



Etude mécanistique des récepteurs P2X par l'utilisation de molécules photoisomérisables

Juline Beudez

► To cite this version:

Juline Beudez. Etude mécanistique des récepteurs P2X par l'utilisation de molécules photoisomérisables. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ084 . tel-02357343

HAL Id: tel-02357343

<https://theses.hal.science/tel-02357343>

Submitted on 10 Nov 2019

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

**UMR7199 – Laboratoire de Conception et Application
de Molécules Bioactives**

THÈSE présentée par :

Juline BEUDEZ

soutenue le : **9 novembre 2018**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurobiologie structurale et moléculaire**

**Etude mécanistique des récepteurs P2X
par l'utilisation de molécules
photoisomérisables**

THÈSE dirigée par :

Dr GRUTTER Thomas

Directeur de Recherche CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr ULMANN Lauriane

Dr CORRINGER Pierre-Jean

MCF, Institut de Génétique Fonctionnelle, Montpellier
Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr SCHLICHTER Rémy

Professeur, Université de Strasbourg



Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (UMR7199) dans l'équipe de Chimie et Neurobiologie Moléculaire, sous la direction du docteur Thomas Grutter.

Il a été financé par une bourse doctorale accordée par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE11-0004-01)



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury pour l'intérêt porté à mes travaux : le professeur Rémy Schlichter qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse, ainsi que les docteurs Lauriane Ulmann et Pierre-Jean Corringer qui ont accepté de juger ce manuscrit en tant que rapporteurs.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, le docteur Thomas Grutter. Merci de m'avoir accueillie dans ton labo en tant que stagiaire et de m'avoir convaincue de faire cette thèse, que ce soit par le sujet, par les techniques utilisées et par l'ambiance générale du labo. Merci sincèrement pour ta disponibilité quotidienne, ton soutien, ta confiance et tes mots d'encouragements quand la science m'a fait douter. Ton optimisme sans faille a été une réelle source de motivation et ton encadrement pendant cette thèse a vraiment été l'idéal pour moi.

Un énorme merci aux autres permanant du labo : Alex pour ta gentillesse et tes remarques pertinentes lors des réunions de labo ; Thierry pour tes blagues (pas toujours drôles) et ton intérêt pour ce travail, merci pour ton aide lors des manips de fluo ; Fred pour tes sifflements de bon matin et tes manips étranges sur la bioluminescence.

Un énorme merci aux docteurs Chloé et Mahboubi qui ont eu la patience de m'apprendre le patch, et à Adeline pour la rapide transmission des techniques de biochimie. Merci à mes stagiaires : Marie, Jérémy, Kays, et Wassima (mention spéciale pour tes nombreuses pâtisseries), et aux autres stagiaires qui ont été de passage au labo. Bon courage aux deux stagiaires Benoit et Clément devenus doctorants, leur grande maturité ont animé le labo pendant ces derniers mois de manips ! Merci aux autres doctorantes du couloir, Sri et Lucie, pour leur joie communicative en toutes circonstances et leurs potins et merci « au labo du fond », Boris et Mickael pour votre bonne humeur au quotidien.

Merci à toi Elie, pour tes « salut les filles » le matin, tes musiques libanaises sur lesquelles tu donnes de la voix, ton houmous, le café du matin dans mon bureau, pour l'organisation de la mémorable soirée crêpes, pour avoir partagé en même temps que moi les étapes de la thèse et ce moment difficile de la rédaction. Je te souhaite sincèrement le meilleur pour la suite.

Merci à toi Kate ou plutôt non, tu m'as pourri m'a playlist YouTube avec tes goûts musicaux spéciaux ! Tu as été bien plus qu'une simple collègue. Merci pour ton soutien, tes conseils parfois, nos discussions, et nos « petits dej' d'urgence ». Tes efforts considérables pour nous convaincre de venir à tes évènements, et tes portes lunettes en perles font de toi une personne unique.

Merci à toi Laurie, pour tout. Ton goût pour le travail bien fait qu'on partage a fait de nous un binôme de choc en patch qui a vite débouché sur une très belle amitié. Merci pour tout ce qu'on a partagé depuis : nos spectacles d'improvisations, nos duos au karaoké, les soirées jusqu'au petit matin, nos moments commérages et tant d'autres. Un énorme et sincère merci pour tout le soutien que tu m'as apporté durant ces trois ans, dans ma vie au labo comme personnelle.

Merci à toi Seb, le squatteur chimiste de la salle de culture cellulaire. Merci pour tes conseils et ta vision de la vie, tes certitudes, tes trolls, tes légendaires montages, mais surtout ta gentillesse et ta bienveillance.

Vous êtes tous les trois la plus belle rencontre du labo, qui s'est très vite étendue en dehors, que ce soit par nos sorties ou nos inoubliables voyages.

Merci à tous mes amis de « l'extérieur » qui de près ou de loin m'ont soutenu durant cette période. En particulier Mike, merci pour nos soirées série/pizzas (presque) hebdomadaires qui réconfortent, pour tout ce qu'on partage depuis le master, notre road trip en Italie, et tous les autres bons moments ; Jérémy pour ta maladresse exceptionnelle, mais surtout pour tes visites à Strasbourg, nos apéros-Skype et tes snaps qui font que, malgré ton exil dans le nord, tu es quand même là. Un énorme merci à mes deux véritables amies Eugénie et Soline : nos retrouvailles aux quatre coins de la France et de l'Europe ont, à chaque fois, été une grande source de bonne humeur, votre présence sans faille dans les bons et mauvais moments et surtout nos fous rires ont été d'un véritable soutien.

Enfin, un merci tout particulier à ma famille qui ont fait de chaque weekend passé dans les Vosges une véritable bouffée d'air frais. Je tiens à remercier de tout cœur mes parents pour leur soutien dans chaque décision de ma vie et de m'avoir inculqué de vraies valeurs qui m'ont permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui. Merci également à mon frère et ma sœur qui font de cette famille un vrai pilier.

