiteurs de ce venin sur les canaux ASIC1a exprimés dans l'ovocyte de xénope et confirment que le zinc présent dans ce type de venin explique l'effet observé sur l'activité de ces canaux.

2.4 Conclusion :

Bien que les venins de *Scorpionidae* semblaient présenter des substances d'intérêt permettant l'étude des canaux ASIC, les résultats obtenus avec le N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl) éthylènediamine montrent que le zinc présent dans ces venins est très probablement à l'origine des effets inhibiteurs observés avec les venins bruts. Ces résultats soulignent les limitations à utiliser des venins bruts pour la première phase de sélection des venins par rapport à un pré-fractionnement. Les deux méthodes présentent cependant à la fois des avantages et des inconvénients.

L'utilisation de venin brut permet par exemple d'observer des effets liés à l'association de deux molécules au sein d'un dimère actif. En revanche, si deux molécules de même affinité présentent des effets antagonistes (l'une activatrice et l'autre inhibitrice du canal), ils ne seront pas observables avec cette méthode. De plus, certains venins possèdent des cytotoxines qui affectent la structure des membranes les rendant inutilisables directement sur les cellules.

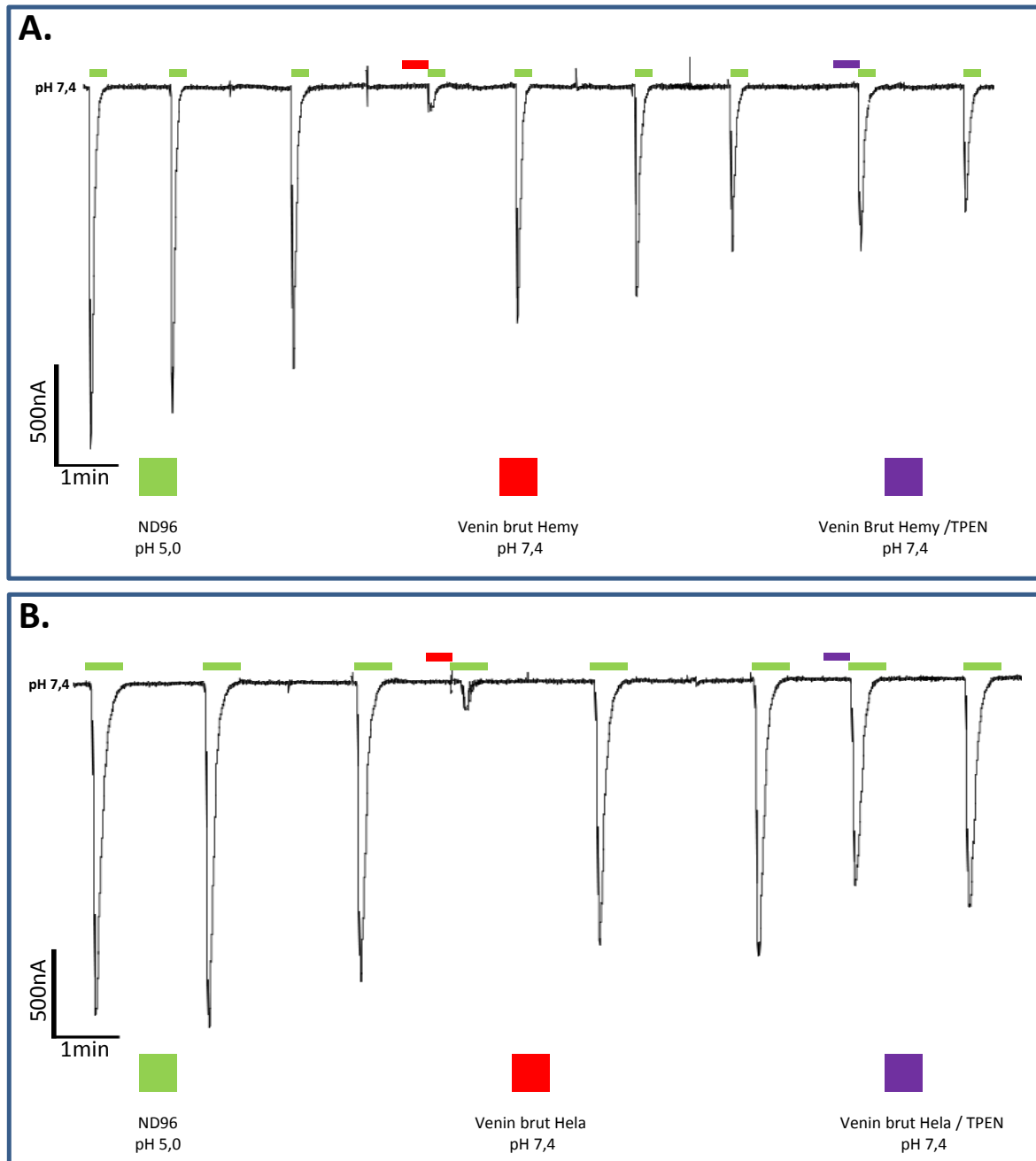


Figure 9: L'utilisation de l'inhibiteur de zinc N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) annule les effets du venin d'*Heterometrus mysorensis* (Hemy) et d' *Heterometrus laoticus* (Hela)

A. Trace représentative de courant généré par rASIC1a, enregistrée en double électrodes intracellulaires (TEVC) sur des ovocytes de *Xenopus laevis*. Les canaux sont stimulés par des changements de pH (passage de pH7,4 à pH5,0) pendant 30 secondes. Le venin brut d' *Heterometrus mysorensis* Hemy (0.1 mg/ml) est appliqué à pH7,4 durant 30 secondes avant le changement de pH puis le venin contenant 10 μ M de TPEN est appliqué à pH7,4 durant 30 secondes avant le changement de pH.

B. Même protocole que (A), réalisé avec le venin de *Heterometrus laoticus* (Hela).

Les résultats observés avec les venins de *Pandinus* et d'*Heterometrus* montrent par ailleurs que des ions peuvent aussi affecter les résultats de screening. L'utilisation de venins fractionnés quant à elle reste plus coûteuse en temps et en matériel et nécessite souvent une personne affectée uniquement à cette tâche. Le préfractionnement de venins permet d'identifier par criblage des sous fractions et d'éliminer celles présentant des activités cytolytiques, d'éliminer les sels et les ions mais ne permet pas d'observer des effets qui seraient liés à des molécules agissant en combinaison. Avec ce type de criblage, il aurait été impossible de découvrir par exemple la MitTx (Bohlen, Chesler et al. 2011) qui est formée d'un dimère non covalent correspondant à un peptide et une protéine présentant des temps de rétention très différents lors des purifications par HPLC en phase inverse.

Bien que ces deux méthodes présentent leurs avantages, je pense que l'utilisation de venin brut est à privilégier pour une étude à grande échelle de venins d'origines différentes pour la première phase de criblage. Cela permet l'étude d'un grand nombre de venins en un minimum de temps. Il est tout de même nécessaire de fractionner certains venins présentant des activités cytolytiques car ils peuvent contenir d'autres molécules d'intérêt pour la pharmacologie des canaux ioniques et des récepteurs avant de les rejeter de l'étude. Enfin il semble important de ne pas utiliser la fraction contenant les composés inorganiques lors des tests de criblage des différentes sous fractions en particulier sur les canaux ASIC pour éliminer les faux positifs liés aux ions (le zinc en particulier).

Seconde partie :
Etude du mécanisme
d'ouverture des canaux
ASIC et de leur régulation
par des toxines

1. Article 2 : Etude du site d'action et du mécanisme d'inhibition de la mambalgine-2 sur les canaux ASIC1a :

1.1 Contexte de l'étude :

Une combinaison d'approches génétiques et pharmacologiques a mis en exergue l'implication des canaux ASIC dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques et leur modulation apparaît donc comme une nouvelle stratégie thérapeutique potentielle dans le traitement de troubles divers tels que la douleur mais aussi les accidents vasculaires cérébraux ou les maladies neurodégénératives.

Depuis de nombreuses années, les toxines peptidiques se sont révélées être de très puissants outils pour étudier le rôle de ces canaux *in vitro* et *in vivo* à la fois dans le système nerveux central et périphérique. Les mambalgines, qui sont les dernières toxines à avoir été découvertes au laboratoire, pourraient présenter un réel intérêt thérapeutique mais leur mécanisme d'inhibition n'était pas encore élucidé. Les mambalgines-1 et -2, ne diffèrent que d'un seul résidu en position 4 (Phe ou Tyr) et présentent le même profil pharmacologique. En 2014 les travaux d'une équipe australienne ont suggéré que la mambalgine-2 pouvait se lier à proximité de la poche acide du canal ASIC1a (Schroeder, Rash et al. 2014) cependant la description précise de son site de liaison et son mécanisme d'action restaient encore mal décrit malgré un premier indice suggérant que la mambalgine est capable de stabiliser l'état fermé du canal (Diochot et al 2012), ce qui se traduit par un décalage de la courbe d'activation vers des pH plus acides.

Pour décrire sa fixation et comprendre précisément son mécanisme d'action, nous avons donc réalisé une mutagénèse dirigée du canal ASIC1a en se basant sur une modélisation informatique de son interaction effectuée en collaboration avec le Dr Dominique Douguet (IPMC, CNRS, Sophia Antipolis). Nous avons utilisé la mambalgine-2 car nous disposions de la structure déterminée par résonance magnétique nucléaire faite par une équipe australienne (Schroeder, Rash et al. 2014).

1.2 Résultats :

La modélisation informatique en trois dimensions de l'interaction entre ASIC1a et la mambalgine-2 a suggéré une fixation de la toxine au niveau de la poche acide qui se situe à l'interface entre deux sous unités et est formée, entre autre, par le domaine pouce (T pour Thumb), la β -balle (β) et le haut du domaine Paume (P) de la sous unité adjacente. Cette modélisation indique notamment que chacun des trois doigts de la mambalgine est capable d'établir un contact avec le canal. Alors que le doigt II semble s'insérer profondément dans la cavité de la poche acide le doigt III semble être en contact avec la région du pouce et le doigt I établit un contact avec le domaine Paume de la sous unité adjacente. Le cœur de la toxine semble interagir avec une autre partie du pouce dont la nature des acides aminés diffère entre ASIC1a et ASIC2a. C'est à partir de cette modélisation que nous avons pu orienter notre approche par mutagenèse et tenter de valider ce site d'action potentiel. Pour confirmer ce site de liaison et éventuellement élucider au niveau moléculaire le mécanisme d'inhibition, nous avons réalisé des chimères « perte de fonction » en introduisant dans ASIC1a des domaines issus du canal ASIC2a qui est insensible à la mambalgine. Dans un second temps, nous avons créé des chimères « gain de fonction » en conférant à ASIC2a une sensibilité à la mambalgine en lui introduisant les régions d'ASIC1a précédemment identifiées comme étant cruciales pour sa fixation ou son mécanisme d'action. La mambalgine agissant comme un modulateur du mécanisme d'ouverture de ces canaux, il est important de vérifier la sensibilité au pH de chacune de ces chimères lors de l'activation et de l'inactivation pour exclure la possibilité d'un effet indirect et être sur que tout ce que nous mesurons résultait d'une perturbation directe de l'interface entre le canal et la toxine. Nous avons donc effectué les courbes d'activation et d'inactivation pour chaque chimère que nous avons créée.

Nous avons montré que les chimères ASIC1a dont le domaine P ou β était remplacé par leur homologue ASIC2a se révélaient moins sensibles aux effets de la mambalgine-2 suggérant que ces deux domaines sont, au moins partiellement, nécessaires pour transmettre l'effet inhibiteur. En revanche, lorsque le domaine T de ASIC1a est remplacé par celui d'ASIC2a, cette chimère 1a/2aT devient totalement insensible à la mambalgine-2, suggérant un rôle central de ce domaine dans l'interaction avec la toxine. Les changements de propriétés biophysiques de ces chimères comparés à ASIC1a ne permettent pas d'expliquer cette diminution ou cette abolition de l'effet inhibiteur, ce qui suggère une implication directe de ces domaines avec la toxine et non un effet indirect dû aux changements de propriétés initiales.

Il n'y a que huit acides aminés qui diffèrent entre les domaines T de ASIC1a et de ASIC2a. Seuls 5 d'entre eux sont à l'interface avec la toxine dans notre modèle 3D. L'analyse par mutation ponctuelle de chacun d'entre eux montre que seuls les résidus Asp349 et Phe350 altèrent l'inhibition. D'autre part, le double mutant D349F,G350L entraîne une diminution drastique de la sensibilité à cette toxine et explique la plus grande partie des effets observés dans la chimère 1a/2aT. Pour confirmer l'importance de ces trois domaines et interpréter leur rôle nous avons construit des chimères « gain de fonction » en remplaçant les domaines T, P et/ou β du canal ASIC2a par ceux du canal ASIC1a. Contrairement à ce que nous avons envisagé, la chimère 2a/1aT, c'est à dire ASIC2a présentant le domaine T du canal ASIC1a, ne nous a pas permis d'observer une inhibition en présence de mambalgine-2 mais a mis en évidence un effet potentialisateur encore jamais observé. Nous en avons conclu que ce domaine, bien que central pour l'interaction avec la toxine, ne permet pas à lui seul d'expliquer le mécanisme d'inhibition. Pour tenter de restaurer le mécanisme complet, nous avons remplacé dans cette chimère le domaine P puis le domaine β . Lorsque la chimère ASIC2a possède le domaine T et P de ASIC1a, l'inhibition par la mambalgine est partiellement restaurée, en revanche la chimère ASIC2a construite avec le domaine T et β du canal ASIC1a ne permet pas d'inverser l'effet stimulateur de la toxine.

Les résultats obtenus avec les chimères « gain de fonction » ou « perte de fonction », nous ont permis d'identifier le rôle central du domaine T, qui est nécessaire et suffisant pour conférer une sensibilité à cette toxine, mais n'expliquent pas le mécanisme d'inhibition à lui seul. Nous avons également identifié le rôle du domaine P qui permet de restaurer partiellement l'inhibition par la mambalgine-2 lorsqu'il est associé au domaine T. En revanche, le domaine β n'est pas capable de faire de même lorsqu'il est, lui aussi, associé au domaine T et ne permet pas de contrer les effets activateurs de la toxine induits via le domaine T. Pour clarifier le rôle joué par le domaine β dans le mécanisme d'inhibition, nous nous sommes intéressés à la chimère 1a/2aP dont l'inhibition est seulement partiellement affectée suggérant qu'il existe un autre domaine, différent de P, qui contribue également la transmission de l'effet inhibiteur de la toxine. La mutation simultanée des trois acides aminés RDQ/KQE du domaine β sur la chimère 1a/2aP (chimère 1a/2aP+RDQ/KQE) entraîne une très forte potentialisation du courant par la mambalgine, alors que la même mutation sur un canal ASIC1a sauvage montre une altération de l'effet inhibiteur identique à celle induite par la mutation complète du domaine β . Ces résultats montrent que les domaines P et β sont tous deux impliqués dans le mécanisme d'inhibition par la mambalgine.

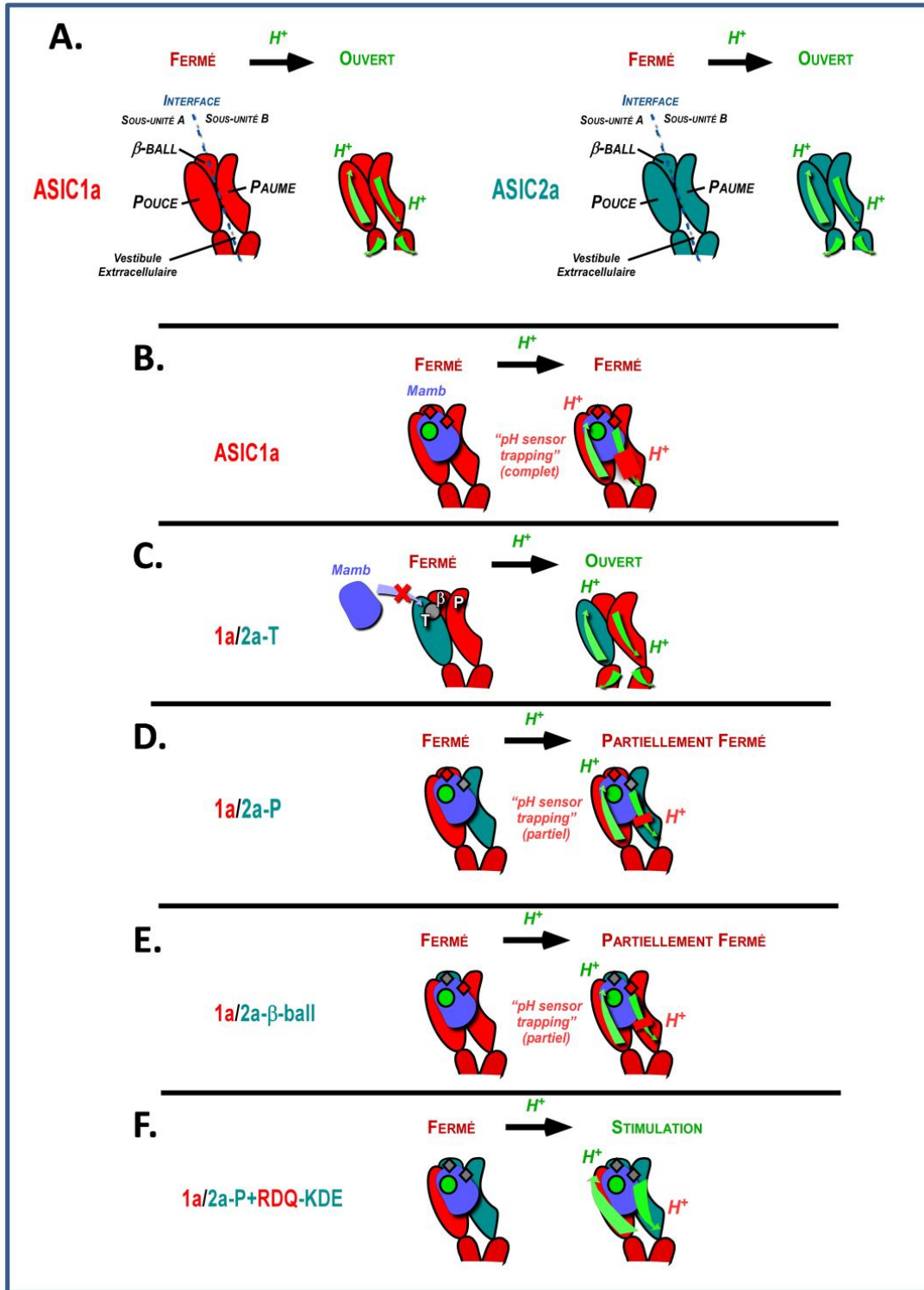


Figure 10 : Modèle de l'inhibition d'ASIC1a par la mambalgine

- A. Représentation schématique de l'interface entre deux sous-unités ASIC1a en rouge ou ASIC2a en turquoise les flèches vertes indiquent les mouvements des différents sous domaines
- B. Représentation schématique de l'interface entre deux sous-unités ASIC1a en rouge en présence de mambalgine.
- C. Représentation schématique de l'interface entre deux-sous unités ASIC1a (en rouge) possédant le domaine T de ASIC2a (en turquoise) en présence de mambalgine.
- D. Représentation schématique de l'interface entre deux sous-unités ASIC1a (en rouge) possédant le domaine P de ASIC2a (en turquoise) en présence de mambalgine.
- E. Représentation schématique de l'interface entre deux-sous unités ASIC1a (en rouge) possédant le domaine β -Ball de ASIC2a (en turquoise) en présence de mambalgine.
- F. Représentation schématique de l'interface entre deux sous-unités ASIC1a (en rouge) possédant le domaine P ainsi que une partie des acides aminés de la β -Ball de ASIC2a (en turquoise), en présence de mambalgine.

Ces résultats permettent de proposer un modèle de l'inhibition d'ASIC1a par la mambalgine (figure 10). Lorsque le canal est à l'état fermé, cette toxine se fixe au niveau de la poche acide à l'interface de deux sous unités et interagit principalement avec les résidus D349 et F350 du domaine T. La mambalgine interfère avec le haut du domaine P de la sous unité adjacente et le domaine β sur les résidus R190, D258 et Q259. Son contact avec le domaine P stabilise l'état fermé du canal en décalant la courbe d'activation vers des pH plus acides (figure 10 B). La présence de seulement l'un de ces deux domaines (β ou P) permet d'observer un effet inhibiteur partiel de la mambalgine, ce qui explique la capacité de cette toxine à inhiber également des hétéromères tels qu'ASIC1a/ASIC2a (figure 10.D et .E). En revanche, la mutation du domaine T entraîne la perte de l'interaction avec la toxine et l'empêche d'exercer son effet inhibiteur (figure 10.C). Une autre toxine, la psalmotoxine-1 (PcTx1) utilise un mécanisme similaire pour stabiliser quant à elle un état inactivé du canal et entraîner une inhibition des courants ASIC1a (Chen, Kalbacher et al. 2005, Salinas, Rash et al. 2006). En revanche il a été montré que son effet sur les homomères ASIC1b favorise un état ouvert (Chen, Kalbacher et al. 2006). Nos expériences complémentaires avec PcTx1 montrent que, à l'inverse de la mambalgine, la mutation d'un seul des deux domaines P ou β suffit à supprimer son mécanisme inhibiteur et potentialise les courants de nos chimères 1a/2aP et 1a-RDQ-KQE (équivalent à 1a/2a β).

Notre modèle illustre l'idée que la mambalgine et PcTx1 ont un effet potentialisateur masqué par un effet inhibiteur. La fixation de la mambalgine sur le domaine T entraîne des changements de conformation susceptibles de favoriser l'ouverture du canal (figure 10.E), tout comme la fixation de PcTx1. En revanche, le contact avec le domaine β et/ou le domaine P stabilise ASIC1a dans un état fermé dans le cas de la mambalgine. PcTx1 quant à elle, stabilise principalement un état inactivé et requiert pour cela une interaction avec le domaine β et le domaine P. Les mécanismes évolutifs des toxines sur ce type de canaux semblent converger vers la préférence d'une modulation au niveau du senseur de pH en entraînant une altération du mécanisme d'ouverture du canal. Ce travail pourrait servir de base pour le développement de nouveaux modulateurs des canaux ASIC1a.

ARTICLE 2 :

Binding site and inhibitory mechanism of the mambalgin-2 pain-relieving peptide on acid- sensing ion channel 1a

Salinas M, Besson T, Delettre Q, Diochot S, Boulakirba S, Douguet D, Lingueglia E.

J Biol Chem. 2014

Binding Site and Inhibitory Mechanism of the Mambalgin-2 Pain-relieving Peptide on Acid-sensing Ion Channel 1a*

Received for publication, February 27, 2014, and in revised form, March 31, 2014. Published, JBC Papers in Press, April 2, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.561076

Miguel Salinas^{‡§¶}, Thomas Besson^{‡§¶}, Quentin Delettre^{‡§}, Sylvie Diochot^{‡§¶}, Sonia Boulakirba^{‡§}, Dominique Douguet^{‡§¶}, and Eric Lingueglia^{‡§¶1,2}

From the [‡]CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, 660 route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France, [§]Université de Nice Sophia Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France, and [¶]LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS and Université de Nice Sophia Antipolis, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France

Background: Mambalgin-2 is a snake venom peptide that blocks acid-sensing ion channels (ASICs) to relieve pain.
Results: Mambalgin-2 interacts with at least three different regions of ASICs and exerts both stimulatory and inhibitory effects.
Conclusion: Binding of mambalgin-2 into the pH sensor traps the channels in the closed conformation.
Significance: This might allow development of optimized blockers of ASICs of therapeutic value.

Acid-sensing ion channels (ASICs) are neuronal proton-gated cation channels associated with nociception, fear, depression, seizure, and neuronal degeneration, suggesting roles in pain and neurological and psychiatric disorders. We have recently discovered black mamba venom peptides called mambalgin-1 and mambalgin-2, which are new three-finger toxins that specifically inhibit with the same pharmacological profile ASIC channels to exert strong analgesic effects *in vivo*. We now combined bioinformatics and functional approaches to uncover the molecular mechanism of channel inhibition by the mambalgin-2 pain-relieving peptide. Mambalgin-2 binds mainly in a region of ASIC1a involving the upper part of the thumb domain (residues Asp-349 and Phe-350), the palm domain of an adjacent subunit, and the β -ball domain (residues Arg-190, Asp-258, and Gln-259). This region overlaps with the acidic pocket (pH sensor) of the channel. The peptide exerts both stimulatory and inhibitory effects on ASIC1a, and we propose a model where mambalgin-2 traps the channel in a closed conformation by precluding the conformational change of the palm and β -ball domains that follows proton activation. These data help to understand inhibition by mambalgins and provide clues for the development of new optimized blockers of ASIC channels.

Acid-sensing ion channels (ASICs)³ form a family of amiloride-sensitive voltage-independent cation channels that predominantly conduct Na⁺ ions (1). ASICs are activated by extracellular acidification within the physiological range of pH, and they form effective proton sensors in both central neurons and peripheral nociceptors. A combination of genetic and

pharmacologic approaches has revealed their implication in an increasing number of physiological and pathophysiological processes, most of them associated with extracellular pH fluctuations, ranging from synaptic plasticity, learning, memory, fear, depression, seizure termination, and neuronal degeneration to nociception and mechanosensation (2–4). Inhibition of ASICs, therefore, emerges as a new potential therapeutic strategy in the management of psychiatric disorders, stroke, neurodegenerative diseases, and pain (5).

Peptide toxins against ASICs have been very powerful tools for studying the role of these channels *in vitro* and *in vivo* in both the central and peripheral nervous system (6). The spider peptide psalmotoxin 1 (PcTx1), which blocks rodent ASIC1a homomeric (7) and ASIC1a/2b heteromeric (8) channels but can also act as an agonist of ASIC1b and chicken ASIC1a (9, 10), has been used to explore the role of ASIC1a in normal and pathophysiological conditions in brain (5) and to demonstrate a role for the central ASIC1a in pain modulation (11, 12). The MitTx identified from the venom of the Texas coral snake does not inhibit but potently activates several homomeric and heteromeric ASIC channels and helped to identify a role for peripheral ASIC1a-containing channels in cutaneous pain (13) and to define the structure of the open state of ASIC1a (14). The sea anemone toxin APETx2, a peptide that blocks ASIC3-containing channels (15) and inhibits to some extent Nav1.8 voltage-dependent Na⁺ channels (16, 17), has been used to demonstrate the role of peripheral ASIC3-containing channels in acidic, inflammatory, and postoperative pain (18–20).

Recently, two 57-amino acid peptides called mambalgins have been isolated from the African black mamba venom (21). Mambalgin-1 and mambalgin-2, which belong to the family of three-finger toxins, only differ by one residue at position 4 and display the same pharmacological profile. They specifically inhibit a set of ASIC1-containing channels important for pain to produce potent analgesic effects *in vivo* in mice that can be as strong as morphine but are resistant to naloxone and do not involve opioid receptors. Mambalgins have no apparent toxicity and seem to produce fewer unwanted side effects than morphine, illustrating the potential therapeutic value of these

* This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale, Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-13-BSV4-0009, and the Association Française contre les Myopathies.

¹ Both authors are equivalent last authors.

² To whom correspondence should be addressed: Inst. de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS-UNS UMR7275, 660 route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France. Tel.: 33-4-93-95-34-23; Fax: 33-4-93-95-77-08; E-mail: lingueglia@ipmc.cnrs.fr.

³ The abbreviations used are: ASIC, acid-sensing ion channel; rASIC, rat ASIC; cASIC, chicken ASIC.

Mechanism of ASIC1a Inhibition by Mambalgin-2

ASIC-inhibitory peptides (22). The binding site and the inhibitory mechanism of these peptides, however, are still not known, although it has been recently suggested that mambalgin-2 may bind in close proximity of the acidic pocket of the ASIC1a channel (23).

In the present work, we combined bioinformatics and functional mutant/chimera approaches between ASIC1a (blocked by the toxin) and ASIC2a (not blocked by the toxin) to study the binding site of mambalgin-2 on ASIC1a and its mechanism of action. The relevance of this functional “cut-and-paste” chimera approach has been nicely demonstrated in our previous study of the binding site of the peptide toxin PcTx1 on ASIC1a (24) that gives results fully consistent with the toxin-channel co-crystal data subsequently published (9, 25). We show here that mambalgin-2 binds into the acidic pocket of the extracellular domain of the channel where it interacts with at least three different regions. We propose that the interaction with one of these regions is stimulatory, whereas interactions with the two other regions are inhibitory and probably trap the pH sensor to lock the channel into the closed state.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Homology Modeling—The three-dimensional structure of mambalgin-2 has been obtained from experimental Protein Data Bank file 2MFA (23). The structural model of rASIC1a (UniProt accession number P55926-1 (526 amino acids); construct 45–450) and rASIC2a (UniProt accession number Q62962-1 (512 amino acids); construct 44–449) were generated based on the structures of cASIC1a (57–90% sequence identity). Modeller 9v8 (comparative protein structure modeling program (26)) was used to perform the homology modeling of the open and desensitized forms of the trimer complex based on the experimental structures (Protein Data Bank codes 4FZ0 and 3HGC, respectively). The N and C termini of rASICs were removed as no reliable coordinates are available for these regions. The final model was chosen based on its low value of the Modeller objective function, satisfying the Ramachandran plot (MolProbity) (27), ERRAT (28), and ProQ scores (29) and by visual inspection. No further model optimization was performed.

Docking Studies—The toxin-channel interactions were modeled by *in silico* rigid body docking of the toxin model onto the homology models of rat ASIC1a and ASIC2a using ZDOCK (version 2.3.2f). The structure of the channel in the desensitized state at conditioning pH 7.0 was used. ZDOCK is an initial stage protein-protein docking program (30) that has been successfully tested in a CAPRI experiment (31), which uses scoring functions that are tolerant to conformational changes (by blurring atomic details). By using such an initial stage program, one should expect a good rank for a near-native binding pose although with elusive atomic details. No constraints were placed on the localization of the binding site or on the blocking areas, and no restraint-driven approach was used. Second stage refinement that would include a minimization stage was not performed because homology models of ASICs are low resolution structures. We validated this docking protocol by assessing the cASIC1-PcTx1 interaction, which shows that the best ranked hit superimposes very well with the structure that has

been experimentally determined (Protein Data Bank code 4FZ0 (9)).

Plasmid Constructions and Mutagenesis—The coding sequences of rat ASIC1a and rat ASIC2a (GenBankTM accession numbers U94403 and U53211, respectively) and related chimeras and point mutants (obtained by recombinant PCR strategies as described previously (24)) were subcloned into the NheI/NotI restriction sites of the pCI vector (Promega). When multiple domains were transferred, only these domains and not their connecting sequences were swapped.

Xenopus Oocyte Preparation, DNA Injection, and Electrophysiological Measurements—Animal handling and experiments fully conformed to French regulations and were approved by local governmental veterinary services (authorization number B 06-152-5 delivered by the Ministère de l'Agriculture, Direction des services vétérinaires). Briefly, animals were anesthetized by exposure for 20 min to a 0.2% solution of 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222). Oocytes were surgically removed and dissociated with collagenase type IA (Sigma). pCI-rat ASIC1a (200 pg) and the derived chimeras or pCI-rat ASIC2a (500 pg) and the derived chimeras were injected into *Xenopus* oocyte nuclei. Only homomeric channels were expressed. Oocytes were kept at 19 °C in ND96 solution containing 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, and 5 mM HEPES (pH 7.4 with NaOH); ND96 solution was supplemented with penicillin (6 μg·ml⁻¹) and streptomycin (5 μg·ml⁻¹). Currents were recorded 1–3 days after DNA injection under voltage clamp (Dagan TEV 200 amplifier, Dagan Corp., Minneapolis, MN) using two standard glass microelectrodes (0.5–2.5 megaohms) filled with a 3 mM KCl solution and at a holding potential of –50 mV. Stimulation, data acquisition, and analysis were performed using pCLAMP 9.2 software (Axon Instruments, Union City, CA). All experiments with or without toxin (mambalgin-2 at 200 or 400 nM; PcTx1 at 10–20 nM) were performed at 19–21 °C in ND96 solution supplemented with 0.05% fatty acid- and globulin-free bovine serum albumin (Sigma) to prevent nonspecific adsorption of the toxins to tubing and containers. Changes in extracellular pH were induced by a microperfusion system that allowed local and rapid changes of solutions. HEPES was replaced by MES (5 mM) for buffer solutions with a pH between 6.5 and 5.0 and by acetic acid (5 mM) for solutions between pH 5.0 and 3.0.

Statistical Analysis—Data analysis was performed using GraphPad Prism 4.03 software. Data are represented as means ± S.E., and the statistical significance of differences between sets of data were estimated using the one-way analysis of variance followed by Newman-Keuls multiple comparison post hoc test or using paired Student's *t* test when appropriate (*, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001).

RESULTS

Molecular Docking of Mambalgin-2 on the Three-dimensional Model Structure of Rat ASIC1a Suggests Binding into the Acidic Pocket—Model structures of rat ASIC1a and rat ASIC2a channels were built and used for *in silico* docking of mambalgin-2. Predictions were done on a model of rat ASIC1a channel in the desensitized state (no experimental structure of the channel in the closed state is available yet). The desensitized

Mechanism of ASIC1a Inhibition by Mambalgin-2

state has been shown to be affected to some extent by mambalgin-2 even if the toxin preferentially binds to the closed state of the channel (21). Docking calculations identified hits with the toxin occupying the acidic pocket (Fig. 1, A and B). The acidic pocket (or "pH sensor") of ASIC1a is formed by intrasubunit contacts between the thumb, the β -ball, and the finger domains and intersubunit contacts with the upper palm domain on an adjacent subunit (Fig. 1B, right panel). These domains refer to the model of upright forearm and clenched hand holding a ball proposed for the structure of an ASIC subunit (32). The two transmembrane domains (TM1 and TM2) form the forearm, the junction with the extracellular domain forms the wrist, and the extracellular domain forms the hand divided into palm, knuckle, finger, thumb, and β -ball (Fig. 1B, inset). In our model, mambalgin-2 has an accessible surface area of 4363 Å², and the toxin-ASIC1a complex possesses an interface of 2271 Å². The positively charged finger II of mambalgin-2 is deeply inserted into the acidic cavity at the interface of two subunits (Fig. 1B). Finger I establishes a contact with another concave cavity in the palm of the adjacent subunit, and finger III is in contact with a region of the thumb that is conserved between ASIC1a and ASIC2a (Fig. 1B). The core of the toxin is in contact with another part of the thumb that is divergent between ASIC1a and ASIC2a (Fig. 1B). The docked pose of mambalgin-1, which is only one amino acid different from mambalgin-2, is identical (not shown). Three candidate regions that are divergent between ASIC1a and ASIC2a and are potentially in contact with the toxin were defined from this molecular model. They have been named P (for finger/palm/ β -ball connecting domain), β (for β -ball-containing domain), and T (for upper part of the thumb) (Fig. 1, C–F). However, such molecular docking is of limited precision (it is unclear for instance to what extent our model of ASIC1a is divergent from the closed state of the channel) and only reveals candidate interfaces with mambalgin-2. Thus, additional experiments were done to validate the model of channel-toxin interaction and to analyze the mechanism of inhibition with mutagenesis and functional approaches.

The T, P, and β Domains Participate in Mambalgin-2 Sensitivity—Based on the fact that mambalgin-2 inhibits ASIC1a but not ASIC2a homomeric channels (21), we produced homomeric ASIC1a/2a chimeric channels to analyze the interaction and the inhibitory mechanism of ASIC1a by the toxin.

Mambalgins act as gating modifiers so they inhibit ASIC activity principally by decreasing the apparent proton sensitivity of activation and by slightly increasing the apparent proton sensitivity for inactivation (21). Thus, the effect of the toxins could be dependent on the holding pH, activating pH, and where these pH values fall within the activation/inactivation curve of the channel. Therefore, to properly interpret these data, it is important to assess the pH sensitivity of the mutant/chimeric channels to exclude a possible indirect effect due to altered gating. The pH dependence of the mutant/chimeric channels used in this study and the effect of mambalgin-2 (400 nM) at two holding pH values (7.4 and 8.0) are shown in Table 1 and Fig. 2. They clearly indicate that, even when the properties are modified compared with wild-type channel, none of the effects associated with modification or lack of mambalgin-2 sensitivity can be attributable to gating modifications of the

mutant/chimeric channels, supporting direct effects of the residues and domains studied in toxin interaction.

To first investigate the respective role of domains P, β , and T in the toxin effect, we constructed loss-of-function chimeras where these domains in ASIC1a were replaced by those of ASIC2a (chimeras 1a/2aP, 1a/2a β , and 1a/2aT). Channels were expressed in the *Xenopus* oocyte expression system, and the effect of mambalgin-2 (400 nM) was tested (Fig. 3). As expected, ASIC1a was nearly completely inhibited by mambalgin-2 ($I_{\text{mamb-2}}/I_{\text{CTR}} = 7 \pm 1\%$; Fig. 3, A and E). Chimeras in which domain P or domain β was replaced (chimeras 1a/2aP and 1a/2a β , respectively) showed a significant decreased efficacy of the toxin ($I_{\text{mamb-2}}/I_{\text{CTR}} = 20 \pm 2\%$ and $57 \pm 5\%$, respectively; Fig. 3, B, C, and E). These two domains, therefore, appear to be directly involved in toxin interaction. When domain T was replaced (chimera 1a/2aT), the chimeric channel became almost insensitive to mambalgin-2 ($I_{\text{mamb-2}}/I_{\text{CTR}} = 97 \pm 1\%$; Fig. 3, D and E), suggesting a central role for this domain in toxin interaction.

Eight residues are divergent between domain T of ASIC1a and ASIC2a (Fig. 1F), but only five of them are located in proximity to the contact surface with the toxin based on our docking model (Fig. 3F). Each residue of ASIC1a was individually mutated by the corresponding residue of ASIC2a (Fig. 3G). Point mutants V352A, Q356S, and E357N displayed similar behavior compared with wild-type ASIC1a; *i.e.* they were potently and evenly inhibited by mambalgin-2 ($I_{\text{mamb-2}}/I_{\text{CTR}} = 28 \pm 3$, 34 ± 8 , and $25 \pm 7\%$; respectively, compared with $27 \pm 4\%$ for ASIC1a with 200 nM toxin; Fig. 3G). This is consistent with the lack of apparent interaction seen in the docking model (Fig. 3F). On the other hand, the D349G and F350L mutants displayed a reduced inhibition by mambalgin-2 with the strongest effect observed for the F350L mutation ($I_{\text{mamb-2}}/I_{\text{CTR}} = 51 \pm 5$ and $89 \pm 2\%$, respectively, with 200 nM toxin and 16 ± 5 and $54 \pm 4\%$, respectively, with 400 nM toxin; Fig. 3G). This is consistent with the potent dose-dependent decrease in mambalgin-2 efficacy recently described in the F350A mutant channel (23). Replacing both residues in the double mutant D349G,F350L (named 1aDF/GL) drastically decreased the sensitivity to the toxin ($I_{\text{mamb-2}}/I_{\text{CTR}} = 101 \pm 2$ and $86 \pm 2\%$ with 200 and 400 nM mambalgin-2, respectively; Fig. 3G) and explained most of the effect observed in chimera 1a/2aT. Residue Phe-350 could be important in the formation of a hydrophobic patch to form part of the binding surface of the toxin, and residue Asp-349, which participates in the pH sensor, could directly interact with the positive charges of the toxin similarly to what has been shown for the toxin PcTx1 (9, 25).

Overall these results support the participation of the thumb, adjacent palm, and β -ball of ASIC1a in mambalgin-2 sensitivity. They confirm the role of residue Phe-350 and identify residue Asp-349, which are located in the upper part of the thumb domain close to the acidic pocket, in the sensitivity to the toxin presumably through a direct interaction.

Mambalgin-2 Binding Exerts Both Stimulatory and Inhibitory Effects on ASICs Supported by the T and P Domains, Respectively—To further explore the respective role of domains P, β , and T in the toxin effect, complementary gain-of-function chimeras were constructed in which domains of ASIC1a were

Mechanism of ASIC1a Inhibition by Mambalgin-2

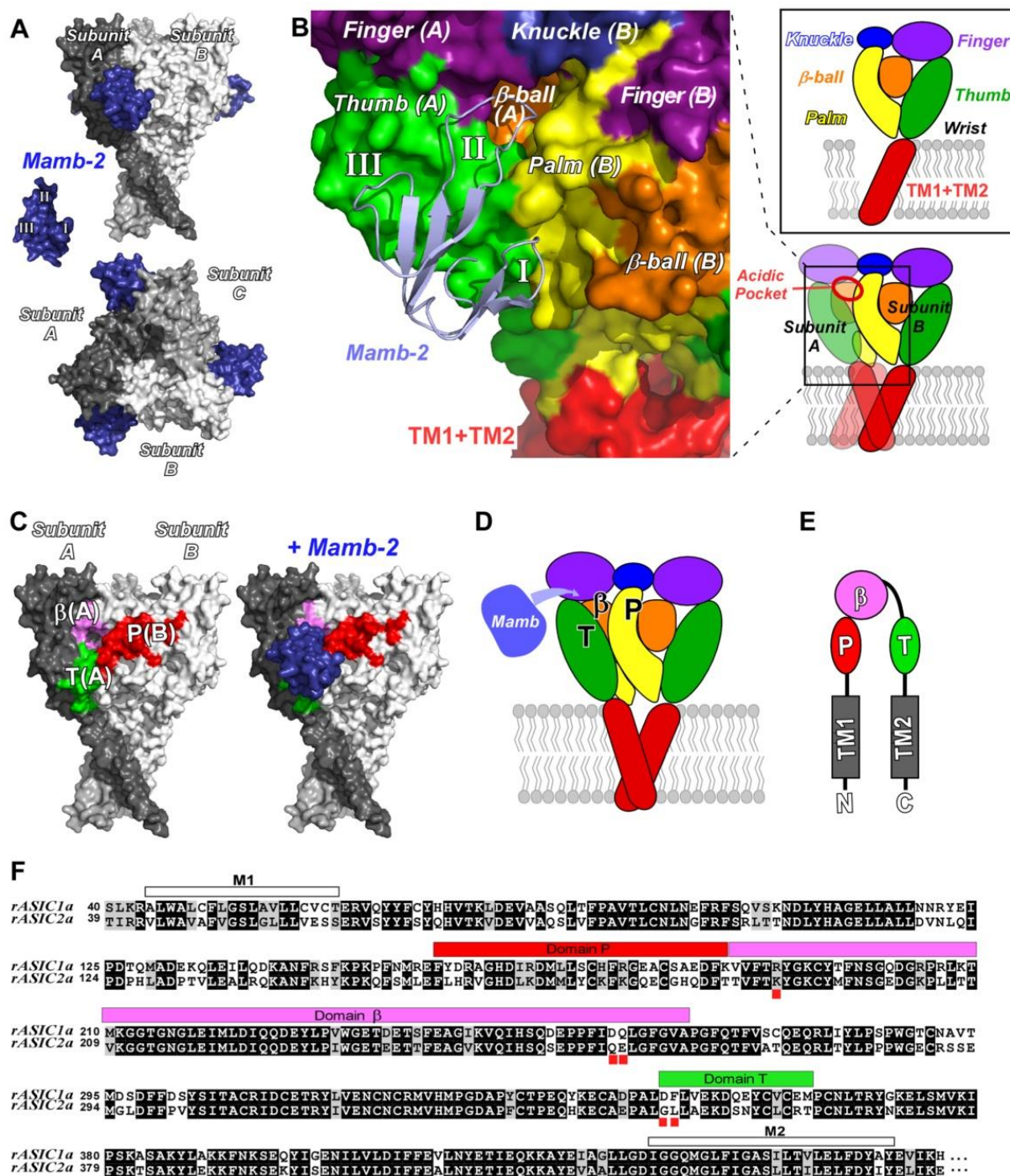


FIGURE 1. Molecular docking of mambalgin-2 on the three-dimensional model structure of rat ASIC1a. *A*, surface representation of the ASIC1a-mambalgin-2 complex (side view in the top panel and top view in the bottom panel). Subunits are shown with different gray levels; toxins are shown in blue. The structure of mambalgin-2 (*Mamb-2*) alone is shown on the left with labeling of the different fingers (see Ref. 23 for further details on the structure). *B*, close view of the mambalgin-2 binding site at the interface between subunits A and B (a mapping of the region in a schematic of the trimeric channel is displayed at the bottom right). The toxin with its fingers I, II, and III is shown in blue ribbon. Domains in the ASIC1a extracellular loop are shown with different colors and refer to the domains identified by Jasti *et al.* (32) and listed in the inset. Transmembrane domains 1 and 2 are represented by only one red block (TM1+TM2). *C*, localization of the three domains potentially located at the interface with mambalgin-2 on a surface representation of a trimeric rat ASIC1a channel (side view). *D* and *E*, localization of the same domains on a schematic representation of the channel (*D*) and on a linear representation of an isolated subunit (*E*). *F*, protein sequence alignment of the rat ASIC1a and ASIC2a proteins (the N- and C-terminal cytoplasmic domains are not shown). Amino acids that are identical or similar are printed white on black or black on gray background, respectively. The two transmembrane domains (M1 and M2) as well as domains P, beta, and T are indicated above the sequences. Key residues identified in this study for the mambalgin-2 effect are highlighted by red squares.

Mechanism of ASIC1a Inhibition by Mambalgin-2

TABLE 1
Functional properties of chimeras and mutants

The $pH_{0.5}$ of activation ($pH_{0.5}$ act) was modified for most chimeras and mutants (see Fig. 2 for curves). However, activation was always shifted toward more acidic pH compared with wild-type ASIC1a, which means that channels have a more stable closed state. The mambalgin effect is largely supported by a shift of the activation curves toward more acidic pH; *i.e.* it stabilizes the closed state of the channel (21). One would therefore expect, if the effects are supported by gating modifications, a more potent inhibition of these chimeras and mutants by the toxin, which was not the case. The $pH_{0.5}$ of inactivation ($pH_{0.5}$ inact) was also modified in some channels, but at holding pH 7.4, which was used in our experimental conditions, all chimeras and mutants were in the closed state before test with pH 5.0 (curves shown in Fig. 2). In addition, the effect of mambalgin-2 (Mamb-2) was not significantly different from a holding pH of 7.4 or 8.0, excluding an effect due to a modification of the pH-dependent inactivation in the presence of toxin (note that only the double mutant 1aD349G,F350L was tested and not the related single mutants 1aD349G and 1aF350L). Changes of the initial biophysical properties of the different chimeras and mutants are thus not able to explain the effects we observed, supporting a direct alteration of the contact between the chimeric (or mutated) channels and the toxin. ND, not determined.

Channels	pH dependence ($n = 4-7$)		Current after incubation with 400 nM Mamb-2	
	$pH_{0.5}$ act	$pH_{0.5}$ inact	From holding pH 7.4 ($n = 7-24$)	From holding pH 8.0 ($n = 5-13$)
1a	6.36 ± 0.03	7.10 ± 0.01	7 ± 1	7 ± 1
1a/2aT	5.00 ± 0.03	6.76 ± 0.01	97 ± 1	97 ± 2
1a/2aP	5.31 ± 0.02	7.17 ± 0.01	20 ± 2	20 ± 4
1a/2aβ	5.42 ± 0.07	6.71 ± 0.02	57 ± 5	60 ± 7
1aRDQ-KQE	5.50 ± 0.07	6.90 ± 0.01	46 ± 6	46 ± 10
1a/2aP+RDQ-KQE	4.47 ± 0.01	7.01 ± 0.01	585 ± 60	666 ± 67
1aD349G	5.96 ± 0.07	7.11 ± 0.01	16 ± 5	ND
1aF350L	5.63 ± 0.04	7.05 ± 0.01	54 ± 4	ND
1aDF/GL	5.08 ± 0.07	7.08 ± 0.01	86 ± 2	85 ± 2
2a	4.48 ± 0.09	5.05 ± 0.04	100 ± 1	99 ± 1
2a/1aT	4.50 ± 0.12	5.92 ± 0.02	195 ± 9	174 ± 7
2a/1aT+P	4.46 ± 0.05	5.99 ± 0.02	69 ± 5	75 ± 2
2a/1aT+β	4.70 ± 0.06	6.33 ± 0.01	195 ± 8	199 ± 14

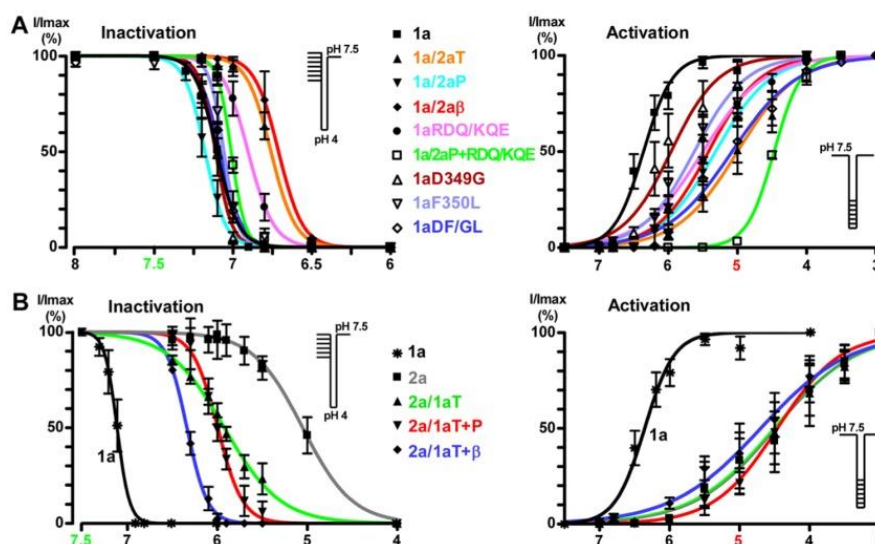


FIGURE 2. pH-dependent activation and inactivation of the chimera and mutant currents. ASIC1a-based and ASIC2a-based chimeras are shown in A and B, respectively. Solid lines are fits of the mean values of each data point to a sigmoidal dose-response curve with variable slope. See Table 1 for $pH_{0.5}$ of activation and inactivation; the protocol is shown in the inset. Data points and error bars represent the mean ± S.E.

inserted into ASIC2a (Fig. 4). As described previously (21), ASIC2a was not sensitive to mambalgin-2 (Fig. 4A; 400 nM toxin). Insertion of domain T of ASIC1a in ASIC2a (chimera 2a/1aT) was associated with a current that was surprisingly not inhibited but potentiated by mambalgin-2 ($I_{mamb-2}/I_{CTR} = 195 \pm 9\%$; Fig. 4, B and E). This confirms that domain T (*i.e.* the upper part of the thumb domain) is central to confer interaction and sensitivity to the toxin but suggests that it is not sufficient to explain the inhibitory effect.

ASIC1a-based loss-of-function chimeras showed that domains P and β are also directly involved in toxin interaction (Fig. 3). Therefore, we combined together domain T, which is mandatory for toxin sensitivity, and domain P of ASIC1a (chimera 2a/1a(T+P)) in ASIC2a to further analyze the contribu-

tion of domain P in the toxin effect. Interestingly, inhibition by mambalgin-2 was partially restored in this chimera ($I_{mamb-2}/I_{CTR} = 69 \pm 5\%$; Fig. 4, C and E). Therefore, domain P seems necessary to partially reproduce the mechanism of inhibition in the presence of domain T of ASIC1a. On the other hand, combining together domain T and domain β of ASIC1a in ASIC2a (chimera 2a/1a(T+β)) did not affect the potentiating effect of domain T ($I_{mamb-2}/I_{CTR} = 195 \pm 8\%$; Fig. 4, D and E), suggesting that domain β of ASIC1a is not able, contrary to domain P, to contribute to the toxin effect in the context of this chimera.

These results confirm that the upper thumb (domain T) of ASIC1a is necessary and sufficient to confer sensitivity to mambalgin-2, but it alone evokes a potentiating effect through destabilization of the closed state of the channel (Fig. 5, D and F).

Mechanism of ASIC1a Inhibition by Mambalgin-2

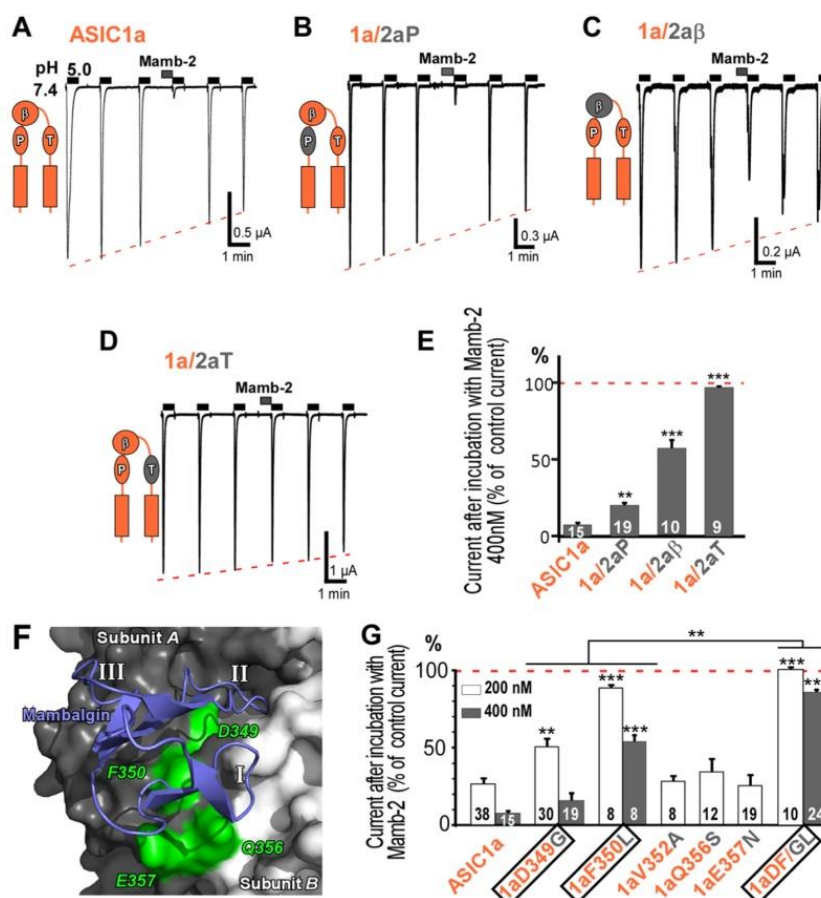


FIGURE 3. The P, β , and T domains are needed for sensitivity to mambalgin-2. A–D, representative current traces generated by ASIC1a and ASIC1a/2a chimeras and evoked by pH 5.0 pulses of 30 s made at 1-min intervals from a holding pH of 7.4 (holding potential, -50 mV). Mambalgin-2 (*Mamb-2*) (400 nM) was applied for 30 s before the pH pulse. Three pulses before toxin application and two pulses after washing are shown for consistency. The red dashed line represents the current rundown, and a schematic illustrating the domain in ASIC1a that was swapped is shown beside the current trace for each chimera. E, bar graph representing the effects shown in A–D expressed as a percentage of the control current without toxin. The number of oocytes analyzed is shown within each histogram. Error bars represent S.E. Statistical comparison is with ASIC1a. F, mapping on the three-dimensional model structure of the ASIC1a-mambalgin-2 complex of residues in domain T that were mutated and are putatively involved in the interaction with mambalgin-2 (toxin shown in ribbon representation). Note that Val-352 cannot be displayed because it points toward the interior of the channel. G, bar graph representing the effect of mambalgin-2 (200 and 400 nM) on the different ASIC1a point mutants shown in F. The number of oocytes analyzed is indicated within each histogram. Data are means \pm S.E. (error bars). Statistical comparison is with ASIC1a unless specified.

Association with domain P of ASIC1a is mandatory to reproduce, at least partially, the inhibitory mechanism through stabilization of the closed state (Fig. 5, E and F).

Three Residues in the β -Ball at the Bottom of the Acidic Pocket Are Necessary to Confer Inhibition by Mambalgin-2—Replacing domain β of ASIC1a by that of ASIC2a in chimera 1a/2a β decreased toxin inhibition (Fig. 3, C and E), suggesting a role for this domain in mediating the toxin effect. However, complementary chimera in which domain β of ASIC2a was replaced by the one of ASIC1a in the presence of domain T of ASIC1a did not confirm the role of domain β (Fig. 4, D and E). To clarify the role of domain β in the mambalgin-2 inhibition, we analyzed the effect of mutations of this domain in a chimera in which domain P of ASIC1a was replaced by that of ASIC2a (*i.e.* lacking the inhibitory effect associated with domain P of ASIC1a; chimera 1a/2aP; $I_{\text{mamb-2}}/I_{\text{CTR}} = 20 \pm 2\%$; Fig. 6B). Molecular docking data point out four amino acids in the β -ball of the same subunit (Arg-190, Asp-237, Asp-258, and Gln-259) that

are divergent between ASIC1a and ASIC2a and are located deep in the acidic pocket and close enough to loop II of mambalgin-2 to interact with it (Fig. 6A). These residues were mutated individually or in combination. Mutation of Arg-190 (1a/2aP+R190K) or double mutation of Asp-258 and Gln-259 (1a/2aP+DQ-QE) reversed or significantly decreased the inhibitory effect of the toxin ($I_{\text{mamb-2}}/I_{\text{CTR}} = 112 \pm 2$ and $70 \pm 5\%$, respectively; Fig. 6B), whereas mutation of Asp-237 (1a/2aP+D237E) had no significant effect ($I_{\text{mamb-2}}/I_{\text{CTR}} = 21 \pm 2\%$; Fig. 6B). Interestingly, combining together the three mutations that affect toxin inhibition (1a/2aP+RDQ-KQE) had a huge effect, making the channel strongly potentiated by the toxin ($I_{\text{mamb-2}}/I_{\text{CTR}} = 585 \pm 60\%$; Fig. 6B). When the three mutations were combined together in ASIC1a but without swapping of domain P (triple mutant 1a-RDQ-KQE), inhibition was observed, which is consistent with the presence of inhibitory domain P of ASIC1a ($I_{\text{mamb-2}}/I_{\text{CTR}} = 46 \pm 6\%$; Fig. 6B). The level of inhibition was comparable with that observed after

Mechanism of ASIC1a Inhibition by Mambalgin-2

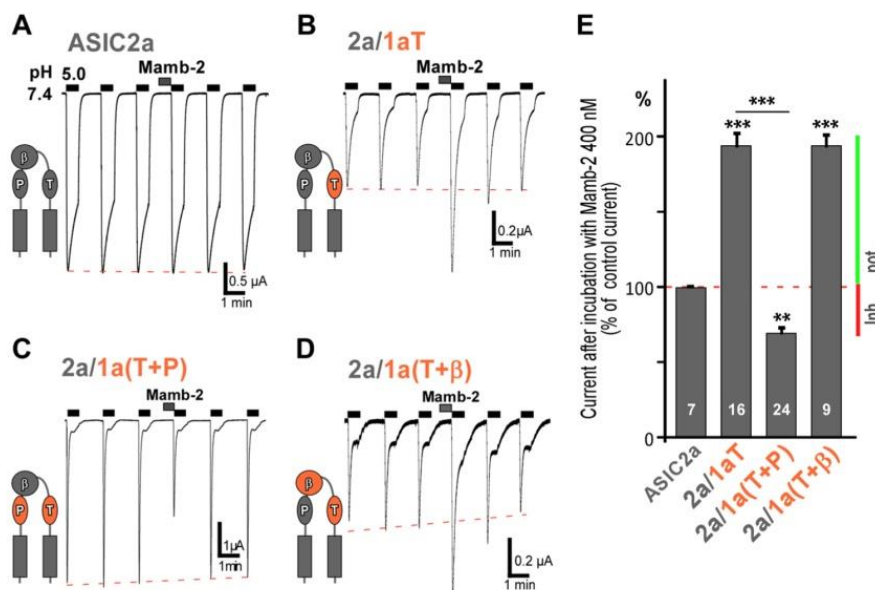


FIGURE 4. Binding of mambalgin-2 exerts both stimulatory and inhibitory effects on ASIC channels supported by domains T and P, respectively. A–D, representative current traces generated by ASIC2a and ASIC2a/1a chimeras. Experimental conditions were similar to those in Fig. 3 (400 nM mambalgin-2 (*Mamb-2*)). Domains in ASIC2a that were swapped are shown in a schematic beside each chimera. E, bar graph representing the effects shown in A–D. The number of oocytes analyzed is mentioned within each histogram. Data are means ± S.E. (error bars). Statistical comparison is with ASIC2a unless specified. Inhibition (*Inh.*) or potentiation (*pot.*) of the current by the toxin is indicated by a red or green bar, respectively.

replacement of the whole domain β in chimera 1a/2a β ($I_{mamb-2}/I_{CTR} = 57 \pm 5\%$; Fig. 6B), supporting the key role of residues Arg-190, Asp-258, and Gln-259 in the effect of domain β . Thus, these results confirm the importance of domain β for inhibition by mambalgin-2 in addition to domain P. The strongest effect was obtained when both domains were present, but each domain was already able on its own to confer a significant inhibition in the ASIC1a context (see Fig. 3, B and C). The potent effect observed when they were both replaced or mutated suggests that other divergent domains between ASIC1a and ASIC2a should have only a minor contribution in the inhibition mechanism of mambalgin-2.

These data identify three important residues in the β -ball located at the bottom of the acidic pocket that probably interact with the toxin and contribute to the inhibition mechanism. Suppressing at the same time in ASIC1a the inhibitory components associated with these residues and with domain P unveiled a robust potentiating effect of the toxin through destabilization of the closed state of the channel (Fig. 5, C and F), further supporting the dual effect mediated by binding of mambalgin-2 on ASIC1a, *i.e.* potentiation (through domain T) and inhibition (through domains P and/or β).

DISCUSSION

Our bioinformatics and mutagenesis data propose that mambalgin-2 binds to the ASIC1a channel in the acidic pocket at the interface of two subunits principally through the upper part of the thumb (residues Asp-349 and Phe-350) and interferes with the upper palm (domain P) on the adjacent subunit and with residues of the β -ball (Arg-190, Asp-258, and Gln-259) located at the bottom of the acidic pocket on the same subunit (Fig. 6A).

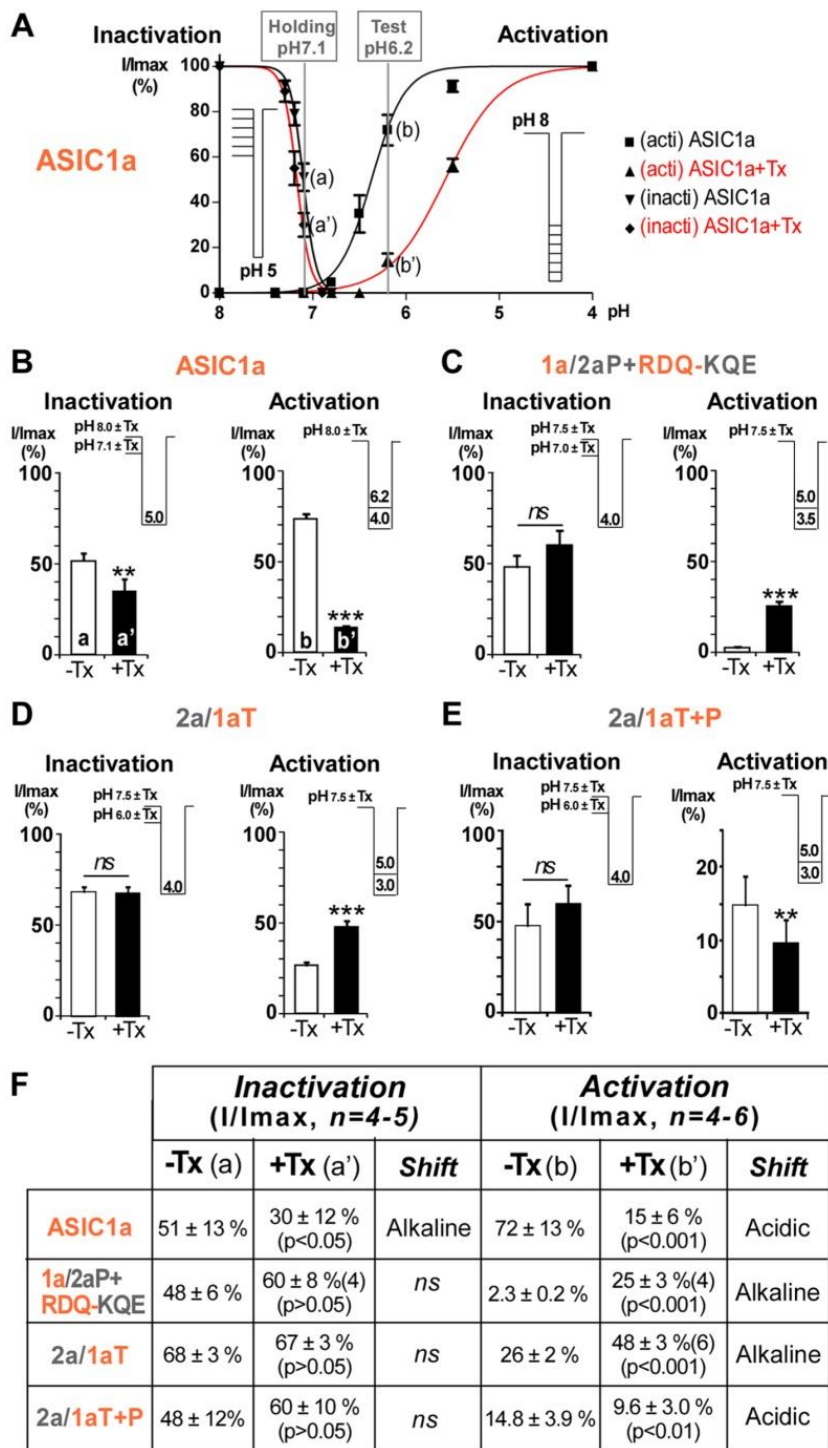
The Finger/Palm/ β -Ball Connecting Domain (Domain P) and the β -Ball Domain Are Central for the Inhibition Effect of Mambalgin-2—Our model suggests that mambalgin-2 establishes a contact with the upper palm (domain P) to principally stabilize the channel in its closed state as shown by the large shift of the pH-dependent activation curve to more acidic pH that promotes closure of the channel whatever the conditioning pH (21). Kellenberger and co-worker have shown that some residues belonging to the upper palm domain form a contact with the finger and the adjacent β -ball in ASIC1a (33). They have demonstrated that this zone undergoes conformational changes during inactivation and that chemical modification of this contact region decreases the probability of channel opening. These results are consistent with our model of an inhibitory action of the toxin through its contact with this key region. Domain P also corresponds to the upper palm domain that is essential for the spider toxin PcTx1 to stabilize the inactivated state of ASIC1a, leading to peak current inhibition (24, 34), or the open state of ASIC1b, promoting opening (35). This is in good agreement with our data showing that the toxin/palm contact is determinant to explain inhibition of the peak current or stimulation when this interaction is modified. Domain P has also been proposed to constitute part of the binding site of diarylamidines, which are inhibitors of ASICs (36).

Besides domain P of an adjacent subunit, the inhibition mechanism by mambalgin-2 also involves a contact with the β -ball of the same subunit. Only one of these ASIC1a domains (*i.e.* domain P or β) is sufficient to produce inhibition, which is relevant to the capacity of mambalgins to inhibit heteromultimeric channels made from the association of ASIC1a and ASIC2a subunits (21). These channels are expected to exhibit

Mechanism of ASIC1a Inhibition by Mambalgin-2

the domain P of ASIC2a at the interface between subunits but to retain the β -ball of the same ASIC1a subunit in the acidic pocket. This could also explain inhibition by mambalgins of other heteromultimers like ASIC1a+ASIC1b and ASIC1a+ASIC2b (21), which all present divergent P domains at their interface.

A pH Sensor-trapping Mechanism May Account for the Effect of Mambalgins and Other Toxins Targeting the Acidic Pocket— We propose a model for inhibition of ASIC1a by mambalgins that takes into account all of our results. Binding of the toxins into the acidic pocket in the closed state of the channel (Fig. 7A) could be associated with movement of the thumb similarly to



Mechanism of ASIC1a Inhibition by Mambalgin-2

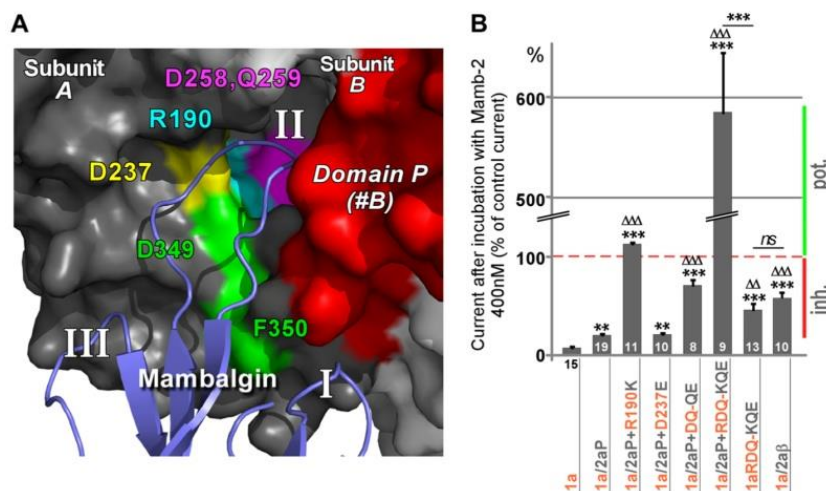


FIGURE 6. Residues of the β -ball at the bottom of the acidic pocket are necessary for inhibition by mambalgin-2. *A*, magnification of the modeled interaction between finger II of mambalgin-2 and the acidic pocket of ASIC1a at the interface between subunits A and B. Amino acids of the β -ball putatively involved in the interaction and mutated in subunit B are shown in different colors. Domain P from subunit B is shown in red, and residues Asp-349 and Phe-350 identified in Fig. 3 are also shown. *B*, bar graph representing the effect of mambalgin-2 (*Mamb-2*) on different chimeras bearing the domain P of ASIC2a and/or point mutations of key residues from the β -ball of ASIC1a (mapped in *A*). The number of oocytes analyzed is shown within (or below) each histogram. Data are means \pm S.E. (error bars). Statistical comparison is with ASIC1a (*) or ASIC1a/2aP (Δ) unless specified. Inhibition (*Inh.*) or potentiation (*pot.*) of the current by the toxin is indicated by a red or green bar, respectively.

what is happening during a pH pulse (9, 37, 38). However, the channel is not activated because a conformational change of the palm is also required for opening (9, 14, 37, 38). This conformational change is prevented by the contact of mambalgins with domain P of the second subunit and with the β -ball of the first subunit, trapping the channel in the closed conformation. Modification of the upper thumb domain, as in chimera ASIC1a/2aT, probably strongly affects binding of the toxin and therefore prevents its effect on the channel (Fig. 7*B*). Modification of the interactions of the P or β -ball domains with the toxin, as in chimera ASIC1a/2aP (Fig. 7*C*) or ASIC1a-RDQ-KQE (Fig. 7*D*), is not sufficient to suppress the pH sensor-trapping mechanism but leads to a decreased inhibitory effect. Conversely, the paradoxical potentiating effect of the toxin seen in the chimera 1a/2a(P+RDQ-KQE) (Fig. 7*E*) is explained by the presence of the toxin thumb stimulatory mechanism conferred by the thumb of ASIC1a in the absence of any inhibitory mechanism (domains P and β from ASIC2a). This model illustrates the idea that mambalgins induce both stimulatory and inhibitory mechanisms and that it is the result of their respective influences that produces the final effect.

The PcTx1 toxin also binds in the acidic pocket of ASIC1a (9, 25) and shows appreciable overlap with the binding site of mambalgin-2. Residue Arg-190 in the β -ball of chicken ASIC1a

has been shown to be in indirect contact with PcTx1 (9), and residues Asp-349 and Phe-350 are directly involved in the binding of the toxin through formation of a hydrogen bond and of a hydrophobic patch, respectively (9, 25). However, PcTx1 principally stabilizes the inactivated state of rat ASIC1a, and its mechanism of action is significantly different from that of mambalgins (34). Interestingly, PcTx1 has a differential effect on ASIC1a and ASIC1b, *i.e.* inhibition and potentiation, respectively, that has been associated with the upper palm (*i.e.* P domain) (35). Modification of the interface with the P domain in chimera ASIC1a/2aP also led to current potentiation by PcTx1 as in ASIC1b (Fig. 8*B*). Similarly, chicken ASIC1a for which only weak contacts between PcTx1 and domain P have been identified (9) shows potentiation of the peak current by PcTx1 (6). In rat ASIC1a, modification of the interface with the β -ball also led to current potentiation by PcTx1 in chimera ASIC1a-RDQ-KQE (Fig. 8*C*) and in previously characterized chimeras between ASIC1a and ASIC2a (24). All these observations are fully compatible with the pH sensor-trapping mechanism proposed here. They suggest that inhibition of rat ASIC1a by PcTx1 via stabilization of the inactivated state of the channel requires interactions with adjacent palm and β -ball. However, interaction with both domains together seems necessary for inhibition by PcTx1, whereas interaction with only one of them

FIGURE 5. Effect of mambalgin-2 on the pH-dependent activation and inactivation of different chimera currents. *A*, inactivation ratios (I/I_{max}) for ASIC1a were calculated in the absence or presence of toxin after stimulation at pH 5.0 from holding pH 8.0 (I_{max}) and holding pH 7.1 (*I*), a value chosen in the descending part of the curves (*a* or *a'*). Activation ratios (I/I_{max}) for ASIC1a were calculated in the absence or presence of toxin from holding pH 8.0 and after stimulation at pH 4.0 (I_{max}) and pH 6.2 (*I*), a value selected in the ascending part of the curves (*b* or *b'*). Protocols used to generate the inactivation (*inacti*) and activation (*acti*) curves are shown in the inset, *i.e.* variable holding pH values and test pH 5.0 for inactivation and holding pH 8.0 and variable test pH values for activation. *B–E*, inactivation and activation ratios for ASIC1a (*B*) and different chimeras (*C–E*). Test and holding pH values for the different chimeras were chosen to be in the ascending or descending portion of the activation and inactivation curves, respectively, based on their properties shown in *A* (for ASIC1a) and in Table 1 and Fig. 2. Protocols are indicated in the inset with short horizontal lines indicating variable holding pH and unique test pH (for inactivation) and variable test pH from a unique holding pH (for activation). Recordings with or without mambalgin-2 (400 nM; except for ASIC1a 200 nM) were made on the same oocyte (paired measures). Error bars represent S.E. *F*, ratios corresponding to data shown in *B–E*. The pH-dependent inactivation is not significantly affected by mambalgin-2 in the different chimeras, but the pH-dependent activation is shifted toward more alkaline pH (chimeras 1a/2aP+RDQ-KQE and 2a/1aT) or more acidic pH (chimera 2a/1aT+P). This shift of the activation curve toward more acidic or more alkaline pH represents stabilization or destabilization of the closed state of the channel, respectively, and explains in large part inhibition or potentiation by the toxin. *ns*, no significant shift of the curve; *Tx*, toxin mambalgin-2.

Mechanism of ASIC1a Inhibition by Mambalgin-2

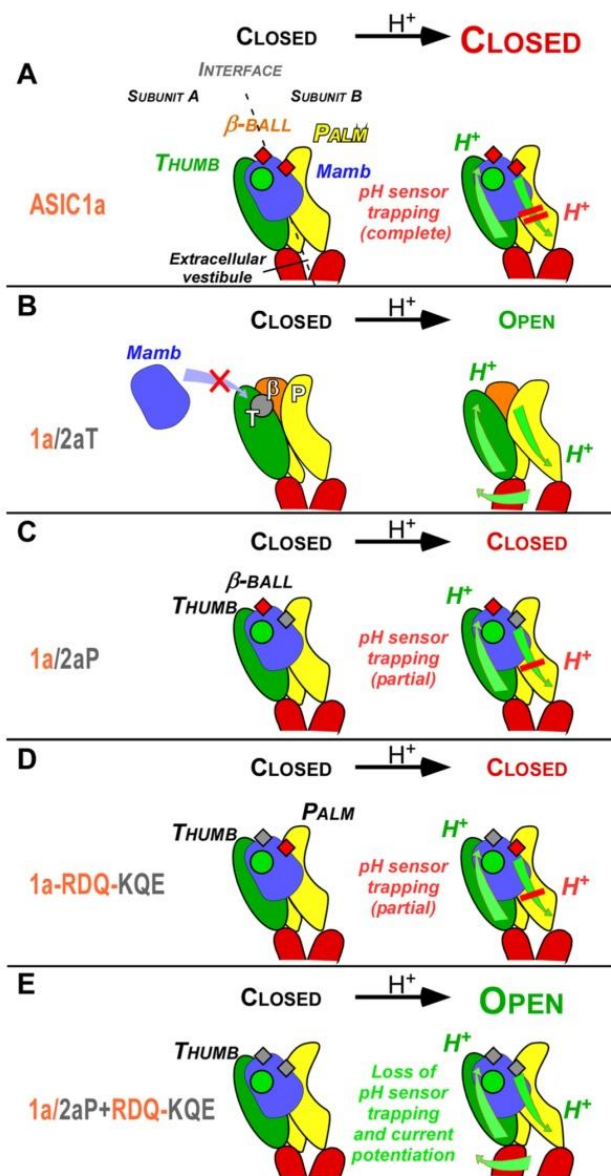


FIGURE 7. A pH sensor-trapping model for inhibition of ASIC1a by mambalgins. A model to describe the interaction of mambalgins on rat ASIC1a is shown together with the proposed mechanism of gating modulation. The model was challenged with four representative chimeras described in the study that differentially affect the pH-activated current. Conformational changes are represented by green arrows, the interaction between mambalgin (Mamb) and the thumb domain crucial for toxin binding and the potentiating effect is symbolized by a circle (in green if formed and destabilizing the closed state or in gray if disrupted), and interfaces with the β -ball and palm domains are symbolized by small squares (in red if stabilizing the closed state or in gray if altered). Protonation by low pH of the acidic pocket and of the lower palm domain is indicated. See "Discussion" for details.

is sufficient to achieve inhibition by mambalgin-2 via stabilization of the closed state of the channel.

In conclusion, the present work gives information on the binding site and inhibitory mechanism of mambalgin-2 on ASIC1a. Even if more in-depth analysis will certainly require co-crystals of ASIC1a with the toxin, our data show that the peptide exerts both stimulatory and inhibitory effects on

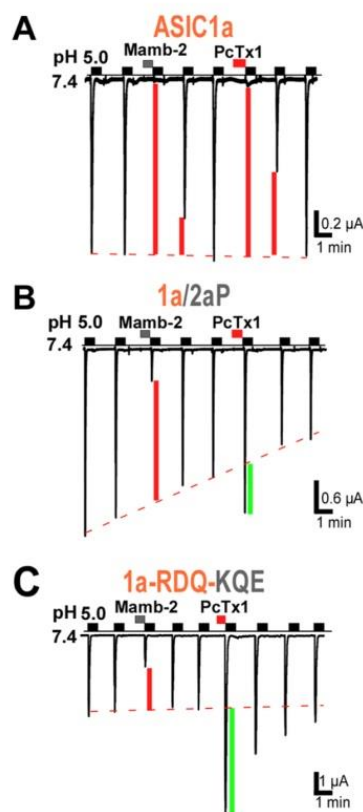


FIGURE 8. Comparison of the effect of mambalgin-2 and PcTx1 on the ASIC1a/2aP chimera and ASIC1a-RDQ-KQE triple mutant. PcTx1 inhibited ASIC1a ($I_{PcTx1}/I_{CTR} = 8 \pm 2\%$, $n = 4$) but evoked current potentiation in chimera ASIC1a/2aP ($I_{PcTx1}/I_{CTR} = 153 \pm 7\%$, $n = 10$) and in mutant ASIC1a-RDQ-KQE ($I_{PcTx1}/I_{CTR} = 312 \pm 63\%$, $n = 4$) contrary to mambalgin-2, which has an inhibitory effect in both cases. Inhibition or potentiation of the current by the toxin is indicated by a red or green bar, respectively.

ASIC1a by way of different regions and suggest inhibition by a pH sensor-trapping mechanism. Sensor trapping appears to be a prevalent mechanism used by toxins to alter the gating of ion channels (39). This work may lead to the development of new modulators of ASIC1a that are of particular interest regarding the increasing suggested roles of this channel in pain and neurological and psychiatric diseases (3, 5, 40).

Acknowledgments—We thank A. Baron, E. Deval, J. Noël, S. Cestele, A. Delaunay, M. Christin, S. Marra, P. Inquimbent, and X. Gasull for discussions and comments; M. Lazdunski for support; V. Friend, M. Dauvois, and N. Leroudier for expert technical assistance; and C. Chevanne for secretarial assistance.

REFERENCES

- Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* **386**, 173–177
- Deval, E., Gasull, X., Noël, J., Salinas, M., Baron, A., Diochot, S., and Lingueglia, E. (2010) Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol. Ther.* **128**, 549–558
- Noël, J., Salinas, M., Baron, A., Diochot, S., Deval, E., and Lingueglia, E. (2010) Current perspectives on acid-sensing ion channels: new advances and therapeutic implications. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **3**, 331–346

Mechanism of ASIC1a Inhibition by Mambalgin-2

4. Sluka, K. A., Winter, O. C., and Wemmie, J. A. (2009) Acid-sensing ion channels: a new target for pain and CNS diseases. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **12**, 693–704
5. Wemmie, J. A., Taugher, R. J., and Kreple, C. J. (2013) Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 461–471
6. Baron, A., Diochot, S., Salinas, M., Deval, E., Noël, J., and Lingueglia, E. (2013) Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicol.* **75**, 187–204
7. Escoubas, P., De Weille, J. R., Lecoq, A., Diochot, S., Waldmann, R., Champigny, G., Moinier, D., Ménez, A., and Lazdunski, M. (2000) Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **275**, 25116–25121
8. Sherwood, T. W., Lee, K. G., Gormley, M. G., and Askwith, C. C. (2011) Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death. *J. Neurosci.* **31**, 9723–9734
9. Bacongus, I., and Gouaux, E. (2012) Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. *Nature* **489**, 400–405
10. Samways, D. S., Harkins, A. B., and Egan, T. M. (2009) Native and recombinant ASIC1a receptors conduct negligible Ca²⁺ entry. *Cell Calcium* **45**, 319–325
11. Duan, B., Wu, L. J., Yu, Y. Q., Ding, Y., Jing, L., Xu, L., Chen, J., and Xu, T. L. (2007) Upregulation of acid-sensing ion channel ASIC1a in spinal dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J. Neurosci.* **27**, 11139–11148
12. Mazzuca, M., Heurteaux, C., Alloui, A., Diochot, S., Baron, A., Voilley, N., Blondeau, N., Escoubas, P., Gélot, A., Cupo, A., Zimmer, A., Zimmer, A. M., Eschalier, A., and Lazdunski, M. (2007) A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat. Neurosci.* **10**, 943–945
13. Bohlen, C. J., Chesler, A. T., Sharif-Naeini, R., Medzihradzsky, K. F., Zhou, S., King, D., Sánchez, E. E., Burlingame, A. L., Basbaum, A. I., and Julius, D. (2011) A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* **479**, 410–414
14. Bacongus, I., Bohlen, C. J., Goehring, A., Julius, D., and Gouaux, E. (2014) X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na-selective channel. *Cell* **156**, 717–729
15. Diochot, S., Baron, A., Rash, L. D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., and Lazdunski, M. (2004) A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* **23**, 1516–1525
16. Blanchard, M. G., Rash, L. D., and Kellenberger, S. (2012) Inhibition of voltage-gated Na⁺ currents in sensory neurons by the sea anemone toxin APETx2. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2167–2177
17. Peigneur, S., Béress, L., Möller, C., Mari, F., Forssmann, W. G., and Tytgat, J. (2012) A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins. *FASEB J.* **26**, 5141–5151
18. Deval, E., Noël, J., Gasull, X., Delaunay, A., Alloui, A., Friend, V., Eschalier, A., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2011) Acid-sensing ion channels in postoperative pain. *J. Neurosci.* **31**, 6059–6066
19. Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., Friend, V., Jodar, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2008) ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J.* **27**, 3047–3055
20. Karczewski, J., Spencer, R. H., Garsky, V. M., Liang, A., Leitl, M. D., Cato, M. J., Cook, S. P., Kane, S., and Urban, M. O. (2010) Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 950–960
21. Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A. S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2012) Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* **490**, 552–555
22. Woolf, C. J. (2013) Pain: morphine, metabolites, mambas, and mutations. *Lancet Neurol.* **12**, 18–20
23. Schroeder, C. I., Rash, L. D., Vila-Farrés, X., Rosengren, K. J., Mobli, M., King, G. F., Alewood, P. F., Craik, D. J., and Durek, T. (2014) Chemical synthesis, 3D structure, and ASIC binding site of the toxin mambalgin-2. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 1017–1020
24. Salinas, M., Rash, L. D., Baron, A., Lambeau, G., Escoubas, P., and Lazdunski, M. (2006) The receptor site of the spider toxin PcTx1 on the proton-gated cation channel ASIC1a. *J. Physiol.* **570**, 339–354
25. Dawson, R. J., Benz, J., Stohler, P., Tetaz, T., Joseph, C., Huber, S., Schmid, G., Hügin, D., Pflimlin, P., Trube, G., Rudolph, M. G., Hennig, M., and Ruf, A. (2012) Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier psalmotoxin 1. *Nat. Commun.* **3**, 936
26. Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., Pieper, U., and Sali, A. (2006) Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **Chapter 5**, Unit 5.6
27. Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21
28. Colovos, C., and Yeates, T. O. (1993) Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* **2**, 1511–1519
29. Wallner, B., and Elofsson, A. (2003) Can correct protein models be identified? *Protein Sci.* **12**, 1073–1086
30. Chen, R., Li, L., and Weng, Z. (2003) ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. *Proteins* **52**, 80–87
31. Chen, R., Tong, W., Mintsers, J., Li, L., and Weng, Z. (2003) ZDOCK predictions for the CAPRI challenge. *Proteins* **52**, 68–73
32. Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E. B., and Gouaux, E. (2007) Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* **449**, 316–323
33. Bargeton, B., and Kellenberger, S. (2010) The contact region between three domains of the extracellular loop of ASIC1a is critical for channel function. *J. Biol. Chem.* **285**, 13816–13826
34. Chen, X., Kalbacher, H., and Gründer, S. (2005) The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity. *J. Gen. Physiol.* **126**, 71–79
35. Chen, X., Kalbacher, H., and Gründer, S. (2006) Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent. *J. Gen. Physiol.* **127**, 267–276
36. Chen, X., Qiu, L., Li, M., Dürnagel, S., Orser, B. A., Xiong, Z. G., and MacDonald, J. F. (2010) Diarylamidines: high potency inhibitors of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology* **58**, 1045–1053
37. Liechti, L. A., Bernèche, S., Bargeton, B., Iwaszkiewicz, J., Roy, S., Michielin, O., and Kellenberger, S. (2010) A combined computational and functional approach identifies new residues involved in pH-dependent gating of ASIC1a. *J. Biol. Chem.* **285**, 16315–16329
38. Yang, H., Yu, Y., Li, W. G., Yu, F., Cao, H., Xu, T. L., and Jiang, H. (2009) Inherent dynamics of the acid-sensing ion channel 1 correlates with the gating mechanism. *PLoS Biol.* **7**, e1000151
39. Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1998) Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by β-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* **21**, 919–931
40. Smoller, J. W., Gallagher, P. J., Duncan, L. E., McGrath, L. M., Haddad, S. A., Holmes, A. J., Wolf, A. B., Hilker, S., Block, S. R., Weill, S., Young, S., Choi, E. Y., Rosenbaum, J. F., Biederman, J., Faraone, S. V., Roffman, J. L., Manfro, G. G., Blaya, C., Hirshfeld-Becker, D. R., Stein, M. B., Van Ameringen, M., Tolin, D. F., Otto, M. W., Pollack, M. H., Simon, N. M., Buckner, R. L., Ongur, D., and Cohen, B. M. (2014) The human ortholog of acid-sensing ion channel gene ASIC1a is associated with panic disorder and amygdala structure and function. *Biol. Psychiatry* **10.1016/j.biopsych.2013.12.018**

2. Article 3: Identification des domaines fonctionnels de la Mambalgine-1 permettant l'inhibition des canaux ASIC1a

2.1 Contexte de l'étude :

Après la caractérisation du site d'action de la mambalgine-2 sur les canaux ASIC1a (voir article 2), nous nous sommes intéressés aux domaines fonctionnels de la toxine nécessaires à son interaction avec le canal. Les 57 acides aminés des mambalgines-1, 2 et 3 ne diffèrent que d'un acide aminé (Mamb-1 versus Mamb-2 et Mamb-1 versus Mamb-3 : Y4F et T23I, respectivement) et présentent les mêmes propriétés (Baron, Diochot et al. 2013). Pour cette nouvelle étude nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe du Dr Denis Servent, au Commissariat à l'Energie Atomique (CEA, Gif-sur-Yvette), qui a pu synthétiser la mambalgine-1 en une seule étape et déterminer sa structure cristallographique. La cristallographie aux rayons X et la RMN fournissent toutes deux des informations sur les positions relatives des atomes dans la molécule. En revanche, la cristallographie permet d'aboutir à une carte de densité électronique indiquant les régions dans lesquelles peuvent se trouver les électrons de la molécule cristallisée, alors que la RMN, permet d'obtenir un ensemble de distance entre les noyaux atomiques qui définissent les structures moléculaires. Bien que les deux techniques présentent leurs avantages et leurs inconvénients, la diffraction aux rayons X donne l'information la plus précise puisqu'elle présente souvent une meilleure résolution et une moins grande flexibilité. Nous avons donc choisi de caractériser les domaines fonctionnels de la mambalgine-1 car sa structure cristallisée permet une meilleure observation des résidus exposés aux solvants ou à l'interface avec ASIC1a dans notre modélisation informatique. Néanmoins, les observations réalisées sur cette toxine peuvent être également transposées à la mambalgine-2.

Les mambalgines présentent des propriétés analgésiques pouvant être équivalentes à celles de la morphine et ne semblent pas présenter d'effets secondaires comme ceux décrits pour la morphine. Synthétiser des composés de taille réduite ou de meilleure affinité/efficacité possédant les mêmes domaines fonctionnels que cette toxine pourrait donc avoir un intérêt thérapeutique et aussi fournir des outils pharmacologiques plus ciblés et plus adaptés permettant d'affiner la compréhension du rôle des canaux ASIC. C'est dans cette optique plus générale que s'intègre ce travail sur l'identification précise des résidus clefs de la mambalgine-1

qui devrait mener à une meilleure caractérisation des zones impliquées dans l'interaction avec les canaux ASIC.

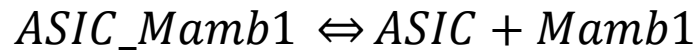
2.2 Résultats :

La structure cristallographique de la mambalgine-1 présente des différences avec les données précédemment obtenues par RMN. Parmi ces différences, la région subissant le plus de variations de conformation entre ces deux structures correspond au doigt II de la toxine. Cette région pénètre profondément dans la poche acide d'ASIC1a et nous avons donc décidé de cibler les acides aminés dans cette région afin d'affiner le modèle de liaison que nous avons établi par modélisation informatique (voir article 2). Pour cela, nous avons utilisé une technique appelée «alanine scan» qui consiste à remplacer un à un chacun des acides aminés de la zone à étudier par une alanine afin de déterminer son implication dans l'interaction avec le canal. L'alanine présente l'avantage d'être électriquement neutre et d'avoir un encombrement stérique faible, ce résidu est donc peu susceptible de créer des interactions.

Nous avons mesuré l'IC50 de chacun de ces variants de la mambalgine-1 sur le canal ASIC1a exprimé dans des ovocytes de xénopes. La modification de l'arginine 28 (R28A), chargée positivement ou encore la phénylalanine 27 (F27A), la leucine 32 (L32A), l'isoleucine 33 (I33A) et la leucine 34 (L34A) qui présentent des chaînes secondaires hydrophobes, entraîne une augmentation significative de l'IC50 donc une baisse de l'affinité de la Mamb-1 pour ASIC1a. L'altération de la fonction inhibitrice la plus drastique observée sur ces canaux est celle obtenue avec la mutation L32A. Tous ces acides aminés sont présents sur la même face de la toxine, et inversement la mutation des résidus exposés sur la face opposée ne semble pas affecter le pouvoir inhibiteur de ces variants.