Table des matières

ABREVIATIONS	5
TABLES DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	9
INTRODUCTION GENERALE	13
1. PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DU SYSTEME NERVEUX.....	13
1.1 TRANSPORT PASSIF A TRAVERS LA MEMBRANE	14
1.2 TRANSPORT ACTIF	15
1.3 PROPRIETES BIOPHYSIQUES DES MEMBRANES.....	16
2. TECHNIQUES D'ENREGISTREMENT.....	19
3. LES CANAUX IONIQUES	22
4. LES RECEPTEURS CANAUX (LGICS)	24
4.1 LES RECEPTEURS PENTAMERIQUES	26
4.2 LES RECEPTEURS TETRAMERIQUES	27
4.3 LES RECEPTEURS TRIMERIQUES	28
5. LES RECEPTEURS P2X.....	28
5.1 ROLES PHYSIO-PATHOLOGIQUES DES RECEPTEURS P2X	29
5.2 EXEMPLE DETAILLE DE L'IMPLICATION DES RECEPTEURS P2X DANS L'AUDITION	34
5.3 PHARMACOLOGIE DES RECEPTEURS P2X.....	41
5.4 DESCRIPTION STRUCTURALE DES RECEPTEURS P2X.....	55
5.5 DYNAMIQUES DES MOUVEMENTS DURANT LE CYCLE D'ACTIVATION	63
5.6 CARACTERISTIQUE DES DIFFERENTS ETATS ALLOSTERIQUES.....	66
6. ETUDE DES RECEPTEURS P2X PAR L'UTILISATION DE MOLECULES PHOTOISOMERISABLES	74
6.1 CONCEPTION D'OUTILS PHOTOISOMERISABLES POUR L'APPLICATION BIOLOGIQUE.....	74

6.2 APPLICATIONS DES DERIVES AZOBENZENES SUR LES RECEPTEURS P2X.....	80
<u>OBJECTIFS DE LA THESE</u>	<u>89</u>
<u>CHAPITRE 1 : ETUDE DU MECANISME DE DESENSIBILISATION DES RECEPTEURS P2X.....</u>	<u>91</u>
<u>1. CONTEXTE</u>	<u>91</u>
<u>2. STRATEGIE.....</u>	<u>92</u>
<u>3. MATERIEL ET METHODES.....</u>	<u>92</u>
<u>4. RESULTATS</u>	<u>96</u>
4.1 ETUDE DES OUTILS MEA-TMA ET MAM	96
4.2 INFLUENCE DE LA TAILLE DU MAM SUR LA DESENSIBILISATION	98
4.3 INCUBATION SEQUENTIELLE DE MAM PUIS DE MEA-TMA	99
4.4 INCUBATION SEQUENTIELLE DU MAM PUIS DE MTS.....	102
4.5 ETUDE DU POSITIONNEMENT DU MEA-TMA	104
4.6 EXPLORATION DE LA PARTIE CYTOPLASMIQUE DANS LA DESENSIBILISATION	111
<u>5. DISCUSSION</u>	<u>115</u>
<u>CHAPITRE 2 : ETUDES BIOPHYSIQUES DE DEUX MUTANTS P2X2 HUMAIN RESPONSABLES D'UNE FORME DE SURDITE.....</u>	<u>119</u>
<u>1. CONTEXTE</u>	<u>119</u>
<u>2. STRATEGIE.....</u>	<u>120</u>
<u>3. MATERIEL ET METHODES.....</u>	<u>120</u>
<u>4. RESULTAT.....</u>	<u>124</u>
4.1 ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE DES DEUX MUTATIONS V60L ET G353R	124
4.2 EXPRESSION DE SURFACE	126

4.3 UTILISATION DE LA MOLECULE PHOTOISOMERISABLE MAM	128
4.4 ETUDES DU MUTANT G353R	132
4.5 ETUDE D'UN POSSIBLE LIEN DYNAMIQUE ENTRE LES CANAUX KIR4.1 ET HP2X2.....	146

5. DISCUSSION	153
----------------------------	------------

ARTICLE 1 P2X2 DOMINANT DEAFNESS MUTATIONS HAVE NO NEGATIVE EFFECT ON WILD-TYPE ISOFORM: IMPLICATIONS FOR FUNCTIONAL RESCUE AND IN DEAFNESS MECHANISM	157
---	-----

ARTICLE 2 PHOTOSWITCHABLE TWEEZERS REVEAL MOLECULAR DYSFUNCTIONS OF HEARING LOSS-RELATED MUTATION IN HUMAN ATP-GATED P2X2 ION CHANNELS.....	157
---	-----

CHAPITRE 3 : ETUDE DE LA CONDUCTANCE UNITAIRE DU NMDG⁺	159
--	------------

PARTIE I : MESURE DE LA CONDUCTANCE UNITAIRE DU NMDG⁺ (AVEC LE DR. LAURIE PEVERINI). 159
--

1. CONTEXTE	159
--------------------------	------------

2. STRATEGIE.....	160
--------------------------	------------

3. MATERIEL ET METHODES.....	161
-------------------------------------	------------

4. RESULTATS	162
---------------------------	------------

5. DISCUSSION	164
----------------------------	------------

ARTICLE 3 ON THE PERMEATION OF LARGE ORGANIC CATIONS THROUGH THE PORE OF ATP-GATED P2X RECEPTORS	165
--	-----

REVUE 1 NEW INSIGHTS INTO PERMEATION OF LARGE CATIONS THROUGH ATP-GATED P2X RECEPTORS.....	165
--	-----

PARTIE II : INFLUENCE DE LA MODIFICATION POTENTIELLE DU PORE IONIQUE SUR LA CONDUCTANCE DU NMDG⁺ (AVEC LE DR. LAURIE PEVERINI)	168
--	------------

1. CONTEXTE	168
--------------------------	------------

2. MATERIEL ET METHODES.....	168
-------------------------------------	------------

<u>3.</u>	<u>RESULTATS</u>	<u>169</u>
<u>4.</u>	<u>DISCUSSION</u>	<u>174</u>
	<u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	<u>176</u>
	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>178</u>