Ces observations suggèrent que le doigt II de la toxine est impliqué dans les interactions avec le canal et les résidus clés identifiés permettent d'orienter la mambalgine-1 sur ASIC1a. Il est intéressant de constater que la face de la toxine qui interagit avec le canal semble être différente de celle suggérée par la modélisation informatique initiale que nous avons faite sur l'étude du site d'action de la mambalgine-2 (voir Article 2). Nous avons également montré que la phénylalanine 350 du canal ASIC1a était importante pour les interactions avec la mambalgine-2. Cette nouvelle modélisation informatique réalisée avec la nouvelle structure cristallographique de la mambalgine-1 sur ASIC1a montre que cette phénylalanine est susceptible d'être en contact avec les résidus L32, L34 et F27. Pour déterminer lequel de ces acides aminés est en interaction avec la phénylalanine 350, nous avons effectué des analyses cycliques en double mutant. Ce type d'analyse se base sur le fait que lorsque deux molécules interagissent, il est possible de calculer

la variation d'énergie libre (ΔG) associée au changement de propriété structurale ou fonctionnelle lors de la formation du complexe.



$$\Delta G_{ASIC/Mamb1} = R.T. \ln \frac{[ASIC][Mamb1]}{[ASIC_Mamb1]}$$

L'introduction d'une mutation dans l'une des deux molécules de ce complexe a des répercussions sur les niveaux d'énergie libre.

$$\Delta G_{ASIC^*/Mamb1} = R.T. \ln \frac{[ASIC^*][Mamb1]}{[ASIC^*_Mamb1]}$$

$$\Delta G_{ASIC/Mamb1^*} = R.T. \ln \frac{[ASIC][Mamb1^*]}{[ASIC_Mamb1^*]}$$

$$\Delta G_{ASIC^*/Mamb1^*} = R.T. \ln \frac{[ASIC^*][Mamb1^*]}{[ASIC^*_Mamb1^*]}$$

On calcule ensuite la variation d'énergie libre ($\Delta\Delta G$) comme suit :

$$ex : \Delta\Delta G_{ASIC/Mamb1 \rightarrow ASIC^*/Mamb1} = \Delta G_{ASIC^*/Mamb1} - \Delta G_{ASIC/Mamb1}$$

Si la variation d'énergie libre associée à la mutation des deux molécules simultanément ($\Delta\Delta G_{ASIC/Mamb1 \rightarrow ASIC^*/Mamb1^*}$) diffère de la somme des variations d'énergies calculées à partir des mutations mesurées individuellement, cela indique que les deux résidus interfèrent probablement l'un avec l'autre et sont donc probablement couplés.

$$\Delta\Delta G_{Couplage} = \Delta\Delta G_{ASIC/Mamb1 \rightarrow ASIC^*/Mamb1^*} - \Delta\Delta G_{ASIC/Mamb1 \rightarrow ASIC^*/Mamb1} - \Delta\Delta G_{ASIC/Mamb1 \rightarrow ASIC/Mamb1^*}$$

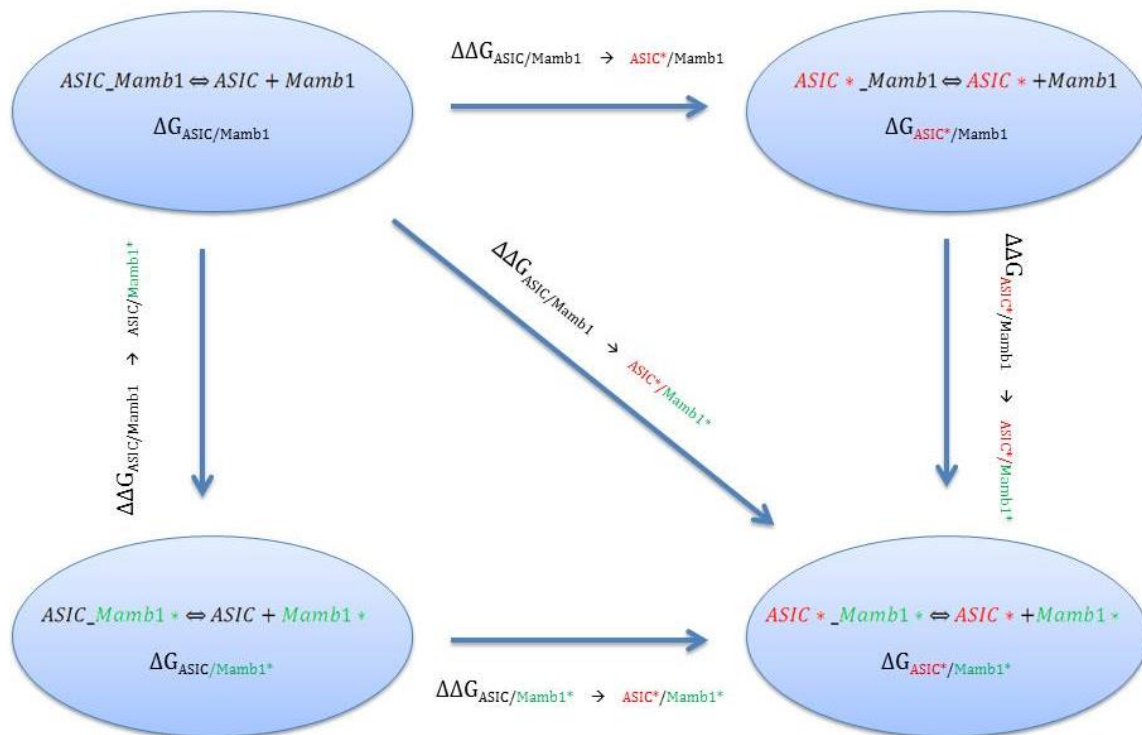
Si

$$\Delta\Delta G_{ASIC/Mamb1 \rightarrow ASIC^*/Mamb1^*} \neq \Delta\Delta G_{ASIC/Mamb1 \rightarrow ASIC^*/Mamb1} + \Delta\Delta G_{ASIC/Mamb1 \rightarrow ASIC/Mamb1^*}$$

Alors

$$\Delta\Delta G_{Couplage} \neq 0 \gg \text{Résidus couplés}$$

Ce couplage peut refléter une interaction directe ou indirecte, ou encore une proximité probable des deux résidus étudiés.



L'analyse en double mutant de l'inhibition d'ASIC1a dont la phénylalanine 350 a été mutée (ASIC1a-F350L), montre un effet purement additif ($\Delta\Delta G = 0$) avec les variants de mambalgine-1 F27A et L34A, indiquant que ces acides aminés ne sont pas en interaction directe avec la phénylalanine 350 même s'ils interviennent dans l'interaction canal/toxine. En revanche, la mambalgine-1-L32A présente un $\Delta\Delta G$ différent de zéro, suggérant un couplage de ces deux acides aminés.

Cette étude confirme le rôle crucial du doigt II de la mambalgine dans son interaction avec le canal ASIC1a et permet d'affiner le modèle présenté lors de notre précédente étude. Bien que l'analyse en double mutant doive être interprétée avec précaution, sa mise en perspective avec notre modèle informatique suggère fortement qu'il existe une interaction entre la leucine 32 de la mambalgine-1 et la phénylalanine 350 du canal ASIC1a et permet d'identifier clairement la face de la mambalgine-1 se liant au canal.

ARTICLE 3:

Mambalgin-1 pain-relieving peptide, stepwise solid-phase synthesis, crystal structure, and functional domain for acid-sensing ion channel 1a inhibition

*Mourier G, Salinas M, Kessler P, Stura EA, Leblanc M, Tepshi L, **Besson T**, Diochot S, Baron A, Douguet D, Lingueglia E, Servent D*

J Biol Chem. 2016

JBC Papers in Press. Published on December 17, 2015 as Manuscript M115.702373
The latest version is at <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M115.702373>

Mambalgin-1 Pain-Relieving Peptide: Stepwise Solid-Phase Synthesis, Crystal Structure and Functional Domain for Acid-Sensing Ion Channel 1a Inhibition

Gilles Mourier^{*1}, Miguel Salinas^{*2,3,4}, Pascal Kessler^{*1}, Enrico A. Stura^{*1}, Mathieu Leblanc¹, Livia Tepshi¹, Thomas Besson^{2,3,4}, Sylvie Diochot^{2,3,4}, Anne Baron^{2,3,4}, Dominique Douguet^{2,3}, Eric Lingueglia^{2,3,4&}, and Denis Servent^{1&}

From the ¹CEA, iBiTecS, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO), 91191 Gif-sur-Yvette, France, ²CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, 06560 Valbonne, France, ³Université de Nice Sophia Antipolis, UMR 7275, 06560 Valbonne, France, ⁴LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, UMR 7275, 06560 Valbonne, France.

*: These authors contributed equally to this work

&: To whom correspondence should be addressed: CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR7275, 06560 Valbonne, France Tel.: 33 4 93 95 34 23; Fax: 33 4 93 95 77 08; E-mail: lingueglia@ipmc.cnrs.fr. CEA, iBiTecS, SIMOPRO, 91191 Gif-sur-Yvette, France. Tel: 33 1 69 08 52 02, Fax: 33 1 69 08 90 71; Email: denis.servent@cea.fr

Running title: Mambalgin full synthesis, crystal structure & pharmacophore

Keywords: mambalgin, acid-sensing ion channel (ASIC), pain, peptide chemical synthesis, toxin, peptide interaction, X-ray crystallography, structural model, sodium channel

ABSTRACT

Mambalgins are peptides isolated from mamba venom that specifically inhibit a set of acid-sensing ion channels (ASICs) to relieve pain. We show here the first full stepwise solid-phase peptide synthesis of mambalgin-1 and confirm the biological activity of the synthetic toxin both *in vitro* and *in vivo*. We also report the determination of its 3D crystal structure showing differences with previously described NMR structures. Finally, the functional domain by which the toxin inhibits ASIC1a channels was identified in its loop II and more precisely in the face containing Phe27, Leu32 and Leu34 residues. Moreover, proximity between Leu32 in mambalgin-1 and Phe350 in rASIC1a was proposed from double-mutant cycle analysis. These data give information on the structure and on the pharmacophore for ASIC channel inhibition

by mambalgins that could have therapeutic value against pain and probably other neurological disorders.

Mambalgins are pain-relieving peptides that have been recently isolated from black and green mamba venoms (1) and characterized for their capacity to specifically inhibit a set of acid-sensing ion channels (ASICs). ASICs are voltage-independent cation channels activated by extracellular acidification (2). They are widely expressed throughout the pain pathway and more generally in the nervous system (3). The involvement of ASICs has been recognized in an increasing number of physiological and pathophysiological processes ranging from synaptic plasticity and neuronal injury to nociception and mechanoperception (for reviews, see (4,5)). ASICs therefore emerge as unique pharmacological targets with potential clinical applications in the management of pain,

psychiatric disorders, stroke and neurodegenerative diseases (5).

Mambalgin-1, -2 and -3 are 57-amino acid peptides that only differ by one or two residues and display the same pharmacological profile (1,6). These three-finger fold toxins block all the ASIC channels combinations expressed in central neurons and some expressed in nociceptors. More specifically, inhibition of ASIC1a and ASIC1b-containing channels (with IC_{50} ranging from 11 to 252 nM) produces potent analgesic effects *in vivo* in mice that can be as strong as morphine but are resistant to naloxone and do not involve opioid receptors (1). Mambalgins have no apparent toxicity and seem to produce fewer unwanted side effects than morphine, illustrating the potential therapeutic value of these ASIC-inhibitory peptides (7-9). Mambalgins act as gating-modifiers that bind to the closed state of the channel and induce a strong shift of the pH-dependent activation of ASIC1a channel towards more acidic pH, decreasing its apparent affinity for protons (1). The binding site on ASIC channels and the inhibitory mechanism of these peptides have been recently identified (10). Mambalgins bind into the acidic pocket of the extracellular domain of ASIC1a and have been proposed to block the channel by a pH sensor-trapping mechanism. Chemical synthesis of mambalgin-1 and -2 have been recently done using chemical ligation approach (11,12) and their structures have been determined using NMR. However, stepwise synthesis of the entire 57-residue toxin failed, even with optimized protocols (11,12), and the crystal structure of the peptide was not solved. In addition, residues of mambalgins involved in the inhibition of ASIC channels remain to be determined.

In the present work, we report the stepwise solid-phase synthesis of mambalgin-1, the X-ray crystal structure of wild-type mambalgin-1 and those of various variants, and propose a crucial role for its central loop in the interaction with ASIC1a. Furthermore, using a double-mutant cycle approach, proximity between Leu32 in mambalgin.1 and Phe350 in rat ASIC1a is

proposed and used to build a binding model of the toxin-channel complex.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Fmoc-amino acids, Fmoc-pseudoproline dipeptides, and 2-(6-chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium hexafluorophosphate (HCTU) were obtained from Activotec (Cambridge, UK). The resin and all the peptide synthesis grade reagents (N-methylpyrrolidone (NMP), N-methylmorpholine (NMM), dichloromethane (DCM), piperidine, trifluoroacetic acid (TFA), anisole, thioanisole and triisopropylsilane (TIPS) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Synthesis of sMamb-1 and Alanine Variants. Peptide synthesis of mambalgin-1 and eleven alanine variants was performed on a Protein Technologies, Inc Prelude synthesizer at a 12.5 μ mole scale using a tenfold excess of Fmoc-amino acid relative to the preloaded Fmoc-Lys(Boc)-wang-LLresin (0.33 mmol/g). Fmoc-protected amino acids were used with the following side-chain protections: *ter*-butyl ester (Glu, Asp), *ter*-butyl ether (Ser, Thr, Tyr), Trityl (Cys, His, Asn, Gln), *ter*-butoxycarbonyl (Lys), 2,2,5,7,8-pentamethyl-chromane-6-sulfonyl (Arg). Amino acids were coupled twice for 5 min using 1:1:2 amino acid/HCTU/NMM in NMP. Pseudoproline dipeptides were coupled twice for 10 min. Amino acids in the sequence fragments 1-5 (LKCYQ) and 30-34 (LKLIL) were coupled four times for 5 min. After incorporation of each residue, the resin was acetylated for 5 min using a 50 fold excess of a mixture of acetic anhydride and NMM in NMP. Fmoc deprotection was performed twice for 2 min using 20% piperidine in NMP, and 30 sec NMP top washes were performed between deprotection and coupling steps. Following chain assembly, the peptidyl-resin was treated with a mixture of TFA/thioanisole/anisole/TIPS/water (82:5:5:2.5:5) for 2 h. The crude peptide was obtained after precipitation and washes in cold ethyl ether followed by dissolution in 10% acetic acid and lyophilization. The different peptides

were purified by reverse phase HPLC using an X-Bridge BHE C18-300-5 semi-preparative column (Waters, USA)(250 x 10 mm; 4 ml.min⁻¹; solvent A, H₂O/TFA 0.1%; solvent B, acetonitrile/TFA 0.1%; gradient, 20 - 40% solvent B in 40 min), and checked by mass spectrometry using ESI-MS (Bruker, Germany).

Disulfide Bond Formation and Characterization. The purified peptides were dissolved in guanidine-HCl 6 M in 0.1 M Tris-HCl pH 8 and diluted (1/100) in degassed 0.1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8 buffer in the presence of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione (molar ratio of 1/10/100 peptide/GSSG/GSH at a peptide concentration of 0.05 mg/ml) and then incubated at 4 °C for 24-36 h. After acidification, purification of the refolded toxins was performed on an X-Bridge BHE C18-300-5 semi-preparative column (Waters, USA) (250 x 10 mm; 4 ml.min⁻¹; solvent A, H₂O/TFA 0.1%; solvent B, acetonitrile/TFA 0.1%; gradient, 20 - 40% solvent B in 40 min). Each toxin was checked by mass spectrometry using ESI-MS (Bruker, Germany) (Table 1) after analytical reverse phase HPLC on a X-Bridge BHE C18-300-5 analytical column (Waters, USA) (250 x 4.5 mm; 1 ml.min⁻¹; solvent A, H₂O/TFA 0.1%; solvent B, acetonitrile/TFA 0.1%; gradient, 20 - 40% solvent B in 40 min).

Xenopus Oocyte Preparation, DNA Injection, and Electrophysiological Measurements. Animal handling and experiments fully conformed to French regulations and were approved by local governmental veterinary services (authorization number B 061525 delivered by the Ministère de l'Agriculture, Direction des services vétérinaires). Briefly, animals were anesthetized by exposure for 20 min to a 0.2% solution of 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222). Oocytes were surgically removed and dissociated with collagenase type IA (Sigma), then injected into the nucleus with 20 nl of pCI-rat ASIC1a (3-5 ng/μl) or pCI rat ASIC1b (100 ng/μl) plasmids, or a mixture of pCI-rat ASIC1a (10 ng/μl) + pCI-rat ASIC2a (5 ng/μl). Oocytes were kept at 19 °C in ND96 solution containing 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, and 5

mM HEPES (pH 7.4 with NaOH) with penicillin (6 μg/ml) and streptomycin (5 μg/ml). ASIC currents were recorded using the two-electrode voltage-clamp technique using two standard glass microelectrodes (0.5–2.5 megaohms) filled with a 3 mM KCl (manual setup) or with a mixture (50:50) of 1 M KCl and 1.5 M potassium acetate (Roboocyte2), 1–2 days after injection using either a Roboocyte2 automated workstation (MultiChannelSystems MCS, Reutlingen, Germany) or a manual setup (Dagan TEV 200 amplifier, Dagan Corp., Minneapolis, MN). Oocytes were clamped at -60 mV (Roboocyte2 recordings) or -50 mV (manual recordings), and ASIC currents were activated by rapid changes in extracellular pH induced by microperfusion systems. HEPES was replaced by MES (5 mM) for buffer solutions at pH 5.0. Stimulation, data acquisition, and analysis for manual recordings were performed using pCLAMP 9.2 software (Axon Instruments, Union City, CA) or Roboocyte2+ software. All experiments were performed at 19-21 °C in ND96 solution supplemented with 0.05% fatty acid- and globulin-free bovine serum albumin (Sigma) to prevent nonspecific adsorption of the toxins to tubing and containers. Mambalgins were applied 30 s before the acid stimulation. Data analysis was performed using GraphPad Prism 4.03 software. Data are represented as means ± S.E.M., and the statistical significance of differences between sets of data were estimated using the Kruskal-Wallis statistic multiple comparison followed by Dunns post test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Double-mutant Cycle Analysis. The difference in binding energy caused by a punctual modification is calculated through $\Delta\Delta G_{wt>mut}$ ($\Delta\Delta G_{wt>mut} = \Delta G_{mut} - \Delta G_{wt} = RT \ln [Kd(mut)/Kd(wt)]$, with $R = 1.99$ cal/mol/K and $T = 293$ K). When the $\Delta\Delta G$ associated with a couple of modifications (*i.e.* on the toxin and on the channel) was significantly different from the sum of the $\Delta\Delta G$ values associated with each single modification, the two modified residues were considered to be in proximity and possibly in interaction (13). The coupling energy ($\Delta\Delta G_{int}$),

which reflects the interaction energy for the two modified residues, was calculated from $\Delta\Delta G_{\text{int}} = RT \ln(\Omega)$, with $\Omega = K(\text{wt1}, \text{wt2}) \times K(\text{mut1}, \text{mut2}) / K(\text{wt1}, \text{mut2}) \times K(\text{mut1}, \text{wt2})$, where K is K_d or K_i , wt1 is Phe350, mut1 is F350L, wt2 is Phe27 or Leu32 or Leu34, mut2 is F27A, L32A or L34A. According to the equation $K_i = [T](I/I_0)/(1-I/I_0)$ (13) where I_0 is the control current level and I is the current in presence of toxin concentration $[T]$, we can deduce that $K_i = IC_{50}$ when $[T] = IC_{50}$. Thus we can deduce $\Omega = IC_{50}(\text{wt1}, \text{wt2}) \times IC_{50}(\text{mut1}, \text{mut2}) / IC_{50}(\text{wt1}, \text{mut2}) \times IC_{50}(\text{mut1}, \text{wt2})$.

Pain Behaviour Experiments. Experiments were performed on 7-13 week-old (20-25 g) male C57BL/6J mice (Charles River). Animal procedures were approved by the Institutional Local Ethical Committee and the French "Ministère de la Recherche" according to the European Union regulations (Agreements C061525, NCE/2011-06 and 01550.03).

Inflammation was evoked by *i.pl.* injection in the left hind paw of 20 μl of 2% carrageenan (Sigma-Aldrich). After two hours, the time-course of paw-flick latency was measured before and after injection of sMamb-1 or vehicle. Heat pain was assessed measuring the hind paw withdrawal latency (s) from a 46 °C bath using the paw-flick test, with a cutoff time at 30 seconds. Synthetic mambalgin-1 was *i.pl.* injected (0.34 nmole/mouse) in the left hind paw (vehicle: NaCl 0.9% + 0.05% BSA) on carrageenan-induced heat hyperalgesia, and the paw withdrawal latency was measured during 2 hours after injection.

Data analysis and statistics were performed with Microcal Origin 6.0 and GraphPad Prism 4 softwares. After testing the normality of data distribution with Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk and D'Agostino-Pearson tests, the statistical difference between two different experimental groups was analyzed by unpaired Student's *t*-test. For data within the same experimental group, a paired Student's *t*-test was used.

Crystallization and Crystallographic Structure Determination. Crystallization experiments were carried out with lyophilized wild-type sMamb-1 and various modified toxins

derived from alanine scanning, redissolved at 5 mg/ml in 50 mM sodium acetate pH 5.5. The crystallization trials were carried out using CrysChem sitting drop vapour diffusion plates with 1 μl drops of protein and precipitant, stored in a constant temperature incubator at 20 °C using the Stura Screens (14) from Molecular Dimensions. Crystals of wild-type sMamb-1 for X-ray data collection were obtained from drops that were streak seeded (15) using a reservoir solution consisting of 30% polyethylene glycol (PEG) 600, 200 mM imidazole malate, pH 7.0 in the tetragonal space group $P4_12_12$ with cell parameters $a = b = 46.9 \text{ \AA}$, $c = 80.6 \text{ \AA}$. Screening for different polymorphs can be a useful strategy not only in drug design (16) but also to obtain heavy atom derivatives, a molecular replacement solution in difficult cases and to ensure that structural variations are not the result of lattice interactions. With a reservoir consisting of 18% PEG 4,000, 3% 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD), 3% 1,4-dioxane, 188 mM imidazole malate, pH 6.0, a different polymorph was obtained in the monoclinic space group $P2_1$ with cell parameters $a = 40.2 \text{ \AA}$, $b = 50.6 \text{ \AA}$, $c = 46.9 \text{ \AA}$, $\beta = 93.26^\circ$. Unfortunately, all attempts to solve the structure using molecular replacement starting from the NMR mambalgin-1 (2MJY (12)) or mambalgin-2 (2MFA (11)) models with either of the two wild-type polymorphs were unsuccessful. Similarly, derivatization of the wild-type crystals did not give sufficiently high quality data to obtain a structure solution using SAD data, probably because of the low solvent content of the crystals. The structure was solved using iodine SAD data collected from another polymorph in the orthorhombic space group $C222_1$ using crystals of the T23A variant with cell parameters $a = 55.9 \text{ \AA}$, $b = 101.0 \text{ \AA}$, $c = 53.5 \text{ \AA}$, grown from 21.6% PEG 600, 3.6% PEG 20,000, 90 mM mixed L-malic acid, MES, Tris (MMT), pH 4.0 and 90 mM mixed sodium malonate, imidazole, boric acid (MIB) pH 10.0. Before data collection the crystals were soaked in 6 μl cryoprotectant solution consisting of 30% monomethyl PEG 550, 100 mM KI, 40% cryomix9 (CryoProtX, from Molecular Dimensions) (16), 100 mM sodium acetate, pH

6.5 for 1 minute. The data for the iodide derivative was collected at Soleil on the microfocus beamline Proxima 2A (17), tuned to wavelength 0.9801 Å using the helican scan procedure to reduce radiation damage. All crystallographic data were integrated using XDS and scaled with XSCALE (18). The Phenix AutoSol Wizard (19) was used to determine the phases from the SAD data (20) and to fit automatically (21) the electron density map starting with the sequence and 1.7 Å resolution data. The anomalous data extends to 1.9 Å resolution with a merging R-factor of 15.7% at this resolution. About 80% of the two molecules in the asymmetric unit were correctly fitted by the automatic procedure and the structure was then completed using COOT (22) and refined with both REFMAC (23) and phenix.refine (24). The sMamb-1 wild-type structures, with two and four molecules in the asymmetric unit, could be solved by molecular replacement using either MOLREP (25) or Phaser (20) starting either from the dimer present in the T23A mutant C222₁ lattice, or from a single molecule. The crystal structure for the variant R28A, with similar P4₁2₁2 cell as the wild-type was determined as well as the more problematic structure of the F27A mutant in the rare P2 space group with 16 molecules in the asymmetric unit, twinning problems, diffracting to lower resolution.

Accession Codes. The crystal structure data for the sMamb-1 wild-type and variants have been deposited at Protein Data Bank with accession codes (T23A: 5DO6; Wild-type P2₁: 5DU1; Wild-type P4₁2₁2: 5DZ5).

Docking Studies. We used ZDOCK (server version 2.3.2f) to carry out the protein–protein docking simulations of rASIC1a to sMamb-1 crystal structures. ZDOCK performs rigid-body docking by exploring both the rotational and translational degrees of freedom of the protein structures. The homology model of the channel in the desensitized state at conditioning pH 7.0 was used. The toxin was represented by its four crystal structures of wild-type PDB 5DU1 chain A, B, C and D. ZDOCK was used with default settings along with the filtering option. In order to take into account the data from alanine

scanning, complex solutions from the top 2000 ZDOCK predictions were filtered using the rASIC1a-Phe350/sMamb-1-Leu32 pairing residues and a 6 Å distance cutoff. Only two out of the four chains (PDB 5DU1 chain B and D) led to binding modes in agreement with experimental results.

RESULTS

Synthesis and Refolding of Wild-Type and Alanine Variants of Mambalgin-1. Despite a size accessible to standard Fmoc-based solid phase peptide synthesis (SPPS) (57 residues), this strategy was reported to fail in obtaining mambalgin-1 (Mamb-1) (11). As shown on the LC-MS profile (Fig. 1), we reached a similar conclusion by using a Fast Fmoc solid phase peptide strategy associated to a large excess of amino acids and using HCTU/NMM as coupling reagents. We confirmed massive chain terminations at position 32, 31 and 30 and found only traces of fully synthesized mambalgin-1. To address this issue, we modified our strategy to adopt a full stepwise solid phase peptide synthesis of Mamb-1 by replacing Ser40, Thr23 and Thr11 by pseudoproline residues, incorporating the commercial dimethylloxazolidine of the di-peptides Ser-Ser at position 39-40, Asn-Thr at position 22-23 and Val-Thr at position 10-11. These compounds, called pseudoproline disrupt peptide chain aggregation in the same manner as a proline residue does (26). At the end of the synthesis, regeneration of the serine or threonine from the oxazolidine occurs during the course of the normal TFA-mediated cleavage reaction. Synthesis was performed by Fast Fmoc solid phase peptide synthesis using HCTU as coupling reagent and coupling times of 5 min. A longer coupling time (10 min) was used for the incorporation of the three pseudoproline dipeptides. Moreover, double coupling was repeated to incorporate residues in sequence fragments 1-5 (LKCYQ) and 30-34 (LKLIL). The synthesis was performed successfully on 0.1 and 0.01 mmole scales in 45 hours. The full-

length polypeptide was isolated readily after HPLC purification (Fig. 2A) and 8.5 mg of pure linear synthetic mambalgin-1 (sMamb-1) was obtained from a 0.01 mmole scale synthesis. The purity of the linear sMamb-1 was determined by RP-HPLC and ESI-MS (Table 1).

Folding of sMamb-1 was achieved using the experimental conditions that were successfully applied to other members of the three-finger fold toxin family such as nicotinic and muscarinic toxins and are similar to those reported for mambalgin-1 and -2 (11,12). As shown in Fig. 2B, sMamb-1 folds efficiently with 55% yield after 36 h, giving 4.6 mg of pure homogenous sMamb-1 after purification. The purity of sMamb-1 was determined by RP-HPLC and ESI-MS (Fig. 2C; observed MW: 6554.4 Da, calculated MW: 6554.6 Da, average isotope composition). Then, in order to perform an alanine-scanning study, eleven sMamb-1 alanine variants were obtained with a similar strategy. Mass analysis of all these variants was performed to confirm their purity and correct sequences (Table 1). Their CD spectra revealed a typical β -sheet signature with a minimum signal close to 213 nm, similar to that of sMamb-1, thus confirming a correct pairing of the four disulphide bridges (Fig. 2D).

sMamb-1 Inhibits Recombinant ASIC Channels and Evokes Peripheral Analgesic Effects In Vivo. sMamb-1 inhibits efficiently homomeric rat ASIC1a, rat ASIC1b, and heteromeric rat ASIC1a+ASIC2a channels heterologously expressed in *Xenopus* oocytes (IC_{50} values are 3.4 ± 0.6 , 22.2 ± 1.7 and 152 ± 21 nM, respectively) (Fig. 3A). These values compare well with those previously reported in the *Xenopus* oocyte expression system for native mambalgin-1 isolated from snake venom, *i.e.* 11, 44 and 252 nM (6). The slightly higher potency of sMamb-1 may reflect the higher purity of the synthetic peptide or the fact that different two-electrode voltage-clamp setups have been used.

Local intraplantar injection of sMamb-1 in mice reversed heat inflammatory hyperalgesia, while injection of vehicle did not, similarly to what we previously described with native mambalgin-1 purified from *Dendroaspis*

polylepis venom (1) (Fig. 3B). The paw-flick latency increased from 3.7 ± 0.3 s up to 9.4 ± 1.5 s ($n = 10$), a value not significantly different from the control latency value before carrageenan injection (8.0 ± 0.3 s). The anti-hyperalgesic effect reached its maximum within 30 minutes and lasted for the two hours of the experiment.

Crystallographic Structure Determination of sMamb-1 and Alanine Variants. Wild-type sMamb-1 and several alanine-variants were crystallized in various crystal forms (Tables 2 & 3). The preferred crystal form depends strongly on the protein sequence, but most modified toxins respond positively to streak seeding (15) with the tetragonal crystal form. Even if the crystal seeds deposited along the streak fails to grow, crystals of a different polymorph nucleate along the line (15B) to yield crystals suitable for X-ray data collection. The resolution to which the crystals diffract ranges from 2.9 to 1.5 Å. The crystal structures of two wild-type sMamb-1 polymorphs and five alanine variants have been determined (Table 3). Among the variants, the T23A crystal form with a higher solvent content was instrumental to obtain a solution for the X-ray structures. No molecular replacement solution could be obtained using neither the NMR models, nor using truncated crystal structures from three-finger fold toxins. The crystal structure of the T23A variant in C222₁ was solved by short-soak iodide SAD phasing permitting the solution of all the other structures by molecular replacement (PDB_id = 5DO6). The asymmetric unit of the C222₁ polymorph contains a dimer in the asymmetric unit. The same dimer is the sole constituent of the asymmetric unit of the tetragonal P4₁2₁2 polymorph of wild-type sMamb-1 (PDB_id = 5DZ5) while the asymmetric unit of the second wild-type polymorph in space group P2₁ is composed by two such dimers (PDB_id = 5DU1). The wild-type crystal data can be exploited to 1.75 Å and 1.8 Å (27), respectively, with good refinement statistics (Table 2). The precise fold adopted by the T32A variant and the wild type toxin in either of the two polymorphs is also found in all alanine-scan variant

structures, with conformational variations being limited to finger III as exemplified in Fig. 4. This fold conforms to that of other three-finger family with a long extended finger II and a short finger III. Finger I leaves residues 29-35 of finger II exposed. In all the crystal polymorphs analysed so far this stretch mediates dimer formation through a long β -zipper interaction. The dimer assembles to form a tetramer through interactions that shield Pro26 and Phe27 from solvent (Fig. 5A, 5B). The tetramer generated through the interaction of several hydrophobic residues centered on Leu32 can be found in several polymorphs when symmetry mates are taken into account (Fig. 5C). The dimer and tetramer interactions may be important to confer good water solubility to the polypeptide when concentrated *in vitro*. In a dilute solution and *in vivo*, the monomer is likely to prevail. Although the overall structure resembles that of the three-finger fold toxins, the short 57 residue sequence confers sMamb-1 a unique character in its second loop. Indeed, the short fingers I and III flanking finger II allow it to form a long anti-parallel double-stranded β -sheet that protrudes to a large extent into the solvent. While finger I maintains the classical short fold, the third finger shows unprecedented flexibility. Portions of this finger (residues 47-50) can form a short β -strand to extend the β -sheet through main-chain hydrogen bonding interactions with residues 17 to 21, or switch to form a short single turn α -helix (Fig. 4). This conformational duality is the likely cause for the higher B values of finger III residues. The crystallographic structures of five variants were solved and their analysis shows a variable number of sMamb-1 molecules in the asymmetric unit (Fig. 5D-G). In addition, comparison of these structures reinforces the variability of finger III that can assume many intermediate conformations between those of sMamb-1A and sMamb-1B. Conversely, the finger II is well defined and virtually identical in all the crystallographic structures (Fig. 5D-G).

Comparison of the Crystal and NMR Structures of sMamb-1. The crystal structure of sMamb-1 is significantly different from the structure previously obtained by NMR (11,12).

The comparison is best done excluding finger III as the root-mean-square deviation (RMSD) on C α between the crystallographic structures can be as high as 2 Å if residues 40-57 are included. This is higher than the best agreement with Mamb-1 NMR structure (2MJY) (RMSD 1.6 Å: model 16 vs 5DU1 chain D on C α residues 1-39). Alanine variants and wild-type sMamb-1 crystal structures obtained in different space groups with up to 16 molecules in the asymmetric unit provide a large diversity of models to compare against an ensemble of 20 models obtained by NMR (Fig. 6). The ensemble of molecules obtained by X-ray crystallography give an idea of the diversity that exists in the crystal lattice. The regions that show the greatest variation are finger III and to a lesser extent the tip of finger II. The highest RMSD on C α for residues 1-39 is 0.7 Å, twice that for the best agreement with any of the NMR models. This stems from variations in the NMR ensemble that are mainly located in the lower part of finger II, a region well conserved among all the crystal structures. In addition, there are differences in the well-structured disulfide-stabilized core of the polypeptide between the crystal and NMR structures (Fig. 6A). Among the various conformations for finger III found in the crystal structures, that of sMamb-1A with a single-turn helix is the most ordered and the most frequent conformation observed, and it is the form chosen for comparison because it is likely to be the most representative structure. Within the conformations for finger III, the one that is closest to the NMR structure is sMamb-1B. It contains a short β -sheet, but its B-values within the finger III region are higher than for sMamb-1A (thick tubes; Fig. 6A). The observed differences between the crystallographic and NMR structures yield molecular surfaces that are different from each other, mainly in the lower part of finger II, which is well defined in the crystallographic structures (with low B-values; Fig. 6B and 6C) and shows more conformational variability within the NMR ensemble.

Alanine Scanning Confirms the Role of Finger II and Identifies a Hydrophobic Patch Region in sMamb-1 Crucial for its Interaction

with ASIC1a. Alanine scanning was achieved on both faces of the second loop of the toxin. The alanine-variants of the positively charged Arg28 or of the hydrophobic Phe27, Leu32, Ile33 and Leu34 induce a significant increase in the IC₅₀ values for ASIC1a channel, suggesting a participation in ASIC1a binding (Fig. 7 and Table 4). Interestingly, the L32A substitution provokes a drastic three-order of magnitude decrease in the affinity of sMamb-1 for ASIC1a channel (Table 4). On the other hand, mambalgin-1 analogues H21A, T23A, N29A, L30A, K31A and K57A share more or less the same affinity for ASIC1a channel than the wild-type toxin (less than 5-fold decrease in affinity) (Table 4). These data support the interaction of finger II with ASIC1a channel but on a face different from the one initially predicted from the docking of mambalgin (NMR structure) onto the channel (10) where no binding constraints were applied.

Double-Mutant Analysis Suggests Proximity between Leu32 in Mambalgin-1 and Phe350 in ASIC1a. Inhibition of the ASIC1a-F350L mutant channel by sMamb-1 variants F27A, L32A and L34A has been analyzed to address the possible proximity of these residues located into the hydrophobic region of the toxin, with Phe350 in ASIC1a, which is located near the acidic pocket of the channel and has been shown to be important for the toxin interaction (10). The four possible combinations have been explored for each sMamb-1/ASIC1a double-mutant (*i.e.*, F27A/F350L, L32A/F350L and L34A/F350L; Fig. 8 A-C). A pure additive effect was observed for the double mutants F27A/F350L and L34A/F350L (Fig. 8 A, C), which was characterized by a free coupling energy close to zero ($\Delta\Delta G_{\text{int}} = -0.24 \pm 0.27$ and 0.11 ± 0.26 kcal/mol, respectively) (Fig. 8D). This suggests that although Leu34 and Phe27 are important for the interface with ASIC1a, they are probably not in contact with Phe350. Conversely, a high free energy of coupling was calculated for the double mutant L32A/F350L ($\Delta\Delta G_{\text{int}} = -2.86 \pm 0.30$ kcal/mol) (Fig. 8 B and D), supporting a proximity between these two residues.

Refined Model of the Interaction between Crystal Structures of sMamb-1 and the Three-Dimensional Model of Rat ASIC1a. Taking into account alanine scanning data, double-mutant analysis, and X-ray structures, we generated new toxin-channel binding mode predictions by using *in silico* rigid body docking of toxin crystal structures onto the homology model of rat ASIC1a channel (Fig. 9). Unlike the previous modelling (10), we used the double mutant L32A/F350L pairing to filter output predictions such that only those with specified residues in the binding site are returned. The selected model exhibits a binding mode where toxin residues His21, Thr23, Lys31 and Lys57 are solvent exposed, residues Phe27 and Arg28 are buried into the acidic pocket of the channel and residues Leu32, Ile33 and Leu34 are in interaction with the thumb domain of the channel and in proximity with residue Phe350 in rASIC1a (Fig. 9). Despite the fact that residues Asn29 and Leu30 are flanking residues Phe27 and Arg28, these residues are likely inserted into the acidic pocket as well, but without deleterious effect when mutated to alanine (Fig. 9). This model is also in good agreement with the fact that mambalgin-2 and -3 inhibit ASIC channels with the same potency as mambalgin-1 since residues at position 4 and 23, which are different in Mamb-2 and -3, respectively, do not appear to be in interaction with the channel.

DISCUSSION

Mambalgins are three-finger folded toxins isolated from the venom of the black mamba *Dendroaspis polylepis* (Mambalgins-1 and -2) and from the venom of the green Mamba *Dendroaspis angusticeps* (mambalgin-3) (1,6). These 57-amino acid peptides contain four disulfide bonds and differ by only one residue in position 4 (Tyr to Phe in mambalgin-2) or 23 (Thr to Ile in mambalgin-3) compared to mambalgin-1. Due to their relative small size, they are, like other members of this family, potentially accessible to stepwise solid-phase peptide synthesis. However, two groups recently reported the failure of this strategy to produce

these toxins in a stepwise manner and localize the termination of chain extension around residue Lys31. To address this issue, they proposed for each of them a similar elegant but sophisticated strategy. Mambalgin-2 was therefore obtained by using a combination of solid-phase peptide synthesis and native chemical ligation (11) while mambalgin-1 was obtained by using a one-pot chemical synthesis and ligation approach combining azide switch strategy and hydrazide-based native chemical ligation (NCL) (12). Despite a rather long synthesis time, requiring preparation of modified resins, peptide synthesis, purification and ligation of several toxin fragments, the procedure resulted in milligrams of the two mambalgin toxins, giving mambalgin-1 in 21% yield and mambalgin-2 in 3.5% yield, calculated from the initial quantity of the less abundant peptide fragment.

Interestingly, such a chain termination, associated to low coupling efficiency was already observed in our laboratory during the synthesis of the three-finger fold polypeptides, such as muscarinic and adrenergic toxins (28,29), and was located (i) in a beta-sheet rich area in the central second loop of the molecules, and (ii) in the N-terminal part of the sequences. We addressed this difficulty by replacing Ser or Thr residues located during the synthetic process just before the critical regions by their corresponding dimethylloxazolidine. These commercially available compounds are called pseudoproline because they disrupt peptide chain aggregation in the same manner as a proline residue does (26). Here again, the use of these dipeptide derivatives, associated with repeated double couplings in sequence 1-5 (LKCYQ) and 30-34 (LKLIL) were very effective in overcoming the difficulties in the synthesis of sMamb-1. For the first time, the full stepwise SPPS of sMamb-1 was successful in only 45 hours. Our standard refolding procedure, similar to that used by Pan and colleagues (12), allowed us to produce sMamb-1 with an overall yield of 6%. Nonetheless, this yield, calculated from the starting synthesis scale, cannot be compared with those resulting from the ligation approach.

Actually, Schroeder *et al.* and Pan *et al.* published a ligation-refolding yield without taking into account the yields obtained during the synthesis of the various fragments needed for the ligation process (12), which would decrease their overall values. Moreover, NCL is quite time consuming, especially in fragment purification by HPLC. For instance, NCL syntheses of mambalgins first required synthesis and purification of three peptide fragments, which was not the case in our process. We demonstrate here that, for mambalgins, optimized SPPS is more competitive in term of time, quantity of toxin produced and overall cost than the NCL approaches described previously. Indeed with only two purification steps (crude linear peptide and refolded peptide) multi-milligrams of homogenous and pure sMamb-1 were obtained and several sMamb-1 alanine variants were readily produced by parallel synthesis, allowing the first structure-activity relationship study of the toxin.

The crystal structures of two wild-type sMamb-1 polymorphs have been determined at 1.75-1.8 Å. Mambalgin-1 has a unique character compared with other three-finger fold toxins, with finger II forming a very long anti-parallel double-stranded β -sheet that protrudes into the solvent and finger III showing unprecedented flexibility. In addition, crystal structures are significantly different from the two structures previously obtained by NMR (11,12). The region that shows the greatest variations is finger III while conformational variability within the NMR ensemble is mainly located in the lower part of finger II (11,12), which is well defined in the crystallographic structures. In addition, several X-ray structures of sMamb-1 variants were solved in order to ensure that the changes in affinity associated with some alanine substitution (Table 4) were due to side chain truncation and not the result of conformational changes that might influence finger II and consequently ASIC channel binding. The structures obtained in different crystal forms, exclude an involvement of lattice interactions in conformational artifacts. All variants maintain the wild-type conformation

and superimposed well with canonical three-finger fold structures.

Indeed, alanine scanning modification in and close to the finger II region of mambalgin-1 identifies several residues (Phe27, Arg28, Leu32, Ile33 and Leu34) that significantly decreased the IC_{50} of the toxin toward ASIC1a channel. This provides the experimental confirmation that finger II is crucial for interaction with ASIC1a, as suggested in the ASIC1a-mambalgin initial model we previously described (10). A loss of inhibitory effect was observed with wild-type mambalgin on the mutant channel rASIC1a-Phe350, suggesting that residue Phe350, located near the acidic pocket in ASIC1a, could be involved in the binding surface with the toxin (10). Double-mutant cycle analysis performed between the F350L mutant in ASIC1a and various sMamb-1 variants suggests proximity between Leu32 in sMamb-1 and Phe350 in ASIC1a. Even if interpretation of double-mutant cycle analysis should be taken with caution (30) these data further support an interaction of the concave face of the toxin containing Phe27, Leu32 and Leu34 with the receptor binding site. Leu34 in sMamb-1 is also important for the interface with ASIC1a and has been proposed to contribute to a hydrophobic patch domain in the finger II region, but our data suggest that this residue may probably not be in close contact with Phe350 in the channel. Modification of Arg28 (R28A) at the tip of Mamb-1 finger II also induces a significant effect on the toxin affinity similar to replacement of Arg28 by alanine in the spider toxin PcTx1 (31). However, changing

Asn29, Leu30 and Lys31 to alanine in mambalgin-1 induces no significant effect on the toxin affinity whereas mutations of residues at equivalent positions in the spider toxin PcTx1 (Arg27 and Arg26), which also binds into the acidic pocket of ASIC1a (32,33), strongly affect their IC_{50} (31). Interestingly, co-crystallization of the PcTx1 toxin bound to the chicken ASIC1 channel (32) shows close interactions of residue Phe351 of cASIC1 to Trp7 and Trp24 in PcTx1, and mutation of these two amino acids to alanine affects the IC_{50} in a range equivalent to the Leu32A and Leu34A variants in sMamb-1 (31,34), supporting a similar mechanism. Therefore, although sharing some features, these results highlight differences in the inhibitory mechanisms of mambalgin-1 and PcTx1 on ASIC1a channel (10). These data clearly identify the binding face of mambalgin-1 on ASIC channels and the crucial role of toxin's loop II (and more particularly Leu32) in this interaction.

In conclusion, the present work presents the first full stepwise solid phase peptide synthesis of mambalgin-1, confirms the biological activity of this synthetic toxin, and reports the determination of its 3D crystal. Furthermore, the functional domain of the toxin for ASIC1a inhibition was delineated, supporting a crucial role of loop II in the toxin-channel interaction. Finally, the proximity of Mamb-1 Leu32 with Phe350 in rASIC1a suggested by double-mutant cycle experiments and the localization of critical toxin interacting residues were exploited to propose a structural model of the toxin-channel complex.

TABLE 1: Mass Determination of wild-type and sMamb-1 Variants

sMamb-1 variant	Theoretical mean MW	Observed mean MW
Reduced wild-type	6562.5	6562.3 ± 0.2
Oxidized wild-type	6554.6	6554.4 ± 0.3
H21A	6488.5	6488.2 ± 0.2
T23A	6524.5	6524.2 ± 0.2
F27A	6478.4	6478.2 ± 0.1
R28A	6469.4	6469.4 ± 0.3
N29A	6511.5	6511.4 ± 0.2
L30A	6512.5	6512.0 ± 0.1
K31A	6497.4	6497.4 ± 0.4
L32A	6512.5	6512.4 ± 0.1
I33A	6512.5	6512.4 ± 0.2
L34A	6512.5	6512.4 ± 0.1
K57A	6497.4	6497.2 ± 0.1

TABLE 2
Statistics for X-ray Data Collection, Processing and Refinement

PDB code	5DU1	5DZ5	5DO6
Mutation	Wild-type	Wild-type	T23A
Protein solution	MMB-1 5 mg/ml in 50 mM sodium acetate, pH 5.5.	MMB-1 5 mg/ml in 50 mM sodium acetate, pH 5.5.	200 µg MMB-1-T23A + 40 µl 50 mM sodium acetate, pH 5.5.
Crystallization ^a	18% PEG4000, 3% MPD, 3% 1,4-dioxane, 1.88 M imidazole malate, pH 6.0.	30% PEG600, 0.2 M imidazole malate, pH 7.0.	21.6% PEG600, 3.6% PEG 20,000, 72 mM MMT [#] , pH 4.0, 108 mM MIB [#] , pH 10.0.
Cryoprotectant	40% SM5, 30% PEG 600, 100 mM AAB [#] 40/60, pH 7.0.	40% SM5, 30% PEG 600, 100 mM AAB [#] 40/60, pH 7.0.	*40% CM9, 30% MPEG 550, 100 mM sodium acetate, pH 6.5, 100 mM KI soaked for 1 min.
Data Collection			
Source	ESRF Massif-1 ID30A-1	ESRF Massif-1 ID30A-1	Soleil Proxima-2
Method	Automatic data collection	Automatic data collection	Helical scan
Wavelength (Å)	0.9650	0.9650	0.9801
Space group	P2 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2	C222 ₁
Unit-cell (Å/°)	39. 50.2 46.9 / β = 93.4	46.8 46.8 80.6	55.9 101.0 53.5
Molec./asym.	4	2	2
Resolution (Å)	39.0-1.80 / 1.91-1.80	40.5-1.95 / 2.00-1.95	36.1-1.70 / 1.74-1.70
CC _{1/2} ^{&}	99.7 / 96.2	99.8 / 45.9	99.9 / 95.7
R _{merge} (%)	6.3 / 25.7	18.3 / 180.2	6.1 / 40.8
R _{p.i.m.} (%)	5.2 / 21.0	17.1 / 168.7	5.7 / 36.5
Mean I/σ(I)	13.8 / 4.35	9.66 / 1.19	21.8 / 4.6
Completeness (%)	95.3 / 84.7	99.9 / 100.0	97.5 / 78.7
Multiplicity	2.98	7.5	7.12
Structure Determination			
Method	Molecular Replacement	Molecular Replacement	SAD Phasing
Program	Phaser	MOLREP	Autosol
Model	5DO6	5DO6	Iodide
Refinement			
Resolution (Å)	1.80	1.95	1.7
No. of reflections	16139	6981	16719 (non-anomalous)
No. atoms	2054	1000	1171
R _{work} (%)	18.6	19.5	17.2
R _{free} (%)	23.6	24.4	20.5
Average B (Å ²)	28.0	34.0	22.0
R.m.s. deviations			
Bond lengths (Å)	0.013	0.025	0.006
Bond angles (°)	2.065	1.991	1.017
Ramachandran^l			
favoured (%)	96	97.3	97.5 ^l
outliers (#)	0	0	0

^aCrystallization: Re-suspended lyophilized protein crystallized in CrystChem plates stored in a cooled incubator at 20 °C.

*Cryoprotection: CM9: 12.5 % diethylene glycol + 12.5 % MPD + 25 % glycerol + 12.5 % 1,2-propanediol + 12.5 % DMSO. (16); SM5: 12.5 % ethylene glycol + 12.5 % glycerol + 12.5 % 1,2-propanediol + 12.5 % 2,3-butanediol + 25 % DMSO + 25 % 1,4-dioxane (35).