ABREVIATIONS

4-GluAzo	dérivé glutamate-azobenzène
5HT3	récepteur ionotrope activé par la sérotonine
2meSATP	2-(méthylthio)adenosine 5'-triphosphate
AAQ	<i>N,N,N</i> -Triethyl-2-oxo-2-[[4-[2-[4-[(1-oxo-2-propen-1-yl)amino]phenyl]diazenyl]phenylamino]ethanaminium
ADP	adenosine 5'-diphosphate
Amp	ampicilline
AMPA	acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
ATP	adenosine 5'-triphosphate
ATP _γ S	adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)
BIS-Q	dibromure de 3,3'-bis(α-(triméthylammonium)méthyl)azobenzène
BMA	bis-maleimide-azobenzène
Bz-ATP	2',3'-O-(4-benzoyl-benzoyl)-adenosine-5'-triphosphate
D	Debye
DFMO	difluorométhylornithine
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTT	dithiothréitol
EC ₅₀	concentration médiane efficace
Elic	<i>Erwinia</i> ligand-gated ion channel
GABA	acide γ-aminobutyrique
GFP	green fluorescent protein
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz
GLIC	bacterial (<i>Gloeobacter</i>) Ligand-gated Ion Channel

GluCl	canal chlore active par le glutamate		
GlyR	récepteur de la glycine		
HEK	human embryonic kidney		
iGluR	récepteur ionotrope du glutamate		
LGIC	ligand gated ion channel (récepteur canal)		
MAACh	maleimide-azobenzène-acétylcholine		
MAG	maleimide-azobenzène-glutamate		
MAHoCh	maleimide-azobenzène-homocholine		
MAM	maleimide-azobenzène-maléimide		
MAQ	maleimide-azobenzène-ammonium quaternaire		
MEA-TMA	maléimide éthylène azobenzène triméthylammonium		
MPC088	(E)-N-(2-Aminoéthyl)-4-((4-((4-(4-hydroxy-3,5-diisopropylphényl)butanamido)méthyl)phényl)diazényle)benzamide		
MRS2159	pyridoxal-5-phosphate-6-azophényl-4'-carboxylate		
MRS2220	acide cyclique pyridoxine-α ^{4,5} -monophosphate-6-azophényl-2',5'-disulfonique		
MRS2257	pyridoxal-5'-phosphonate bisméthylène phosphonate	6-azophényl	3',5'-
MTS	méthanethiosulfonate		
MTS-BE	tert-butyl- méthanethiosulfonate		
MTS-E	éthyl méthanethiosulfonate		
MTSEA	hydrobromure de 2-aminoéthyl méthanethiosulfonate		
MTSET	bromure de 2-(triméthylammonium)éthyl méthanethiosulfonate		
MSTP	propyl méthanethiosulfonate		
MTS-PT	3-(Triméthylammonium)propyl methanethiosulfonate		
nAChR	récepteur nicotinique à l'acétylcholine		

NF023	acide 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phénylène carbonylimino)bis-1,3,5-napththalène trisulfonique
NF279	acide 8,8'-(carbonylbis(imino-4,1-phenylenecarbonylimino-4,1-phénylène carbonylimino)) bis-1,3,5-napththalènetrisulfonique
NF449	acide 8,8'-(Carbonylbis(imino-5,1,3-benzènetriylbis(carbonylimino)))tetrakis-benzène-1,3-disulphonique
NF770	acide 7,7'-(carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylene)carbonylimino))bis-1-methoxy-naphthalene-3,6-disulfonique
NF864	8,8',8'',8'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis(carbonylimino)))tetrakis-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid-dodecasodium
NMDA	acide N-methyl-D-aspartique
NMDG	N-methyl-D-glucamine
ODC	ornithine décarboxylase
P2X	récepteur ionotrope purinergique de type 2
P2Y	récepteur métabotrope purinergique de type 2
PCL	ligand photochromique
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PIP _n	phosphoinositide
PPADS	acide pyridoxal-5-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonique
PSB1011	disodium 1-amino-4-[3-(4,6-dichloro[1,3,5]triazine-2-ylamino)-4-sulfophenylamino]-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2-sulfonate
PSB10211	sodium 1-amino-4-[3-(4,6-dichloro[1,3,5]triazine-2-ylamino)phenylamino]-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2-sulfonate
PTL	photoswitched tethered ligand
QAQ	ammonium quaternaire-azobenzene-ammonium quaternaire
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SPARK	synthetic photoisomerisable azobenzene-regulated K ⁺ channel
SPD	spermidine
TM	segment transmembranaire
TNP-ATP	2',3'-O-(2,4,6-trinitrophényl) adenosine 5'-triphosphate
TRIS	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
UV	ultra violet
Vis	visible
YO-PRO1	Diiodure de 4-[(3-méthyl-1,3-benzoxazol-2(3H)-ylidène)méthyl]-1-[3-(triméthyl ammonio)propyl]quinoléinium
ZAC	canal activé par le zinc
α,βmeATP	α,β-méthylène adénosine 5'-triphosphate
β,γmeATP	β,γ-méthylène adénosine 5'-triphosphate

Tables des figures et des tableaux

Figure 1 Schéma des deux types de transports passifs.	15
Figure 2 Schéma électrique d'une cellule.	17
Figure 3 Premiers enregistrements en configuration canal ionique	20
Figure 4 Représentation des différentes configurations d'enregistrements patch-clamp	21
Figure 5 Représentation schématique des trois familles de canaux ioniques	25
Figure 6 Schématisation de la signalisation purinergique des récepteurs P2X et P2Y.	29
Figure 7 Coupe vertico-transversale de l'appareil auditif.	34
Figure 8 Organisation de la cochlée.	35
Figure 9 Cycle de dépolarisation-repolarisation de la cellule ciliée.	38
Figure 10 Influence de l'ATP sur le potentiel endocochléaire.	40
Figure 11 Cycle d'ouverture des récepteurs P2X.	42
Figure 12 Profils de désensibilisation des différents homomères de P2X.	43
Figure 13 Structures chimiques de quelques agonistes de P2X dérivés d'ATP.	48
Figure 14 Structures chimiques de quelques antagonistes des récepteurs P2X.	50
Figure 15 Structures globales des récepteurs P2X.	56
Figure 16 Schéma réactionnel entre une cystéine et un dérivé MTS	58
Figure 17 Site de fixation de l'ATP.	59
Figure 18 Crevasses transmembranaires en fonction des différents modèles.	61
Figure 19 Passage de l'état fermé à l'état ouvert.	63
Figure 20 Structure de l'état désensibilisé.	65
Figure 21 Représentation schématique du cycle d'activation des récepteurs P2X.	67
Figure 22 Représentation schématique des domaines nécessaires à la modulation de la désensibilisation de chimères P2X1 et P2X2.	69
Figure 23 Caractérisation de l'état dilaté.	72
Figure 24 Incorporation de YO-Pro-1 au travers de P2X2.	73
Figure 25 Structures chimiques des principaux groupements structurellement modifiables par la lumière	75
Figure 26 Isomérisation de l'azobenzène.	76
Figure 27 Illustration des mécanismes de rotation et d'inversion des azobenzènes.	77
Figure 28 Photocontrôle des récepteurs de l'acétylcholine par le Bis-Q.	79
Figure 29 Photocontrôle des canaux SPARK par le MAQ.	80
Figure 30 Réaction entre une cystéine et le maléimide du MEA-TMA.	81
Figure 31 Action du MEA-TMA sur le récepteur P2X2-3T	82
Figure 32 Bistabilité des courants induits par le MEA-TMA.	83
Figure 33 Optoblock par le MEA-TMA sur I328C	83
Figure 34 Fonctionnement du MAM.	84
Figure 35 Profil de la photorégulation de I328C/S345C et schéma fonctionnel.	85

Figure 36 Structures chimiques de quelques MAM	87
Figure 37 Caractérisation de la désensibilisation du MAM et du MEA-TMA.	97
Figure 38 Utilisation de MAMs de taille croissante.	99
Figure 39 Incubation séquentielle de MAM et de MEA-TMA.	100
Figure 40 Variabilité de marquage.	101
Figure 41 Addition des courants induits par le MAM et le MEA-TMA.	102
Figure 42 Effet des MTS sur la désensibilisation induite par le MAM.	103
Figure 43 Schéma et nomenclature des différents concatémères.	105
Figure 44 Etude de l'optogating.	106
Figure 45 Etude de l'optoblock.	107
Figure 46 Mutations tryptophanes dans les crevasses transmembranaires.	109
Figure 47 Influence de la tyrosine sur l'action du MEA-TMA.	110
Figure 48 Schéma structural de la nouvelle structure cristallographique du récepteur hP2X3	111
Figure 49 Position des différents couples de cystéines.	112
Figure 50 Expression de surface des 18 mutants cystéines	113
Figure 51 Etude de la formation de pont disulfure dans le domaine intracellulaire.	114
Figure 52 Etude électrophysiologique des mutants V60L et G353R.	125
Figure 53 Etude électrophysiologique des co-transfections.	126
Figure 54 Expression de surface des récepteurs hP2X2, V60L et G353R.	127
Figure 55 Ouverture par la lumière des récepteurs humains P2X2.	129
Figure 56 Mise en évidence du marquage des récepteurs P2X par le MAM	131
Figure 57 Étude des différences de courants en ATP et en lumière pour hP2X2 et G353R.	132
Figure 58 Perméabilités relatives de petits ions.	134
Figure 59 Mesure de la perméabilité relative de la spermidine par la lumière.	137
Figure 60 Mesure de la perméabilité relatives de la spermidine des hétéromères hP2X2 : G353R.	139
Figure 61 Rectification des courants.	141
Figure 62 Etude de l'incorporation du YO-Pro-1 et de l'effet de la mutation G353R.	143
Figure 63 Incorporation de YO-Pro-1 sur V60L.	144
Figure 64 Modélisation du pore ionique.	145
Figure 65 Hypothèse d'un lien dynamique entre Kir4.1 et hP2X2.	147
Figure 66 Traces électrophysiologiques des canaux Kir4.1	148
Figure 67 Inhibition partielle des Kir4.1 par la spermidine.	149
Figure 68 Évolution au cours du temps des courants portés par Kir4.	150
Figure 69 Étude d'un lien dynamique par l'utilisation du patch perforé.	152
Figure 70 Cinétique d'ouverture en condition outside-out multi canaux sur rP2X2-3T.	160
Figure 71 Mesure de la conductance unitaire de NMDG+	162
Figure 72 Influence de la concentration d'ATP sur la conductance unitaire de rP2X2-3T.	163
Figure 73 Influence de la mutation T339A.	170

<i>Figure 74 Influence des acides aminés en position 339 sur la conductance unitaire du canal.</i>	<i>171</i>
<i>Figure 75 Enregistrement préliminaire en canal unitaire de T339A en conditions symétriques SPD³⁺</i>	<i>172</i>
<i>Figure 76 Alignement de séquence de la partie TM2.....</i>	<i>172</i>
<i>Figure 77 Etude de la conductivité unitaire de rP2X4 et hP2X2.....</i>	<i>173</i>
<i>Figure 78 Etude de la conductivité unitaire de rP2X4 et hP2X2.....</i>	<i>173</i>
 <i>Tableau 1 Résumé des propriétés pharmacologiques des récepteurs P2X.</i>	 <i>53</i>
<i>Tableau 2 Composition des solutions extracellulaires utilisées pour les mesures de perméabilités.</i>	<i>123</i>