[#]Buffers are at 100 mM. AAB : Na acetate, ADA, Bicine; MMT: L-malic acid, MES, Tris (component A pH 4; B pH 9); Na Malonate, imidazole, boric acid (component A pH 4; B pH 10) (36).

[&]CC_{1/2}: Data quality correlation coefficient (27).

[†]From phenix.refine output (24).

TABLE 3**List of Crystal Polymorphs**

Crystallization experiments for sMamb-1 variants were carried out with lyophilized peptide redissolved at 5 mg/ml in 50 mM sodium acetate pH 5.5 in CrysChem sitting drop vapour diffusion plates with 1 μ l drops of protein and precipitant, stored in a constant temperature incubator at 20 °C starting from optimized crystallization conditions used in the crystallization of wild-type sMamb-1, which were streak seeded (15). All variants required minor variations in precipitant formulation to yield large crystals, and this, combined with the mutation, has resulted in various polymorphs, in which each variant makes different lattice interactions. The large number of polymorphs is not unusual when screening enzyme-drug complexes (16) but less usual with three-finger toxins, with the exception of *Dendroaspis angusticeps* MT7, for which crystals of various morphology were obtained but none that lead to useful X-ray data until the diiodotyrosine variant was successfully crystallized (37).

Protein	Space-group	Molecules per asymmetric unit	Solvent content	Cell parameters (Å)	Cell angles (°)	Resolution (Å)	Status
Wild-type	P2 ₁	4	29.4%	39.50.2 46.9	90 93.4 90	2.0-1.8	Deposited PDB_id=5DU1
Wild-type	P4 ₁ 2 ₁ 2	2	26.7%	46.8 46.8 80.6	90 90 90	2.8-1.75	Deposited PDB_id=5DZ5
Wild-type	P1	16	43.7%	46.2 47.6 106.9	91.9 90.2 101.9	1.97	Refined R=24.2% R-free=30.1%
H21A	P1	8	41.0%	46.3 46.6 52.3	85.8 86.2 77.3	2.05	Refined R=22.6% R-free=28.8
T23A	C222 ₁	2	57.2%	55.9 101.0 53.5	90 90 90	1.7	Deposited PDB_id=5DO6
F27A	P2	12	39.3%	46.3 55.5 124.6	90 92.7 90	2.5	Being refined R=25.1% R-free=36.1%
R28A	P4 ₁ 2 ₁ 2	2	38.4%	49.3 49.3 86.4	90 90 90	1.55	Refined R=13.7% R-free=22.8%
K31A	P2	(4)*	41.0%*	35.2 51.6 59.9	90 90.05 90	2.5	Collected
I33A	P2 ₁	8	43.0%	58.9 52.6 73.2	90 90.6 90	2.85	Being refined R=28.5% R-free=35.2%

* Predicted values

TABLE 4
Pharmacological Properties of sMamb-1 Variants

IC₅₀ values (mean ± S.E.M) of the inhibition of rat ASIC1a current by wild-type and sMamb-1 variants. Asterisks indicate a statistically significant difference compared with wild-type sMamb-1 (Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post hoc test done from 4-10 dose-response curves for each mutant). Note that two-electrode voltage-clamp recordings have been obtained using a manual setup, leading to an IC₅₀ value for sMamb-1 that is not exactly the same as the one obtained with the Robocyte2 automated workstation shown in Fig. 3A (10 nM vs. 3.4 nM, respectively).

Peptide	IC ₅₀ (nM)	Hill slope	Fold change
sMamb-1	10 ± 1	1.1 ± 0.1	-
H21A	31 ± 3	1.4 ± 0.2	3.1
T23A	39 ± 5	1.2 ± 0.1	3.8
F27A	341 ± 29***	1.3 ± 0.1	33.3
R28A	193 ± 11**	1.2 ± 0.1	18.8
N29A	28 ± 2	1.2 ± 0.1	2.8
L30A	51 ± 3	1.1 ± 0.1	4.8
K31A	49 ± 2	1.4 ± 0.1	4.8
L32A	21979 ± 4174***	0.8 ± 0.1	2147.8
I33A	163 ± 5***	1.5 ± 0.1	15.9
L34A	579 ± 59***	1.3 ± 0.1	56.6
K57A	15 ± 4	1.2 ± 0.1	1.5

Acknowledgments: We thank members of the Lingueglia team for discussions, M. Lazdunski for support, V. Friend for technical assistance and C. Chevance for secretarial assistance. This work was supported by CNRS, INSERM and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV4-0009). The help of the staff at the Soleil beamline Proxima 2A and ESRF beamline Massifl ID30A-1 and the grant of beamtime are acknowledged with gratitude, in particular to Drs. Shepard and Savko for assistance during data collection. We thank G. Upert for fruitful discussion.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contributions: G.M., P.K., and M.L. performed the chemical synthesis, purification and CD spectra analysis of wild-type and sMamb-1 variants. Electrophysiological measurements and *in vivo* analgesic experiments were carried out by M.S., S.D., T.B. and A.B.. E.A.S and L.T. determined the crystal structures of wild-type and alanine-variants of sMamb-1. D.D. performed the structural modeling of the toxin-ASIC channel complex. E.L. and D.S. conceived and designed the project. All the authors made contributions to the writing of the manuscript and approved the final version.

REFERENCES

1. Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A. S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2012) Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* **490**, 552-555
2. Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* **386**, 173-177
3. Deval, E., and Lingueglia, E. (2015) Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacol.* **94**, 49-57
4. Noel, J., Salinas, M., Baron, A., Diochot, S., Deval, E., and Lingueglia, E. (2010) Current perspectives on acid-sensing ion channels: new advances and therapeutic implications. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **3**, 331-346
5. Wemmie, J. A., Taugher, R. J., and Kreple, C. J. (2013) Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 461-471
6. Baron, A., Diochot, S., Salinas, M., Deval, E., Noel, J., and Lingueglia, E. (2013) Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon* **75**, 187-204
7. Baron, A., and Lingueglia, E. (2015) Pharmacology of acid-sensing ion channels - Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacol.* **94**, 19-35
8. Woolf, C. J. (2013) Pain: morphine, metabolites, mambas, and mutations. *Lancet Neurol.* **12**, 18-20
9. Diochot, S., Alloui, A., Rodrigues, P., Dauvois, M., Friend, V., Aissouni, Y., Eschalier, A., Lingueglia, E., and Baron, A. (2015) Analgesic effects of mambalgin

- peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain. *Pain* doi: [10.1097/j.pain.0000000000000397](https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000397)
10. Salinas, M., Besson, T., Delettre, Q., Diochot, S., Boulakirba, S., Douguet, D., and Lingueglia, E. (2014) Binding site and inhibitory mechanism of the mambalgin-2 pain-relieving peptide on acid-sensing ion channel 1a. *J. Biol. Chem.* **289**, 13363-13373
 11. Schroeder, C. I., Rash, L. D., Vila-Farres, X., Rosengren, K. J., Mobli, M., King, G. F., Alewood, P. F., Craik, D. J., and Durek, T. (2014) Chemical synthesis, 3D structure, and ASIC binding site of the toxin mambalgin-2. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 1017-1020
 12. Pan, M., He, Y., Wen, M., Wu, F., Sun, D., Li, S., Zhang, L., Li, Y., and Tian, C. (2014) One-pot hydrazide-based native chemical ligation for efficient chemical synthesis and structure determination of toxin Mambalgin-1. *Chem. Commun. (Camb)* **50**, 5837-5839
 13. Hidalgo, P., and MacKinnon, R. (1995) Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* **268**, 307-310
 14. Stura, E. A., Nemerow, G. R., and Wilson, I. A. (1992) Strategies in the Crystallization of Glycoproteins and Protein Complexes. *J. Cryst. Growth* **122**, 273-285
 15. Stura, E. A., and Wilson, I. A. (1991) Applications of the Streak Seeding Technique in Protein Crystallization. *J. Cryst. Growth* **110**, 270-282
 16. Vera, L., Antoni, C., Devel, L., Czarny, B., Cassar-Lajeunesse, E., Rossello, A., Dive, V., and Stura, E. A. (2013) Screening Using Polymorphs for the Crystallization of Protein-Ligand Complexes. *Cryst. Growth Des.* **13**, 1878-1888
 17. Duran, D., Couster, S., Le, D., K., Delmotte, A., Fox, G., Meijers, R., and Shepard, W. (2013) PROXIMA 2A – A New Fully Tunable Micro-focus Beamline for Macromolecular Crystallography. *Journal of Physics: Conference Series* **425**, 012005
 18. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D* **66**, 125-132
 19. Terwilliger, T. C., Adams, P. D., Read, R. J., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Grosse-Kunstleve, R. W., Afonine, P. V., Zwart, P. H., and Hung, L. W. (2009) Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr. D* **65**, 582-601
 20. McCoy, A. J., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2004) Simple algorithm for a maximum-likelihood SAD function. *Acta Crystallogr. D* **60**, 1220-1228
 21. Terwilliger, T. C. (2002) Automated structure solution, density modification and model building. *Acta Crystallogr. D* **58**, 1937-1940
 22. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D* **66**, 486-501
 23. Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., and Vagin, A. A. (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D* **67**, 355-367
 24. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D* **66**, 213-221
 25. Vagin, A., and Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. D* **66**, 22-25
 26. Mutter, M., Nefzi, A., Sato, T., Sun, X., Wahl, F., and Wöhr, T. (1995) Pseudo-Prolines (Psi-Pro) for Accessing Inaccessible Peptides. *Peptide Res.* **8**, 145-153
 27. Diederichs, K., and Karplus, P. A. (2013) Better models by discarding data? *Acta Crystallogr. D* **69**, 1215-1222

28. Mourier, G., Dutertre, S., Fruchart-Gaillard, C., Menez, A., and Servent, D. (2003) Chemical synthesis of MT1 and MT7 muscarinic toxins: critical role of Arg-34 in their interaction with M1 muscarinic receptor. *Mol. Pharmacol.* **63**, 26-35
29. Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Blanchet, G., Vera, L., Gilles, N., Menez, R., Marcon, E., Stura, E. A., and Servent, D. (2012) Engineering of three-finger fold toxins creates ligands with original pharmacological profiles for muscarinic and adrenergic receptors. *PLoS one* **7**, e39166
30. Chowdhury, S., Haehnel, B. M., and Chanda, B. (2014) A self-consistent approach for determining pairwise interactions that underlie channel activation. *J. Gen. Physiol.* **144**, 441-455
31. Saez, N. J., Mobli, M., Bieri, M., Chassagnon, I. R., Malde, A. K., Gamsjaeger, R., Mark, A. E., Gooley, P. R., Rash, L. D., and King, G. F. (2011) A dynamic pharmacophore drives the interaction between Psalmotoxin-1 and the putative drug target acid-sensing ion channel 1a. *Mol. Pharmacol.* **80**, 796-808
32. Bacongus, I., and Gouaux, E. (2012) Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. *Nature* **489**, 400-405
33. Dawson, R. J., Benz, J., Stohler, P., Tetaz, T., Joseph, C., Huber, S., Schmid, G., Hugin, D., Pflimlin, P., Trube, G., Rudolph, M. G., Hennig, M., and Ruf, A. (2012) Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier Psalmotoxin 1. *Nat. Commun.* **3**, 936
34. Saez, N. J., Deplazes, E., Cristofori-Armstrong, B., Chassagnon, I. R., Lin, X., Mobli, M., Mark, A. E., Rash, L. D., and King, G. F. (2015) Molecular dynamics and functional studies define a hot spot of crystal contacts essential for PcTx1 inhibition of acid-sensing ion channel 1a. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 4985-4995
35. Ciccone, L., Tepshi, L., Nencetti, S., and Stura, E. A. (2015) Transthyretin complexes with curcumin and bromo-estradiol: evaluation of solubilizing multicomponent mixtures. *New Biotechnol.* **32**, 54-64
36. Newman, J. (2004) Novel buffer systems for macromolecular crystallization. *Acta Crystallogr. D* **60**, 610-612
37. Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Marquer, C., Stura, E., Birdsall, N. J., and Servent, D. (2008) Different interactions between MT7 toxin and the human muscarinic M1 receptor in its free and N-methylscopolamine-occupied states. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1554-1563

Abbreviations: ASIC, acid-sensing ion channel; sMamb-1, synthetic mambalgin-1; HCTU, hexafluorophosphate; NMP, N-methylpyrrolidone; NMM, N-methylmorpholine; DCM Dichloromethane; TIPS, triisopropylsilane; GSSG, oxidized glutathione; SPPS, solid phase peptide synthesis; MPD, methyl pentanediol; ADA, N-(2-acetamido)iminodiacetic acid; RMSD, root-mean-square deviation

FIGURES LEGENDS

FIGURE 1. LC-ESI/MS of the Crude Mixture Resulting from the Synthesis of sMamb-1 in the Absence of Pseudoproline. Analysis was performed on an Agilent 1100 series (Santa Clara, Ca) coupled online to an ion trap mass spectrometer Esquire equipped with an AP-ESI source (Bruker, Germany) LC separation Xbridge C18 BEH300, 3.5 μm (4.6 x 150 mm), gradient: 10 - 45% acetonitrile in TFA 0.1% , 45 min, 1 ml.min⁻¹. The sequence of sMamb-1 is shown at the top of the figure.

FIGURE 2. RP-HPLC Chromatograms of sMamb-1 Synthesis and Refolding, and MS Spectrum and Circular Dichroism Analyses. (A) Crude mixture obtained after SPPS of sMamb-1; the major peak at 28.5 min corresponds to mambalgin-1, (B) crude mixture after 36 h of refolding and (C) chromatogram of the purified toxin. Separations were performed on a X-Bridge BHE C18-300-5 analytical column (Waters, USA) (250 x 4.5 mm; 1 ml.min⁻¹; solvent A, H₂O/TFA 0.1%; solvent B, acetonitrile/TFA 0.1%; gradient, 20 - 40% solvent B in 40 min). Insert in (C) shows the ESI-MS spectrum of the individual peak. (D) Circular dichroism spectra of wild-type and alanine variants of sMamb-1 showing their three-finger fold signature characterized by a maxima and a minima at 202 nm and 213 nm, respectively.

FIGURE 3. *In Vitro* and *In Vivo* Biological Activity of sMamb-1. A, Inhibition by sMamb-1 of recombinant ASIC channels. Inhibitory sMamb-1 dose-response curves (% of control current) for homomeric rat ASIC1a, homomeric rat ASIC1b and heteromeric rat ASIC1a + ASIC2a channels expressed in *Xenopus* oocytes. Curves were fitted according to the sigmoidal dose-response equation: $Y = \text{current \%} / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * n_H)})$, with n_H the Hill slope number and IC_{50} the concentration that inhibits 50% of the control current. IC_{50} values are 3.4 ± 0.6 (nH = -0.75), 22.2 ± 1.7 (nH = -0.9) and 152 ± 21 nM (nH = -1) for rASIC1a, rASIC1b and rASIC1a + rASIC2a currents, respectively (n= 3-5). B, Intraplantar injection of sMamb-1 reverses thermal inflammatory hyperalgesia. Effect of *i.pl.* injection of sMamb-1 (0.34 nmole/mouse) in the left hindpaw (vehicle: saline + 0.05% BSA) on carrageenan-induced heat hyperalgesia (carrageenan 2%, 2 h) determined using the paw-immersion test (46 °C). Mean \pm SEM, n = 10-20. *, p < 0.05; **, p < 0.001; ***, p < 0.005 compared to vehicle (unpaired t-test); #, p < 0.05; ##, p < 0.001; ###, p < 0.005 compared to control value before carrageenan injection (paired t-test). CAR, carrageenan.

FIGURE 4. Crystallographic Structures of sMamb-1 Polymorphs. The sMamb-1 structures belong to the three-finger fold toxin family and the two structures obtained differ on loop III that can form either a short β -strand (sMamb-1A) or a short single turn α -helix (sMamb-1B).

FIGURE 5. Electron Density and Asymmetric Unit Content for Four Variants of sMamb-1. The various crystal polymorphs that have been obtained for the wild-type and for the various alanine-variants show a variable number of sMamb-1 molecules assembled together to form dimers and tetramers that constitute the asymmetric unit of the various polymorphs. The comparison of the structures reinforce the variability of finger III that can assume many intermediate conformations between those of sMamb-1A and sMamb-1B.

A. The centre of symmetry of the well conserved dimer formed by a β -zipper is shown in stick representation. B. The assembly of the tetramer is mediated by an ensemble of hydrophobic residues

shown in black. **C.** Leu32, shown in space-filling spheres, from four different molecules form the centre of the ensemble by their interaction with each other. **D.** The H21A variant shows two such tetramers while the wild-type P2₁ crystal form just one. **E.** The loss of Phe27 side chain by the F27A variant results in 12 molecules in the asymmetric unit. The dimer is preserved but not the integrity of the tetramer and in the lattice the typical manner in which the tetramers assemble is lost completely. **F.** In those cases where a single dimer is found in the asymmetric unit such as for the R28A variant, that shares the same polymorph as P4₁2₁2 form of the wild-type protein and the T23A variant in the C222₁ space-group, a symmetry operation rebuilds the tetramer. The tetramers then assemble together in a manner that reproduces the lattice found in the asymmetric unit of the polymorphs of lower symmetry. **G.** The I33A substitution is close to the centre of symmetry of the well conserved dimer formed by a β -zipper shown in stick representation in **A**.

FIGURE 6. Comparison between NMR and X-ray Mambalgin Structures. **A:** (left) Superimposition of all the NMR structures of sMamb-1 with the two polymorphs crystallographic structures shown in blue and violet, (right) profile view of the superimposition of NMR model 1 with crystal structure sMamb-1A.

Visualization of the residues studied in this paper in the X-ray (**B**) or NMR structures (**C**) of Mamb-1, respectively (12). Modified residues are colored in pink for interacting and yellow for non-interacting. The key residue Leu32 is shown in red.

FIGURE 7. Inhibition of Recombinant ASIC1a Channels by sMamb-1 Variants. Alanine-scanning of residues located in or close to the finger II region of sMamb-1. Dose-response curves (% of control current) of the inhibition of homomeric rat ASIC1a channels expressed in *Xenopus* oocytes by sMamb-1 and its variants. See Table 4 for IC₅₀ values and Hill slopes of the sigmoid fits shown (n = 4-10). For clarity, curves have been split in two panels and the same curve for sMamb-1, which is different from the one shown in Fig. 3 (see legend Table 4), is included in both panels.

FIGURE 8. Inhibition of Recombinant ASIC1a-F350L Channels by the sMamb-1 Variants F27A, L32A and L34A. **A-C,** Dose-response curves (% of control current) of the inhibition of F350L mutant ASIC1a channels by sMamb-1 (n = 4) and its variants F27A (**A**, n = 5), L32A (**B**, n = 4) and L34A (**C**, n = 4). Inhibition of ASIC1a by WT sMamb-1 and its variants was described in Fig. 7. **D,** Pharmacological properties of the ASIC1a-F350L inhibition by sMamb-1 and its variants (calculated from data shown in A-C). The fold-change is relative to ASIC1a inhibition by wild-type sMamb-1 (see Table 4). The variation in free energy of interaction ($\Delta\Delta G_{int}$) was calculated from the IC₅₀ values shown here and in Table 2. For clarity, curves have been split in three panels (A-C) and the same curves for sMamb-1/ASIC1a (see also Fig. 7) and sMamb-1/ASIC1aF350L are shown in all panels.

FIGURE 9. Selected Binding Model of sMamb-1 Crystal Structure on the Three-Dimensional Model Structure of Rat ASIC1a. Surface representation of the ASIC1a-mambalgin-1 complex (side view). Subunits are shown with different gray levels and toxin is shown in blue. A close view of the binding interface between ASIC1a and mambalgin-1 is shown on the top left. Mutated residues are colored in pink and yellow for interacting and non-interacting ones, respectively. Key residue Leu32 is shown in red, and residue Phe350 in ASIC1a that may form part of the binding surface is indicated in

green (10). Bottom left: zoom on the interaction surface between sMamb-1 and ASIC1a, highlighting the proximity between Phe350 and the toxin.

FIGURE 1. LC-ESI/MS of the Crude Mixture Resulting from the Synthesis of sMamb-1 in the Absence of Pseudoproline. Analysis was performed on an Agilent 1100 series (Santa Clara, Ca) coupled online to an ion trap mass spectrometer Esquire equipped with an AP-ESI source (Bruker, Germany) LC separation Xbridge C18 BEH300, 3.5 μm (4.6 x 150 mm), gradient: 10 - 45% acetonitrile in TFA 0.1% , 45 min, 1 ml.min⁻¹. The sequence of sMamb-1 is shown at the top of the figure.

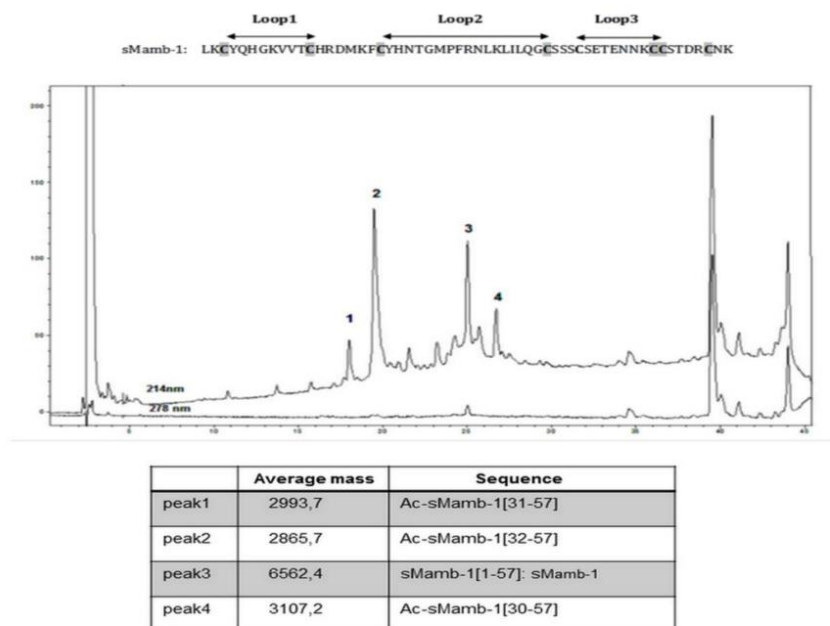


FIGURE 2. RP-HPLC Chromatograms of sMamb-1 Synthesis and Refolding, and MS Spectrum and Circular Dichroism Analyses. (A) Crude mixture obtained after SPPS of sMamb-1; the major peak at 28.5 min corresponds to mambalgin-1, (B) crude mixture after 36 h of refolding and (C) chromatogram of the purified toxin. Separations were performed on a X-Bridge BHE C18-300-5 analytical column (Waters, USA) (250 x 4.5 mm; 1 ml.min⁻¹; solvent A, H₂O/TFA 0.1%; solvent B, acetonitrile/TFA 0.1%; gradient, 20 - 40% solvent B in 40 min). Insert in (C) shows the ESI-MS spectrum of the individual peak. (D) Circular dichroism spectra of wild-type and alanine variants of sMamb-1 showing their three-finger fold signature characterized by a maxima and a minima at 202 nm and 213 nm, respectively.

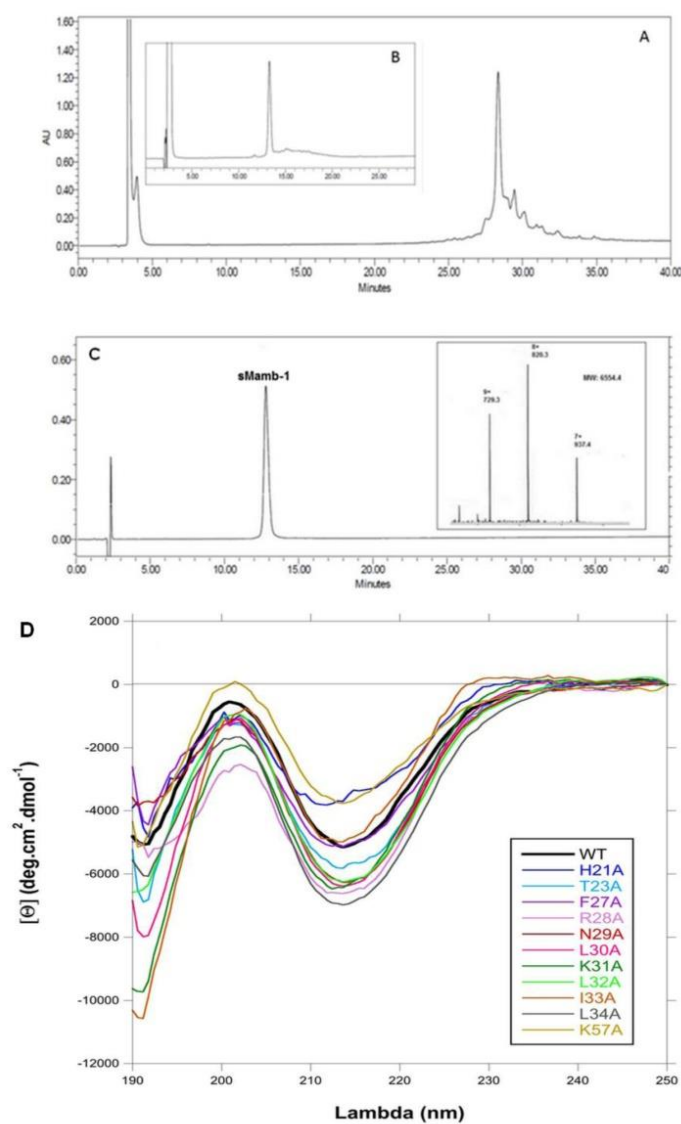


FIGURE 3. *In Vitro* and *In Vivo* Biological Activity of sMamb-1. **A**, Inhibition by sMamb-1 of recombinant ASIC channels. Inhibitory sMamb-1 dose-response curves (% of control current) for homomeric rat ASIC1a, homomeric rat ASIC1b and heteromeric rat ASIC1a + ASIC2a channels expressed in *Xenopus* oocytes. Curves were fitted according to the sigmoidal dose-response equation: $Y = \text{current \%} / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * n_H)})$, with n_H the Hill slope number and IC_{50} the concentration that inhibits 50% of the control current. IC_{50} values are 3.4 ± 0.6 (nH = -0.75), 22.2 ± 1.7 (nH = -0.9) and 152 ± 21 nM (nH = -1) for rASIC1a, rASIC1b and rASIC1a + rASIC2a currents, respectively (n= 3-5). **B**, Intraplantar injection of sMamb-1 reverses thermal inflammatory hyperalgesia. Effect of *i.pl.* injection of sMamb-1 (0.34 nmole/mouse) in the left hindpaw (vehicle: saline + 0.05% BSA) on carrageenan-induced heat hyperalgesia (carrageenan 2%, 2 h) determined using the paw-immersion test (46 °C). Mean \pm SEM, n = 10-20. *, p < 0.05; **, p < 0.001; ***, p < 0.005 compared to vehicle (unpaired t-test); #, p < 0.05; ##, p < 0.001; ###, p < 0.005 compared to control value before carrageenan injection (paired t-test). CAR, carrageenan.

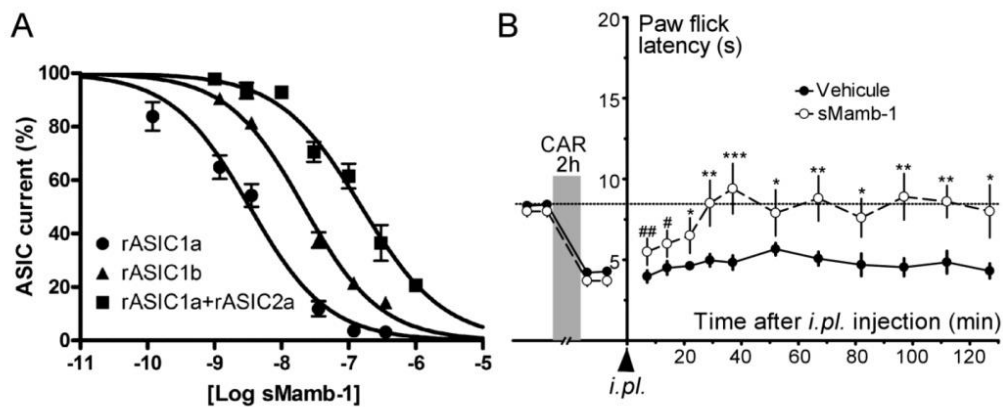


FIGURE 4. Crystallographic Structures of sMamb-1 Polymorphs. The sMamb-1 structures belong to the three-finger fold toxin family and the two structures obtained differ on loop III that can form either a short β -strand (sMamb-1A) or a short single turn α -helix (sMamb-1B).

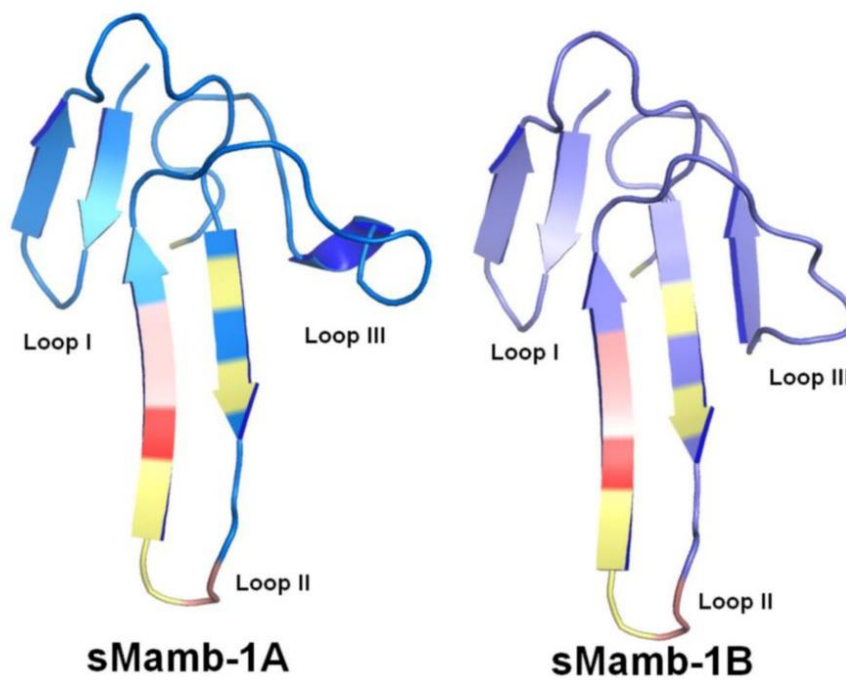


FIGURE 5. Electron Density and Asymmetric Unit Content for Four Variants of sMamb-1.

The various crystal polymorphs that have been obtained for the wild-type and for the various alanine-variants show a variable number of sMamb-1 molecules assembled together to form dimers and tetramers that constitute the asymmetric unit of the various polymorphs. The comparison of the structures reinforce the variability of finger III that can assume many intermediate conformations between those of sMamb-1A and sMamb-1B.

A. The centre of symmetry of the well conserved dimer formed by a β -zipper is shown in stick representation. **B.** The assembly of the tetramer is mediated by an ensemble of hydrophobic residues shown in black. **C.** Leu32, shown in space-filling spheres, from four different molecules form the centre of the ensemble by their interaction with each other. **D.** The H21A variant shows two such tetramers while the wild-type P2₁ crystal form just one. **E.** The loss of Phe27 side chain by the F27A variant results in 12 molecules in the asymmetric unit. The dimer is preserved but not the integrity of the tetramer and in the lattice the typical manner in which the tetramers assemble is lost completely. **F.** In those cases where a single dimer is found in the asymmetric unit such as for the R28A variant, that shares the same polymorph as P4₁2₁2 form of the wild-type protein and the T23A variant in the C222₁ space-group, a symmetry operation rebuilds the tetramer. The tetramers then assemble together in a manner that reproduces the lattice found in the asymmetric unit of the polymorphs of lower symmetry. **G.** The I33A substitution is close to the centre of symmetry of the well conserved dimer formed by a β -zipper shown in stick representation in **A**.

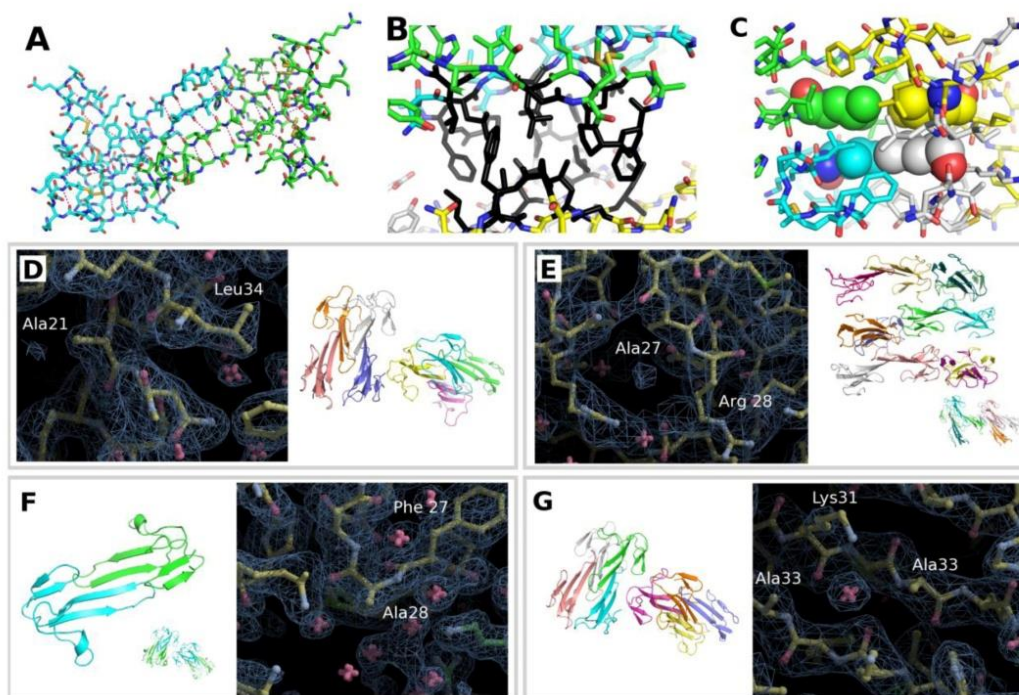


FIGURE 6. Comparison between NMR and X-ray Mambalgin Structures. A: (left) Superimposition of all the NMR structures of sMamb-1 with the two polymorphs crystallographic structures shown in blue and violet, (right) profile view of the superimposition of NMR model 1 with crystal structure sMamb-1A. Visualization of the residues studied in this paper in the X-ray (B) or NMR structures (C) of Mamb-1, respectively (12). Modified residues are colored in pink for interacting and yellow for non-interacting. The key residue Leu32 is shown in red.

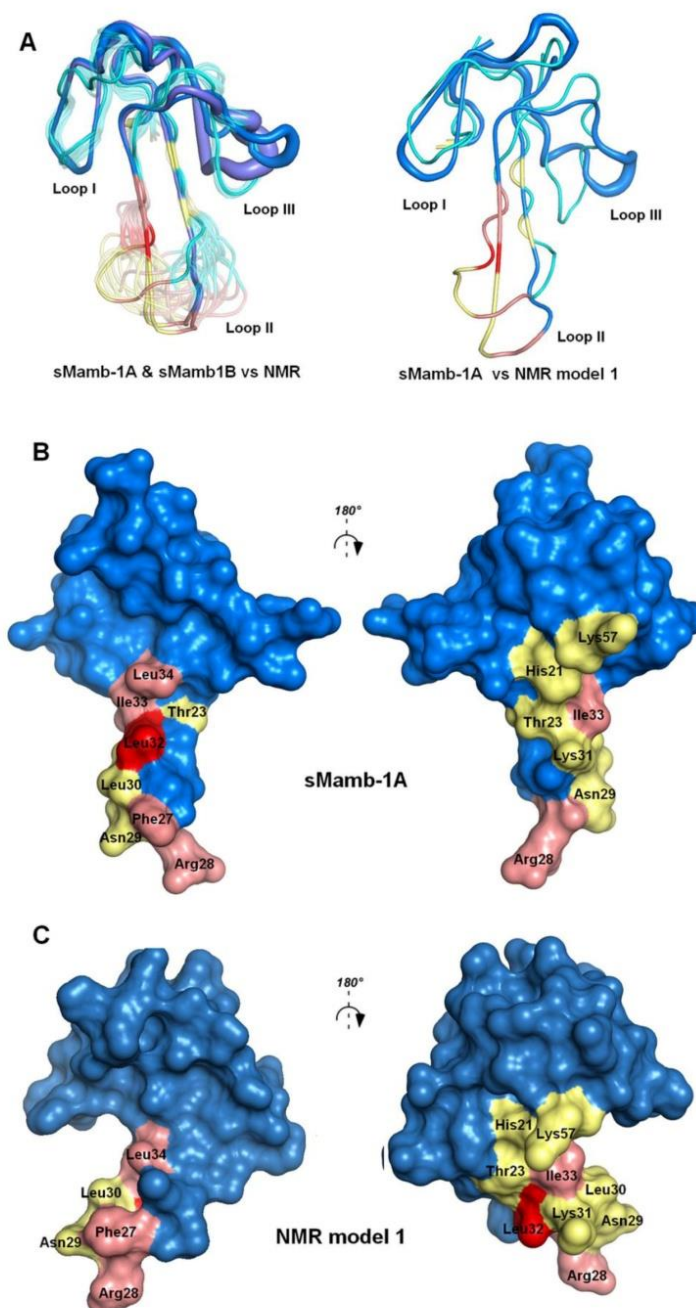


FIGURE 7. Inhibition of Recombinant ASIC1a Channels by sMamb-1 Variants. Alanine-scanning of residues located in or close to the finger II region of sMamb-1. Dose-response curves (% of control current) of the inhibition of homomeric rat ASIC1a channels expressed in *Xenopus* oocytes by sMamb-1 and its variants. See Table 4 for IC₅₀ values and Hill slopes of the sigmoid fits shown (n = 4-10). For clarity, curves have been split in two panels and the same curve for sMamb-1, which is different from the one shown in Fig. 3 (see legend Table 4), is included in both panels.

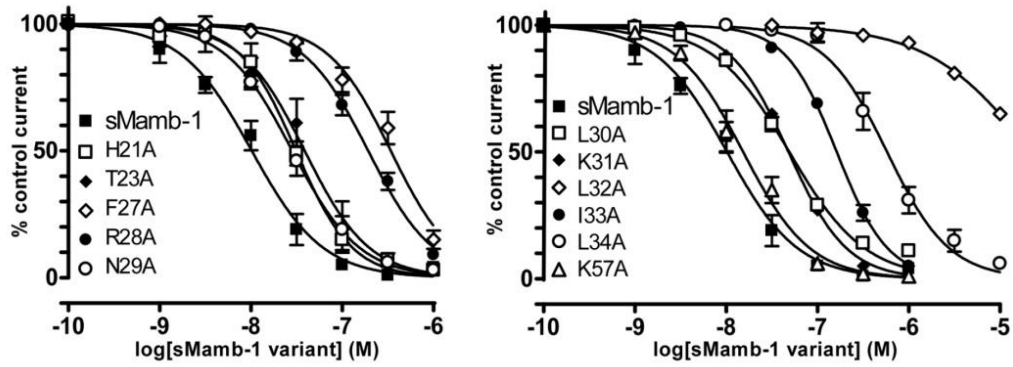


FIGURE 8. Inhibition of Recombinant ASIC1a-F350L Channels by the sMamb-1 Variants F27A, L32A and L34A. A-C, Dose-response curves (% of control current) of the inhibition of F350L mutant ASIC1a channels by sMamb-1 (n = 4) and its variants F27A (A, n = 5), L32A (B, n = 4) and L34A (C, n = 4). Inhibition of ASIC1a by WT sMamb-1 and its variants was described in Fig. 7. D, Pharmacological properties of the ASIC1a-F350L inhibition by sMamb-1 and its variants (calculated from data shown in A-C). The fold-change is relative to ASIC1a inhibition by wild-type sMamb-1 (see Table 4). The variation in free energy of interaction ($\Delta\Delta G_{int}$) was calculated from the IC_{50} values shown here and in Table 4. For clarity, curves have been split in three panels (A-C) and the same curves for sMamb-1/ASIC1a (see also Fig. 7) and sMamb-1/ASIC1aF350L are shown in all panels.

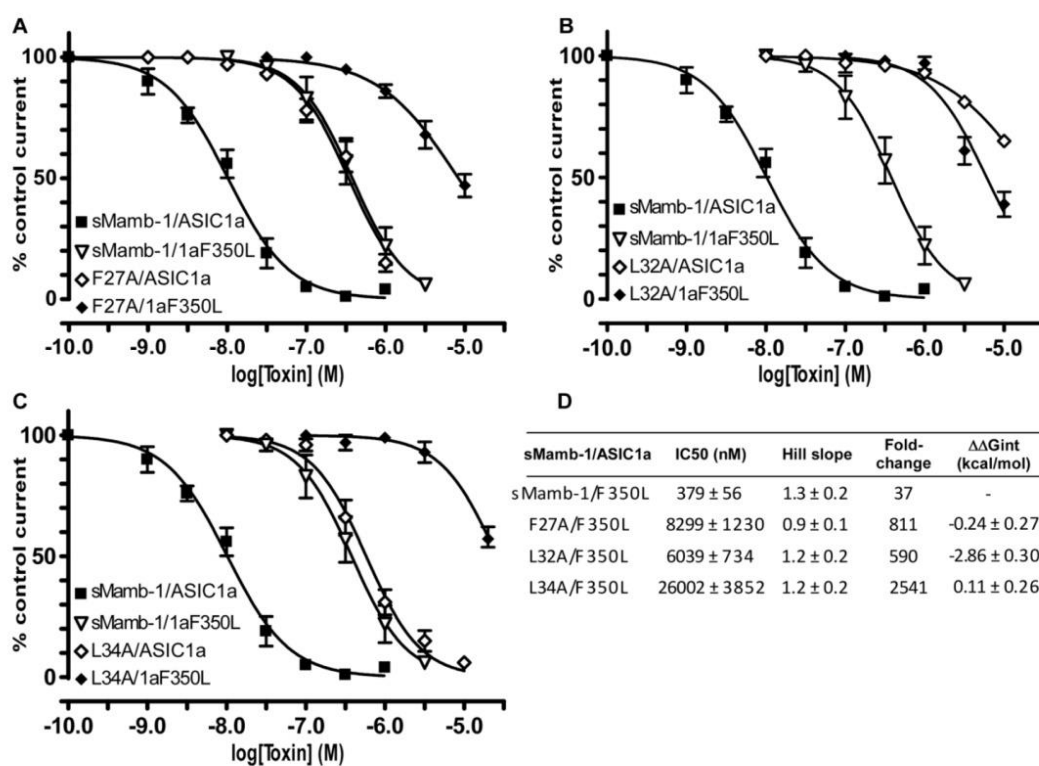
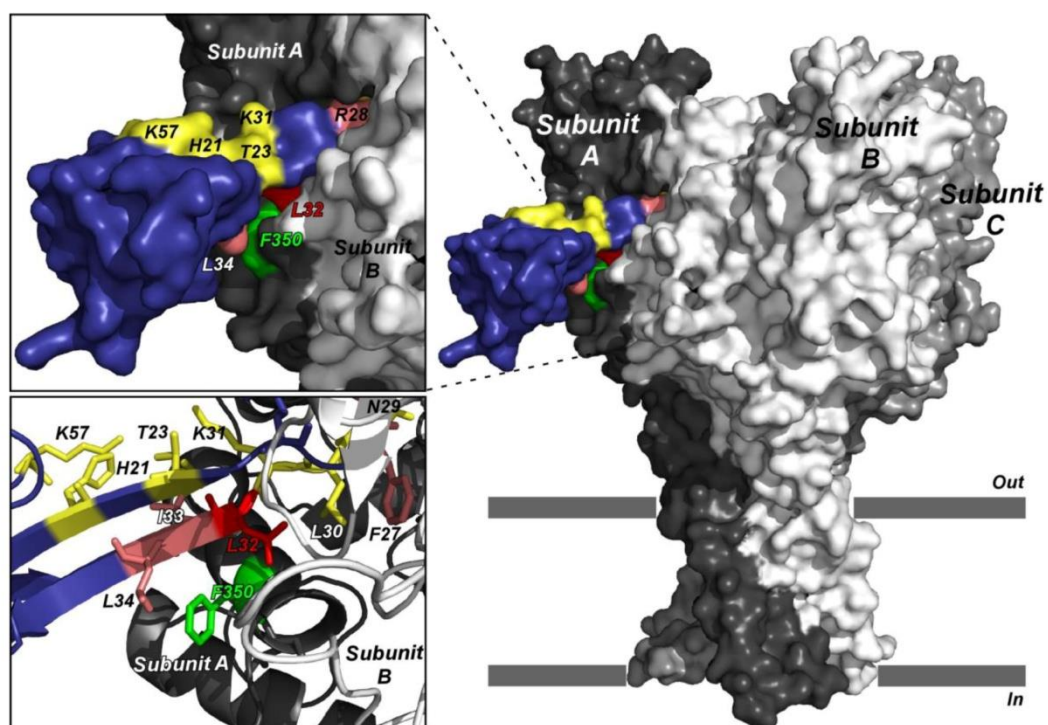


FIGURE 9. Selected Binding Model of sMamb-1 Crystal Structure on the Three-Dimensional Model Structure of Rat ASIC1a. Surface representation of the ASIC1a-mambalgin-1 complex (side view). Subunits are shown with different gray levels and toxin is shown in blue. A close view of the binding interface between ASIC1a and mambalgin-1 is shown on the top left. Mutated residues are colored in pink and yellow for interacting and non-interacting ones, respectively. Key residue Leu32 is shown in red, and residue Phe350 in ASIC1a that may form part of the binding surface is indicated in green (10). Bottom left: zoom on the interaction surface between sMamb-1 and ASIC1a, highlighting the proximity between Phe350 and the toxin.



3. Article 4 : Une nouvelle approche basée sur la pharmacologie pour analyser le mécanisme d'ouverture des canaux ASIC

3.1 Contexte de l'étude :

La fixation des protons sur la boucle extracellulaire des canaux ASIC au niveau de la poche acide entraîne des changements de conformation qui affectent la structure du canal jusqu'aux domaines transmembranaires qui forment le pore (Gonzales, Kawate et al. 2009). Ces domaines transmembranaires sont capables à leur tour d'exercer un rétrocontrôle sur la bouche afin de moduler la sensibilité au pH de ces canaux (Salinas, Lazdunski et al. 2009). L'influence du couplage entre la boucle extracellulaire et les domaines transmembranaires et cytosoliques (N/TM/C), ainsi que la façon dont différents agents pharmacologiques affectent ce couplage, n'ont pas encore été bien caractérisées.

Certaines petites molécules telles que l'amiloride sont connues pour inhiber les canaux ASIC en agissant comme des pores bloqueurs de faible affinité (Baron and Lingueglia 2015). Néanmoins un effet paradoxal stimulateur a été observé à haute concentration sur les canaux ASIC3 (Waldmann, Champigny et al. 1995, Adams, Snyder et al. 1999, Li, Yu et al. 2011). Cet effet a été associé à une interaction possible de l'amiloride avec la boucle extracellulaire et des données provenant de cristallographie et de modélisation informatique suggèrent la fixation de cette molécule au niveau de la poche acide (Qadri, Song et al. 2010, Bacongus, Bohlen et al. 2014). D'autres études montrent que l'amiloride peut se fixer à des sites non-protons dépendants et partager un site commun à des molécules tel que le 2-guanidine-4-méthylquinazoline (GMQ). Bien que le GMQ présente également un léger effet pore bloqueur il est principalement connu pour ses effets activateurs sur ASIC3 (Yu, Chen et al. 2010, Li, Yu et al. 2011).