INTRODUCTION GENERALE

1. Propriétés électrophysiologiques du système nerveux

Le système nerveux est l'organe supérieur de contrôle de l'activité de l'être humain. Il se compose essentiellement de cellules nerveuses. Ces cellules, dites neurones, forment un réseau complexe qui accumule et transmet l'information, et qui contrôle les différentes unités fonctionnelles de l'organisme. Ce système nerveux est relié au reste de l'organisme par de nombreux nerfs périphériques, formés de millions de fibres nerveuses. Il s'établit alors, grâce à ce réseau, une communication à double sens entre l'encéphale qui reçoit les signaux sensitifs de tout le corps et qui déclenche alors une commande motrice sur les différents organes et tissu de la périphérie. D'une manière générale, la transmission d'un signal par une fibre nerveuse repose sur la membrane cellulaire. En effet, les membranes sont chargées électriquement, avec une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane. Une modification de ces charges à un endroit quelconque du neurone engendre le passage d'un courant électrique au travers la membrane qui va induire une succession de rapide décharges électriques le long de la membrane neuronale créant un courant qui se propage sur l'ensemble de la fibre nerveuse. Les signaux se transmettent alors d'un neurone à l'autre par les synapses. Il existe deux types de fibres nerveuses qui relient le système nerveux central à la périphérie : les fibres sensitives et les fibres motrices. Les fibres sensitives prennent naissance sur des terminaisons nerveuses que l'on appelle récepteur, avec par exemple les récepteurs à la douleur, visuels, ou encore auditif comme détaillé plus tard dans cette introduction. Chacun de ces récepteurs présente une structure particulière qui lui permet, au niveau de la fibre nerveuse, de générer les modifications électriques nécessaire à l'influx nerveux. Les fibres motrices transmettent quant à elles les signaux qui proviennent du système nerveux central et qui sont destinés aux différentes unités fonctionnelles de l'organisme, aux muscles par exemple.

Les liquides intracellulaires qui composent les cellules délimitées par la membrane, sont d'une composition différente des liquides extracellulaires avec en particulier une

Introduction

grande quantité d'ions sodium pour le milieu extracellulaire et peu d'ions potassium, ce qui est l'inverse pour le milieu intracellulaire. Les différentes substances de chaque milieu peuvent franchir la membrane cellulaire de deux façons : soit par diffusion, soit par un transport actif.

1.1 Transport passif à travers la membrane

Les substances de part et d'autre de la membrane peuvent traverser la membrane de manière passive par le biais de deux phénomènes : la diffusion libre et la diffusion facilitée.

La diffusion libre est faisable, d'un point de vue physique, grâce au gradient électrochimique et ne nécessite pas d'énergie. Cette diffusion n'est possible que si les molécules qui traversent la membrane sont liposolubles. Un certain nombre de substances sont solubles dans les lipides membranaires, comme par exemple les molécules de dioxygène, de dioxyde de carbone ou encore les dérivés d'alcool. Quand l'une de ces molécules entre en contact avec la membrane, elle se solubilise immédiatement dans la bicouche lipidique permettant la diffusion. Ce type de diffusion n'est donc pas spécifique à un type de molécule et est un processus relativement lent.

La diffusion facilitée repose sur l'implication d'une protéine de transport dans le phénomène de diffusion. La différence de concentration de part et d'autre de la membrane reste le moteur de ce transport. Toutefois, le passage de molécules se fait par le biais de canaux ioniques, dont la description est détaillée plus loin, ou de transporteurs ce qui le rend très spécifique et régulé (Figure 1).

Introduction

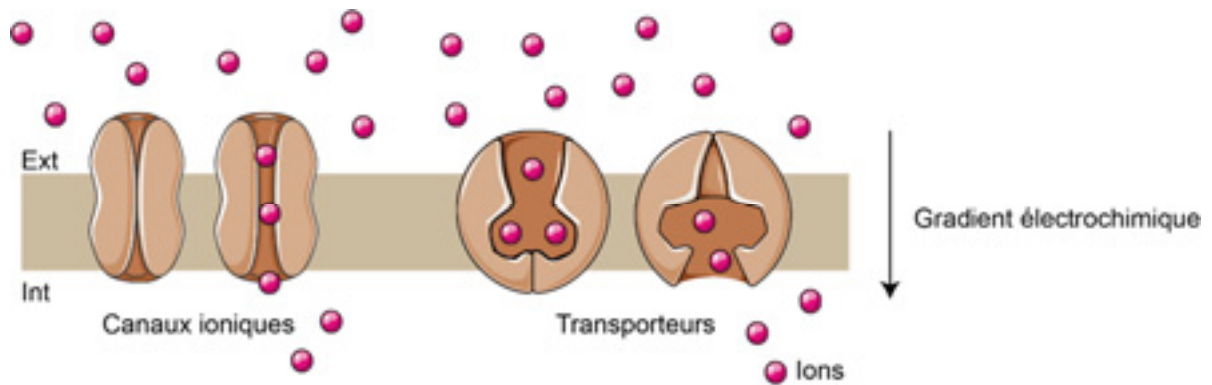


Figure 1 Schéma des deux types de transports passifs. Diffusion au travers de la membrane grâce au gradient électrochimique via des canaux ioniques ou des transporteurs

1.2 Transport actif

Certains mouvements ioniques se faisant dans le sens contraire du gradient électrochimique sont cependant impliqués dans le bon maintien du fonctionnement cellulaire. Pour effectuer un transport actif, la cellule doit vaincre ce gradient, et doit donc dépenser de l'énergie. Il est démontré dans nombre de cas que cette énergie provient de l'hydrolyse des liaisons phosphate, riches en énergie, de l'acide adénosine triphosphorique (ATP) qui se transforme en acide adénosine diphosphorique (ADP). Il existe deux types de transports actifs : primaires et secondaires. Les transports actifs primaires utilisent directement l'hydrolyse de l'ATP. C'est le cas des pompes sodium/potassium qui lors de l'hydrolyse de l'ATP en ADP, permettent la sortie vers le milieu extracellulaire de trois ions Na^+ pour l'entrée vers le milieu intracellulaire de deux ions K^+ (Toyoshima et al., 2011) ou des pompes calcium qui lors de la même réaction d'hydrolyse par des ATPase permet la sortie de l'ion Ca^{2+} (Brini et al., 2013). Les transports secondaires sont plutôt des co-transporteurs qui vont tirer profit de l'énergie d'un transport actif primaire. Ils peuvent être symport : transports de deux ions ou de deux molécules du milieu extérieur vers le milieu intérieur ou antiport qui correspond au transport simultané de deux espèces ioniques ou d'autres molécules qui traversent le pore dans des directions opposées.