Les petites molécules comme l'amiloride, le GMQ ou les toxines telles les mambalgines et PcTx1 interfèrent avec le mécanisme d'activation et d'inactivation des canaux ASIC. Nous avons donc décidé d'étudier l'influence de la boucle extracellulaire et des domaines N/TM/C des canaux ASIC1a et ASIC3 sur la sensibilité aux protons en présence de ces différentes molécules. Pour cela nous avons développé une approche basée sur l'analyse cyclique en double mutants, que nous avons déclinée en deux approches : soit une analyse cyclique simple pour analyser la

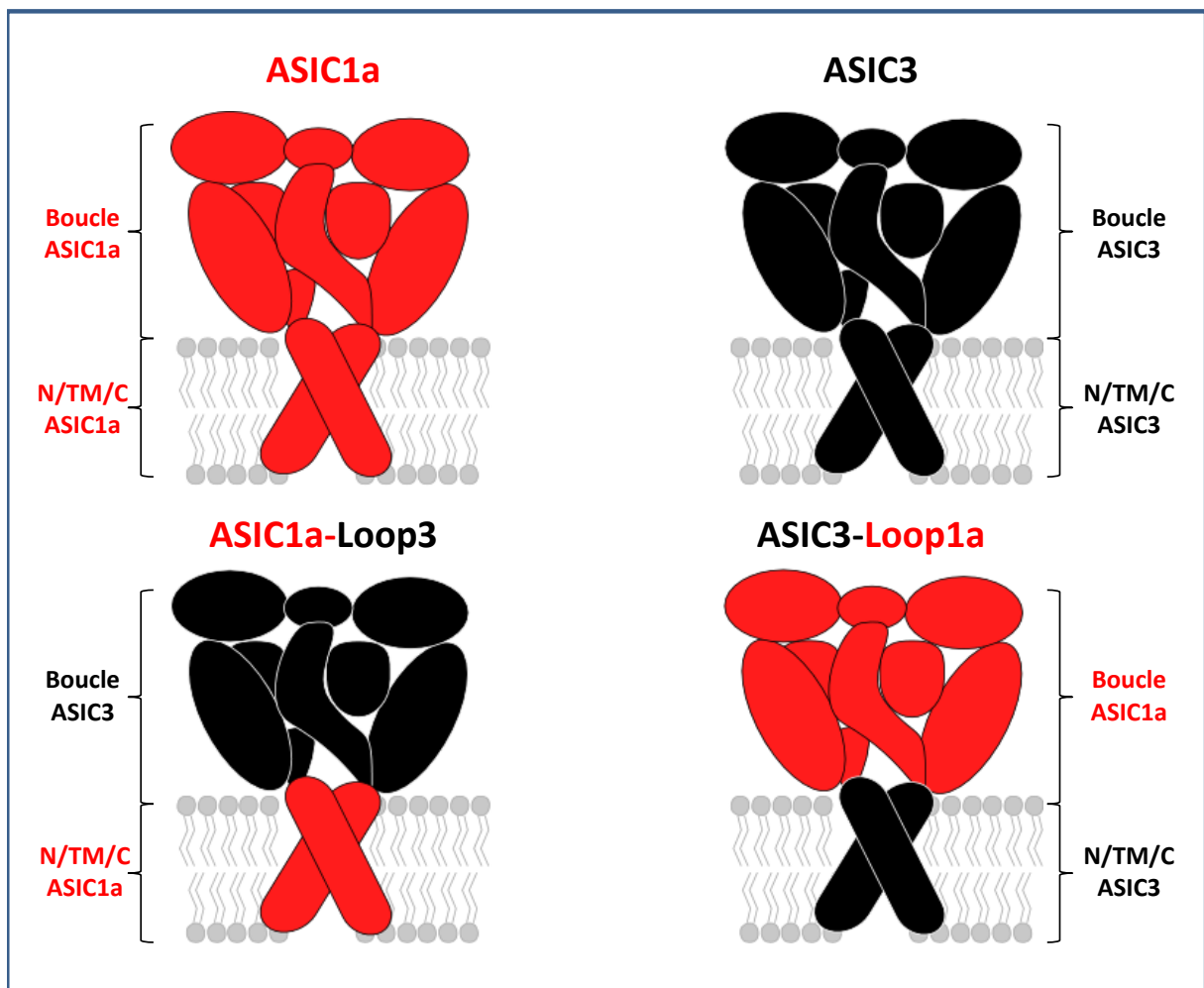
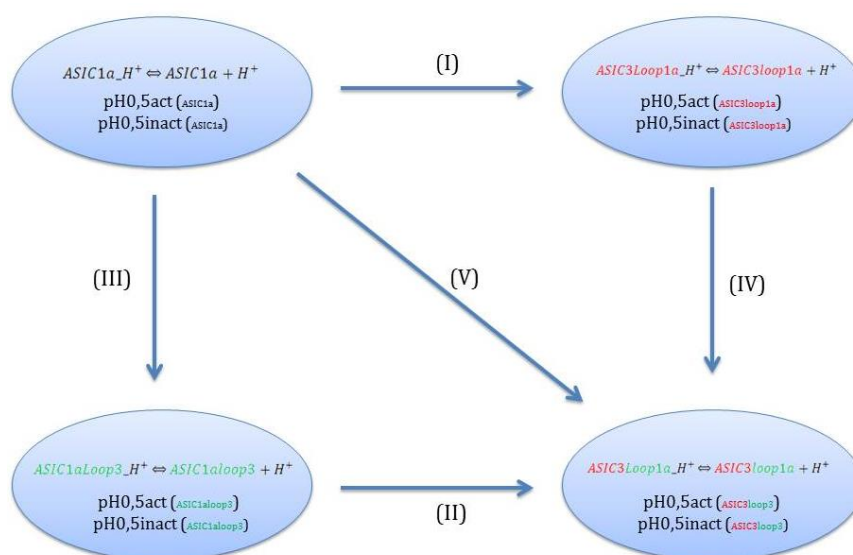


Figure 11 : Représentation schématique des différentes chimères réalisées à partir des canaux ASIC1a et ASIC3

coopérativité entre les effets des agents pharmacologiques, soit une nouvelle analyse cyclique de chimères fonctionnelles pour analyser le couplage entre deux domaines.

3.2 Résultats :

Pour étudier le couplage de la boucle extracellulaire (Loop) et des domaines transmembranaires et cytosoliques (N/TM/C) au cours du mécanisme d'ouverture des canaux ASIC1a et ASIC3 et leur modulation par des agents pharmacologiques, nous avons utilisé deux chimères. La première, nommée ASIC1aLoop3 possède la boucle extracellulaire de ASIC3 avec les domaines N/TM/C de ASIC1a. La seconde nommée ASIC3Loop1a, possède la boucle extracellulaire d'ASIC1a avec les domaines N/TM/C de ASIC3 (figure 11). Les changements de conformation de la boucle extracellulaire induits par la fixation de protons sont transmis aux segments transmembranaires et aux domaines cytosoliques. Inversement ces domaines sont capables à leur tour d'exercer un rétrocontrôle sur la boucle en fonction de leur plus ou moins grande stabilité. Pour comprendre la nature du couplage entre la boucle et les domaines (N/TM/C), nous avons mis au point une méthode d'analyse cyclique de chimères fonctionnelles qui est dérivée de la méthode d'analyse cyclique en double mutants. La mesure des pH de demi-activation ($pH_{0,5act}$) ou de demi-inactivation ($pH_{0,5inact}$) des canaux ASIC1a, ASIC3 et de leurs deux chimères associées a permis de déduire une variable que nous avons appelée Zeta (Z) et qui est proportionnelle à la variation d'énergie libre de couplage classiquement utilisée dans l'analyse cyclique en double mutant pour déterminer l'interaction entre deux résidus ($\Delta\Delta G_{couplage}$). Notre analyse cyclique de chimères fonctionnelles (voir schéma ci dessous) montre que Z n'est pas différent de 0 aussi bien pour l'activation que pour l'inactivation.



Lorsque Z est proche de zéro, cela indique que le couplage entre la boucle extracellulaire et les domaines N/TM/C est purement additif. Les mécanismes de couplage dans ASIC1a, ASIC3, ASIC1aLoop3 et ASIC3Loop1a sont donc similaires. Autrement-dit, ce couplage est indépendant de la nature de la boucle et des domaines N/TM/C. Ces résultats démontrent que la boucle extracellulaire et les domaines N/TM/C présentent le même comportement quel que soit le contexte, c'est-à-dire quelle que soit la nature de la boucle et des domaines N/TM/C. Cela permet de quantifier et comparer la sensibilité relative de chacun de ces domaines entre ASIC1a et ASIC3. Pour l'activation et l'inactivation, nous avons montré que la boucle extracellulaire d'ASIC3 est moins sensible aux protons que la boucle extracellulaire d'ASIC1a. De la même manière, la sensibilité apparente aux protons des domaines N/TM/C d'ASIC1a est moins grande que celle des domaines N/TM/C d'ASIC3. Le fait que les domaines N/TM/C d'ASIC1a diminuent à la fois la sensibilité au pH de l'activation et de l'inactivation implique que ces domaines doivent induire une plus grande stabilité de l'état fermé comparativement à ASIC3. L'effet inverse se produit pour ASIC3, ce qui confirme les précédents travaux de l'équipe démontrant une instabilité particulière des N/TM/C de ce canal (Salinas, Lazdunski et al. 2009), lui conférant sa capacité à générer des courants soutenus lors de légère acidose (pH7,0).

En présence d'amiloride ou de GMQ, les courbes d'activation et d'inactivation d'ASIC3 en fonction du pH sont décalées respectivement vers des pH plus alcalins et plus acides. Le chevauchement de ces courbes entraîne la formation d'un important courant de fenêtre. Néanmoins, ce courant soutenu en présence d'amiloride est moins important en raison de son effet pore bloqueur supérieur à celui du GMQ. Sur les canaux, l'étude de la régulation d'ASIC1a par les protons en présence d'amiloride n'avait jamais été effectuée. Les résultats obtenus en présence d'amiloride montrent, comme pour le GMQ, un décalage de la courbe d'activation vers des pH plus acides. L'amiloride et le GMQ induisent également un décalage de la courbe d'inactivation d'ASIC3 vers des pH plus acides et on observe également cette tendance sur ASIC1a sans que cela soit significatif. Par conséquent, le décalage des courbes d'activation et d'inactivation, qui s'opère dans le même sens, ne permettra pas le chevauchement des courbes nécessaire à la formation d'un courant soutenu.

Pour étudier l'action de ces deux molécules sur le couplage de la boucle extracellulaire et des domaines N/TM/C, nous avons étudié leur effet sur les chimères ASIC1aLoop3 et ASIC3Loop1a. En présence de GMQ, la chimère ASIC3Loop1a se comporte comme ASIC1a, ce qui suggère que les effets du GMQ sont directement dépendants de la nature de la boucle. L'amiloride entraîne également un décalage des courbes d'activation et d'inactivation vers des pH plus acides, cependant ce décalage semble plus important que ceux observés sur ASIC1a et suggère une influence des segments transmembranaires, contrairement à ce qui se produit avec

le GMQ. Sur les chimères ASIC1aloop3, l'application d'amiloride ou de GMQ décale les courbes d'activation et d'inactivation de la même manière que sur ASIC3 suggérant une fois de plus que leurs effets dépendent principalement de la nature de la boucle extracellulaire. L'analyse globale de ces résultats avec notre nouvelle approche indique une valeur de Zéta différente de 0 entre la boucle et les domaines N/TM/C lors d'une activation par les protons en présence d'amiloride ou de GMQ. Pour l'inactivation, seul le GMQ génère une valeur de Zéta différent de 0. Ces résultats indiquent deux choses :

1) Ces deux molécules affectent le couplage entre la boucle et les domaines N/TM/C de la même manière lors de l'activation, mais différemment lors de l'inactivation.

2) Lorsque Zeta est différente de zéro, cela indique que le couplage entre la boucle et les domaines transmembranaires n'est plus indépendant de la nature de ces domaines. Il semble que dans le cadre d'une régulation par l'amiloride ou le GMQ, il n'est plus possible d'invertir les boucles extracellulaires d'ASIC1a et d'ASIC3 sans affecter leur couplage. Autrement dit il n'y a plus additivité des effets dépendants de ces deux domaines contrairement à ce qui est observé quand seuls les protons sont impliqués.

Afin d'explorer plus en détail les mécanismes d'action de l'amiloride et du GMQ sur les canaux ASIC1a et ASIC3, et comprendre leur lien fonctionnel, nous avons regardé avec une analyse cyclique simple si ces deux modulateurs, lorsqu'ils sont utilisés ensemble, se limitent à des effets purement additifs ou agissent en coopérativité. Les valeurs de Zéta, calculées pour les canaux ASIC1a et ASIC3 indiquent que ces deux molécules présentent un effet purement additif ce qui suggère que l'amiloride et le GMQ agissent par le biais de deux mécanismes indépendants, ce qui est en accord avec la présence d'un seul site de fixation par canal.

Après avoir déterminé l'influence de l'amiloride et du GMQ sur les canaux ASIC, nous avons étudié l'influence des domaines (N/TM/C) sur la régulation du mécanisme d'ouverture par la mambalgine-1 et la PcTx1, deux toxines ciblant spécifiquement la boucle extracellulaire d'ASIC1a. En se fixant sur ASIC1a, la mambalgine-1 décale la courbe d'activation vers des pH plus acides traduisant une stabilisation de son état fermé, alors que PcTx1 décale la courbe d'inactivation du canal ASIC1a vers des pH plus alcalins ce qui indique une stabilisation de l'état inactivé. Afin de déterminer l'influence sur les domaines N/TM/C nous avons testé l'effet de ces deux toxines sur la chimère ASIC3Loop1a. Nos résultats montrent que les domaines N/TM/C ont un impact faible sur l'effet régulateur de la mambalgine-1 mais induisent d'importantes modifications de l'effet de PcTx1 qui devient stimulatrice.

Si nous mettons de côté les puissants effets « pore bloqueurs » de l'amiloride, nous avons montré au cours de cette étude que sur ASIC1a, l'amiloride et le GMQ génèrent des mécanismes

de régulation de la pH-dépendance différents de ceux observés sur ASIC3. Au sein de chacune de ces isoformes (ASIC1a et ASIC3), ces deux molécules présentent des mécanismes de régulation similaires, néanmoins le GMQ est capable d'induire des effets sur l'inactivation plus puissants que ceux de l'amiloride. C'est pour cette raison que nous avons choisi le GMQ pour comparer les mécanismes de régulation entre les toxines et les composés à base de guanidinium. De plus, le GMQ présente un faible effet pore bloqueur.

Une simple analyse cyclique nous a permis de montrer que lorsque le GMQ et PcTx1 sont appliqués simultanément sur ASIC1a, ces deux molécules exercent un effet purement additif sur l'activation ce qui suggère deux mécanismes d'action indépendants. En revanche, on observe une coopérativité négative de ces deux molécules sur l'inactivation des canaux ASIC1a. Les mêmes observations ont été faites pour les chimères ASIC3Loop1a, ce qui suggère que les effets observés ne sont pas dépendants de la nature des domaines N/TM/C. Cette coopérativité négative indique un mécanisme commun de régulation par le pH en présence de GMQ ou de PcTx1 lors de l'inactivation. L'analyse cyclique faite avec la mambalgine-1 et le GMQ révèle un effet purement additif ce qui suggère des mécanismes indépendants de régulation. L'introduction des domaines N/TM/C de ASIC3 dans la chimère ASIC3Loop1a modifie considérablement le comportement de la mambalgine-1 et du GMQ. On observe alors l'apparition d'une coopérativité positive de ces deux molécules sur l'activation et une coopérativité négative sur l'inactivation. Bien que la nature des domaines N/TM/C ait peu d'influence lorsque le GMQ et la mambalgine sont utilisés séparément, leur application simultanée semble pouvoir révéler les effets potentialisateurs de la mambalgine (voir article 2). Inversement, la nature des domaines N/TM/C n'affecte pas les effets produits par l'application simultanée de PcTx1 et GMQ, ce qui semble cohérent avec le fait que PcTx1 stabilise l'état inactivé et ouvert.

En conclusion, nous avons utilisé des agents pharmacologiques combinés à des approches d'analyse cyclique pour comprendre les mécanismes de régulation de l'activation et de l'inactivation des canaux ASIC par le pH et en particulier les mécanismes de couplage entre la boucle extracellulaire et les segments transmembranaires. En adaptant la méthode d'analyse cyclique en double mutant à des chimères fonctionnelles, il nous a été possible de déduire la nature du couplage entre deux domaines d'un même canal. Grâce à cette analyse de chimères fonctionnelles, nous avons pu mettre en évidence que les changements de conformations induits par les protons au niveau de la boucle extracellulaire et transmis aux domaines transmembranaires (N/TM/C) sont similaires entre ASIC1a et ASIC3. En d'autres termes, quelle que soit la nature de la boucle et des domaines transmembranaires, le mécanisme de transmission entre ces deux domaines va suivre les mêmes règles.

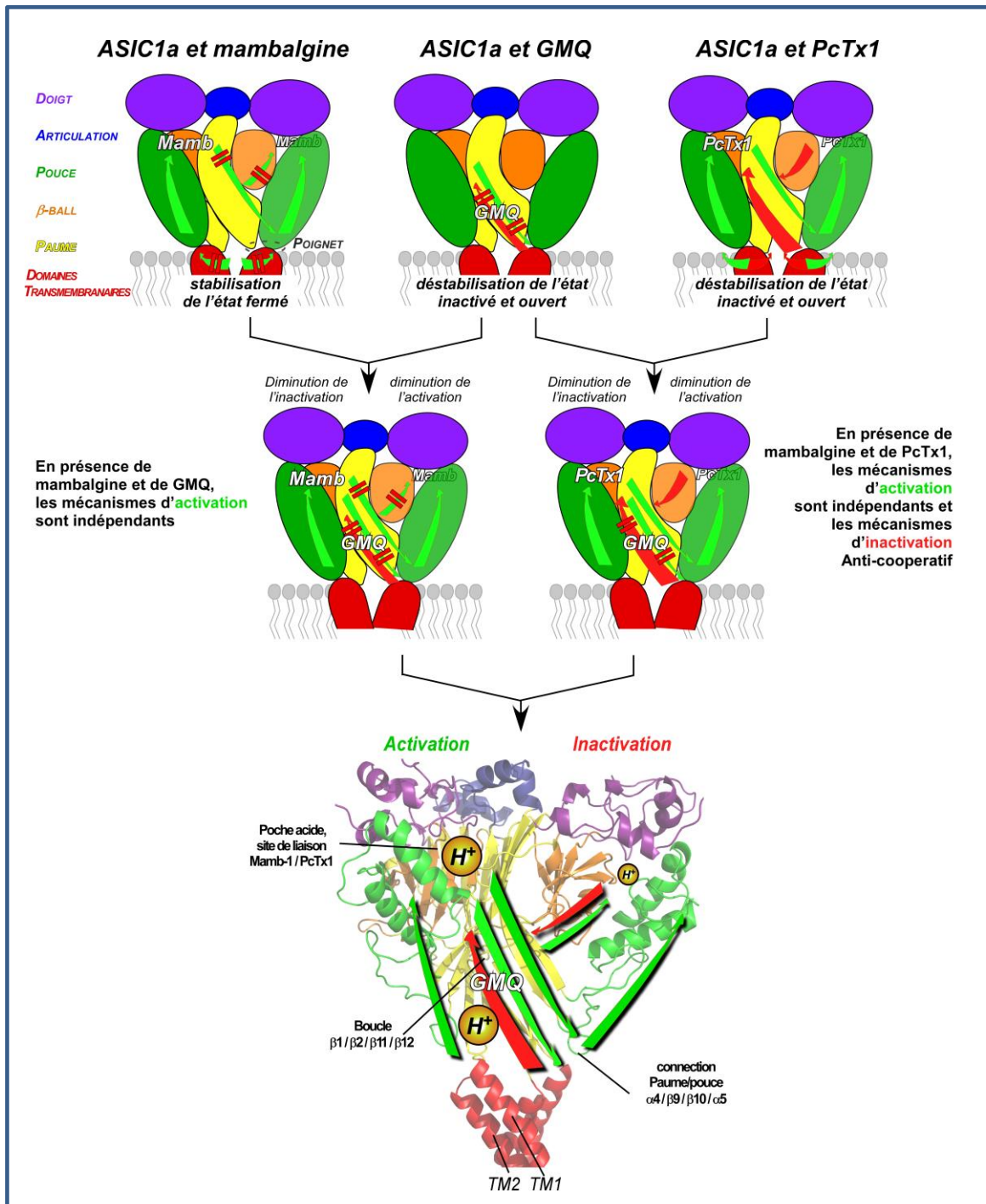


Figure 12: Modèle simplifié des relations complexes entre les mécanismes d'activation et d'inactivation dans la boucle d'ASIC1a en présence de différents agents pharmacologiques

De manière intéressante, nous avons pu observer que la boucle extracellulaire d'ASIC3 présente une moins grande sensibilité au pH comparée à la boucle d'ASIC1a. Dans ASIC3, la plus faible sensibilité au pH de la boucle extracellulaire semble compensée par une plus grande instabilité de ses domaines N/TM/C favorisant son ouverture. Nous avons montré que c'est l'instabilité amenée par les domaines N/TM/C d'ASIC3 qui permet l'induction d'un courant soutenu lors d'une acidification modérée, ce qui est caractéristique des canaux ASIC3. Bien que l'amiloride et le GMQ impactent fortement ce courant soutenu, nous avons montré qu'il s'agissait d'un mécanisme indirect via une action de ces molécules sur la boucle extracellulaire. Nos résultats suggèrent également que les mécanismes de régulation par l'amiloride et le GMQ induisent des couplages de la boucle et des domaines N/TM/C différents dans ASIC1a et ASIC3, les boucles ne peuvent plus être interverties sans modifier le mécanisme. En effet, en présence de GMQ ou d'amiloride, le mécanisme initié par la boucle extracellulaire ASIC1a n'est pas altéré par la présence des domaines N/TM/C d'ASIC3 contrairement au mécanisme initié par la boucle d'ASIC3 qui est affecté par les domaines N/TM/C d'ASIC1a. Bien que les deux molécules affectent le mécanisme d'activation de la même manière, leurs effets sur l'inactivation ne sont pas de la même intensité et nous laisse penser que, bien que ces deux molécules partagent un site de liaison commun, leur différence de structure moléculaire devrait modifier légèrement la manière dont elles interagissent avec le canal. L'analyse cyclique des chimères fonctionnelles montre que ces deux composés modulent l'activité des canaux ASIC différemment de la régulation par les protons, suggérant que les effets activateurs de ces molécules ne miment pas les effets des protons au niveau du senseur de pH et donc ne partagent probablement pas le même site de liaison que ces derniers. La mambalgine et PcTx1 se fixent tous deux dans la poche acide (senseur de pH). Cependant, cette étude montre que leurs effets sur la régulation du canal par les protons sont différemment affectés selon la nature des domaines N/TM/C.

Enfin, nous proposons un modèle présenté figure 12, décrivant les connexions complexes des mécanismes d'activation et d'inactivation dans la boucle d'ASIC1a et les mécanismes possibles de couplage avec les domaines transmembranaires / cytosoliques. Deux régions (Paume/Pouce et β -Balle/Paume) sont en mesure de relayer les deux mécanismes agissant en parallèle sur la région du poignet. La région β -Balle/Paume, agit aussi bien pour l'activation que pour l'inactivation par la liaison covalente avec les domaines transmembranaires (β 1 / TM1 et β 12 / TM2). La région Pouce/Palm, agit sur l'activation par la liaison non covalente avec le premier domaine transmembranaire (pouce / TM1) (figure 7 de l'article 4).

ARTICLE 4:

A pharmacology-based approach to analyze the pH-dependent gating of Acid-Sensing Ion Channels

Besson T, Lingueglia E. and Salinas M

A Pharmacology-Based Approach to Analyse the pH-dependent Gating of Acid-Sensing Ion Channels

Thomas Besson^{1,2}, Eric Lingueglia^{1,2*#} and Miguel Salinas^{1,2*#}

From the ¹: Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France; ²: LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, Valbonne, France

Equivalent last authors; *: Corresponding authors Tel.: +33 4 93 95 34 23; E-mail: lingueglia@ipmc.cnrs.fr or salinas@ipmc.cnrs.fr

Abstract

Acid-Sensing Ion Channels (ASICs) are cation channels activated by extracellular acidification that emerge as potential pharmacological targets in pain and other neurological disorders. Overlap of the activation and inactivation processes makes analysis of their pH-dependent gating and their pharmacological regulation difficult. Here we took advantage of small molecules and peptides that act on the ASIC activation and inactivation by specifically targeting different sub-domains. We used optimized cycle analysis approaches, including a new Functional Chimera Cycle (FCC) analysis, to show that in ASIC1a and ASIC3, the coupling between the extracellular loop and the transmembrane/cytosolic domains is independent of the nature of the domains, to determine the relative influences of each domain, and to address the relationships between the effects of small molecule and peptide modulators. We propose a model describing the intricate connections of the activation and inactivation processes in the loop of ASIC1a and the possible mechanisms of coupling with the transmembrane/cytosolic domains.

Impact statement

The pharmacological regulation of Acid-Sensing Ion Channels by small molecules and peptides was used in a new cycle analysis approach to address their pH-dependent gating.

Introduction

Acid-Sensing Ion Channels (ASICs; Waldmann et al., 1997b) are voltage-independent cation channels activated by extracellular acidification (ASIC1-3) and lipids (ASIC3; Marra et al., 2016). They are widely expressed in the peripheral and the central nervous systems (Deval and Lingueglia, 2015), where they are involved in physiological and pathophysiological processes ranging from synaptic plasticity and neuronal injury to nociception and mechanoperception (Noel et al., 2010). ASICs appear as interesting pharmacological targets with potential clinical applications in the treatment of pain, psychiatric disorders, stroke and neurodegenerative diseases (Baron and Lingueglia, 2015; Dussor, 2015; Li and Xu, 2015; Wemmie et al., 2013). Understanding of the pH-dependent gating of these channels and of their regulations by pharmacological agents appears therefore to be crucial for further drug development.

The tridimensional structure of these channels has been solved (Jasti et al. Nature 2007) and emerges, at least for the organization of the central transmembrane core and the pore, as a structure shared by several other unrelated trimeric cationic channels like P2X receptors and more recently Piezo mechanosensitive channels (Ge et al., 2015; Hattori and Gouaux, 2012; Zhao et al., 2016). Despite the increasing amount of data on their structure (Gonzales et al., 2009; Bacongus et al., 2014), little remains known on the mechanisms of ASIC gating.

Structure-function relationship studies have shown that protons bind to the extracellular loop of ASIC channels and lead to several conformational changes, which are propagated to the transmembrane domains (TM1 and TM2) forming the pore (Gonzales et al., 2009) and trigger two overlapping mechanisms, activation and inactivation, which are intricately

connected making investigation of the gating difficult. Pharmacological modulators like the small molecules GMQ and amiloride, or the peptides PcTx1 and mambalgin-1, interfere with the activation and inactivation of ASIC channels (Baron et al., 2013).

Amiloride is a well-known, non-selective small molecule inhibitor of ASICs that acts as a non-discriminative low affinity pore-blocker through a binding site into the pore. A paradoxical stimulatory effect on ASIC3 at high concentrations was also described and associated with a possible binding site in the extracellular loop (Adams et al., 1999; Li et al., 2011; Waldmann et al., 1997a; Yagi et al., 2006). Crystallographic data and molecular docking have further suggested binding of amiloride into the acidic pocket (also referred as the pH sensor) (Bacongus et al., 2014; Qadri et al., 2010), although binding into a different nonproton ligand sensing domain that was first identified for the small molecule GMQ (2-guanidine-4-methylquinazoline) has also been proposed (Li et al., 2011; Yu et al., 2010). On the other side, PcTx1 and mambalgin-1 are peptides specifically targeting ASIC channels to relieve pain (Diochot et al., 2012; Mazzuca et al., 2007). Both peptides binds into the pH sensor (Bacongus and Gouaux, 2012; Mourier et al., 2016; Salinas et al., 2014; Salinas et al., 2006) and are able to inhibit (and sometimes to potentiate) the ASIC currents.

In this study, we investigated the possible mechanisms of coupling between the loop and the transmembrane/cytosolic domains, and the gating mechanisms of ASICs. To do this, we used a combination of optimized cycle analysis approaches, including an approach derived from double mutant cycle analysis (Horovitz, 1996; Mildvan et al., 1992) that we called Functional Chimera Cycle (FCC) analysis, and pharmacological modulation by amiloride, GMQ, PcTx1 and mambalgin-1. We propose a model highlighting the relationships, in the extracellular loop of ASIC1a, between the pH-dependent activation and inactivation gating mechanisms and how they may be translated to the transmembrane/cytosolic domains.

Results

Functional Chimera Cycle Analysis: a new approach to analyze and to interpret data from complementary chimeras. To study the pH-dependent gating regulation of ASIC1a and ASIC3 by pharmacological agents (Fig. 1A, B), and the role of their respective extracellular loop and transmembrane/cytosolic domains (identified as Loop and N/TM/C, respectively), we have characterized the two complementary chimeras ASIC1aLoop3 and ASIC3Loop1a (Fig. 1C, D) previously described in another context (Salinas et al., 2009). The ASIC3-L529A point mutant (ASIC3^{L/A}), where a consensus motif for internalization close to the end of the cytoplasmic carboxy-terminus has been altered, was used to increase the channel expression in the *Xenopus* oocyte expression system without affecting its other properties (Suppl. Figure 1).

The apparent pH sensitivity of ASIC channels can be interpreted as a combination of the pH sensitivity defined by the Loop and of the indirect influence from the (N/TM/C) domains. To characterize the nature of the coupling between the Loop and the (N/TM/C) domains during the gating, we have designed and applied a new approach called Functional Chimera Cycle analysis to chimeras ASIC1aLoop3 and ASIC3Loop1a (note that the L529A mutation has not been introduced into chimera ASIC3Loop1a since it already displayed a sufficient level of expression in *Xenopus* oocyte). Classical double-mutant cycle analysis (Horowitz, 1996; Mildvan et al., 1992) allows to investigate if two residues are in close contact or not in a protein based on the variation in free energy of coupling ($\Delta\Delta G_{\text{coupling}}$) calculated from the EC_{50} or IC_{50} values of point mutants for activators and /or modulators. When the variation of free energy ($\Delta\Delta G$) associated with a couple of modifications was significantly different from the sum of the $\Delta\Delta G$ values associated with each single modification, the two modified residues were considered to be in proximity and possibly in interaction. FCC analysis is derived from this classical double-mutant cycle analysis approach and allows to determine if the mechanism between two domains (instead of the interaction between two residues) is

working in a similar way or not in different channels, i.e., ASIC1a and ASIC3 here (see methods). The variable Zeta (Z), which is proportional to the $\Delta\Delta G_{\text{coupling}}$ (see equation 4 in methods), is used to represent the variation of pH sensitivity induced by concomitant domain exchange minus the sum of variations produced by individual domain exchange (see equation 3 in methods). A Zeta value close to zero indicates a similar mechanism of coupling during the pH-dependent gating between the different swapped domains.

Calculation of Zeta from the $\text{pH}_{0.5}$ of activation and inactivation of ASIC1a, ASIC3^{L/A}, ASIC1aLoop3 and ASIC3Loop1a (see equation 2 in methods; Fig. 1A-D and Table 1) indicated that it was not different from zero for both the pH-dependent activation and inactivation ($Z_{\text{Loop/(N/TM/C)-act}}=0.01\pm 0.12$ and $Z_{\text{Loop/(N/TM/C)-inact}}=0.01\pm 0.04$). This supports a similar mechanism of coupling during the pH-dependent gating between the different swapped domains, and means that the influences of the Loop and the (N/TM/C) domains on the apparent proton affinity are purely additive, i.e., the coupling between loop1a and (N/TM/C)3 domains, or between loop3 and (N/TM/C)1a domains follows the same rules than in wild type channels. In other words, the Loop1a, Loop3, (N/TM/C)1a and (N/TM/C)3 domains have the same pH-dependent behavior whatever their context.

Relative pH sensitivity of Loop1a versus Loop3, and (N/TM/C)1a versus (N/TM/C)3 domains. The fact that the coupling between the loop and the (N/TM/C) domains in ASIC1a and ASIC3 is independent of the nature of the domains opens the possibility to quantify and compare the relative pH sensitivity of each domain. The variations of the $\text{pH}_{0.5}$ of activation and inactivation found between the different channels and chimeras based on the cycle analysis graph shown in Fig. 1E were used to precisely quantify the relative influence of the Loop and (N/TM/C) domains of ASIC1a and ASIC3. Variation of the $\text{pH}_{0.5}$ of activation for the pathway (I) shown in Figure 1E is:

(I) = $pH_{0.5act}(ASIC1aLoop3) - pH_{0.5act}(ASIC1a) = -0.75 \pm 0.05$ (Table 1 and Fig. 1F):

Equivalent to (see methods): $pH_{0.5act} Loop3 - pH_{0.5act} Loop1a = -0.75 \pm 0.05$,

i.e., $pH_{0.5act} Loop3 < pH_{0.5act} Loop1a$

The intrinsic $pH_{0.5act}$ attributable to Loop3 was thus 0.75 ± 0.05 pH unit more acidic than the one of Loop1a (Fig. 1F), meaning that the activation through Loop3 is less pH sensitive. The comparison of ASIC3Loop1a and ASIC3^{L/A} (Table 1) by the independent pathway (II) (Fig. 1E) led to : $pH_{0.5act} Loop3 - pH_{0.5act} Loop1a = -0.74 \pm 0.07$, and to exactly the same conclusion even if the nature of the (N/TM/C) domains is different (Fig. 1F). The comparison of ASIC1a with ASIC3Loop1a (Table 1) by the pathway (III) and the independent comparison of ASIC1aLoop3 with ASIC3^{L/A} (Table 1) by the pathway (IV) led to: $pH_{0.5act}(N/TM/C)3 - pH_{0.5act}(N/TM/C)1a = +0.54 \pm 0.05$ and $+0.53 \pm 0.05$, respectively (Fig. 1F). In both cases, $pH_{0.5act}(N/TM/C)3 > pH_{0.5act}(N/TM/C)1a$, meaning that the (N/TM/C)3 domains apparent pH sensitivity is ~ 0.5 pH unit higher than the (N/TM/C)1a domains for the activation whatever the nature of the Loop.

Even if the amplitude of the effects was lower because the proton cooperativity for this process is stronger, analysis of inactivation led to the same conclusion as for activation since the variations of pH sensitivity for the pathways (I) and (II) were similar and more acidic ($pH_{0.5inact} Loop3 - pH_{0.5inact} Loop1a = -0.08 \pm 0.02$ and -0.07 ± 0.02 , respectively), and since the variation for the pathway (IV) was less acidic and equivalent to the one of pathway (III) ($pH_{0.5inact}(N/TM/C)3 - pH_{0.5inact}(N/TM/C)1a = 0.08 \pm 0.02$ and 0.07 ± 0.02 , respectively) (Fig. 1F and Table 1).

Loop3 is thus less pH sensitive than Loop1a for both activation and inactivation, and conversely the presence of the (N/TM/C)3 domains modulates the pH sensitivity towards more alkaline values compared to the presence of the (N/TM/C)1a ones. The fact that both activation and inactivation are less sensitive to protons in the presence of the (N/TM/C)1a domains implies that these domains must stabilize the closed state of the channel. In ASIC3,

the situation is opposite with a greater closed state instability generated by the (N/TM/C)₃ domains, as we proposed previously (Salinas et al., 2009).

Amiloride and GMQ similarly affect the gating of ASIC channels. The effect of the guanidine-based compounds amiloride and GMQ on the gating of ASIC1a and ASIC3 was then explored. Amiloride and GMQ shifted the activation and inactivation curves of ASIC3^{L/A} toward alkaline and acidic pH, respectively (Fig. 2A-C; Suppl. Figure 3A,B and Table 1). This leads to a strong increase of the sustained window current generated in ASIC3^{L/A} by moderate acidification that results from the overlap of the pH-dependent curves of activation and inactivation (Fig. 2E). The shift of inactivation induced by amiloride was smaller than with GMQ (Fig. 2C, Suppl. Figure 3A,B and Table 1). Together with its pore blocker effect, it explains why amiloride generates a smaller potentiation of the window current compared to GMQ (Fig. 2E). For ASIC1a, regulation of the pH-dependent gating by amiloride, which has never been investigated, showed an acidic shift of the activation curves similarly to GMQ (Fig. 2C; Figure 2– Suppl. Figure 3C,D and Table 1). GMQ, but not amiloride induced an acidic shift of the inactivation curve. Both compounds did not allow the generation of a window current (Fig. 2F). The results obtained with GMQ on ASIC1a and ASIC3 are in good agreement with the data previously obtained by Alijevic et al. (Alijevic and Kellenberger, 2012). Amiloride and GMQ thus modulate the pH-dependent activation and inactivation of each channel in a similar way but with a smaller effect of amiloride on inactivation.

The effects of GMQ and amiloride are primarily driven by the extracellular loop and both molecules modify the coupling between the loop and the (N/TM/C) domains. We next investigated how amiloride and GMQ affect the gating of the ASIC1aLoop3 and ASIC3Loop1a chimeras. In chimera ASIC3Loop1a (Figure 2– Suppl. Figure 3E,F), amiloride and GMQ shifted the activation and inactivation curves in the same direction as in ASIC1a

(Fig. 2C; Table 1), suggesting that their effects directly depends on the nature of the Loop. However, the amplitude of the shifts induced by amiloride in ASIC3Loop1a was greater than in ASIC1a (Fig. 2C and Table 1), suggesting an influence of the (N/TM/C)3 domains, contrary to the effect of GMQ that was similar in ASIC1a and ASIC3Loop1a (Fig. 2C and Table 1).

In chimera ASIC1aLoop3 (Figure 2– Suppl. Figure 3G,H), amiloride and GMQ shifted the activation and inactivation curves in the same direction as in ASIC3^{L/A} (Fig. 2C and Table 1), suggesting again that the nature of the Loop is important for their effects. However, the amplitude of the activation and inactivation shifts was much smaller compared to ASIC3, which suggests a significant influence of the (N/TM/C)1a domains. Amiloride and GMQ were able to still generate a small window current (Fig. 2G), but the smaller shift of inactivation by amiloride (Fig. 2C and Table 1) explains, as for ASIC3^{L/A}, the smaller amplitude of the window current compared with GMQ.

Functional Chimera Cycle analysis (Fig. 2D) indicated a Zeta value different from zero between the Loop and N/TM/C domains during the pH-dependent activation in the presence of amiloride and GMQ ($Z_{\text{Loop/(N/TM/C)-GMQ-act}}=0.79\pm 0.12$ and $Z_{\text{Loop/(N/TM/C)-AMI-act}}=0.84\pm 0.14$). The Zeta value was also different from zero for inactivation in the presence of GMQ, but not of amiloride ($Z_{\text{Loop/(N/TM/C)-GMQ-inact}}=0.49\pm 0.06$ and $Z_{\text{Loop/(N/TM/C)-AMI-inact}}=0.02\pm 0.04$). This suggests that both molecules affect the nature of the coupling between the loop and the (N/TM/C) domains, and that they share a similar mechanism of regulation of the pH-dependent activation, but not of the pH-dependent inactivation.

The effects of amiloride and GMQ are purely additive. A simple cycle analysis was performed to further explore the mechanism of action of amiloride and GMQ and their possible link. In this case, and contrary to the FCC analysis, the effect of the two pharmacological modulators alone or in combination was evaluated in an identical structural

context, and the Zeta value was calculated in view to determine if the two modulators have purely additive effects on the pH-dependent activation and inactivation (i.e., a Zeta value close to zero) or if they display a cooperative effect (i.e., a Zeta value different from zero). GMQ was always able to induce the same acidic shift of the activation and inactivation curves in ASIC1a in the presence or in the absence of amiloride ($\Delta\text{pH}_{0.5(\text{AMI}/\text{GMQ})-\text{AMI}} = -0.22 \pm 0.07$ and 0.19 ± 0.03 versus $\Delta\text{pH}_{0.5\text{GMQ}} = -0.32 \pm 0.04$ and 0.17 ± 0.02 for activation and inactivation, respectively ($P > 0.05$); Fig. 3A,E). The simple cycle analysis showed that both molecules have a pure additive effect and therefore no cooperativity during the activation and inactivation processes of ASIC1a ($Z_{\text{act GMQ/AMI}} = 0.10 \pm 0.11$ and $Z_{\text{inact GMQ/AMI}} = -0.02 \pm 0.05$; Fig. 3F). In ASIC3^{L/A}, GMQ (1 mM) was always able to induce an acidic shift of inactivation with or without 1 mM amiloride (Fig. 3B,E). A simple cycle analysis indicates a pure additive effect of amiloride and GMQ for inactivation ($Z_{\text{inact GMQ/AMI}} = -0.02 \pm 0.07$). To check the effect of amiloride and GMQ on the activation of ASIC3^{L/A}, the procedure has been slightly modified because of possible experimental limitations to measure the effect of GMQ at concentrations of 1 mM on activation at pHs above 8.0 (which were not used for ASIC1a). Indeed, the pKa of GMQ and amiloride (8.5 and 8.7, respectively) indicate that a great proportion of these molecules must be deprotonated at pH ~ 8.0. Moreover, several important residues in rat ASIC3 (E416/E79 and R80; Li et al., 2011; Liechti et al., 2010) closed to the nonproton binding site could also be deprotonated at pH ~ 8.0, which is the theoretical pH_{0.5} value necessary to reach a $Z_{\text{act GMQ(1mM)/AMI(1mM)}}$ close to zero. The pH_{0.5act} of ASIC3 in the presence of both 1 mM GMQ and 1 mM amiloride is 7.24 ± 0.03 (Fig. 3B; Table 1), a value very closed to the calculated pKa of key residue Glu416 in ASIC3 estimated to 7.2 (Liechti et al., 2010). To avoid a possible artifact on the activation mechanism due to deprotonation at alkaline pH of GMQ, amiloride or key residues in ASIC3, a simple cycle analysis was done with a two-fold decreased concentration of GMQ and amiloride to limit the pH_{0.5} shift (Fig. 3C). In these conditions, GMQ and amiloride have a pure additive effect ($Z_{\text{act-GMQ/AMI}} =$

0.03±0.12; Fig. 3F). Thus, the simple cycle analysis indicates a pure additive effect of amiloride and GMQ for inactivation and activation of ASIC3^{L/A} (Fig. 3F). Both mechanisms are therefore non-cooperative, as for ASIC1a. These data are consistent with the presence of only one common binding site per functional channel for amiloride and GMQ, as suggested by previous results showing the presence of only one nonproton binding site per trimeric channel (Yu et al., 2010; Yu et al., 2011). Interestingly, the effect of GMQ on ASIC3^{L/A} was also purely additive on itself ($Z_{\text{act-GMQ } 0.5\text{mM}/\text{GMQ } 0.5\text{mM}}=0.02\pm0.15$; Fig. 3D,F) contrary to the strong cooperativity seen with protons (Bonifacio et al., 2014), which supports the fact that GMQ behaves differently than protons.

Comparison of the mechanism of action of GMQ versus the PcTx1 and mambalgin-1 peptides. We have shown that amiloride and GMQ have a similar regulatory mechanism on ASIC1a probably via the same binding site different from the pH-sensor. On the other side, PcTx1 and mambalgin-1, two venom-derived peptide modulators of ASIC1a, specifically bind into the pH sensor (Bacongus and Gouaux, 2012; Salinas et al., 2014; Salinas et al., 2006). We had previously shown that PcTx1 principally induces a shift of the inactivation curve of ASIC1a toward alkaline pH (Fig. 4A), meaning that this peptide inhibits the channel by stabilizing the inactivated state even if PcTx1 is also able to slightly stabilize the open state at the same time (Chen et al., 2005). Inversely, mambalgin-1 principally induces an acidic shift of the activation curves of ASIC1a through stabilization of the closed state (Diochot et al., 2012; Salinas et al., 2014) (Fig. 4B). A set of experiments was therefore designed to compare the mechanisms of action of GMQ and PcTx1 or mambalgin-1, and to evaluate their possible overlap. GMQ only was used because it induces a stronger effect on inactivation than amiloride (see Fig. 2C). GMQ was able to generate an acidic shift of the pH-dependent curves of activation and inactivation of ASIC1a in the presence of PcTx1 (Fig. 4C,E) or mambalgin-1 (Fig. 4D,E). A simple cycle analysis (Fig. 4F) showed that the effects of GMQ

and PcTx1 or mambalgin-1 were purely additive on the pH-dependent activation ($Z_{\text{act_GMQ/PcTx1}}=-0.02\pm 0.09$ and $Z_{\text{act_GMQ/mamb1}}=0.04\pm 0.10$), suggesting two independent mechanisms for the regulation of the activation by GMQ and these two peptides. The negative cooperativity found for the pH-dependent inactivation in the presence of PcTx1 ($Z_{\text{inact_GMQ/PcTx1}}=-0.22\pm 0.04$) but not mambalgin-1 ($Z_{\text{inact_GMQ/mamb1}}=0.01\pm 0.04$; Fig. 4F) suggests that the pH-dependent regulation of the inactivation by GMQ (acidic shift) and PcTx1 (alkaline shift; Fig. 4A) share an overlapping mechanism while the regulation by GMQ and mambalgin-1 involves independent mechanisms.

The (N/TM/C) domains affect the ASIC1a pH-dependent gating regulation by mambalgin-1 and PcTx1. PcTx1 and mambalgin-1 specifically bind to the Loop1a domain (Salinas et al., 2014; Salinas et al., 2006) and their effect on the chimera ASIC3Loop1a could be used to determine the influence of the transmembrane/cytosolic domains in their effects on the pH-dependent gating of the channel (Fig. 5). Mambalgin-1 did not significantly affect the pH-dependent curves of inactivation and the pH-dependent curve of activation was shifted toward acidic pH, similarly to the effect on ASIC1a (Fig. 5A,D).

The amplitude of the alkaline shift of the inactivation curve induced by PcTx1 was strongly decreased compared with ASIC1a (Fig. 5B,D), and a strong alkaline shift of the activation curve was observed (Fig. 5B,D). All together, these data show that the (N/TM/C) domains have only a weak impact on the regulation of the pH-dependent gating by mambalgin-1, but strongly modify the gating regulation induced by PcTx1.

Discussion

This study uses pharmacological agents and functional cycle analysis approaches to better understand the pH-dependent gating of ASIC channels and its regulation, which are still poorly understood (Grunder and Pusch, 2015; Sherwood et al., 2012). For this purpose,

we have first refined simple cycle analysis with a new variable Zeta (Z) that is proportional to the free energy of coupling ($\Delta\Delta G_{\text{coupling}}$) and that is used to determine if two molecules, two parameters or two mutations have additive effects, or positive- or negative-cooperative effects (i.e., Zeta equal to, greater than or less than zero, respectively). We have then further implemented this approach by designing Functional Chimeras Cycle (FCC) analysis, which allows to analyze the coupling between two domains. A purely additive coupling (i.e., Zeta equal to zero) means that both domains work in the same way whatever the structural context, i.e., coupling of the two domains is independent of the nature of these domains. Conversely, a Zeta value different from zero reflects a specific coupling of two domains to fully accomplish the studied mechanism, i.e., their coupling depends on the nature of both domains. Interestingly, this new approach could be easily generalized to the structure and function analysis of any ion channels as well as many other proteins.

The FCC analysis reveals that transmission of the pH-dependent conformational changes from the Loop to the transmembrane/cytosolic domains is similar between ASIC1a and ASIC3, i.e., that the coupling between the two domains during the pH-dependent gating is independent of the nature of the domains. The extracellular loop and the transmembrane/cytosolic domains therefore behave like ‘independent’ modules. The relative influence of each domain was assessed and shows that Loop1a is more pH sensitive than Loop3, and that the (N/TM/C)3 domains can indirectly increase the pH sensitivity while the (N/TM/C)1a domains decrease it. Interestingly, a window current under moderate acidifications was only observed in channels with the (N/TM/C)3 domains and not in channels with the (N/TM/C)1a domains (Suppl. Figure 2). These data support a model where the greater closed-state instability associated with the (N/TM/C)3 domains compared with the (N/TM/C)1a domains generates the unique property of ASIC3 to display a sustained window current through a stronger alkaline shift of the activation compared to the inactivation curves, in good agreement with our previous data (Salinas et al., 2009). It also suggests that the strong

potentiating effect of guanidine compounds, which primarily depends on the extracellular loop as shown in this work, is not directly dependent on the presence of a window current as it would have been initially expected. The nature of the cytosolic/transmembrane domains also strongly affects the regulation of the pH-dependent gating by the peptide PcTx1, and could partially support, at a structural level, the paradoxical agonist effect of this peptide on chicken ASIC1, rat ASIC1b, and on some ASIC chimeras (Chen et al., 2006).

The effect of the small molecules amiloride and GMQ was next determined on the coupling between the Loop to the transmembrane/cytosolic domains to clarify their mechanisms of action and their sites of action. Amiloride and GMQ act both as blockers of ASIC channels through binding into the pore (Alijevic and Kellenberger, 2012). GMQ is primarily known as a positive modulator of ASIC3 (Yu et al., 2010), but also modulates ASIC1a (Alijevic and Kellenberger, 2012), and amiloride has a stimulatory effect on ASIC3 (Adams et al., 1999; Li et al., 2011; Waldmann et al., 1997a; Yagi et al., 2006). The effect of amiloride on the gating of ASIC1a was not known, and the nature of the binding sites responsible for the modulatory effects of amiloride and GMQ on the pH-dependent gating of ASIC1a and/or ASIC3 remained discussed (Alijevic and Kellenberger, 2012). In ASIC3, one study have suggested that the nonproton ligand sensing domain identified for GMQ (Yu et al., 2010) is also required for the paradoxical stimulatory effect of amiloride (Li et al., 2011). On the other side, two studies based on molecular docking (Qadri et al., 2010) and crystallographic data (Bacongus et al., 2014) have suggested that amiloride could bind into the pH sensor (acidic pocket) in the extracellular loop. Here, we show that the gating regulation of ASIC1a and ASIC3 by amiloride and GMQ are driven by the extracellular loop and modulated by the (N/TM/C) domains. Functional Chimera Cycle analysis reflects the necessity to have a specific coupling between the Loop and the (N/TM/C) domains to fully accomplish the amiloride- and GMQ-dependent modulation, contrary to the sole pH-dependent gating where coupling is independent of the nature of the domains. Overall, the very close behavior of

GMQ and amiloride is consistent with a common binding site for both compounds, as previously proposed (Li et al., 2011), even if two independent binding sites cannot be completely ruled out from our data. They share a similar mechanism of regulation of the pH-dependent activation, but not of the pH-dependent inactivation, which may reflect difference between the molecular structures of these two compounds. They do not mimic protons alone in the FCC analysis, suggesting that they do not share a common binding site with protons. This is in agreement with our previous data showing a lack of binding competition between amiloride and PcTx1 (Salinas et al., 2006), which is known to bind into the pH sensor (Salinas et al., 2006; Bacongus and Gouaux, 2012). GMQ alone, or amiloride and GMQ together, act by a purely additive and non-cooperative mechanism on ASIC1a and ASIC3, which is also consistent with the presence of only one nonproton binding site per trimeric channel (Yu et al., 2010; Yu et al., 2011), contrary to protons which bind into three acidic pockets per functional trimeric channel (Jasti et al., 2007) as well as several other sites (Liechti et al., 2010; Paukert et al., 2008) that leads to a highly cooperative pH-dependent gating.

Binding of protons to several sites of the extracellular loop of ASICs including the acidic pocket (or “pH sensor”) contributes to open the channel through movement of the thumb domain, and by conformational change of at least the palm and the β -ball domains (Bacongus et al., 2014; Bacongus and Gouaux, 2012; Yang et al., 2009) that are propagated to the transmembrane domains through a flexible interface identified as the “wrist” (Jasti et al., 2007) (see Suppl. Figure 4 for a schematic representation of the different domains). The activation and inactivation mechanisms of ASICs are not only functionally coupled, but they also depend on the same residues (Bonifacio et al., 2014; Liechti et al., 2010). We have taken advantage of the fact that the guanidine-based compound GMQ and the peptide toxins PcTx1 and mambalgin-1 target two different sub-domains to modulate the channel gating, a nonproton binding site and the pH-sensor, respectively, contrary to protons that target almost all domains. Analysis of the relationships between their mechanisms of action showed

purely additive regulation of the pH-dependent activation by GMQ and by mambalgin-1 or PcTx1, suggesting, based on our previous data on the mechanism of action of mambalgins (Salinas et al., 2014), two independent mechanisms that regulate activation: 1) the GMQ-dependent mechanism acting through the lower palm domain (Suppl. Figure 4C), and 2) the PcTx1 or mambalgin-1 dependent mechanism acting primarily through the thumb domain connected to the palm domain (Suppl. Figure 4A,B). On the other hand, our data indicate that regulation of inactivation by PcTx1 that takes place through the palm/ β -ball domains (Salinas et al., 2014), and by GMQ that takes place through the lower palm domain (Yu et al., 2010; Yu et al., 2011) (Alijevic and Kellenberger, 2012), are anti-cooperative, suggesting an overlap of the two regulatory mechanisms (Suppl. Figure 4B, C). Structural and functional data show a covalent connection between the $\beta 9\beta 10$ part of the palm and the Thumb $\alpha 4\alpha 5$ (Fig. 6A). In addition, the $\beta 1\beta 2/\beta 11\beta 12$ regions of the palm/ β -ball domains is in close contact with the nonproton binding site that accommodates both GMQ and amiloride (Li et al., 2011; Yu et al., 2010; Yu et al., 2011) and has been described to be crucial for the inactivation process (Li et al., 2010; Springauf et al., 2011). We therefore propose a partial model (Fig. 6B) based on our data and on the available structural information to describe the possible mechanisms of coupling between the loop and the transmembrane/cytosolic domains of ASIC1a, which fits well with most of the previous data describing the gating of ASIC channels (Baconguis et al., 2014; Grunder and Chen, 2010; Krauson and Carattino, 2016; Liechti et al., 2010; Paukert et al., 2008; Sherwood et al., 2012). In this model the two regions $\beta 9\beta 10/\alpha 4\alpha 5$ and $\beta 1\beta 2/\beta 11\beta 12$ are able to relay two mechanisms acting in parallel on the wrist region: one for both activation and inactivation through the covalent links with the transmembrane domains ($\beta 1/\text{TM1}$ and $\beta 12/\text{TM2}$), and the other one mainly for activation through the non-covalent link with the first transmembrane domain ($\alpha 4\alpha 5/\text{TM1}$).

These data on the gating of ASIC channels by protons and their regulation by pharmacological agents will contribute to a better understanding of their mechanisms of

activation and inactivation. More generally, they would probably also give valuable clues on the gating of other trimeric channels sharing structural similarities with ASICs (Ge et al., 2015; Hattori and Gouaux, 2012; Zhao et al., 2016).

Materials and Methods

Plasmid Constructions and Mutagenesis. The coding sequences of rat ASIC1a, rat ASIC3 (GenBank Accession Number #U94403 and #AF013598, respectively) and the related chimeras and mutant were subcloned into the NheI/NotI restriction sites of the pCI vector (Promega). Chimeras were obtained by recombinant PCR strategies as previously described (Salinas et al., 2006). Chimeras ASIC3Loop1a and ASIC1aLoop3 have been fully described in a previous article (Salinas et al., 2009).

Xenopus Oocyte Preparation, DNA Injection, and Electrophysiology. Animal handling and experiments fully conformed to French regulations and were approved by local governmental veterinary services (authorization number B061525 delivered by the Ministère de l'Agriculture, Direction des services vétérinaires). Animals were anesthetized by exposure for 20 min to a 0.1% solution of 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222) (Sigma) buffered at pH 7.4. Oocytes were surgically removed and dissociated with collagenase type IA (Sigma) in presence of trypsin inhibitor (Sigma), then injected into the nucleus with: 18 nl of pCI-ratASIC1a (1-5 ng/μl) or pCI-ratASIC3 (25 ng/μl) plasmids, or with mutant and chimeras: pCI-ratASIC3-L529A (25 ng/μl), pCI-ratASIC3Loop1a (25 ng/μl) or pCI-ratASIC1aLoop3 (25 ng/μl). Oocytes were kept at 19°C in ND96 solution containing 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, and 5 mM HEPES (pH 7.4 with NaOH) with penicillin (6 μg/ml) and streptomycin (5 μg/ml). ASIC currents were recorded using the two-electrode voltage-clamp technique with two standard glass microelectrodes (0.5–2.5 mega-ohms) filled with a 3 M KCl, 1–3 days after injection using a manual setup (Dagan TEV 200 amplifier,

Dagan Corp.). Oocytes were clamped at -50 mV, and ASIC currents were activated by rapid changes in extracellular pH induced by microperfusion systems. HEPES was replaced by MES (5 mM) for buffer solutions at pH from 6.5 to 4.0. Stimulation, data acquisition, and analysis for manual recordings were performed using pCLAMP 9.2 software (Axon Instruments). All experiments were performed at 19°C in ND96 solution supplemented with 0.05% fatty acid- and globulin-free bovine serum albumin (Sigma) to prevent nonspecific adsorption of the toxins to tubing and containers. Synthetic mambalgin-1 (Smartox) and PcTx1 (Synprosis/Provepep) were applied 30 s and 1 min before the acid stimulation, respectively, or during the pH pulses as indicated in some protocols. Amiloride (Sigma) and GMQ (Sigma) were applied during the pH pulses.

Simple Cycle Analysis. To determine if compounds A and B have additive, synergistic or antagonistic effects, a simple cycle analysis has been done. Contrary to the FCC analysis described below, the structural context is identical between all the conditions. It is thus possible to determine if there is a pure additive effect ($Z_{A/B}=0$), a positive cooperativity ($Z_{A/B}>0$) or a negative cooperativity ($Z_{A/B}<0$) between the two compounds. The simple cycle analysis equation corresponds to the difference between the variations of $pH_{0.5}$ induced by a mix of A +B minus the sum of individual effects generated by A or B:

$$Z_{A/B} = \Delta pH_{0.5ASIC \rightarrow ASIC-A/B} - \Delta pH_{0.5ASIC \rightarrow ASIC-A} - \Delta pH_{0.5ASIC \rightarrow ASIC-B}$$

which is also equivalent to

$$Z_{A/B} = pH_{0.5ASIC} + pH_{0.5ASIC-A/B} - pH_{0.5ASIC-A} - pH_{0.5ASIC-B} \text{ (see Eq. 2)}$$

Functional Chimera Cycle analysis. The FCC analysis developed in this work is a new approach inspired from the double mutant cycle analysis (Horovitz, 1996; Mildvan et al., 1992) but applied to complementary chimeras. The $pH_{0.5act}$ and $pH_{0.5inact}$ (Table 1) calculated

from the pH-dependent curves of activation and inactivation of ASIC3^{L/A}, ASIC1a and the two chimeras ASIC1aLoop3 and ASIC3Loop1a (Fig. 1A-D) are used to estimate the proton sensitivity of the activation and inactivation mechanisms. The pH sensitivity change ($\Delta\text{pH}_{0.5}$) when going from ASIC1a (i.e., wt,wt) to ASIC3 (i.e., mut,mut) (Fig. 1E) must be the same regardless of the pathway taken; therefore we have:

$$(I) + (IV) = (III) + (II)$$

$$\text{with for example } (I) = \Delta\text{pH}_{0.5\text{wt,wt} \rightarrow \text{mut,wt}} = \text{pH}_{0.5\text{mut,wt}} - \text{pH}_{0.5\text{wt,wt}}$$

The variable Zeta (Z) was calculated as follow based on the definition of the Ω variable made in the double-mutant cycle analysis (Hidalgo and MacKinnon, 1995):

$$Z = (IV) - (III) = (II) - (I) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$Z = (\text{pH}_{0.5\text{mut,mut}} - \text{pH}_{0.5\text{wt,mut}}) - (\text{pH}_{0.5\text{mut,wt}} - \text{pH}_{0.5\text{wt,wt}})$$

$$Z = \text{pH}_{0.5\text{wt,wt}} + \text{pH}_{0.5\text{mut,mut}} - \text{pH}_{0.5\text{wt,mut}} - \text{pH}_{0.5\text{mut,wt}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Zeta can also be developed as follow:

$$Z = \text{pH}_{0.5\text{wt,wt}} + \text{pH}_{0.5\text{mut,mut}} - \text{pH}_{0.5\text{wt,mut}} - \text{pH}_{0.5\text{mut,wt}} + (\text{pH}_{0.5\text{wt,wt}} - \text{pH}_{0.5\text{wt,wt}})$$

$$Z = (\text{pH}_{0.5\text{mut,mut}} - \text{pH}_{0.5\text{wt,wt}}) - (\text{pH}_{0.5\text{wt,mut}} - \text{pH}_{0.5\text{wt,wt}}) - (\text{pH}_{0.5\text{mut,wt}} - \text{pH}_{0.5\text{wt,wt}})$$

$$Z = \Delta\text{pH}_{0.5\text{wt,wt} \rightarrow \text{mut,mut}} - \Delta\text{pH}_{0.5\text{wt,wt} \rightarrow \text{wt,mut}} - \Delta\text{pH}_{0.5\text{wt,wt} \rightarrow \text{mut,wt}} \quad (\text{Eq. 3})$$

or

$$Z = (V) - (I) - (III) \quad (\text{Eq. 3})$$

which correspond in this study to:

$$Z = \Delta p\text{H}_{0.5 \text{ ASIC1a} \rightarrow \text{ASIC3}} - \Delta p\text{H}_{0.5 \text{ ASIC1a} \rightarrow \text{ASIC1aLoop3}} - \Delta p\text{H}_{0.5 \text{ ASIC1a} \rightarrow \text{ASIC3loop1a}}$$

This formulation of Z is similar to the definition of free energy of coupling given by

$$\Delta\Delta G_{\text{coupling}} = \Delta\Delta G_{\text{wt,wt} \rightarrow \text{mut,mut}} - \Delta\Delta G_{\text{wt,wt} \rightarrow \text{wt,mut}} - \Delta\Delta G_{\text{wt,wt} \rightarrow \text{mut,wt}}$$

(Horovitz, 1996 ; Mildvan et al., 1992)

Because K_D is equivalent to $[\text{H}^+]_{0.5}$ (Li et al., 2009) then $K_D = 10^{-\text{pH}_{0.5}}$ or $\text{pH}_{0.5} = -\log K_D$.

Thus, *Eq. 1* allows to deduce:

$$Z = -\log K_{D_{\text{wt,wt}}} - \log K_{D_{\text{mut,mut}}} + \log K_{D_{\text{wt,mut}}} + \log K_{D_{\text{mut,wt}}}$$

$$10^Z = (K_{D_{\text{wt,mut}}} \cdot K_{D_{\text{mut,wt}}}) / (K_{D_{\text{wt,wt}}} \cdot K_{D_{\text{mut,mut}}})$$

$$\text{RT} \cdot \ln 10^Z = \text{RT} \cdot \ln [(K_{D_{\text{wt,mut}}} \cdot K_{D_{\text{mut,wt}}}) / (K_{D_{\text{wt,wt}}} \cdot K_{D_{\text{mut,mut}}})]$$

$$\text{RT} \cdot \ln 10^Z = \Delta\Delta G_{\text{wt,wt} \rightarrow \text{mut,wt}} - \Delta\Delta G_{\text{mut,wt} \rightarrow \text{mut,mut}}$$

which corresponds to the definition of the free energy of coupling (Horovitz, 1996),

and leads to the demonstration that Zeta is proportional to $\Delta\Delta G_{\text{coupling}}$:

$$\Delta\Delta G_{\text{coupling}} = Z \cdot \text{RT} \cdot \ln 10 \quad (\text{Eq. 4})$$

In the case of a couple of punctual modifications, $\Delta\Delta G_{\text{coupling}}$ can be interpreted as the variation of free energy produced by a double mutation minus the sum of free energy variations produced by individual mutations. If $\Delta\Delta G_{\text{coupling}}$ is equal to zero, the effect of both mutations are purely additive, meaning that their effects are independent and that mutated amino acids are probably not in close contact. A $\Delta\Delta G_{\text{coupling}}$ is different from zero means that both mutations are dependent on each other or possibly in close contact, leading to positive or negative cooperativity ($\Delta\Delta G > 0$ synergistic or $\Delta\Delta G < 0$ antagonistic, respectively; Mildvan et al., 1992).

The equation $\Delta\Delta G = Z \cdot \text{RT} \cdot \ln 10$ (*Eq. 3*) means that Z and $\Delta\Delta G_{\text{coupling}}$ have the same behavior: $\Delta\Delta G_{\text{coupling}} = 0$ when $Z = 0$, and $\Delta\Delta G_{\text{coupling}} > 0$ or < 0 when $Z > 0$ or < 0 , respectively. In

our approach, equation 3 means that Z corresponds to the variation of pH sensitivity induced by concomitant domain exchange minus the sum of variations produced by individual domain exchange. However, with the complementary chimeras approach, the interpretation of Zeta or $\Delta\Delta G_{\text{coupling}}$ is quite different from the double mutant cycle analysis. Contrary to the classical double mutant cycle analysis, which is used to determine a potential proximity between two residues (Della Vecchia et al., 2013; Horovitz, 1996; Li et al., 2009), the FCC analysis cannot be used to find direct interactions. Indeed, contrary to the single mutations where the structural context is identical, the complementary chimeras have a structural context completely different, thus Z equal to zero must be interpreted as a similar mechanism of coupling during the pH-dependent gating between the different swapped domains. Inversely, Z different from zero means that the coupling of Loop and (N/TM/C) domains during the pH-dependent gating is not identical in the different structural context.

The equation 2: $Z = \text{pH}_{0.5\text{wt,wt}} + \text{pH}_{0.5\text{mut,mut}} - \text{pH}_{0.5\text{wt,mut}} - \text{pH}_{0.5\text{mut,wt}}$ allows to understand that wt,wt and mut,mut conditions can be inverted without changing the results. Indeed, if ASIC3 becomes the wt,wt condition and ASIC1a the mut,mut condition, this permutation does not change the equation 2. In the same way it is easy to demonstrate that Z can be calculated with:

$$Z = \Delta\text{pH}_{0.5\text{ASIC1a}\rightarrow\text{ASIC3}} - \Delta\text{pH}_{0.5\text{ASIC1a}\rightarrow\text{ASIC1aLoop3}} - \Delta\text{pH}_{0.5\text{ASIC1a}\rightarrow\text{ASIC3loop1a}}$$

or

$$Z = \Delta\text{pH}_{0.5\text{ASIC3}\rightarrow\text{ASIC1a}} - \Delta\text{pH}_{0.5\text{ASIC3}\rightarrow\text{ASIC1aLoop3}} - \Delta\text{pH}_{0.5\text{ASIC3}\rightarrow\text{ASIC3loop1a}}$$

This property of permutation allows a better interpretation of Z or $\Delta\Delta G$. Thus, this new approach exploits the variable Zeta relative to the swapped Loop and (N/TM/C) domains to determine if the mechanisms between both domains are working in a similar way or not in ASIC1a and ASIC3.

Comparison of the relative pH sensitivity of the Loop and (N/TM/C) domains. To quantify the relative influence of the Loop and (N/TM/C) domains in the pH sensitivity of ASIC1a and ASIC3, we analyzed independently the different variation of pH sensitivity (I), (II), (III) and (IV) (Fig. 1E) found in the equation 1 defining Zeta: $Z = (IV) - (III) = (II) - (I)$ (Eq. 1). For example, if we analyze the way (I) where Loop1a of ASIC1a was exchanged by Loop3 to build ASIC1aLoop3, we must consider that the biophysical changes are due to the introduction of the new Loop3 as well as to the suppression of Loop1a. This means that the comparison between ASIC1a and ASIC1aLoop3 gives access to the relative effect of Loop3 compared to Loop1a and not to the effect of Loop3 alone.

Loop and (N/TM/C) domains can be considered like two independent modules during proton stimulation (see results). Thus the $\Delta pH_{0.5}$ resulting from the exchange of Loop1a in *ASIC1a* by Loop3 to give *ASIC1aLoop3*, can be written as follow:

$$\begin{aligned} (I) &= \Delta pH_{0.5} = pH_{0.5}(ASIC1aLoop3) - pH_{0.5}(ASIC1a) \\ (I) &= pH_{0.5}[(N/TM/C)1a + Loop3] - pH_{0.5}[(N/TM/C)1a + Loop1a] \\ (I) &= pH_{0.5}(N/TM/C)1a + pH_{0.5}Loop3 - pH_{0.5}(N/TM/C)1a - pH_{0.5}Loop1a \\ (I) &= \Delta pH_{0.5} = pH_{0.5}Loop3 - pH_{0.5}Loop1a \end{aligned}$$

Thus, the value and the sign of $\Delta pH_{0.5}$ allow to quantify and to define which domain generates the greater pH sensitivity compared to the other one. The comparison between both wild-type channels and both chimeras should allowed to define the relative influence of Loop1a versus Loop3, and also (N/TM/C)1a versus (N/TM/C)3 in two independent structural contexts.

Statistical analysis. Data analysis was performed using GraphPad Prism 4.03 software. Data are represented as means \pm S.E.M., and the statistical significance of differences

between sets of data were estimated using the Kruskal-Wallis statistic multiple comparison followed by Dunns post test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). When the measures were done on the same current trace, the statistical difference were analyzed with nonparametric, paired t-test, Wilcoxon signed rank test. The standard error associated with Zeta (δZ) was calculated as: $\delta Z = \delta pH_{0.5wt,wt} + \delta pH_{0.5mut,mut} + \delta pH_{0.5wt,mut} + \delta pH_{0.5mut,wt}$, where the different $\delta pH_{0.5}$ are the standard error associated with $pH_{0.5}$ measurement.

Acknowledgments

We thank D. Servent, S. Diochot, A. Baron, E. Deval, J. Noël, A. Negm, S. Marra, C. Verkest and M. Chafai for discussions and comments, M. Lazdunski for his support, V. Friend for expert technical assistance, and V. Berthieux for secretarial assistance.

References

- Adams, C.M., P.M. Snyder, and M.J. Welsh. 1999. Paradoxical stimulation of a DEG/ENaC channel by amiloride. *J Biol Chem.* 274:15500-4. PubMed PMID: 10336442
- Alijevic, O., and S. Kellenberger. 2012. Subtype-specific modulation of acid-sensing ion channel (ASIC) function by 2-guanidine-4-methylquinazoline. *J Biol Chem.* 287:36059-70. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.360487>.
- Baconguis, I., C.J. Bohlen, A. Goehring, D. Julius, and E. Gouaux. 2014. X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na(+)-selective channel. *Cell.* 156:717-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.011>.
- Baconguis, I., and E. Gouaux. 2012. Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. *Nature.* 489:400-5. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11375>.
- Baron, A., S. Diochot, M. Salinas, E. Deval, J. Noel, and E. Lingueglia. 2013. Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon.* 75:187-204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.04.008>.
- Baron, A., and E. Lingueglia. 2015. Pharmacology of acid-sensing ion channels - Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology.* 94:19-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.005>.
- Bonifacio, G., C.I. Lelli, and S. Kellenberger. 2014. Protonation controls ASIC1a activity via coordinated movements in multiple domains. *J Gen Physiol.* 143:105-18. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.201311053>.
- Chen, X., H. Kalbacher, and S. Grunder. 2005. The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity. *J Gen Physiol.* 126:71-9. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.200509303>.
- Chen, X., H. Kalbacher, and S. Grunder. 2006. Interaction of Acid-sensing Ion Channel (ASIC) 1 with the Tarantula Toxin Psalmotoxin 1 is State Dependent. *J Gen Physiol.* 127:267-76. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.200509409>.

- Della Vecchia, M.C., A.C. Rued, and M.D. Carattino. 2013. Gating transitions in the palm domain of ASIC1a. *J Biol Chem.* 288:5487-95. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.441964>.
- Deval, E., and E. Lingueglia. 2015. Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacology.* 94:49-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.02.009>.
- Diochot, S., A. Baron, M. Salinas, D. Douguet, S. Scarzello, A.S. Dabert-Gay, D. Debayle, V. Friend, A. Alloui, M. Lazdunski, and E. Lingueglia. 2012. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature.* 490:552-5. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11494>.
- Dussor, G. 2015. ASICs as therapeutic targets for migraine. *Neuropharmacology.* 94:64-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.015>.
- Escoubas, P., J.R. De Weille, A. Lecoq, S. Diochot, R. Waldmann, G. Champigny, D. Moinier, A. Menez, and M. Lazdunski. 2000. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J Biol Chem.* 275:25116-21. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M003643200>.
- Ge, J., W. Li, Q. Zhao, N. Li, M. Chen, P. Zhi, R. Li, N. Gao, B. Xiao, and M. Yang. 2015. Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature.* 527:64-9. <http://dx.doi.org/10.1038/nature15247>.
- Gonzales, E.B., T. Kawate, and E. Gouaux. 2009. Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature.* 460:599-604. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08218>.
- Grunder, S., and X. Chen. 2010. Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels (ASICs): focus on ASIC1a. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2:73-94. PubMed PMID: 21383888; PMCID: PMC3047259.
- Grunder, S., and M. Pusch. 2015. Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs). *Neuropharmacology.* 94:9-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.016>.
- Hattori, M., and E. Gouaux. 2012. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature.* 485:207-12. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11010>.
- Hidalgo, P., and R. MacKinnon. 1995. Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science.* 268:307-10. PubMed PMID: 7716527.
- Horovitz, A. 1996. Double-mutant cycles: a powerful tool for analyzing protein structure and function. *Fold Des.* 1:R121-6. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-0278\(96\)00056-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-0278(96)00056-9).
- Jasti, J., H. Furukawa, E.B. Gonzales, and E. Gouaux. 2007. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature.* 449:316-23. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06163>.
- Krauson, A.J., and M.D. Carattino. 2016. Thumb domain mediates acid-sensing ion channel desensitization. *J Biol Chem.* <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.702316>.
- Li, T., Y. Yang, and C.M. Canessa. 2009. Interaction of the aromatics Tyr-72/Trp-288 in the interface of the extracellular and transmembrane domains is essential for proton gating of acid-sensing ion channels. *J Biol Chem.* 284:4689-94. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M805302200>.
- Li, T., Y. Yang, and C.M. Canessa. 2010. Asn415 in the beta11-beta12 linker decreases proton-dependent desensitization of ASIC1. *J Biol Chem.* 285:31285-91. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.160382>.
- Li, W.G., and T.L. Xu. 2015. Acid-sensing ion channels: a novel therapeutic target for pain and anxiety. *Curr Pharm Des.* 21:885-94. PubMed PMID: 25345607
- Li, W.G., Y. Yu, C. Huang, H. Cao, and T.L. Xu. 2011. Nonproton ligand sensing domain is required for paradoxical stimulation of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) channels by amiloride. *J Biol Chem.* 286:42635-46. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.289058>.
- Liechti, L.A., S. Berneche, B. Bargeton, J. Iwazskiewicz, S. Roy, O. Michielin, and S. Kellenberger. 2010. A combined computational and functional approach identifies new residues involved in pH-dependent gating of ASIC1a. *J Biol Chem.* 285:16315-29. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.092015>.
- Marra, S., R. Ferru-Clement, V. Breuil, A. Delaunay, M. Christin, V. Friend, S. Seville, C. Cognard, T. Ferreira, C. Roux, L. Euller-Ziegler, J. Noel, E. Lingueglia, and E. Deval. 2016. Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *EMBO J.* 35:414-28. <http://dx.doi.org/10.15252/emj.201592335>.

- Mazucca, M., C. Heurteaux, A. Alloui, S. Diochot, A. Baron, N. Voilley, N. Blondeau, P. Escoubas, A. Gelot, A. Cupo, A. Zimmer, A.M. Zimmer, A. Eschalier, and M. Lazdunski. 2007. A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat Neurosci.* 10:943-5. <http://dx.doi.org/10.1038/nn1940>.
- Mildvan, A.S., D.J. Weber, and A. Kuliopulos. 1992. Quantitative interpretations of double mutations of enzymes. *Arch Biochem Biophys.* 294:327-40. PubMed PMID: 1567189.
- Mourier, G., M. Salinas, P. Kessler, E.A. Stura, M. Leblanc, L. Tepshi, T. Besson, S. Diochot, A. Baron, D. Douguet, E. Lingueglia, and D. Servent. 2016. Mambalgin-1 Pain-relieving Peptide, Stepwise Solid-phase Synthesis, Crystal Structure, and Functional Domain for Acid-sensing Ion Channel 1a Inhibition. *J Biol Chem.* 291:2616-29. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.702373>.
- Noel, J., M. Salinas, A. Baron, S. Diochot, E. Deval, and E. Lingueglia. 2010. Current perspectives on acid-sensing ion channels: new advances and therapeutic implications. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 3:331-46. <http://dx.doi.org/10.1586/ecp.10.13>.
- Paukert, M., X. Chen, G. Polleichtner, H. Schindelin, and S. Grunder. 2008. Candidate amino acids involved in H⁺ gating of acid-sensing ion channel 1a. *J Biol Chem.* 283:572-81. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M706811200>.
- Qadri, Y.J., Y. Song, C.M. Fuller, and D.J. Benos. 2010. Amiloride docking to acid-sensing ion channel-1. *J Biol Chem.* 285:9627-35. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.082735>.
- Salinas, M., T. Besson, Q. Delettre, S. Diochot, S. Boulakirba, D. Douguet, and E. Lingueglia. 2014. Binding site and inhibitory mechanism of the mambalgin-2 pain-relieving peptide on acid-sensing ion channel 1a. *J Biol Chem.* 289:13363-73. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.561076>.
- Salinas, M., M. Lazdunski, and E. Lingueglia. 2009. Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3. *J Biol Chem.* 284:31851-9. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.043984>.
- Salinas, M., L.D. Rash, A. Baron, G. Lambeau, P. Escoubas, and M. Lazdunski. 2006. The receptor site of the spider toxin PcTx1 on the proton-gated cation channel ASIC1a. *J Physiol.* 570:339-54. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2005.095810>.
- Sherwood, T.W., E.N. Frey, and C.C. Askwith. 2012. Structure and activity of the acid-sensing ion channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 303:C699-710. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00188.2012>.
- Springauf, A., P. Bresenitz, and S. Grunder. 2011. The interaction between two extracellular linker regions controls sustained opening of acid-sensing ion channel 1. *J Biol Chem.* 286:24374-84. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.230797>.
- Waldmann, R., F. Bassilana, J. de Weille, G. Champigny, C. Heurteaux, and M. Lazdunski. 1997a. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem.* 272:20975-8. PubMed PMID: 9261094.
- Waldmann, R., G. Champigny, F. Bassilana, C. Heurteaux, and M. Lazdunski. 1997b. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature.* 386:173-7. <http://dx.doi.org/10.1038/386173a0>.
- Wemmie, J.A., R.J. Taugher, and C.J. Kreple. 2013. Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat Rev Neurosci.* 14:461-71. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3529>.
- Yagi, J., H.N. Wenk, L.A. Naves, and E.W. McCleskey. 2006. Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia. *Circ Res.* 99:501-9. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000238388.79295.4c>.
- Yang, H., Y. Yu, W.G. Li, F. Yu, H. Cao, T.L. Xu, and H. Jiang. 2009. Inherent dynamics of the acid-sensing ion channel 1 correlates with the gating mechanism. *PLoS Biol.* 7:e1000151. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000151>.
- Yu, Y., Z. Chen, W.G. Li, H. Cao, E.G. Feng, F. Yu, H. Liu, H. Jiang, and T.L. Xu. 2010. A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel. *Neuron.* 68:61-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.001>.
- Yu, Y., W.G. Li, Z. Chen, H. Cao, H. Yang, H. Jiang, and T.L. Xu. 2011. Atomic level characterization of the nonproton ligand-sensing domain of ASIC3 channels. *J Biol Chem.* 286:24996-5006. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.239558>.

Zhao, Q., K. Wu, J. Geng, S. Chi, Y. Wang, P. Zhi, M. Zhang, and B. Xiao. 2016. Ion Permeation and Mechanotransduction Mechanisms of Mechanosensitive Piezo Channels. *Neuron*. 89:1248-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.046>.

Figures and Legends

Table 1. pH_{0.5} of activation and inactivation in the absence or in the presence of different pharmacological agents.

	pH _{0.5} inact	pH _{0.5} act	ΔpH _{0.5} inact from control	ΔpH _{0.5} act from control
ASIC3	7.17±0.01 ^{ns}	6.19±0.04 ^{ns}	-	-
ASIC3^{L/A}	7.16±0.01	6.17±0.02	-	-
ASIC3 ^{L/A} +GMQ (1mM)	6.44±0.02 ^{***}	7.12±0.04 ^{***}	-0.72±0.03	0.95±0.06
ASIC3 ^{L/A} +AMI (1mM)	6.92±0.01 ^{***}	7.06±0.04 ^{***}	-0.24±0.02 ^{***}	0.89±0.06 ^{ns}
ASIC1a	7.16±0.01	6.39±0.02	-	-
ASIC1a+GMQ (1mM)	6.99±0.01 ^{***}	6.07±0.02 ^{**}	-0.17±0.02	-0.32±0.04
ASIC1a+AMI (1mM)	7.13±0.01 ^{ns}	6.25±0.04 [*]	-0.03±0.02 ^{***}	-0.14±0.06 ^{ns}
ASIC3Loop1a	7.23±0.01	6.93±0.03	-	-
ASIC3Loop1a+GMQ (1mM)	7.12±0.01 ^{***}	6.62±0.03 [*]	-0.11±0.02	-0.31±0.06
ASIC3Loop1a+AMI (1mM)	7.09±0.01 ^{**}	6.58±0.04 [*]	-0.14±0.02 ^{ns}	-0.35±0.07 ^{ns}
ASIC1aLoop3	7.08±0.01	5.64±0.03	-	-
ASIC1aLoop3+GMQ (1mM)	6.80±0.02 ^{***}	5.78±0.03 [*]	-0.28±0.03	0.14±0.06
ASIC1aLoop3+AMI (1mM)	6.94±0.01 ^{***}	5.89±0.02 ^{**}	-0.14±0.02 ^{***}	0.25±0.05 ^{ns}
ASIC1a+AMI (1mM)	7.13±0.01	6.25±0.04	-	-
ASIC1a+GMQ (1mM)/AMI (1mM)	6.94±0.02 ^{***}	6.03±0.03 [*]	-0.19±0.03	-0.22±0.07
ASIC3^{L/A}+AMI (1mM)	6.92±0.01	7.06±0.04	-	-
ASIC3 ^{L/A} +GMQ (1mM)/AMI (1mM)	6.19±0.03 ^{***}	7.24±0.03 ^{**}	-0.73±0.04	0.18±0.07
ASIC3^{L/A}		6.17±0.02		-
ASIC3 ^{L/A} +GMQ (0.5mM)		6.63±0.04 ^{***}		0.46±0.06
ASIC3 ^{L/A} +AMI (0.5mM)		6.70±0.04 ^{***}		0.53±0.06
ASIC3 ^{L/A} +GMQ(0.5mM)/AMI (0.5mM)		7.13±0.02 ^{***}		0.96±0.04 ^{***}
ASIC3 ^{L/A} +GMQ (1mM)		7.12±0.04 ^{***}		0.95±0.06 ^{***}
ASIC1a	7.16±0.01	6.39±0.02	-	-
ASIC1a+PcTx1 (10nM)	7.53±0.01 ^{***}	6.37±0.02 ^{ns}	0.37±0.02	-0.02±0.04
ASIC1a+Mamb1(10nM)	7.12±0.01 [*]	5.70±0.03 ^{***}	-0.04±0.02	-0.69±0.05
ASIC1a+PcTx1 (10nM)	7.53±0.01	6.37±0.02	-	-
ASIC1a+GMQ(1mM)/PcTx1(10nM)	7.14±0.01 ^{***}	6.03±0.03 ^{***}	-0.39±0.02	-0.34±0.05
ASIC1a+Mamb1(10nM)	7.12±0.01	5.70±0.03	-	-
ASIC1a+GMQ(1mM)/Mamb1(10nM)	6.96±0.01 ^{***}	5.42±0.03 ^{**}	-0.16±0.02	-0.28±0.06
ASIC3Loop1a	7.23±0.01	6.93±0.03	-	-
ASIC3Loop1a+PcTx1(10nM)	7.35±0.02 ^{**}	7.68±0.02 ^{***}	0.12±0.03	0.75±0.05
ASIC3Loop1a+Mamb1(100nM)	7.22±0.01 ^{ns}	6.38±0.04 ^{***}	-0.01±0.02	-0.55±0.07
ASIC3Loop1a+PcTx1(10nM)	7.35±0.02	7.68±0.02	-	-
ASIC3Loop1a+GMQ(1mM)/PcTx1(10nM)	6.84±0.02 ^{***}	7.32±0.02 ^{***}	-0.51±0.04	-0.36±0.04
ASIC3Loop1a+Mamb1(100nM)	7.22±0.01	6.38±0.04	-	-
ASIC3Loop1a+GMQ(1mM)/Mamb(100nM)	6.66±0.01 ^{***}	6.84±0.02 ^{***}	-0.56±0.02	0.46±0.06

Half maximal pH of inactivation (pH_{0.5}inact) and activation (pH_{0.5}act) of ASIC1a, ASIC3, ASIC3^{L/A}, ASIC3Loop1a and ASIC1aLoop3 treated or not with GMQ or amiloride (AMI) or GMQ/AMI or GMQ/peptides. Variations of pH sensitivity (ΔpH_{0.5}) induced by the different treatments are calculated as follow: ΔpH_{0.5}=pH_{0.5}[GMQ and/or AMI and/or peptides] - pH_{0.5}control (noted in bold). A positive or negative value of ΔpH_{0.5} indicates greater or smaller pH sensitivity, respectively. Mean ± SEM, Unpaired t-test: *P>0.05, **P>0.01, ***P>0.001 indicate the significance compared to the control conditions (indicated in bold).

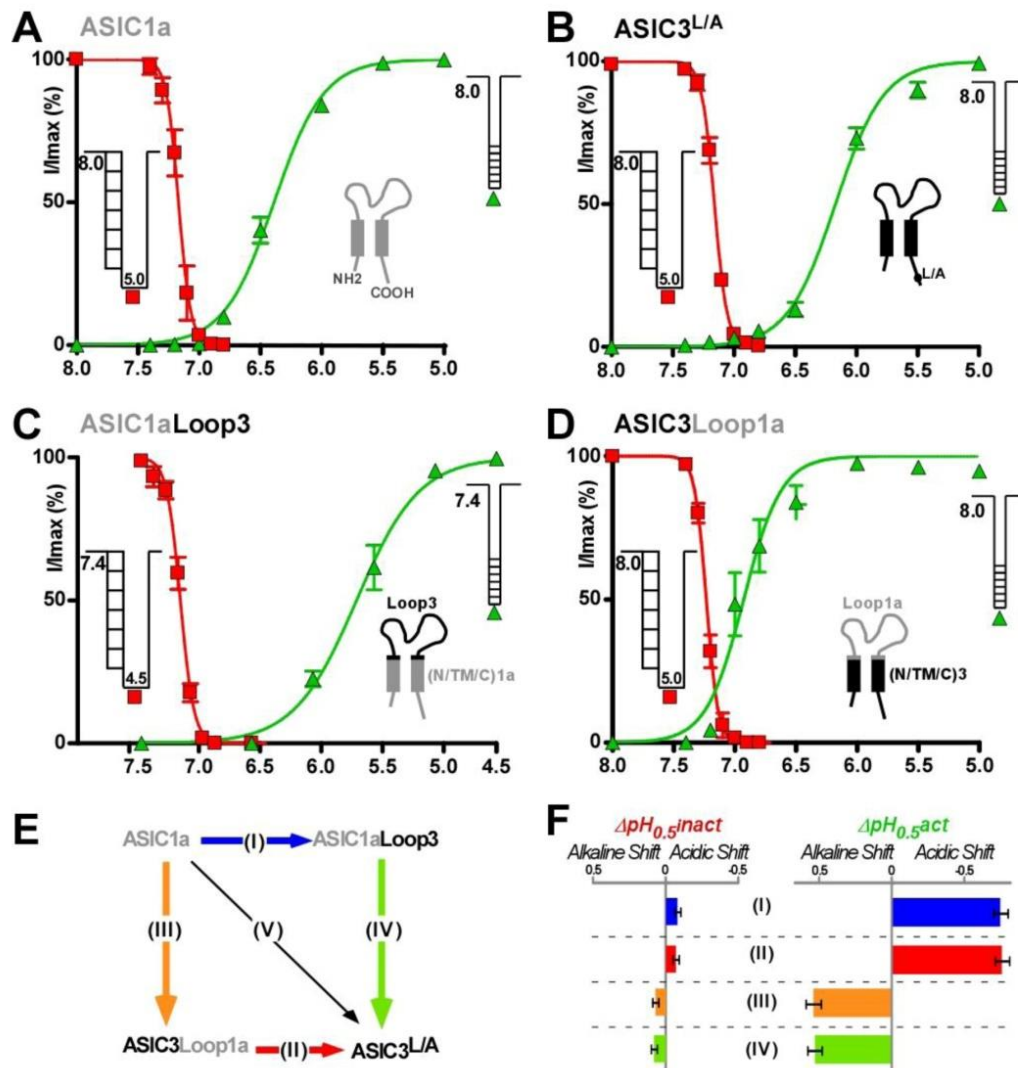


Figure 1. Contribution of the extracellular loop (Loop) and the transmembrane/cytosolic domains (N/TM/C) from ASIC1a and ASIC3 to the pH sensitivity of the channels. A-D) pH-dependent curves of activation (green) and inactivation (red) for ASIC3^{L/A} (n=6-8), ASIC1a (n=5-8), ASIC3Loop1a (n=5-10) and ASIC1aLoop3 (n=9-7). Solid lines are fits of the mean values of each data point to a sigmoidal dose-response curve with variable slope (the corresponding p_H_{0.5} values are listed in Table 1). Cartoons beside the curves illustrate the domains in ASIC1a (grey) and in ASIC3 (black) that have been swapped in chimeras. Protocols used for activation and inactivation are shown in inset. The L529A point mutation in the ASIC3 C-terminal domain is indicated by L/A (Figure 1-figure supplement 1). E) Cycle analysis where the terms (I), (II), (III) and (IV) are the variations of pH sensitivity (ΔpH_{0.5}) for activation and inactivation along the arrows. F) Calculation of the ΔpH_{0.5} of activation and inactivation for the pathways (I), (II), (III) and (IV) shown in E. Measures of window current are reported in Figure 1-figure supplement 2.

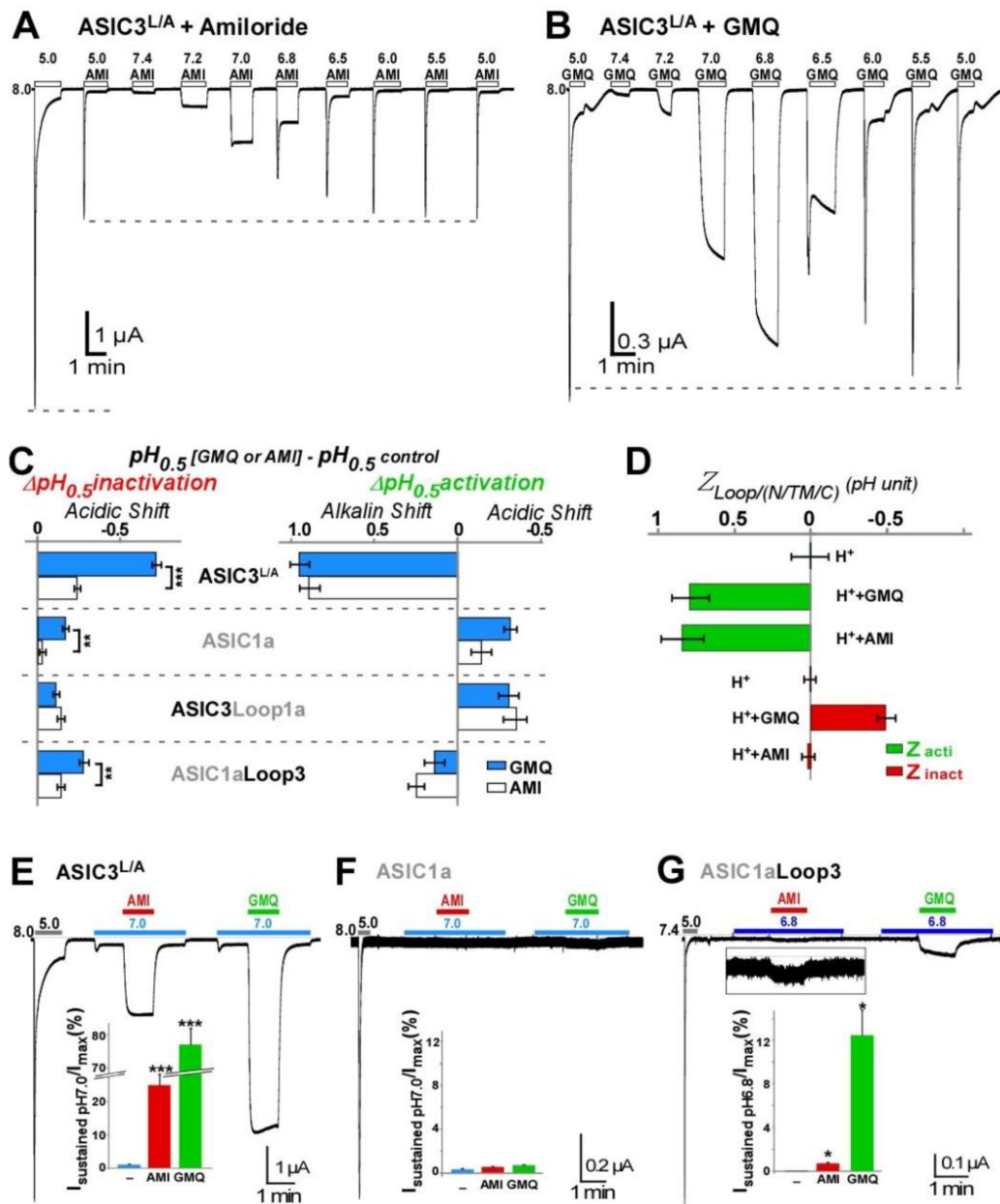


Figure 2. Amiloride and GMQ similarly affect the gating of ASIC channels. **A)** Typical current trace of ASIC3^{L/A} generated by application of different pH in the presence of 1 mM amiloride. The currents evoked at different pH from holding pH8.0 are used to trace the activation curve shown in Figure 2–figure supplement 1. **B)** Typical current trace of ASIC3^{L/A} in the presence of 1 mM GMQ using the same protocol as in A. **C)** Graph showing the variations of pH_{0.5} of activation and inactivation induced by GMQ or amiloride (1 mM) from control conditions as shown in Figure 2–figure supplement 1. **D)** Functional chimera cycle analysis of the Loop versus the (N/TM/C) domains from ASIC1a and ASIC3 during pH-dependent gating with or without 1 mM amiloride or GMQ. (Mean ± SEM; see methods). **E–G)** Effects of amiloride and GMQ on the window current generated by moderate acidification (pH 6.8 or 7.0). Application of 1 mM amiloride or 1 mM GMQ during the pH pulse potentiates or induces a sustained window current. (Inset in E: $I_{\text{sustained pH7.0}}/I_{\text{max}} = 1.1 \pm 0.1\%$,

25±3 % and 77±5 %, respectively; inset in F: $I_{\text{sustained pH7.0}}/I_{\text{max}}=0.4\pm0.1$ %, 0.6±0.1 % and 0.8±0.1 %, respectively; inset in G: $I_{\text{sustained pH6.8}}/I_{\text{max}}=0.7\pm0.1$ % and 12.5±2.3 % for amiloride and GMQ, respectively). Mean ± SEM, *P<0.05, ***P<0.001, nonparametric paired t-test + Wilcoxon signed rank test as compared to control; n=5-23.