1.3 Propriétés biophysiques des membranes

Les différences de concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane cellulaire permettent la présence d'un potentiel de membrane entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. L'existence de ce potentiel repose sur deux mécanismes principaux : le transport actif des ions à travers la membrane qui crée un déséquilibre entre les charges positives et négatives ; et la diffusion transmembranaire des ions résultant d'une différence de concentration et qui est à l'origine d'un déséquilibre des charges. Il est fonction du rapport entre la tendance pour les ions à diffuser dans une direction par rapport à l'autre. Les fluctuations pour un ion donné suivent la loi de Nernst adaptée pour une membrane :

$$V_m = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[I]_A}{[I]_B} \quad (\text{équation 1})$$

avec V_m : le potentiel de membrane, R : la constante des gaz parfaits, T : la température en Kelvin, z : la charge de l'ion perméant, F : la constante de Faraday, et $[I]_x$: la concentration de l'ion d'intérêt dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire.

Comme certaines protéines qui composent la membrane sont perméables aux ions sodium, potassium, calcium et chlore, en réalité, le potentiel de membrane ne correspond pas au résultat de cette équation mais combine les différents flux ioniques, issus des gradients de concentration et des gradients électriques. C'est l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) qui prend en compte ces paramètres et qui considère également la perméabilité de chaque ion. La cellule peut alors être schématisée comme un circuit électrique qui prend en compte la conductance et la force électromotrice de chaque ion (Figure 2). La membrane cellulaire joue alors le rôle de condensateur puisque les charges négatives et positives s'attirent de part et d'autre et sont alignées le long de la membrane.

Introduction

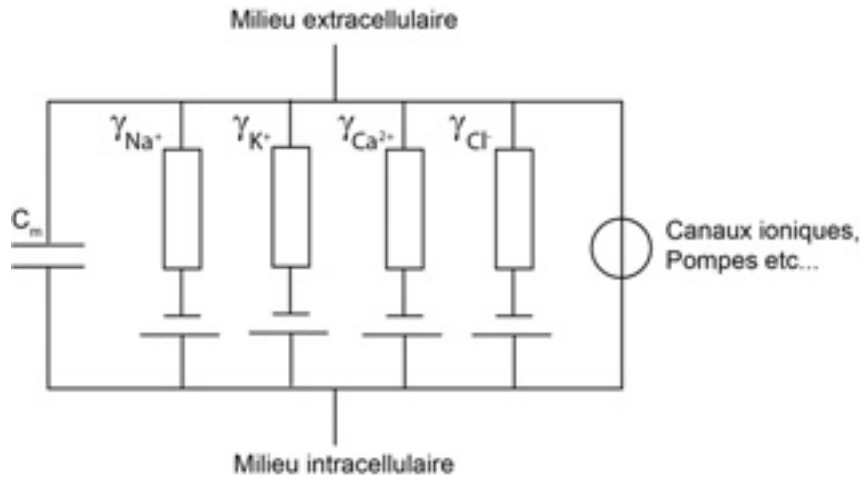


Figure 2 Schéma électrique d'une cellule, avec C_m : la capacité de la membrane influencée par la taille de la cellule, chaque rectangles représentent les conductances des ions en fonction du générateur de tension (canaux ioniques, pompes...), figurent également es piles électrochimiques associées, équivalent à l'équation de Nernst, pour chaque ion.

L'équation de courant de GHK indique le potentiel d'inversion de la membrane en présence de plusieurs conductances, c'est à dire le potentiel pour lequel le courant net est nul (toutes les conductances s'annulent). Si les ions perméants sont le potassium, le sodium et le chlore, l'équation est :

$$E_{inv} = \frac{R.T}{F} \cdot \ln \frac{P_{K^+}[K^+]_{ext} + P_{Na^+}[Na^+]_{ext} + P_{Cl^-}[Cl^-]_{int}}{P_{K^+}[K^+]_{int} + P_{Na^+}[Na^+]_{int} + P_{Cl^-}[Cl^-]_{ext}} \quad (\text{équation 2})$$

Avec E_{inv} : le potentiel d'inversion, R : la constante des gaz parfaits, T : la température en Kelvin, F : la constante de Faraday, P_{X^n} : la perméabilité de l'ion X^n , $[X^n]_{ext/int}$: la concentration intracellulaire (int) ou extracellulaire (ext) de l'ion X^n .

Ainsi, un changement de la perméabilité d'une espèce ionique va engendrer une modification du potentiel de membrane. Si la membrane devient plus perméable aux ions Na^+ , cet ion va avoir tendance à rentrer dans la cellule et le milieu intérieur aura donc un surplus de charges positives provoquant un déplacement du potentiel de membrane vers des valeurs moins négatives, la cellule se dépolarise. Inversement,

Introduction

dans le cas d'une repolarisation ou d'une hyperpolarisation, le potentiel de membrane devient plus négatif par rapport au potentiel de repos.

Ce potentiel d'action à un endroit précis de la membrane peut être transmis tout le long d'un axone, jusqu'aux terminaisons nerveuses et joue donc un rôle essentiel dans la transmission synaptique. Le déclenchement du potentiel d'action peut être de différentes natures : chimique, mécanique, ou électrique (Bogotov et al., 2014).

L'effet d'un potentiel d'action dans une terminaison nerveuse dépend du type de synapse que forme l'axone avec ses cellules cibles. Il existe des synapses électriques et des synapses chimiques. Les premières sont constituées de canaux transmembranaires qui mettent en communication le milieu intracellulaire du neurone avec celui de la cellule cible, de sorte que le potentiel d'action se propage directement de l'un à l'autre. Ce type de synapse présente l'avantage d'une transmission très rapide.

Au niveau d'une synapse chimique, l'arrivée d'un potentiel d'action produit une séquence complexe d'événements. La terminaison d'un axone contient de petites vésicules remplies de neurotransmetteurs qui vont assurer la transmission de l'activité neuronale à travers l'espace synaptique. La dépolarisation d'une terminaison synaptique par un potentiel d'action provoque l'ouverture de canaux perméables au calcium, entraînant l'entrée de cet ion dans la terminaison. Sous l'impulsion de cet influx de calcium, les vésicules fusionnent avec la membrane cellulaire libérant ainsi leur contenu dans le milieu extracellulaire. Le neurotransmetteur va alors y diffuser librement jusqu'à atteindre la membrane de la cellule cible de cette terminaison nerveuse. Le début de la transmission synaptique correspond donc à la conversion d'un signal électrique porté par le potentiel d'action, en signal chimique induit par le neurotransmetteur. Les protéines réceptrices membranaires de la cellule cible accueillent alors les molécules de neurotransmetteur qui viennent s'associer spécifiquement. Cette liaison va généralement provoquer l'ouverture (ou plus rarement la fermeture) de canaux dans la membrane des cellules cibles, déclenchant un flux ionique. Selon le type d'ions auxquels les canaux sont perméables, ce flux entraîne une dépolarisation ou une hyperpolarisation de la cellule. Cette deuxième étape de la transmission synaptique correspond donc à la reconversion d'un signal chimique en signal électrique.

Introduction

L'excitabilité du neurone par un courant électrique dépolarisant ainsi que son aptitude à engendrer et à propager ces potentiels d'actions, sont les deux propriétés qui donnent à l'électrophysiologie une place prépondérante en neurophysiologie, notamment pour approfondir le mécanisme de la transmission synaptique de l'excitation.

2. Techniques d'enregistrement

Le premier enregistrement intracellulaire d'un potentiel d'action a été rapporté en 1939 par Hodgkin et Huxley dans l'axone géant de calmars (Hodgkin and Huxley, 1939). Cet axone a été choisi pour son grand diamètre ($\sim 500 \mu\text{m}$) permettant le placement d'une microélectrode à l'intérieur de l'axone. Plus tard, une méthode de pince de tension a été utilisée pour comprendre la création du potentiel d'action (Hodgkin and Huxley, 1952). Cette méthode repose sur la mise en place d'une deuxième microélectrode dans l'axone pour servir de référence. En 1963, ils reçurent le prix Nobel pour ces travaux, fondements de la neurophysiologie moderne. Bien que cette technique ait été étendue à d'autres fibres nerveuses, telles que la fibre de Purkinje (Draper and Weidmann, 1951), il est peu pratique d'introduire deux électrodes dans des cellules plus petites. De plus, ces enregistrements intracellulaires ne représentent que l'effet global de toutes les fluctuations ioniques de la membrane cellulaire, fournissant peu de détails sur les caractéristiques individuelles des canaux ioniques unitaires par exemple.

L'invention de la technique du patch clamp par Bert Sakmann et Erwin Neher a permis aux expérimentateurs d'enregistrer des canaux ioniques uniques (Figure 3), de petits groupes de canaux, des potentiels de membrane ou des courants intracellulaires dans pratiquement n'importe quel type de cellule en n'utilisant qu'une seule électrode. Depuis son développement à la fin des années 1970, de nombreuses variantes ont été établies et il est maintenant considéré comme la méthode de référence pour l'étude de l'activité des canaux ioniques (Hamill et al., 1981). L'importance du patch clamp et des découvertes qu'il a permis a été reconnue dans toutes les sciences biomédicales, notamment par l'attribution d'un prix Nobel en 1991 à ses inventeurs Bert Sakmann et Erwin Neher.

Introduction

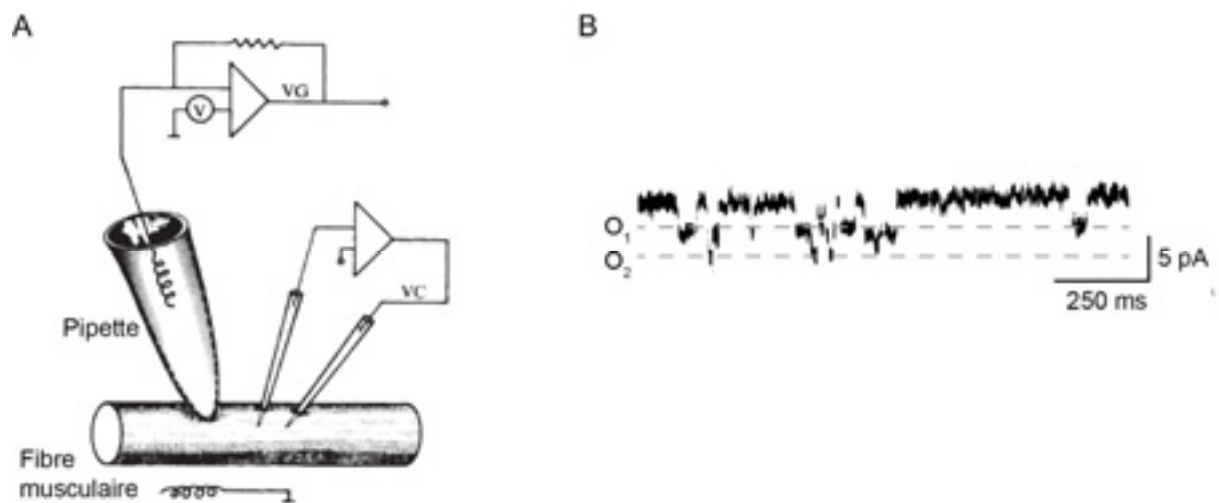


Figure 3 Premiers enregistrements en configuration canal ionique. A. Schéma du dispositif utilisé pour enregistrer les courants portés par un récepteur à l'acétylcholine sur la membrane d'une fibre nerveuse de grenouille. VC permet d'imposer un potentiel de membrane et VG permet l'enregistrement des courants. B. Première trace électrophysiologique en configuration canal unique de la fibre musculaire de grenouille après application d'une solution de SubCh. O₁ et O₂ correspondent à l'état ouvert d'un canal ou de deux canaux respectivement. (D'après Neher and Sakmann, 1976)

La technique de patch-clamp a été un apport considérable pour la compréhension de la physiologie cellulaire. La très grande sensibilité de cette technique expérimentale permet en effet de mesurer les fluctuations rapides de courants électriques provenant du passage des ions dans un seul canal ionique (Neher and Sakmann, 1976). Le développement de cette technique ainsi que l'amélioration des méthodes de biochimie des protéines et de clonage moléculaire ont permis de mieux comprendre les canaux ioniques.