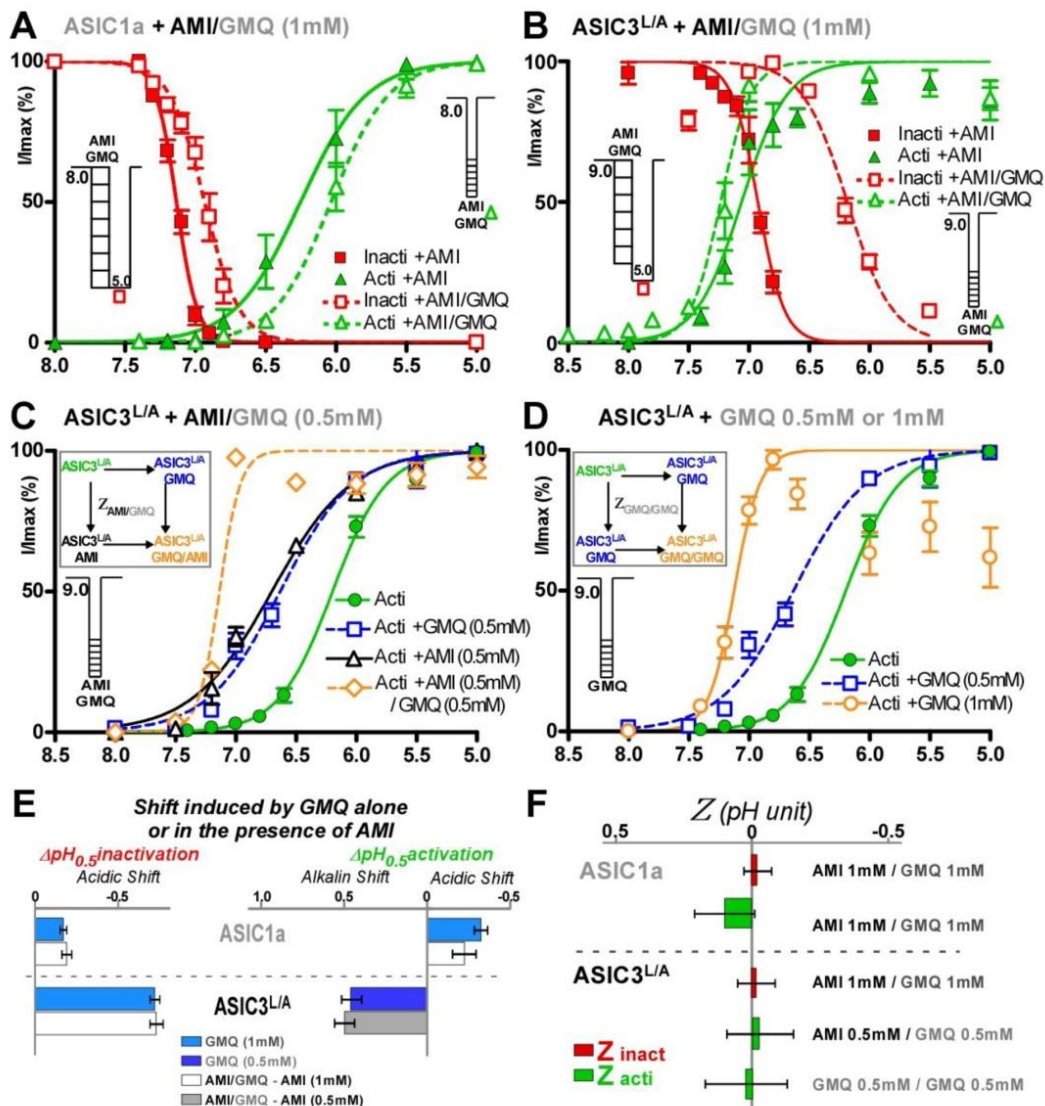


Figure 3. Amiloride and GMQ have no cooperative effect. A-B) pH-dependent curves of activation (green; n=6-9) and inactivation (red; n=5) for ASIC1a and ASIC3^{L/A} in the presence of 1 mM amiloride plus 1 mM GMQ compared to control condition with amiloride alone (same data as in Fig. 2-suppl. 1). The corresponding pH_{0.5} values are shown in Table 1. Protocols are displayed beside the curves. C-D) pH-dependent curves of activation for ASIC3^{L/A} alone (green in C and D; same data as in Fig. 1A), with 0.5 mM or 1 mM GMQ (same data as in Figure 2-figure supplement 1B), with 0.5 mM amiloride, or with 0.5 mM amiloride plus 0.5 mM GMQ (n=5). Protocols used are indicates beside the curves. Insets, cycle analysis graph. The corresponding pH_{0.5} values and their variations are listed in Table 1. E) Histograms reporting the shifts of pH_{0.5} induced by GMQ alone (same data as in Fig. 2C) or in the presence of amiloride (calculated from the curves shown in A-D). F) Calculated Zeta values for activation (green) and inactivation (red) for the different conditions shown in A-D (deduced from the cycle analysis graphs shown in inset in C and D).

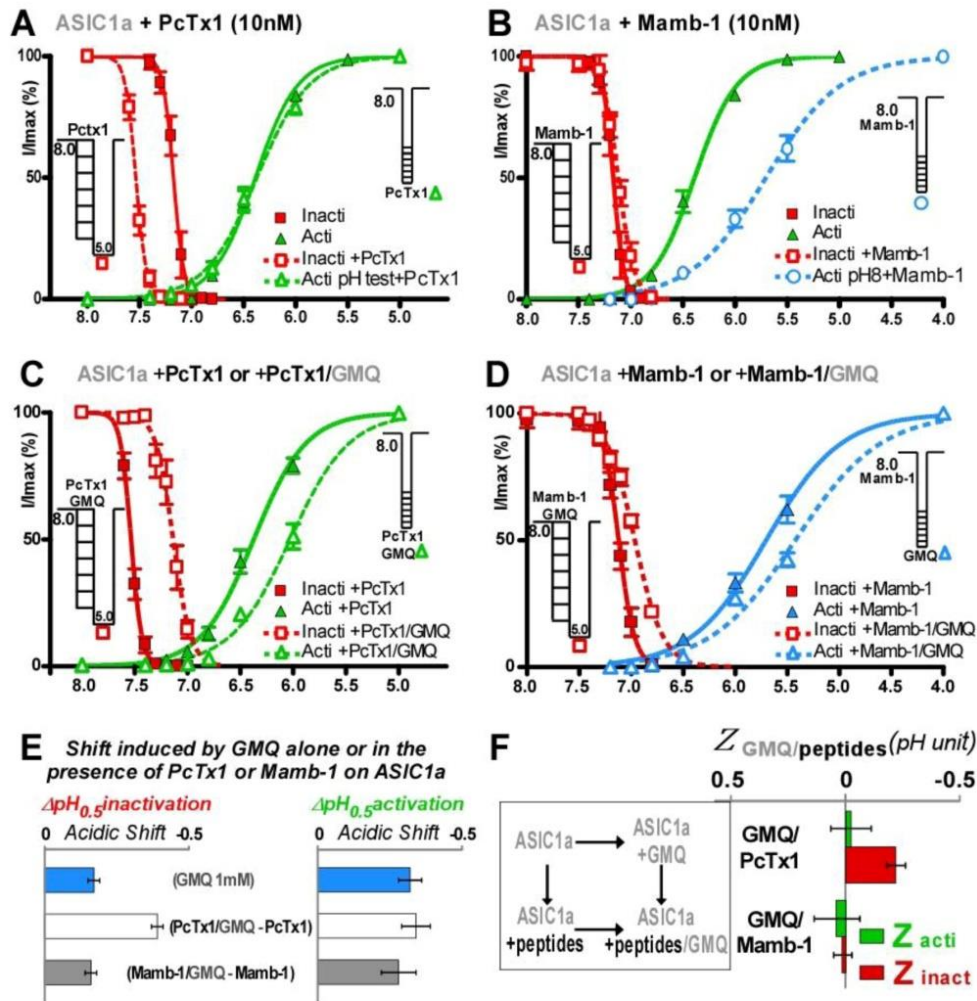


Figure 4. Comparison of the mechanism of action of GMQ and PcTx1 or mambalgin-1 in ASIC1a. A-B) pH-dependent curves of activation (green or blue; $n=6-11$) and inactivation (red; $n=5$) in the presence of 10 nM PcTx1 (A) or 10 nM mambalgin-1 (B) compared with control conditions (same data as in Fig. 1A). C-D) pH dependent curves of activation (green or blue; $n=6-9$) and inactivation (red; $n=5-9$) in the presence of 1 mM GMQ plus 10 nM PcTx1 (C) or in the presence of 1 mM GMQ plus 10 nM mambalgin-1 for ASIC1a (D), compared to control conditions with PcTx1 or mambalgin-1 alone (same data as A and B). See Table 1 for the corresponding $\text{pH}_{0.5}$ values. Protocols used are shown besides the curves. For activation, PcTx1 was applied during the pH pulses, and mambalgin-1 was applied in the holding pH. E) Histograms reporting the shifts of $\text{pH}_{0.5}$ induced by GMQ alone (same data as in Fig. 2C) or in the presence of PcTx1 or mambalgin-1 (calculated from the curves shown in C and D). F) Graphical representation of the Zeta values calculated from the cycle analysis graph shown on the left.

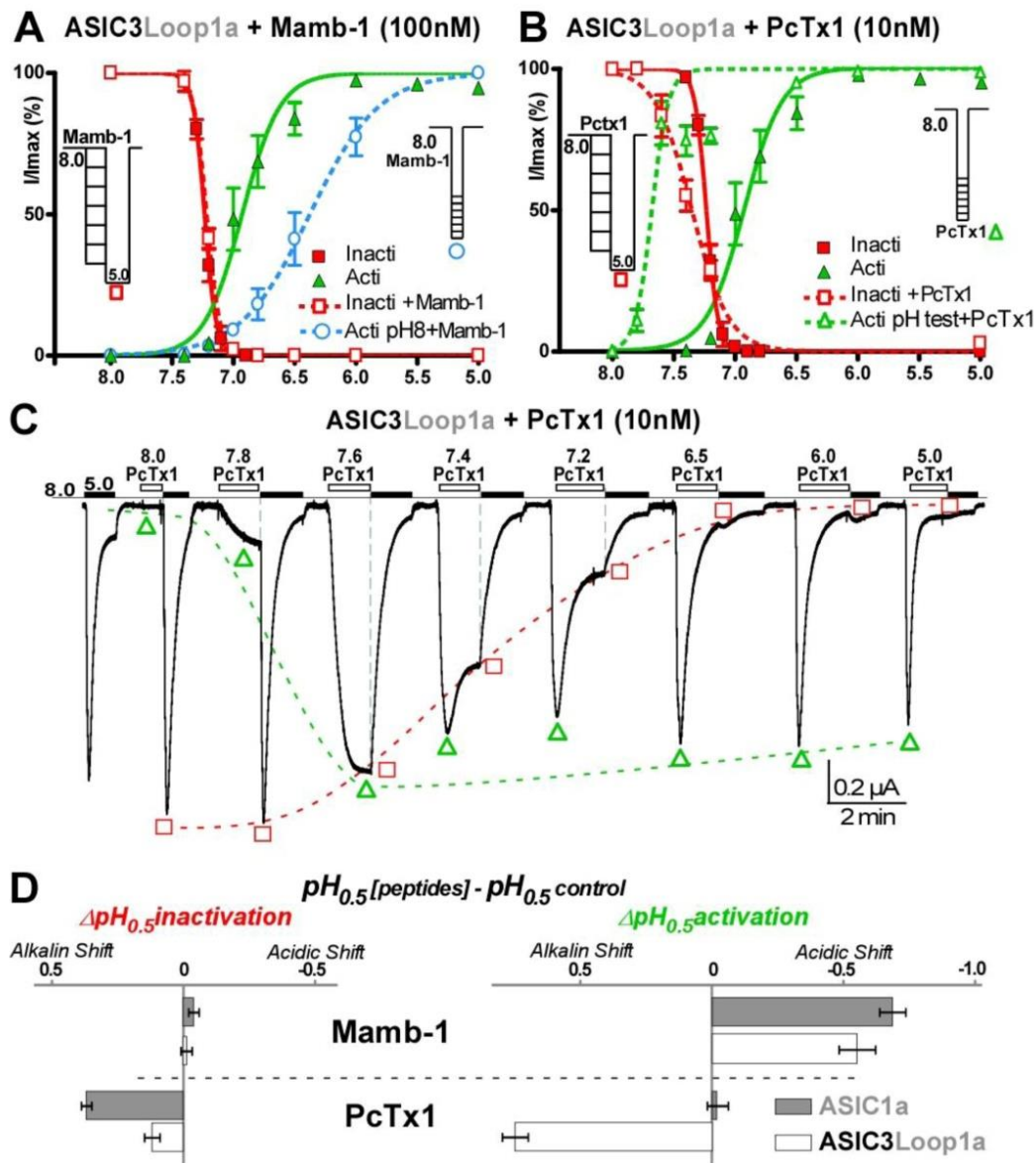


Figure 5. Influence of the (N/TM/C) domains on the modulation of the pH-dependent gating of ASIC1a by mambalgin-1 and PcTx1. A-B) pH-dependent curves of activation and inactivation ($n=5$) in the presence of 100 nM mambalgin-1 (A) or 10 nM PcTx1 (B) compared with control condition without peptides (same data as in Fig. 1D). The $pH_{0.5}$ values are listed in Table 1. Note that chimera ASIC3Loop1a was less sensitive to mambalgin-1 than ASIC1a since 100 nM of peptide inhibited $41 \pm 5\%$ of the peak current ($n=5$) while the IC_{50} for ASIC1a is ~ 10 nM (Baron et al., 2013; Mourier et al., 2016). For ASIC1a and ASIC3Loop1a, PcTx1 is used at a concentration 10-fold greater (10nM) than the reported IC_{50} value for ASIC1a (1nM; Escoubas et al., 2000). **C)** Representative current trace used to establish the pH-dependent curves of ASIC3Loop1a shown in B. A sustained window current is visible between pH 7.8 and 7.2. **D)** Histogram reporting the shifts of $pH_{0.5}$ induced by PcTx1 or mambalgin1 in ASIC3Loop1a (calculated from the curves shown in A and B) and ASIC1a (same data as in Fig. 4A,B).

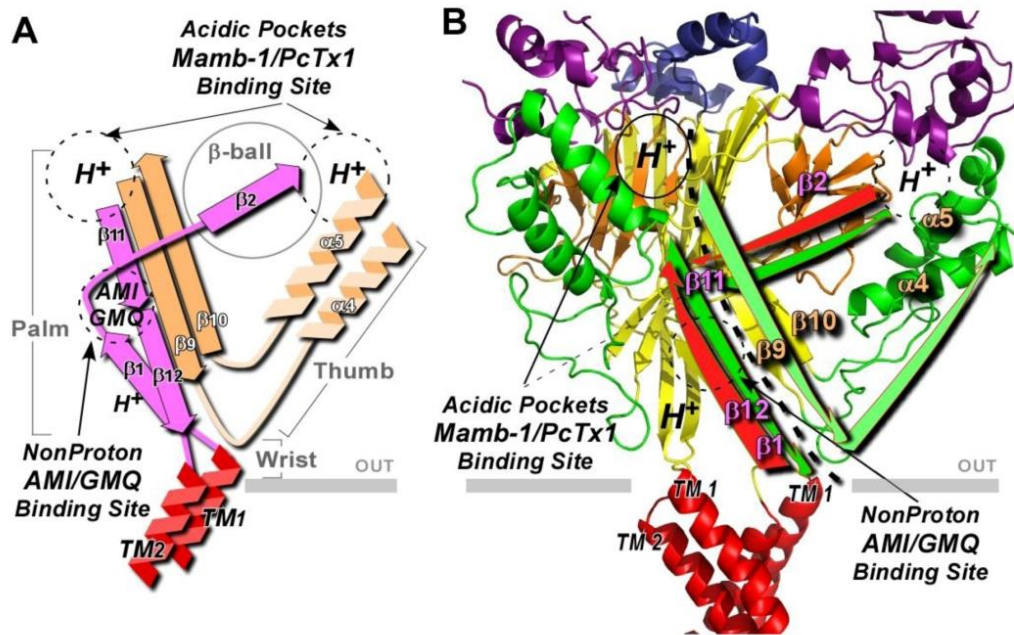
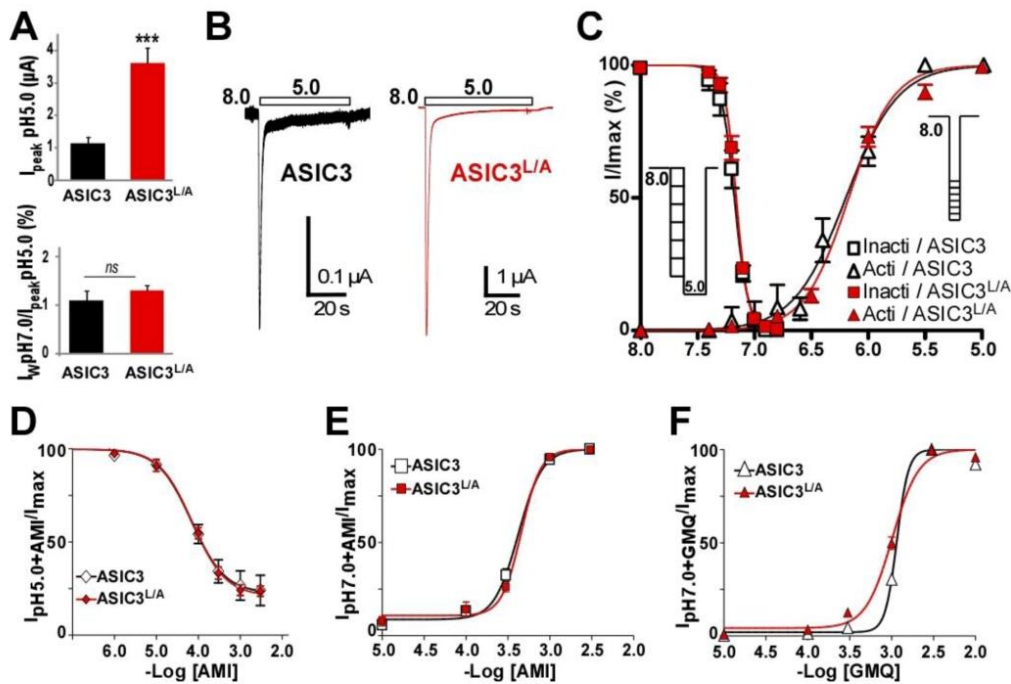
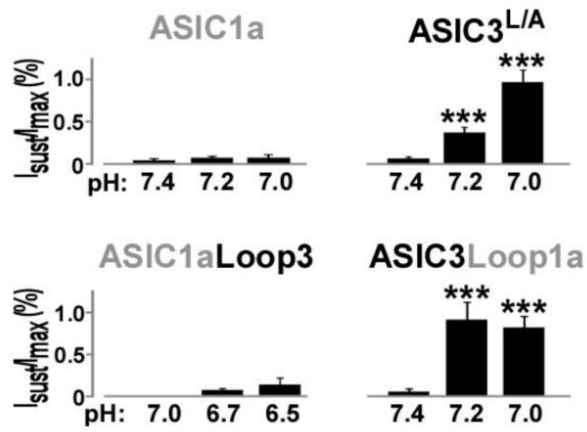


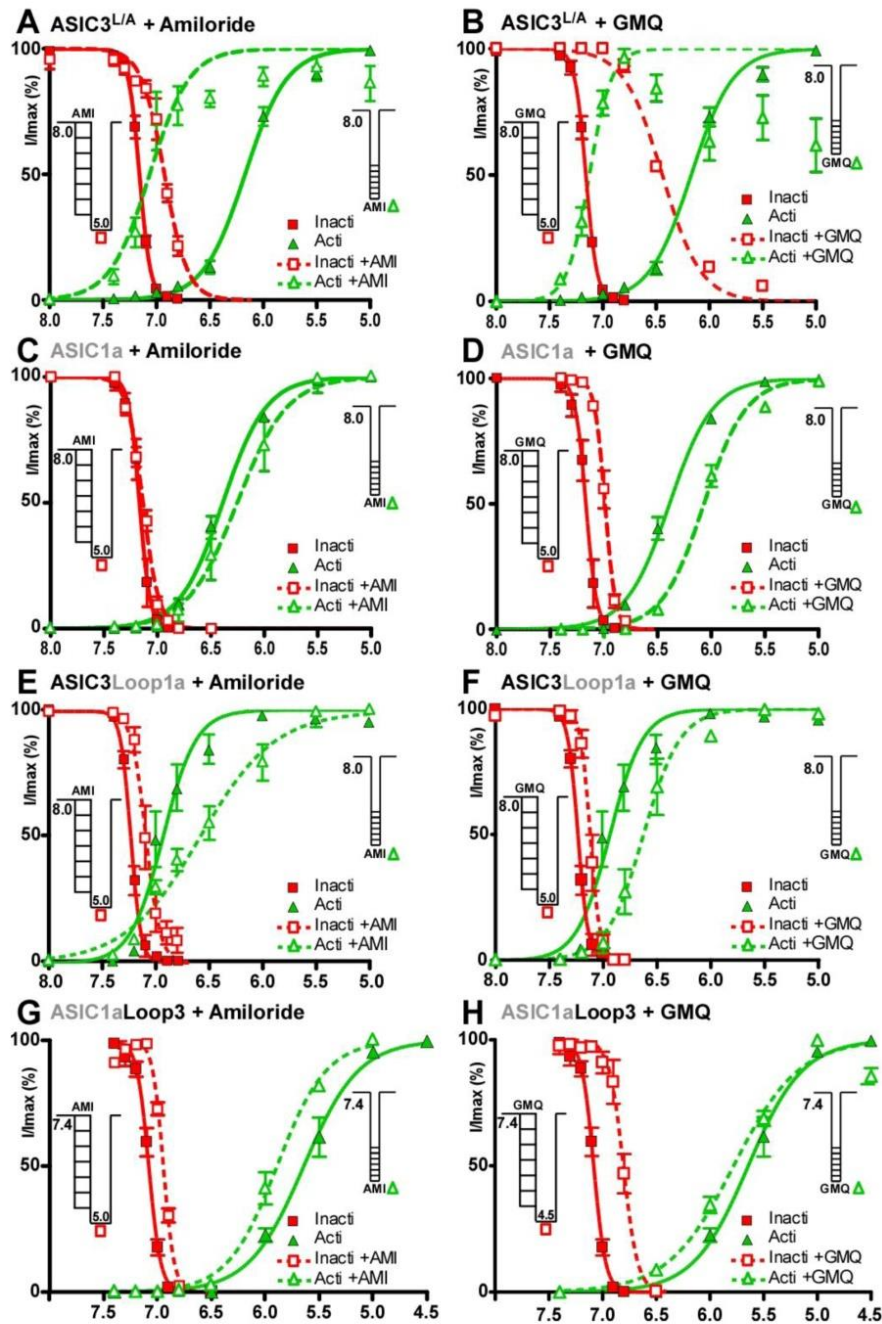
Figure 6. Model describing the activation and inactivation processes in the loop of ASIC1a and the possible mechanisms of coupling with the transmembrane/cytosolic domains. **A)** Schematic representation of the different structural elements involved in the pH-dependent gating of ASIC1a (Palm/ β -ball domain in violet, Palm/Thumb domain in orange) that support the two mechanisms of activation and/or inactivation acting in parallel on the wrist region as shown in B. Only one subunit is represented for clarity. **B)** Model of pH-dependent gating of ASIC1a based on our data and on the available structural information presented in A. Arrows represent the motions during activation (green) and inactivation (red) on one subunit, according to available data in the literature (see text for details and Figure 6–figure supplement 1). Only two subunit of the 3D model of rat ASIC1a (Salinas et al., 2014) based on crystal structure of chicken ASIC1a (Jasti et al., 2007) are represented for clarity. The $\beta_9\beta_{10}/\alpha_4\alpha_5$ regions of the palm/thumb domains, and the $\beta_1\beta_2/\beta_{11}\beta_{12}$ regions of the palm/ β -ball domains could be able to relay two mechanisms acting in parallel on the wrist region, one for both activation and inactivation through covalent links with the transmembrane domains ($\beta_1/TM1$ and $\beta_{12}/TM2$), and the other one mainly for activation through non covalent link between the Thumb ($\alpha_4\alpha_5$) and $TM1$. The different domains are identified by different colors: Finger (violet), Knuckle (blue), β -ball (orange), thumb (green) and palm (yellow). The black dashed line is used to distinguish between the two sub-domains of the palm. See panel A for details on the relevant secondary structures (α -helices and β -sheets) shown.



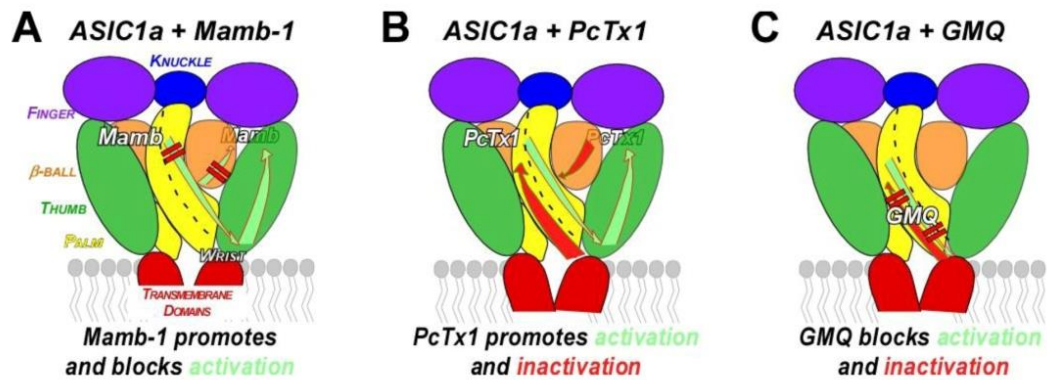
Suppl. Figure 1. Wild-type ASIC3 and the L529A point mutant (ASIC3^{L/A}) have the same functional properties. **A)** Statistical analysis of the peak current amplitudes associated with the ASIC3 and ASIC3^{L/A} channels and induced by a drop in pH from 7.4 to 5.0 (top), and of the sustained window current at pH7.0 normalized to the peak current (bottom) (unpaired t-test; n=8-13). L529A corresponds to a mutation in a consensus motif for internalization closed to the end of the cytoplasmic carboxy-terminus (R...LV) that increases the peak current of ASIC3 by about 3-fold ($I_{\text{peak-pH5.0}} = 1.14 \pm 0.20$ and 3.62 ± 0.47 μA for ASIC3 and ASIC3^{L/A}, respectively) without affecting the window current ($I_{\text{w-pH7.0}}/I_{\text{peak-pH5.0}} = 1.09 \pm 0.20$ % and 1.30 ± 0.11 % for ASIC3 and ASIC3^{L/A}; $p > 0.05$) and the others properties. **B)** Typical current traces showing the same characteristic biphasic current in ASIC3 and ASIC3^{L/A}. **C)** The pH-dependent curves of activation (triangle) and inactivation (square) for ASIC3 (black lines; n=5) and ASIC3^{L/A} (red lines; n=6-8) are identical. Solid lines are fits of the mean values of each data point to a sigmoidal dose-response curve with variable slope. The pHs for half-maximal activation and inactivation are not significantly different between ASIC3 and ASIC3^{L/A} (see values in Table 1). **D)** Amiloride inhibited in a similar way the ASIC3 and ASIC3^{L/A} peak currents at pH 5.0. Current amplitudes, normalized to amplitude in the absence of amiloride, are plotted as the inverse of a logarithmic function of amiloride concentration. Solid lines are fit of the mean values of each data point to a sigmoidal dose-response curve with variable slope. The $\text{pIC}_{50\text{pH5.0+AMI}}$ value determined from the fit is $\text{pIC}_{50\text{pH5.0+AMI}} = 4.14 \pm 0.12$ (n=6) and 4.16 ± 0.06 (n=7), $p > 0.05$; respectively. **E)** Amiloride similarly activated the ASIC3 and ASIC3^{L/A} currents when applied at pH 7.0 ($\text{pEC}_{50\text{pH7.0+AMI}} = 3.37 \pm 0.02$ (n=5) and 3.34 ± 0.03 (n=5), $p > 0.05$; respectively). **F)** Activation of the pH 7.0-evoked ASIC3 and ASIC3^{L/A} currents by GMQ are also not significantly different ($\text{pEC}_{50\text{pH7.0+GMQ}} = 2.99 \pm 0.02$ (n=9) and 2.94 ± 0.06 (n=8), $p > 0.05$; respectively). Note that the L529A mutation has not been introduced into chimera ASIC3Loop1a, which displayed a sufficient level of expression in the *Xenopus* oocyte expression system.



Suppl. Figure 2. Contribution of the transmembrane and cytosolic domains (N/TM/C) to the sustained window current. Measure of the sustained window current with three successive pH steps (Mean \pm SEM, *** $P < 0.001$, nonparametric paired t-test + Wilcoxon signed rank test as compared to the pH 7.4 condition; $n=6-14$).



Suppl. Figure 3. Amiloride and GMQ similarly affect the gating of ASIC channels. A-D) pH-dependent curves of activation (green; n=5-11) and inactivation (red; n=6-9) for ASIC3^{L/A} (A, B) and ASIC1a (C, D) channels, and for ASIC3Loop1a (E, F) and ASIC1aLoop3 (G, H) chimeras, in the absence (control as already shown in Fig. 1) or in the presence of 1 mM amiloride (A, C, E and G) or 1 mM GMQ (B, D, F and H). The measures were done on the ASIC1a residual current after inhibition by amiloride (65±7 % inhibition of the peak current at pH5.0; n=6). Protocols used for activation and inactivation are shown beside the curves. See Table 1 for pH_{0.5} values.



Suppl. Figure 4. Mechanisms of regulation by mambalgin-1, PcTx1 and GMQ. The different sub-domains of ASIC1a are schematically represented as described by Jasti et al. (Jasti et al., 2007), and only 2 subunits of the trimeric channel are shown for simplicity. The black dashed line allows to distinguish between the two sub-domains of the palm. The conformational changes are represented only on one subunit for simplicity. **A)** Mambalgin-1 (Mamb-1) promotes activation (green arrows) via the Thumb domain but also blocks activation (green arrows with red bars) via the β -Ball or the Palm domains (Salinas et al., 2014). **B)** PcTx1 promotes activation (green arrows) via the Thumb domain similarly to mambalgin-1 and promotes inactivation (red arrows) via the Palm and the β -Ball domains (Salinas et al., 2014). **C)** GMQ blocks activation (green arrows with red bars) and inactivation (red arrows with red bars) via the lower Palm domain (Yu et al., 2010; Yu et al., 2011; Alijevic and Kellenberger, 2012).

Conclusions générales et perspectives

Dans la première partie de mon travail de thèse, j'ai élaboré de nouvelles stratégies permettant la collecte de venins dans la nature et j'ai également utilisé des venins commerciaux afin de tenter de découvrir des nouveaux modulateurs pharmacologiques des canaux ASIC. Cela soulève néanmoins certaines questions :

- **Est-il nécessaire de collecter des venins dans la nature pour rechercher de nouvelles molécules actives ?**

Cette question peut paraître anodine mais je me suis aperçu durant certains congrès que la communauté scientifique semble partagée à ce sujet. Lorsque je dresse un bilan de mon travail de thèse, je constate que malgré mes efforts et le nombre d'heures passées à rechercher dans une grande diversité de venins commerciaux des molécules ciblant spécifiquement les canaux ASIC, je ne suis pas parvenu à en découvrir de nouvelles en trois ans. Le rendement de l'étude des venins peut sembler faible lorsque l'on s'intéresse à un seul canal mais si l'on teste ces venins sur d'autres cibles il est probable que des toxines d'intérêt soient découvertes dans ces venins. Parfois une toxine peut avoir certains effets sur un canal humain et des effets complètement différents sur son homologue présent dans un autre organisme. Collecter un maximum de venins que nous ne connaissons pas nous permettrait donc de multiplier nos chances de découvrir de nouvelles substances actives. Cela revient à augmenter la diversité des livres d'une bibliothèque qui nous permettra de répondre à de nombreuses questions structurales ou fonctionnelles dans l'étude des canaux ioniques. Rien ne garantit la découverte de nouvelles molécules d'intérêt. En revanche, se limiter seulement à la recherche de composés présents dans les venins commercialisés restreint considérablement la possibilité de faire avancer la recherche de nouvelles substances actives. A mon sens il est donc indispensable de collecter de nouveaux venins dans la nature.

- **Les méthodes actuelles de prélèvement des venins sont-elles adaptées ?**

Je me suis intéressé à diverses méthodes d'extraction de venin pour pouvoir exploiter les venins français. Néanmoins, je reste conscient que malgré les efforts fournis pour améliorer ces techniques de prélèvement, elles restent imparfaites. Comme mentionné dans l'introduction, certains animaux utilisent des venins différents en fonction de la nature de leur utilisation (attaque ou défense). D'autres sont fortement sensibles aux écarts de température. Il est évident qu'une seule méthode d'extraction ne conviendra pas à tous les types d'organismes. Il sera donc nécessaire d'adapter le protocole à la spécificité des animaux.

De plus, il est important d'apporter une notion écologique au prélèvement de venins sauvages. J'ai constaté que certains auteurs ont recours à des méthodes létales pour les animaux. Il me semble peu convenable à l'heure actuelle de prélever des venins sans se soucier de l'impact écologique que cela peut avoir.

Dans la seconde partie de ma thèse je me suis servi de toxines peptidiques et de petites molécules synthétiques connues pour moduler l'activité des canaux ASIC afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

Notre étude du site d'action de la mambalgine-2 sur les canaux ASIC1a suggère que cette toxine se fixe au niveau de la poche acide, appelée aussi « senseur de pH », et interagit spécifiquement avec le domaine T, le domaine P et le domaine β du canal. Cela nous a permis d'établir un modèle du mécanisme d'inhibition des canaux ASIC1a par la mambalgine. Cette toxine stabilise un état fermé du canal et la mutation du domaine P ou du domaine β entraîne seulement une altération partielle des effets inhibiteurs, en revanche la mutation des deux domaines P et β permet de supprimer l'inhibition et de révéler un effet potentialisateur sous-jacent. De manière intéressante la toxine PcTx1 se fixe également dans le senseur de pH des canaux ASIC via le domaine T et bien qu'elle entraîne également une inhibition, son mécanisme d'action diffère de celui de la mambalgine, même s'il s'agit dans les deux cas d'un mécanisme plus général que nous avons appelé « pH sensor trapping » (Figure 7 de l'article 2). Dans le cas de PcTx1, cette toxine favorise un état inactivé et la mutation d'un seul des deux domaines P ou β permet dans ce cas une suppression totale des effets inhibiteurs et l'apparition de l'effet potentialisateur.

Après avoir déterminé le site de liaison sur ASIC, la caractérisation de différents mutants de la mambalgine-1 nous a permis d'identifier les résidus clés permettant son interaction spécifiquement avec le canal ASIC1a (pharmacophore). Les mutations d'acides aminés effectuées sur la mambalgine ont été réalisées dans le cadre d'un « alanine scan », qui a pour but d'entraîner des pertes d'interactions entre deux composés. Aucune de ces mutations n'a engendré une amélioration de l'affinité de la mambalgine et un certain nombre n'a pas eu d'effet significatif. Dans d'autres cas, les mutations ont entraîné une altération drastique des effets inhibiteurs de cette toxine. Maintenant que nous avons une idée plus précise des résidus clés de la mambalgine qui interagissent avec le canal, il serait intéressant de les modifier de manière plus subtile pour améliorer son affinité ou modifier sa spécificité pour améliorer encore cet outil pharmacologique. Ces nouveaux variants de mambalgine devront être testés sur d'autres isoformes de canaux ASIC homomériques ou hétéromériques. Ces nouveaux outils pharmacologiques permettront d'améliorer les connaissances sur les mécanismes de régulation des canaux ASIC et sur leur rôle physiologique.

Enfin, la régulation pharmacologique des canaux ASIC par des petites molécules et des toxines peptidiques combinée à une nouvelle approche en analyse cyclique nous a permis d'étudier le couplage entre la boucle extracellulaire et les domaines transmembranaires des canaux ASIC et de proposer un modèle reflétant l'extrême complexité du mécanisme d'ouverture des canaux ASIC par les protons. Ce modèle pourrait être validé et amélioré par une étude plus détaillée sur le rôle des différents sous-domaines de la boucle extracellulaire impliqués dans les divers processus d'activation et d'inactivation.

Cette approche a deux objectifs. D'une part, il est possible en se basant sur les structures « actives » des agents pharmacologiques, de rechercher de nouvelles molécules dans les bases de données. Il est également possible, de modifier les toxines sauvages pour tenter de concevoir des nouveaux peptides plus efficaces et/ou plus courts sans altérer leurs fonctions initiales. De la même manière que pour le ziconotide, qui est utilisé dans le traitement des douleurs chroniques intenses nécessitant une analgésie intrarachidienne, des dérivés de mambalgine pourraient être utilisés pour un usage thérapeutique et constituer une nouvelle gamme d'antidouleur.

D'autre part, les mécanismes d'action de ces agents pharmacologiques et leurs interactions ont été utilisés pour mieux comprendre des mécanismes d'activation et d'inactivation des canaux ASIC par les protons. De la même manière que nous avons étudié le couplage entre la boucle extracellulaire et les domaines N/TM/C des canaux ASIC1a et ASIC3, il serait envisageable d'étudier les sous domaines de la boucle ou des segments transmembranaires afin de compléter notre modèle et d'affiner la compréhension des mécanismes qui régulent ces canaux. De plus, cette étude pourrait être envisagée pour d'autres composés qui interagissent avec les canaux ASIC1a et ASIC3 comme les molécules de la famille des RF-amides. Ces molécules sont sécrétées en masse dans les tumeurs (Xu and Xiong 2007) et comprendre la manière dont elles interfèrent avec les canaux ASIC pourraient nous permettre d'avoir une vision plus large de leur rôle dans les cancers. Enfin, la toxine APETx2, qui cible la boucle extracellulaire des canaux ASIC3 tout comme le GMQ ou les autres toxines ciblant ces canaux pourrait faire l'objet du même type d'étude. Cela pourrait nous informer sur le site et le mode de fixation de cette molécule mais aussi sur leur mécanisme d'action.

Annexes

1. Méthodes chirurgicales de prélèvement d'ovocytes de *Xenopus laevis* par Ovariectomie

Il n'y a pas de phrase plus dangereuse dans la recherche que « *on a toujours fait comme ça!* ». La plupart des protocoles de prélèvement d'ovocytes de xénope que je vois dans des publications scientifiques sont les mêmes depuis plus de 10 ans. De plus lorsque l'on s'intéresse à la chirurgie et que l'on compare les protocoles utilisés par les chercheurs à ceux élaborés par des vétérinaires, on s'aperçoit qu'ils sont erronés ou ne comportent pas tous les détails techniques. Pourtant de nombreux ouvrages expliquent clairement les méthodes chirurgicales utilisées chez les amphibiens. J'ai donc décidé de détailler ici la méthode que j'utilise pour réaliser une ovariectomie chez le xénope et que j'ai élaborée à partir de différentes techniques utilisées par des vétérinaires.

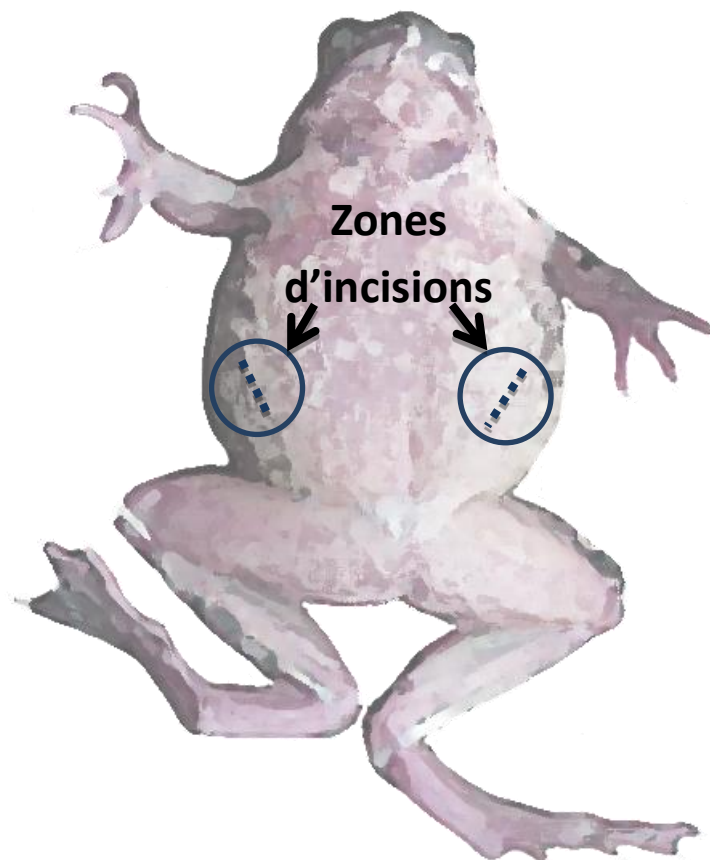
1.1 L'anesthésie :

Il est possible d'utiliser plusieurs anesthésiants chez les amphibiens. Pour ma part, j'utilise de la Tricaine aussi appelée MS-222 (Ethyl 3-aminobenzonate methanesulfonate, SIGMA® CAS : 886-86-2). Lorsque l'on utilise de la Tricaine, il est impératif de tamponner la solution avec du phosphate de sodium dibasique ($\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$, SIGMA® CAS : 7558-79-4). Sans cela, le pH de la solution anesthésiante diminue considérablement (pH3,0). La solution est alors ionisée et ne pénètre quasiment pas dans l'animal. Lorsque l'anesthésiant est appliqué par immersion de l'animal, on prépare une solution de Tricaine à 1g/L pour une anesthésie profonde dans de l'eau filtrée (0,45 μM). Cette solution est alors tamponnée avec le phosphate de sodium dibasique (0,5M). 400 ml suffisent pour anesthésier convenablement un animal. Il est conseillé de préparer cette solution à l'avance et de la stocker à 4°C. Je n'ai pas constaté de différence majeure dans le temps d'induction de l'anesthésie ou sa profondeur, entre une solution à température ambiante (25°C) ou une solution froide (4°C). En revanche l'effet vasoconstricteur du froid permet de limiter l'hémorragie lors des incisions dans les différents tissus et de gérer l'hémostase plus facilement au cours de l'opération. Avec ces concentrations, le temps d'induction est de 5 min environ et on obtient une anesthésie profonde au bout de 20 à 30 min selon la taille de l'animal.

1.2 Chirurgie :

Après vérification de la profondeur de l'anesthésie (réflexe de retrait de la patte), l'animal est positionné en décubitus dorsal dans un récipient en plastique à fond plat (environ 3 cm) contenant 1cm de solution anesthésiante. Effectuer une première incision (environ 1cm) de la peau dans le quart inférieur gauche ou droit de l'abdomen.

Plus on s'éloigne du centre, moins grande est l'hémorragie. Il est important de stopper l'hémorragie en comprimant la plaie avec une compresse stérile avant de poursuivre l'opération. Effectuer la même chose au niveau du muscle. L'ovaire gauche ou droit est directement visible après cette étape. On peut l'extraire délicatement à l'aide de deux pinces fines puis, si l'on ne prélève pas la totalité, il n'est pas nécessaire d'effectuer de ligature des vaisseaux sanguins. Si la totalité est prélevée, il faut ligaturer les vaisseaux sanguins environnants qui irriguent l'ovaire. Lorsque cette étape est effectuée, il faut suturer l'animal plant par plant.



J'utilise une aiguille (11mm, 3/8c) sertie sur un monofil en propylène non résorbable 6/0 de 75 cm (ETHICON) pour la suture du muscle puis de la peau. L'utilisation d'un porte aiguille est impérative et après de nombreux tests, les points simples sont les plus adaptés aussi bien pour les sutures musculaires que dermiques.

1.3 Réveil :

Pour la phase de réveil, placer l'animal la tête hors de l'eau dans une boîte plastique inclinée pour éviter qu'il se noie. La phase de réveil complète peut durer jusqu'à une heure et il faut isoler l'animal dans un aquarium personnel durant au moins quatre jours. On observe une cicatrisation complète des tissus au bout de 15 jours.

2. Préparation et conservation des ovocytes de *Xenopus laevis* :

Une fois l'ovaire prélevé, il faut le placer dans une boîte de Petri (D :100mm) contenant du milieu ND96 (96mM NaCl, 2nM KCl, 1.8nM CaCl₂, 2nM MgCl₂, 5 mM HEPES,) à pH 7.4 (tamponné avec du NaOH). Il faut ensuite déchirer la poche d'ovocyte puis découper des morceaux d'environ 5 mm³ et les placer dans un Falcon® de 50 ml contenant 20 ml de ND96 pH 7,4. Ajouter 1 ml d'un mix de collagénase type IA (SIGMA® CAS : 9001-12-1) préparé à partir de collagénase 1mg/ml et d'inhibiteur de trypsine 0.2mg/ml (SIGMA® CAS : 9035-81-8). Placer dans un agitateur à faible vitesse pendant une durée de 2 heures à 4 heures selon la pureté de la collagénase.

Une fois digérés, les ovocytes sont rincés plusieurs fois jusqu'à ce que le milieu soit propre et translucide avec du ND96 pH7.4 additionné d'antibiotique (Penicilline/Streptomycine Lonza® 10ml/l). Enfin ils sont stockés à 4°C en changeant le milieu tous les deux jours pour la conservation puis à 19°C après injection avec de l'ADN ou de l'ARN.

Références bibliographiques

- Adams, C. M., P. M. Snyder and M. J. Welsh (1999). "Paradoxical stimulation of a DEG/ENaC channel by amiloride." *J Biol Chem* **274**(22): 15500-15504.
- Aguilar, M. B., K. S. Luna-Ramirez, D. Echeverria, A. Falcon, B. M. Olivera, E. P. Heimer de la Cotera and M. Maillo (2008). "Conorfamide-Sr2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks." *Peptides* **29**(2): 186-195.
- Akiba, Y., M. Mizumori, M. Kuo, M. Ham, P. H. Guth, E. Engel and J. D. Kaunitz (2008). "CO₂ chemosensing in rat oesophagus." *Gut* **57**(12): 1654-1664.
- Alijevic, O. and S. Kellenberger (2012). "Subtype-specific modulation of acid-sensing ion channel (ASIC) function by 2-guanidine-4-methylquinazoline." *J Biol Chem* **287**(43): 36059-36070.
- Alvarez de la Rosa, D., P. Zhang, D. Shao, F. White and C. M. Canessa (2002). "Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2326-2331.
- Aryeetey, E. and R. Kumar (1973). "Structure and function of the dorsal abdominal gland and defence mechanism in cocoa-capsids (Miridae: Heteroptera)." *Journal of Entomology Series A, General Entomology* **47**(2): 181-189.
- Babini, E., M. Paukert, H. S. Geisler and S. Grunder (2002). "Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1)." *J Biol Chem* **277**(44): 41597-41603.
- Baconguis, I., C. J. Bohlen, A. Goehring, D. Julius and E. Gouaux (2014). "X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na(+)-selective channel." *Cell* **156**(4): 717-729.
- Baconguis, I. and E. Gouaux (2012). "Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes." *Nature* **489**(7416): 400-405.
- Baron, A., S. Diochot, M. Salinas, E. Deval, J. Noel and E. Lingueglia (2013). "Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels." *Toxicon* **75**: 187-204.
- Baron, A. and E. Lingueglia (2015). "Pharmacology of acid-sensing ion channels—physiological and therapeutical perspectives." *Neuropharmacology* **94**: 19-35.
- Baron, A., N. Voilley, M. Lazdunski and E. Lingueglia (2008). "Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons." *J Neurosci* **28**(6): 1498-1508.
- Bartoi, T., K. Augustinowski, G. Polleichtner, S. Grunder and M. H. Ulbrich (2014). "Acid-sensing ion channel (ASIC) 1a/2a heteromers have a flexible 2:1/1:2 stoichiometry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(22): 8281-8286.
- Bartram, S. and W. Boland (2001). "Chemistry and ecology of toxic birds." *ChemBiochem* **2**(11): 809-811.
- Basbaum, A. I., D. M. Bautista, G. Scherrer and D. Julius (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." *Cell* **139**(2): 267-284.
- Bettini, S. (2013). *Arthropod venoms*, Springer Science & Business Media.
- Bhattacharya, P., A. K. Pandey, S. Paul and R. Patnaik (2012). "Neuroprotective potential of Piroxicam in cerebral ischemia: an in silico evaluation of the hypothesis to explore its therapeutic efficacy by inhibition of aquaporin-4 and acid sensing ion channel1a." *Med Hypotheses* **79**(3): 352-357.
- Biardi, J. E. and R. G. Coss (2011). "Rock squirrel (*Spermophilus variegatus*) blood sera affects proteolytic and hemolytic activities of rattlesnake venoms." *Toxicon* **57**(2): 323-331

- Adelman, W. Almers, R. P. Elde and E. W. McCleskey (2010). "Sensing muscle ischemia: coincident detection of acid and ATP via interplay of two ion channels." *Neuron* **68**(4): 739-749.
- Blanchard, M. G., L. D. Rash and S. Kellenberger (2012). "Inhibition of voltage-gated Na(+) currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2." *Br J Pharmacol* **165**(7): 2167-2177.
- Bohlen, C. J., A. T. Chesler, R. Sharif-Naeini, K. F. Medzihradzky, S. Zhou, D. King, E. E. Sanchez, A. L. Burlingame, A. I. Basbaum and D. Julius (2011). "A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain." *Nature* **479**(7373): 410-414.
- Burnett, J. W., P. J. Fenner and J. F. Rifkin (1996). *Venomous and poisonous marine animals: a medical and biological handbook*, UNSW Press.
- Canessa, C. M., A. M. Merillat and B. C. Rossier (1994). "Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells." *Am J Physiol* **267**(6 Pt 1): C1682-1690.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* **389**(6653): 816-824.
- Chai, S., M. Li, D. Branigan, Z. G. Xiong and R. P. Simon (2010). "Activation of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) by surface trafficking." *J Biol Chem* **285**(17): 13002-13011.
- Chen, C. C. and C. W. Wong (2013). "Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels." *Journal of cellular and molecular medicine* **17**(3): 337-349.
- Chen, X. and S. Grunder (2007). "Permeating protons contribute to tachyphylaxis of the acid-sensing ion channel (ASIC) 1a." *J Physiol* **579**(Pt 3): 657-670.
- Chen, X., H. Kalbacher and S. Grunder (2005). "The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity." *J Gen Physiol* **126**(1): 71-79.
- Chen, X., H. Kalbacher and S. Grunder (2006). "Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent." *J Gen Physiol* **127**(3): 267-276.
- Church, J. E. and W. C. Hodgson (2002). "The pharmacological activity of fish venoms." *Toxicon* **40**(8): 1083-1093.
- Cooper, A. M., G. A. Fox, D. R. Nelsen and W. K. Hayes (2014). "Variation in venom yield and protein concentration of the centipedes *Scolopendra polymorpha* and *Scolopendra subspinipes*." *Toxicon* **82**: 30-51.
- Coryell, M. W., A. M. Wunsch, J. M. Haenfler, J. E. Allen, J. L. McBride, B. L. Davidson and J. A. Wemmie (2008). "Restoring Acid-sensing ion channel-1a in the amygdala of knock-out mice rescues fear memory but not unconditioned fear responses." *The journal of Neuroscience* **28**(51): 13738-13741.
- Coryell, M. W., A. M. Wunsch, J. M. Haenfler, J. E. Allen, M. Schnizler, A. E. Ziemann, M. N. Cook, J. P. Dunning, M. P. Price and J. D. Rainier (2009). "Acid-sensing ion channel-1a in the amygdala, a novel therapeutic target in depression-related behavior." *The Journal of neuroscience* **29**(17): 5381-5388.
- Coryell, M. W., A. E. Ziemann, P. J. Westmoreland, J. M. Haenfler, Z. Kurjakovic, X. M. Zha, M. Price, M. K. Schnizler and J. A. Wemmie (2007). "Targeting ASIC1a reduces innate fear and alters neuronal activity in the fear circuit." *Biol Psychiatry* **62**(10): 1140-1148.
- Cox, J. J., F. Reimann, A. K. Nicholas, G. Thornton, E. Roberts, K. Springell, G. Karbani, H. Jafri, J. Mannan, Y. Raashid, L. Al-Gazali, H. Hamamy, E. M. Valente, S. Gorman, R. Williams, D. P. McHale, J. N. Wood, F. M. Gribble and C. G. Woods (2006). "An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain." *Nature* **444**(7121): 894-898.
- Daly, J. W., C. W. Myers, J. E. Warnick and E. X. Albuquerque (1980). "Levels of batrachotoxin and lack of sensitivity to its action in poison-dart frogs (*Phylllobates*)." *Science* **208**(4450): 1383-1385.

- Dawson, R. J., J. Benz, P. Stohler, T. Tetaz, C. Joseph, S. Huber, G. Schmid, D. Hugin, P. Pflimlin, G. Trube, M. G. Rudolph, M. Hennig and A. Ruf (2012). "Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier Psalmotoxin 1." Nat Commun **3**: 936.
- de Graaf, D. C., M. Aerts, E. Danneels and B. Devreese (2009). "Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy." J Proteomics **72**(2): 145-154.
- de Weille, J. and F. Bassilana (2001). "Dependence of the acid-sensitive ion channel, ASIC1a, on extracellular Ca(2+) ions." Brain Res **900**(2): 277-281.
- Deval, E., J. Noel, N. Lay, A. Alloui, S. Diochot, V. Friend, M. Jodar, M. Lazdunski and E. Lingueglia (2008). "ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain." EMBO J **27**(22): 3047-3055.
- Deval, E., M. Salinas, A. Baron, E. Lingueglia and M. Lazdunski (2004). "ASIC2b-dependent regulation of ASIC3, an essential acid-sensing ion channel subunit in sensory neurons via the partner protein PICK-1." J Biol Chem **279**(19): 19531-19539.
- Diochot, S., A. Alloui, P. Rodrigues, M. Dauvois, V. Friend, Y. Aissouni, A. Eschalier, E. Lingueglia and A. Baron (2016). "Analgesic effects of mambalgin peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain." Pain **157**(3): 552-559.
- Diochot, S., A. Baron, L. D. Rash, E. Deval, P. Escoubas, S. Scarzello, M. Salinas and M. Lazdunski (2004). "A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons." EMBO J **23**(7): 1516-1525.
- Diochot, S., A. Baron, M. Salinas, D. Douguet, S. Scarzello, A. S. Dabert-Gay, D. Debayle, V. Friend, A. Alloui, M. Lazdunski and E. Lingueglia (2012). "Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain." Nature **490**(7421): 552-555.
- Du, J., L. R. Reznikov, M. P. Price, X. M. Zha, Y. Lu, T. O. Moninger, J. A. Wemmie and M. J. Welsh (2014). "Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(24): 8961-8966.
- Duan, B., Y. Z. Wang, T. Yang, X. P. Chu, Y. Yu, Y. Huang, H. Cao, J. Hansen, R. P. Simon, M. X. Zhu, Z. G. Xiong and T. L. Xu (2011). "Extracellular spermine exacerbates ischemic neuronal injury through sensitization of ASIC1a channels to extracellular acidosis." J Neurosci **31**(6): 2101-2112.
- Dubinnyi, M. A., D. I. Osmakov, S. G. Koshelev, S. A. Kozlov, Y. A. Andreev, N. A. Zakaryan, I. A. Dyachenko, D. A. Bondarenko, A. S. Arseniev and E. V. Grishin (2012). "Lignan from thyme possesses inhibitory effect on ASIC3 channel current." J Biol Chem **287**(39): 32993-33000.
- Dufton, M. J. (1992). "Venomous mammals." Pharmacol Ther **53**(2): 199-215.
- Dumbacher, J. P., T. F. Spande and J. W. Daly (2000). "Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: a second toxic bird genus (*Ifrita kowaldi*) from New Guinea." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 12970-12975.
- Dutertre, S., A. H. Jin, I. Vetter, B. Hamilton, K. Sunagar, V. Laverigne, V. Dutertre, B. G. Fry, A. Antunes, D. J. Venter, P. F. Alewood and R. J. Lewis (2014). "Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails." Nat Commun **5**: 3521.
- Dutertre, S. and R. J. Lewis (2010). "Use of venom peptides to probe ion channel structure and function." Journal of Biological Chemistry **285**(18): 13315-13320.
- Escoubas, P., J. R. De Weille, A. Lecoq, S. Diochot, R. Waldmann, G. Champigny, D. Moinier, A. Menez and M. Lazdunski (2000). "Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels." J Biol Chem **275**(33): 25116-25121.
- Escoubas, P. and G. F. King (2009). "Venomics as a drug discovery platform." Expert Rev Proteomics **6**(3): 221-224.

Ettaiche, M., N. Guy, P. Hofman, M. Lazdunski and R. Waldmann (2004). "Acid-sensing ion channel 2 is important for retinal function and protects against light-induced retinal degeneration." J Neurosci **24**(5): 1005-1012.

Freeman, S. T. R. (1970). "Maculotoxin, a potent toxin secreted by Octopus maculosus Hoyle." Toxicol Appl Pharmacol **16**(3): 681-690.

Friese, M. A., M. J. Craner, R. Etzensperger, S. Vergo, J. A. Wemmie, M. J. Welsh, A. Vincent and L. Fugger (2007). "Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system." Nat Med **13**(12): 1483-1489.

Fry, B. G., N. R. Casewell, W. Wuster, N. Vidal, B. Young and T. N. Jackson (2012). "The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile venom system." Toxicon **60**(4): 434-448.

Fry, B. G., K. Roelants, D. E. Champagne, H. Scheib, J. D. Tyndall, G. F. King, T. J. Nevalainen, J. A. Norman, R. J. Lewis, R. S. Norton, C. Renjifo and R. C. de la Vega (2009). "The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms." Annu Rev Genomics Hum Genet **10**: 483-511.

Gao, J., L. J. Wu, L. Xu and T. L. Xu (2004). "Properties of the proton-evoked currents and their modulation by Ca²⁺ and Zn²⁺ in the acutely dissociated hippocampus CA1 neurons." Brain Res **1017**(1-2): 197-207.

Garb, J. E. (2014). "Extraction of venom and venom gland microdissections from spiders for proteomic and transcriptomic analyses." J Vis Exp(93): e51618.

Garza, A., O. Lopez-Ramirez, R. Vega and E. Soto (2010). "The aminoglycosides modulate the acid-sensing ionic channel currents in dorsal root ganglion neurons from the rat." J Pharmacol Exp Ther **332**(2): 489-499.

Gnadinger, M., W. Nentwig, J. Fuchs and A. Ceschi (2013). "Swiss prospective study on spider bites." Swiss Med Wkly **143**: w13877.

Gnatzy, W., J. Michels, W. Volkandt, S. Goller and S. Schulz (2015). "Venom and Dufour's glands of the emerald cockroach wasp *Ampulex compressa* (Insecta, Hymenoptera, Sphecidae): structural and biochemical aspects." Arthropod Struct Dev **44**(5): 491-507.

Goehring, A., C. H. Lee, K. H. Wang, J. C. Michel, D. P. Claxton, I. Baconguis, T. Althoff, S. Fischer, K. C. Garcia and E. Gouaux (2014). "Screening and large-scale expression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies." Nat Protoc **9**(11): 2574-2585.

Goldberg, Y. P., J. MacFarlane, M. L. MacDonald, J. Thompson, M. P. Dube, M. Mattice, R. Fraser, C. Young, S. Hossain, T. Pape, B. Payne, C. Radomski, G. Donaldson, E. Ives, J. Cox, H. B. Youngusband, R. Green, A. Duff, E. Boltshauser, G. A. Grinspan, J. H. Dimon, B. G. Sibley, G. Andria, E. Toscano, J. Kerdraon, D. Bowsher, S. N. Pimstone, M. E. Samuels, R. Sherrington and M. R. Hayden (2007). "Loss-of-function mutations in the Nav1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations." Clin Genet **71**(4): 311-319.

Goncalves Paterson Fox, E., D. Russ Solis, L. Delazari Dos Santos, J. R. Aparecido Dos Santos Pinto, A. Ribeiro da Silva Menegasso, R. Cardoso Maciel Costa Silva, M. Sergio Palma, O. Correa Bueno and E. de Alcantara Machado (2013). "A simple, rapid method for the extraction of whole fire ant venom (Insecta: Formicidae: Solenopsis)." Toxicon **65**: 5-8.

Gong, N., M. Zhang, X. B. Zhang, L. Chen, G. C. Sun and T. L. Xu (2008). "The aspirin metabolite salicylate enhances neuronal excitation in rat hippocampal CA1 area through reducing GABAergic inhibition." Neuropharmacology **54**(2): 454-463.

Gonzales, E. B., T. Kawate and E. Gouaux (2009). "Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors." Nature **460**(7255): 599-604.

Green, B. R., G. Bulaj and R. S. Norton (2014). "Structure and function of mu-conotoxins, peptide-based sodium channel blockers with analgesic activity." Future Med Chem **6**(15): 1677-1698.

- Grow, N. B., Wirdateti and K. A. Nekaris (2015). "Does toxic defence in *Nycticebus* spp. relate to ectoparasites? The lethal effects of slow loris venom on arthropods." *Toxicon* **95**: 1-5.
- Grunder, S. and K. Augustinowski (2012). "Toxin binding reveals two open state structures for one acid-sensing ion channel." *Channels (Austin)* **6**(6): 409-413.
- Hawgood, B. J. (1997). "Mauricio Rocha e Silva MD: snake venom, bradykinin and the rise of autopharmacology." *Toxicon* **35**(11): 1569-1580.
- HAYES, W. K. (1995). "Venom metering by juvenile prairie rattlesnakes, *Crotalus v. viridis*: effects of prey size and experience." *Animal Behaviour* **50**(1): 33-40.
- Howard, R. W. and J. E. Baker (2003). "Morphology and chemistry of Dufour glands in four ectoparasitoids: *Cephalonomia tarsalis*, *C. waterstoni* (Hymenoptera: Bethylinidae), *Anisopteromalus calandrae*, and *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae)." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **135**(1): 153-167.
- Hu, R., B. Duan, D. Wang, Y. Yu, W. Li, H. Luo, P. Lu, J. Lin, G. Zhu, Q. Wan and H. Feng (2011). "Role of acid-sensing ion channel 1a in the secondary damage of traumatic spinal cord injury." *Ann Surg* **254**(2): 353-362.
- Huque, T., B. J. Cowart, L. Dankulich-Nagrudny, E. A. Pribitkin, D. L. Bayley, A. I. Spielman, R. S. Feldman, S. A. Mackler and J. G. Brand (2009). "Sour ageusia in two individuals implicates ion channels of the ASIC and PKD families in human sour taste perception at the anterior tongue." *PLoS One* **4**(10): e7347.
- Ievglevskiy, O., D. Isaev, O. Netsyk, A. Romanov, M. Fedoriuk, O. Maximyuk, E. Isaeva, N. Akaike and O. Krishtal (2016). "Acid-sensing ion channels regulate spontaneous inhibitory activity in the hippocampus: possible implications for epilepsy." *Phil. Trans. R. Soc. B* **371**(1700): 20150431.
- Immke, D. C. and E. W. McCleskey (2001). "Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons." *Nat Neurosci* **4**(9): 869-870.
- Immke, D. C. and E. W. McCleskey (2003). "Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca²⁺ blockade." *Neuron* **37**(1): 75-84.
- Inceoglu, B., J. Lango, J. Jing, L. Chen, F. Doymaz, I. N. Pessah and B. D. Hammock (2003). "One scorpion, two venoms: pre venom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 922-927.
- Jared, C., P. L. Mailho-Fontana, M. M. Antoniazzi, V. A. Mendes, K. C. Barbaro, M. T. Rodrigues and E. D. Brodie, Jr. (2015). "Venomous Frogs Use Heads as Weapons." *Curr Biol* **25**(16): 2166-2170.
- Jasti, J., H. Furukawa, E. B. Gonzales and E. Gouaux (2007). "Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH." *Nature* **449**(7160): 316-323.
- Jensen, J. E., B. Cristofori-Armstrong, R. Anangi, K. J. Rosengren, C. H. Lau, M. Mobli, A. Brust, P. F. Alewood, G. F. King and L. D. Rash (2014). "Understanding the molecular basis of toxin promiscuity: the analgesic sea anemone peptide APETx2 interacts with acid-sensing ion channel 3 and hERG channels via overlapping pharmacophores." *J Med Chem* **57**(21): 9195-9203.
- Joeres, N., K. Augustinowski, A. Neuhof, M. Assmann and S. Gründer (2015). "Functional and pharmacological characterization of two different ASIC1a/2a heteromers reveals their sensitivity to the spider toxin PcTx1." *Scientific reports* **6**: 27647-27647.
- Jones, N. G., R. Slater, H. Cadiou, P. McNaughton and S. B. McMahon (2004). "Acid-induced pain and its modulation in humans." *J Neurosci* **24**(48): 10974-10979.
- Jones, R. C., 3rd, E. Otsuka, E. Wagstrom, C. S. Jensen, M. P. Price and G. F. Gebhart (2007). "Short-term sensitization of colon mechanoreceptors is associated with long-term hypersensitivity to colon distention in the mouse." *Gastroenterology* **133**(1): 184-194.

- Kalia, J., M. Milescu, J. Salvatierra, J. Wagner, J. K. Klint, G. F. King, B. M. Olivera and F. Bosmans (2015). "From foe to friend: using animal toxins to investigate ion channel function." *J Mol Biol* **427**(1): 158-175.
- Karczewski, J., R. H. Spencer, V. M. Garsky, A. Liang, M. D. Leidl, M. J. Cato, S. P. Cook, S. Kane and M. O. Urban (2010). "Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2." *Br J Pharmacol* **161**(4): 950-960.
- Kellenberger, S., I. Gautschi and L. Schild (1999). "A single point mutation in the pore region of the epithelial Na⁺ channel changes ion selectivity by modifying molecular sieving." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 4170-4175.
- Kellenberger, S. and L. Schild (2002). "Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure." *Physiol Rev* **82**(3): 735-767.
- Kita, M., Y. Nakamura, Y. Okumura, S. D. Ohdachi, Y. Oba, M. Yoshikuni, H. Kido and D. Uemura (2004). "Blarina toxin, a mammalian lethal venom from the short-tailed shrew *Blarina brevicauda*: Isolation and characterization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20): 7542-7547.
- Klint, J. K., J. J. Smith, I. Vetter, D. B. Rupasinghe, S. Y. Er, S. Senff, V. Herzig, M. Mobli, R. J. Lewis and F. Bosmans (2015). "Seven novel modulators of the analgesic target NaV1.7 uncovered using a high-throughput venom-based discovery approach." *British journal of pharmacology* **172**(10): 2445-2458.
- Kobayashi, T., Y. Sakakibara, A. Masuda, T. Ohdaira and Y. Honda (1996). "Contribution of peripheral chemoreceptor drive in exercise hyperpnea in humans." *Appl Human Sci* **15**(6): 259-266.
- Konno, K., M. Hisada, H. Naoki, Y. Itagaki, T. Yasuhara, M. A. Juliano, L. Juliano, M. S. Palma, T. Yamane and T. Nakajima (2001). "Isolation and sequence determination of peptides in the venom of the spider wasp (*Cyphononyx dorsalis*) guided by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry." *Toxicon* **39**(8): 1257-1260.
- Korenko, S. and S. Pekar (2011). "A parasitoid wasp induces overwintering behaviour in its spider host." *PLoS One* **6**(9): e24628.
- Kozlenkov, A., L. Lapatsina, G. R. Lewin and E. S. Smith (2014). "Subunit-specific inhibition of acid sensing ion channels by stomatin-like protein 1." *J Physiol* **592**(4): 557-569.
- Kreple, C. J., Y. Lu, R. J. Taugher, A. L. Schwager-Gutman, J. Du, M. Stump, Y. Wang, A. Ghobbeh, R. Fan, C. V. Cosme, L. P. Sowers, M. J. Welsh, J. J. Radley, R. T. LaLumiere and J. A. Wemmie (2014). "Acid-sensing ion channels contribute to synaptic transmission and inhibit cocaine-evoked plasticity." *Nat Neurosci* **17**(8): 1083-1091.
- Krishtal, O. A. and V. I. Pidoplichko (1980). "A receptor for protons in the nerve cell membrane." *Neuroscience* **5**(12): 2325-2327.
- Krishtal, O. A. and V. I. Pidoplichko (1981). "Receptor for protons in the membrane of sensory neurons." *Brain Res* **214**(1): 150-154.
- Kweon, H. J. and B. C. Suh (2013). "Acid-sensing ion channels (ASICs): therapeutic targets for neurological diseases and their regulation." *BMB Rep* **46**(6): 295-304.
- Lei, Z., X. Li, G. Wang, J. Fei, T. Meng, X. Zhang, J. Yu and J. Li (2014). "Inhibition of acid-sensing ion channel currents by propofol in rat dorsal root ganglion neurons." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **41**(4): 295-300.
- Leng, T., J. Lin, J. E. Cottrell and Z. G. Xiong (2013). "Subunit and frequency-dependent inhibition of acid sensing ion channels by local anesthetic tetracaine." *Mol Pain* **9**: 27.
- Li, R., L. Zhang, Y. Fang, B. Han, X. Lu, T. Zhou, M. Feng and J. Li (2013). "Proteome and phosphoproteome analysis of honeybee (*Apis mellifera*) venom collected from electrical stimulation and manual extraction of the venom gland." *BMC Genomics* **14**: 766.

- Li, T., Y. Yang and C. M. Canessa (2009). "Interaction of the aromatics Tyr-72/Trp-288 in the interface of the extracellular and transmembrane domains is essential for proton gating of acid-sensing ion channels." *J Biol Chem* **284**(7): 4689-4694.
- Li, W. G., Y. Yu, C. Huang, H. Cao and T. L. Xu (2011). "Nonproton ligand sensing domain is required for paradoxical stimulation of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) channels by amiloride." *J Biol Chem* **286**(49): 42635-42646.
- Li, X., J. Fei, Z. Lei, K. Liu, J. Wu, T. Meng, J. Yu and J. Li (2014). "Chloroquine impairs visual transduction via modulation of acid sensing ion channel 1a." *Toxicol Lett* **228**(3): 200-206.
- Lin, J., X. Chu, S. Maysami, M. Li, H. Si, J. E. Cottrell, R. P. Simon and Z. Xiong (2011). "Inhibition of acid sensing ion channel currents by lidocaine in cultured mouse cortical neurons." *Anesth Analg* **112**(4): 977-981.
- Lingueglia, E., J. R. de Weille, F. Bassilana, C. Heurteaux, H. Sakai, R. Waldmann and M. Lazdunski (1997). "A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells." *J Biol Chem* **272**(47): 29778-29783.
- Lingueglia, E., E. Deval and M. Lazdunski (2006). "FMRFamide-gated sodium channel and ASIC channels: a new class of ionotropic receptors for FMRFamide and related peptides." *Peptides* **27**(5): 1138-1152.
- Liu, Y., D. Li, Z. Wu, J. Li, D. Nie, Y. Xiang and Z. Liu (2012). "A positively charged surface patch is important for hainantoxin-IV binding to voltage-gated sodium channels." *Journal of Peptide Science* **18**(10): 643-649.
- Lopez-Vera, E., M. B. Aguilar and E. P. Heimer de la Cotera (2008). "FMRFamide and related peptides in the phylum mollusca." *Peptides* **29**(2): 310-317.
- Low, D. H., K. Sunagar, E. A. Undheim, S. A. Ali, A. C. Alagon, T. Ruder, T. N. Jackson, S. Pineda Gonzalez, G. F. King, A. Jones, A. Antunes and B. G. Fry (2013). "Dracula's children: molecular evolution of vampire bat venom." *J Proteomics* **89**: 95-111.
- Lu, Y., X. Ma, R. Sabharwal, V. Snitsarev, D. Morgan, K. Rahmouni, H. A. Drummond, C. A. Whiteis, V. Costa, M. Price, C. Benson, M. J. Welsh, M. W. Chapleau and F. M. Abboud (2009). "The ion channel ASIC2 is required for baroreceptor and autonomic control of the circulation." *Neuron* **64**(6): 885-897.
- Lu, Y., C. A. Whiteis, K. A. Sluka, M. W. Chapleau and F. M. Abboud (2013). "Responses of glomus cells to hypoxia and acidosis are uncoupled, reciprocal and linked to ASIC3 expression: selectivity of chemosensory transduction." *J Physiol* **591**(4): 919-932.
- Maertens, C., E. Cuypers, M. Amininasab, A. Jalali, H. Vatanpour and J. Tytgat (2006). "Potent modulation of the voltage-gated sodium channel Nav1.7 by OD1, a toxin from the scorpion *Odonthobuthus doriae*." *Mol Pharmacol* **70**(1): 405-414.
- Malmberg, A. B. and T. L. Yaksh (1995). "Effect of continuous intrathecal infusion of omega-conopeptides, N-type calcium-channel blockers, on behavior and antinociception in the formalin and hot-plate tests in rats." *Pain* **60**(1): 83-90.
- Mamet, J., A. Baron, M. Lazdunski and N. Voilley (2002). "Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels." *J Neurosci* **22**(24): 10662-10670.
- Marchini, B., L. De Nuccio, M. Mazzei and G. L. Mariottini (2004). "A fast centrifuge method for nematocyst isolation from *Pelagia noctiluca* Forskal (Cnidaria: Scyphozoa)." *Riv Biol* **97**(3): 505-515.
- Mazzuca, M., C. Heurteaux, A. Alloui, S. Diochot, A. Baron, N. Voilley, N. Blondeau, P. Escoubas, A. Gelot, A. Cupo, A. Zimmer, A. M. Zimmer, A. Eschalié and M. Lazdunski (2007). "A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms." *Nat Neurosci* **10**(8): 943-945.

- McKemy, D. D., W. M. Neuhauser and D. Julius (2002). "Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation." *Nature* **416**(6876): 52-58.
- Mebs, D. (2001). "Toxicity in animals. Trends in evolution?" *Toxicon* **39**(1): 87-96.
- Morgan, D. L., D. J. Borys, R. Stanford, D. Kjar and W. Tobleman (2007). "Texas coral snake (*Micrurus tener*) bites." *South Med J* **100**(2): 152-156.
- Moshourab, R. A., C. Wetzel, C. Martinez-Salgado and G. R. Lewin (2013). "Stomatin-domain protein interactions with acid-sensing ion channels modulate nociceptor mechanosensitivity." *J Physiol* **591**(22): 5555-5574.
- Nentwig, W., M. Gnadinger, J. Fuchs and A. Ceschi (2013). "A two year study of verified spider bites in Switzerland and a review of the European spider bite literature." *Toxicon* **73**: 104-110.
- Omerbasic, D., L. N. Schuhmacher, Y. A. Bernal Sierra, E. S. Smith and G. R. Lewin (2015). "ASICs and mammalian mechanoreceptor function." *Neuropharmacology* **94**: 80-86.
- Osmakov, D. I., S. A. Kozlov, Y. A. Andreev, S. G. Koshelev, N. P. Sanamyan, K. E. Sanamyan, I. A. Dyachenko, D. A. Bondarenko, A. N. Murashev, K. S. Mineev, A. S. Arseniev and E. V. Grishin (2013). "Sea anemone peptide with uncommon beta-hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity." *J Biol Chem* **288**(32): 23116-23127.
- Osteen, J. D., V. Herzig, J. Gilchrist, J. J. Emrick, C. Zhang, X. Wang, J. Castro, S. Garcia-Caraballo, L. Grundy, G. Y. Rychkov, A. D. Weyer, Z. Dekan, E. A. Undheim, P. Alewood, C. L. Stucky, S. M. Brierley, A. I. Basbaum, F. Bosmans, G. F. King and D. Julius (2016). "Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain." *Nature* **534**(7608): 494-499.
- Oukkache, N., F. Chgoury, M. Lalaoui, A. A. Cano and N. Ghalim (2013). "Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco." *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* **19**(1): 5.
- Page, A. J., S. M. Brierley, C. M. Martin, M. P. Price, E. Symonds, R. Butler, J. A. Wemmie and L. A. Blackshaw (2005). "Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function." *Gut* **54**(10): 1408-1415.
- Palagi, A., J. M. Koh, M. Leblanc, D. Wilson, S. Dutertre, G. F. King, G. M. Nicholson and P. Escoubas (2013). "Unravelling the complex venom landscapes of lethal Australian funnel-web spiders (Hexathelidae: Atracinae) using LC-MALDI-TOF mass spectrometry." *J Proteomics* **80**: 292-310.
- Pappone, P. A. and M. D. Cahalan (1987). "Pandinus imperator scorpion venom blocks voltage-gated potassium channels in nerve fibers." *J Neurosci* **7**(10): 3300-3305.
- Patel, S. and B. R. Meher (2016). "A review on emerging frontiers of house dust mite and cockroach allergy research." *Allergol Immunopathol (Madr)*.
- Paukert, M., E. Babini, M. Pusch and S. Grunder (2004). "Identification of the Ca²⁺ blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating." *J Gen Physiol* **124**(4): 383-394.
- Pawlak, J., S. P. Mackessy, B. G. Fry, M. Bhatia, G. Mourier, C. Fruchart-Gaillard, D. Servent, R. Menez, E. Stura, A. Menez and R. M. Kini (2006). "Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (Mangrove Catsnake) with bird-specific activity." *J Biol Chem* **281**(39): 29030-29041.
- Peigneur, S., L. Béress, C. Möller, F. Marí, W.-G. Forssmann and J. Tytgat (2012). "A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins." *The FASEB Journal* **26**(12): 5141-5151.
- Pope, J. E. and T. R. Deer (2013). "Ziconotide: a clinical update and pharmacologic review." *Expert Opin Pharmacother* **14**(7): 957-966.
- Prabhakar, N. R. and Y. J. Peng (2004). "Peripheral chemoreceptors in health and disease." *J Appl Physiol* (1985) **96**(1): 359-366.

Prashanth, J. R., S. Dutertre, A. H. Jin, V. Lavergne, B. Hamilton, F. C. Cardoso, J. Griffin, D. J. Venter, P. F. Alewood and R. J. Lewis (2016). "The role of defensive ecological interactions in the evolution of conotoxins." *Mol Ecol* **25**(2): 598-615.

Price, M. P., H. Gong, M. G. Parsons, J. R. Kundert, L. R. Reznikov, L. Bernardinelli, K. Chaloner, G. F. Buchanan, J. A. Wemmie, G. B. Richerson, M. D. Cassell and M. J. Welsh (2014). "Localization and behaviors in null mice suggest that ASIC1 and ASIC2 modulate responses to aversive stimuli." *Genes Brain Behav* **13**(2): 179-194.

Price, M. P., S. L. McIlwrath, J. Xie, C. Cheng, J. Qiao, D. E. Tarr, K. A. Sluka, T. J. Brennan, G. R. Lewin and M. J. Welsh (2001). "The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice." *Neuron* **32**(6): 1071-1083.

Qadri, Y. J., Y. Song, C. M. Fuller and D. J. Benos (2010). "Amiloride docking to acid-sensing ion channel-1." *J Biol Chem* **285**(13): 9627-9635.

Qiu, F., T. T. Liu, Z. W. Qu, C. Y. Qiu, Z. Yang and W. P. Hu (2014). "Gastrodin inhibits the activity of acid-sensing ion channels in rat primary sensory neurons." *Eur J Pharmacol* **731**: 50-57.

Qiu, F., C. Y. Qiu, Y. Q. Liu, D. Wu, J. D. Li and W. P. Hu (2012). "Potentiation of acid-sensing ion channel activity by the activation of 5-HT(2) receptors in rat dorsal root ganglion neurons." *Neuropharmacology* **63**(3): 494-500.

Qu, Z. W., T. T. Liu, C. Y. Qiu, J. D. Li and W. P. Hu (2014). "Inhibition of acid-sensing ion channels by chlorogenic acid in rat dorsal root ganglion neurons." *Neurosci Lett* **567**: 35-39.

Rajeshkumar, R. K., R. Vennila, S. Karthikeyan, N. R. Prasad, M. Arumugam, T. Velpandian and T. Balasubramaniam (2015). "Antiproliferative activity of marine stingray *Dasyatis sephen* venom on human cervical carcinoma cell line." *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* **21**: 41.

Rausch, S. M., B. J. Whipp, K. Wasserman and A. Huszczuk (1991). "Role of the carotid bodies in the respiratory compensation for the metabolic acidosis of exercise in humans." *J Physiol* **444**: 567-578.

Rode-Margono, J. E. and K. A. Nekaris (2015). "Cabinet of Curiosities: Venom Systems and Their Ecological Function in Mammals, with a Focus on Primates." *Toxins (Basel)* **7**(7): 2639-2658.

Rossi, G. D., G. Salvador and F. L. Consoli (2014). "The parasitoid, *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), influences food consumption and utilization by larval *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae)." *Arch Insect Biochem Physiol* **87**(2): 85-94.

Rowe, A. H., Y. Xiao, M. P. Rowe, T. R. Cummins and H. H. Zakon (2013). "Voltage-gated sodium channel in grasshopper mice defends against bark scorpion toxin." *Science* **342**(6157): 441-446.

Rungsa, P., P. Incamnoi, S. Sukprasert, N. Uawonggul, S. Klaynongsruang, J. Daduang, R. Patramanon, S. Roytrakul and S. Daduang (2016). "Comparative proteomic analysis of two wasps venom, *Vespa tropica* and *Vespa affinis*." *Toxicon* **119**: 159-167.

Salinas, M., M. Lazdunski and E. Lingueglia (2009). "Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3." *J Biol Chem* **284**(46): 31851-31859.

Salinas, M., L. D. Rash, A. Baron, G. Lambeau, P. Escoubas and M. Lazdunski (2006). "The receptor site of the spider toxin PcTx1 on the proton-gated cation channel ASIC1a." *J Physiol* **570**(Pt 2): 339-354.

Sasa, M. (1999). "Diet and snake venom evolution: can local selection alone explain intraspecific venom variation?" *Toxicon* **37**(2): 249-252; author reply 253-260.

Schroeder, C. I., L. D. Rash, X. Vila-Farres, K. J. Rosengren, M. Mobli, G. F. King, P. F. Alewood, D. J. Craik and T. Durek (2014). "Chemical synthesis, 3D structure, and ASIC binding site of the toxin mambalgin-2." *Angew Chem Int Ed Engl* **53**(4): 1017-1020.

- Sherwood, T., R. Franke, S. Conneely, J. Joyner, P. Arumugan and C. Askwith (2009). "Identification of protein domains that control proton and calcium sensitivity of ASIC1a." *J Biol Chem* **284**(41): 27899-27907.
- Sherwood, T. W. and C. C. Askwith (2009). "Dynorphin opioid peptides enhance acid-sensing ion channel 1a activity and acidosis-induced neuronal death." *J Neurosci* **29**(45): 14371-14380.
- Sherwood, T. W., K. G. Lee, M. G. Gormley and C. C. Askwith (2011). "Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death." *J Neurosci* **31**(26): 9723-9734.
- Sluka, K. A., O. C. Winter and J. A. Wemmie (2009). "Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases." *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**(5): 693-704.
- Smith, E. S., H. Cadiou and P. A. McNaughton (2007). "Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action." *Neuroscience* **145**(2): 686-698.
- Smith, L. M. and L. A. Burgoyne (2004). "Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper." *BMC Ecol* **4**: 4.
- Sokolov, S., R. L. Kraus, T. Scheuer and W. A. Catterall (2008). "Inhibition of sodium channel gating by trapping the domain II voltage sensor with protoxin II." *Mol Pharmacol* **73**(3): 1020-1028.
- Stabili, L., R. Schirosi, M. G. Parisi, S. Piraino and M. Cammarata (2015). "The Mucus of *Actinia equina* (Anthozoa, Cnidaria): An Unexplored Resource for Potential Applicative Purposes." *Mar Drugs* **13**(8): 5276-5296.
- Sun, X., Y. B. Cao, L. F. Hu, Y. P. Yang, J. Li, F. Wang and C. F. Liu (2011). "ASICs mediate the modulatory effect by paeoniflorin on alpha-synuclein autophagic degradation." *Brain Res* **1396**: 77-87.
- Sun, X., J. Jin, J. G. Zhang, L. Qi, F. K. Braun, X. D. Zhang and F. Xu (2014). "Expression of acid-sensing ion channels in nucleus pulposus cells of the human intervertebral disk is regulated by non-steroid anti-inflammatory drugs." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **46**(9): 774-781.
- Uetz, P. (2010). "The original descriptions of reptiles." *Zootaxa* **2334**: 59-68.
- Ugawa, S., T. Ueda, Y. Ishida, M. Nishigaki, Y. Shibata and S. Shimada (2002). "Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors." *J Clin Invest* **110**(8): 1185-1190.
- Voilley, N. (2004). "Acid-sensing ion channels (ASICs): new targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs)." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **3**(1): 71-79.
- Voilley, N., J. de Weille, J. Mamet and M. Lazdunski (2001). "Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors." *J Neurosci* **21**(20): 8026-8033.
- von Reumont, B. M., A. Blanke, S. Richter, F. Alvarez, C. Bleidorn and R. A. Jenner (2014). "The first venomous crustacean revealed by transcriptomics and functional morphology: remipede venom glands express a unique toxin cocktail dominated by enzymes and a neurotoxin." *Mol Biol Evol* **31**(1): 48-58.
- Waldmann, R., F. Bassilana, J. de Weille, G. Champigny, C. Heurteaux and M. Lazdunski (1997). "Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons." *J Biol Chem* **272**(34): 20975-20978.
- Waldmann, R., G. Champigny, F. Bassilana, C. Heurteaux and M. Lazdunski (1997). "A proton-gated cation channel involved in acid-sensing." *Nature* **386**(6621): 173-177.
- Waldmann, R., G. Champigny, F. Bassilana, N. Voilley and M. Lazdunski (1995). "Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na⁺ channel." *J Biol Chem* **270**(46): 27411-27414.

- Wang, W., B. Duan, H. Xu, L. Xu and T. L. Xu (2006). "Calcium-permeable acid-sensing ion channel is a molecular target of the neurotoxic metal ion lead." *J Biol Chem* **281**(5): 2497-2505.
- Wang, W., Y. Yu and T. L. Xu (2007). "Modulation of acid-sensing ion channels by Cu(2+) in cultured hypothalamic neurons of the rat." *Neuroscience* **145**(2): 631-641.
- Wang, W. Z., X. P. Chu, M. H. Li, J. Seeds, R. P. Simon and Z. G. Xiong (2006). "Modulation of acid-sensing ion channel currents, acid-induced increase of intracellular Ca²⁺, and acidosis-mediated neuronal injury by intracellular pH." *J Biol Chem* **281**(39): 29369-29378.
- Whittington, C. M., J. M. Koh, W. C. Warren, A. T. Papenfuss, A. M. Torres, P. W. Kuchel and K. Belov (2009). "Understanding and utilising mammalian venom via a platypus venom transcriptome." *J Proteomics* **72**(2): 155-164.
- Wu, P. Y., Y. Y. Huang, C. C. Chen, T. T. Hsu, Y. C. Lin, J. Y. Weng, T. C. Chien, I. H. Cheng and C. C. Lien (2013). "Acid-sensing ion channel-1a is not required for normal hippocampal LTP and spatial memory." *J Neurosci* **33**(5): 1828-1832.
- Xiong, Z.-G., G. Pignataro, M. Li, S.-y. Chang and R. P. Simon (2008). "Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases." *Current opinion in pharmacology* **8**(1): 25-32.
- Xiong, Z., Y. Liu, L. Hu, B. Ma, Y. Ai and C. Xiong (2013). "A rapid facilitation of acid-sensing ion channels current by corticosterone in cultured hippocampal neurons." *Neurochem Res* **38**(7): 1446-1453.
- Xu, T. L. and Z. G. Xiong (2007). "Dynamic regulation of acid-sensing ion channels by extracellular and intracellular modulators." *Curr Med Chem* **14**(16): 1753-1763.
- Yagi, J., H. N. Wenk, L. A. Naves and E. W. McCleskey (2006). "Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia." *Circ Res* **99**(5): 501-509.
- Yan, J., R. M. Edelmayer, X. Wei, M. De Felice, F. Porreca and G. Dussor (2011). "Dural afferents express acid-sensing ion channels: a role for decreased meningeal pH in migraine headache." *Pain* **152**(1): 106-113.
- Yang, H., Y. Yu, W. G. Li, F. Yu, H. Cao, T. L. Xu and H. Jiang (2009). "Inherent dynamics of the acid-sensing ion channel 1 correlates with the gating mechanism." *PLoS Biol* **7**(7): e1000151.
- Yang, L. and L. G. Palmer (2014). "Ion conduction and selectivity in acid-sensing ion channel 1." *J Gen Physiol* **144**(3): 245-255.
- Yin, T., T. E. Lindley, G. W. Albert, R. Ahmed, P. B. Schmeiser, M. S. Grady, M. A. Howard and M. J. Welsh (2013). "Loss of Acid sensing ion channel-1a and bicarbonate administration attenuate the severity of traumatic brain injury." *PLoS One* **8**(8): e72379.
- Yu, Y., Z. Chen, W. G. Li, H. Cao, E. G. Feng, F. Yu, H. Liu, H. Jiang and T. L. Xu (2010). "A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel." *Neuron* **68**(1): 61-72.
- Yuan, L. P., Y. Bo, G. Ming and Q. L. Zhou (2012). "Expression of acid-sensing ion channels of gastric mucosa from patients with Henoch-Schonlein purpura." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **54**(4): 561-563.
- Zhang, P., F. J. Sigworth and C. M. Canessa (2006). "Gating of acid-sensitive ion channel-1: release of Ca²⁺ block vs. allosteric mechanism." *The Journal of general physiology* **127**(2): 109-117.
- Ziegman, R. and P. Alewood (2015). "Bioactive components in fish venoms." *Toxins (Basel)* **7**(5): 1497-1531.
- Ziemann, A. E., M. K. Schnizler, G. W. Albert, M. A. Severson, M. A. Howard, 3rd, M. J. Welsh and J. A. Wemmie (2008). "Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a." *Nat Neurosci* **11**(7): 816-822.

Etude de la régulation pharmacologique des canaux ioniques ASIC par des toxines animales

Les ASIC ou « Acid Sensing Ion Channel » sont des canaux cationiques activés par une acidification extracellulaire et sont largement exprimés dans le système nerveux central et périphérique. Ils sont impliqués dans un nombre croissant de fonctions physiologiques ou pathologiques, telles que la transmission synaptique, la plasticité synaptique, l'apprentissage, la mémoire, la peur, la dépression, l'épilepsie et la dégénérescence neuronale, ainsi que la nociception et la mécanosensibilité. Ces canaux représentent donc des cibles thérapeutiques d'intérêt dans le traitement de la douleur ou de troubles neurologiques.

On dénombre actuellement six sous-unités ASIC différentes s'associant en homo- ou en hétéro-trimères pour former un canal, néanmoins la fonction physiologique et la pharmacologie de chacune des isoformes ne sont pas encore toutes connues.

Les toxines animales ont la capacité de perturber le fonctionnement normal des canaux ioniques et sont utilisées depuis de nombreuses années pour étudier aussi bien leurs fonctions biologiques que leurs structures ou encore leurs mécanismes de régulation. De plus, certains médicaments ont été élaborés à partir de toxines issues de venins et sont utilisés dans le traitement de pathologies aussi diverses que le diabète, la douleur chronique ou l'hypertension.

Plusieurs toxines provenant de venins de serpents mais également d'araignées ou d'anémones de mer ont montré leur efficacité dans l'inhibition ou l'activation de ces canaux. Une toxine de venin de mamba noir, la mambalgine, découverte au laboratoire en 2012 possède la capacité d'inhiber spécifiquement les canaux contenant l'iso-forme ASIC1a. Cependant, son site de liaison et son mécanisme d'action restaient encore inconnus.

Mon travail de thèse s'est donc orienté vers deux axes. D'une part, la mise en place de nouvelles stratégies de collectes de venin provenant de différents organismes afin de pouvoir identifier de nouvelles molécules spécifiques des canaux ASIC. Pour cela, j'ai conçu un extracteur de venin électronique qui pourra nous permettre de collecter des venins qui ne sont pas commercialisés. D'autre part, je me suis intéressé à l'identification du site de liaison de la mambalgine sur ASIC1a et à la description de son mécanisme d'action. Mon travail a permis l'identification des résidus clefs de la mambalgine nécessaires à sa liaison, ce qui a permis d'affiner notre modèle d'interaction de la toxine sur ASIC1a. En se basant sur une nouvelle approche pharmacologique tirant partie des mécanismes d'action des toxines et des petites molécules nous avons pu établir un modèle plus global du mécanisme de régulation du canal par les protons.

Ce travail ouvre des perspectives pour le développement de formes optimisées de la mambalgine et apporte de nouvelles informations sur les mécanismes d'activation et d'inactivation des canaux ASIC par les protons.

Mots clefs : Acid-Sensing Ion Channel (ASIC), canaux ioniques, structure/fonction, venins, toxines, mambalgine, pharmacologie, électrophysiologie.