D'un point de vue technique, plusieurs configurations d'enregistrements sont possibles après contact entre une électrode de verre et la membrane cellulaire (Ashcroft and Rorsman, 2013), qui présentent chacun ses avantages et inconvénients (Figure 4).

Introduction

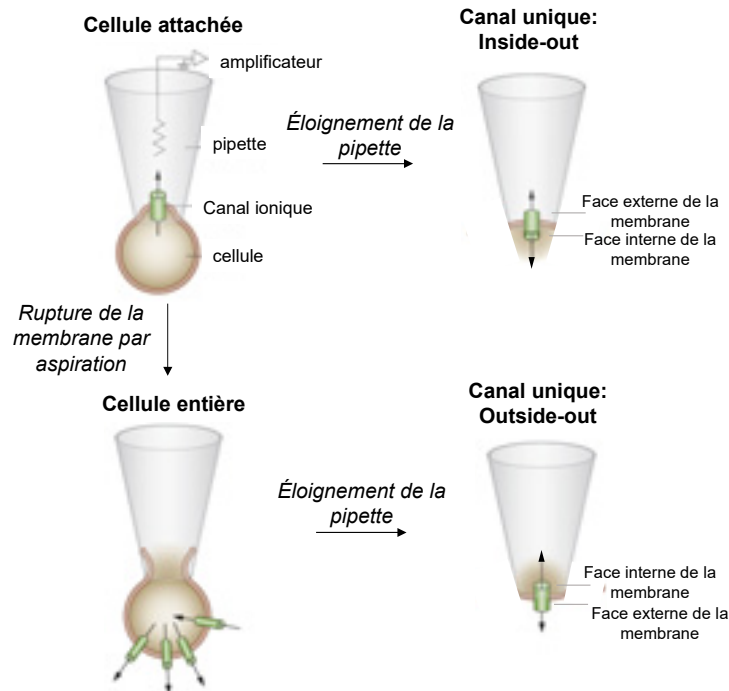


Figure 4 Représentation des différentes configurations d'enregistrements patch-clamp. (Adapté de Ashcroft and Rorsman, 2013)

La configuration cellule attachée est un mode d'enregistrement qui permet de conserver l'intégralité du milieu intracellulaire et ne pas déstructurer les interactions intracellulaires. Les courants de faibles intensités obtenus restent le principal inconvénient ainsi que le manque de contrôle de la composition du milieu intracellulaire.

Les enregistrements en configuration cellule entière sont réalisés après rupture de la membrane cellulaire, permettant l'enregistrement des courants portés par l'ensemble des canaux de la cellule. Le milieu intracellulaire est donc rapidement dialysé par la solution intrapipette, le cytoplasme n'est donc pas conservé.

Il existe, enfin, deux techniques d'enregistrements de canal unique. La configuration « inside out » est issue de l'arrachement d'un fragment de la membrane après contact de la pipette avec la membrane. La face extérieure de la membrane se retrouve donc en contact avec le milieu intrapipette et la face intérieure avec le milieu extracellulaire. A l'inverse, la configuration « outside out » est réalisée après rupture de la membrane cellulaire ce qui permet d'avoir la face extérieure de la membrane en contact avec le milieu extracellulaire, présentant l'avantage de pouvoir appliquer des solutions aux

compositions variées. Toutefois, ces deux configurations peuvent entraîner la perte de facteurs de régulation du canal.

3. Les canaux ioniques

Les cellules excitables ont un potentiel régulé de façon extrêmement fine. Pour ce faire, les cellules disposent de canaux ioniques, qui, lorsqu'ils sont ouverts, permettent de laisser passer avec une très grande efficacité les ions selon leur gradient de concentration. Ce passage se fait donc de manière passive, comme décrit précédemment. La valeur de ce potentiel membranaire est déterminée à chaque instant par l'état d'ouverture des différents canaux présents dans la membrane. Dans les organismes complexes, les différents types cellulaires sont capables, selon les stimuli externes, de reprogrammer en quelques millisecondes la valeur de leur potentiel de membrane, par la modulation de l'état d'ouverture de leurs canaux. Ce phénomène est responsable de fonctions physiologiques vitales, comme le fonctionnement du système nerveux (Bean, 2007), la rythmicité des battements cardiaques (Zaza, 2010) ou encore la sécrétion de certaines hormones, par exemple l'insuline (Rorsman and Braun, 2013). De plus, des ions tels que le calcium, dont les variations de concentration dans les cellules sont finement contrôlées par des canaux et des transporteurs spécifiques, ont un rôle important en tant que « seconds messagers ». Les canaux ioniques ont des propriétés fonctionnelles bien définies. La conductance de ces canaux définit le nombre de charges fluctuant au travers du pore par unité de temps à un potentiel donné. Elle est caractéristique de la population de canaux ouverts à un instant précis et est donnée par la loi d'Ohm : la quantité de charges traversant la membrane par unité de temps est représentée par le produit du potentiel membranaire par la conductance :

$$I = E \cdot \gamma \text{ (équation 3)}$$

Avec I : la quantité de charges, E : le potentiel de membrane, γ : la conductance

Introduction

Dans le cas des membranaires cellulaires, il faut ajouter une grandeur supplémentaire qui est la force électromotrice de l'ion. La loi devient donc :

$$I = \gamma \cdot (E - E_s) \text{ (équation 4)}$$

où E_s représente le potentiel d'équilibre de l'ion considéré et E le potentiel de membrane.

En plus de cette conductance, les canaux ioniques sont définis par des caractéristiques intrinsèques bien précises comme la probabilité d'ouverture, leur fréquence d'ouverture/fermeture et enfin la sélectivité ionique.

Cette dernière caractéristique est variable selon les types de canaux. Quelques canaux, comme le récepteur de l'acétylcholine, sont spécifiques pour les petits cations mais ne présentent que peu de préférences entre eux (Auerbach, 2015) ; d'autres, comme les canaux potassiques, sont extrêmement sélectifs et préfèrent, par exemple, les ions K^+ aux ions Na^+ avec un rapport de 1/10 000 (Horn et al., 2014); certains ne laissant passer qu'un seul ion, alors que d'autres discriminent les ions selon leur charge globale. La sélectivité ionique dépend de plusieurs facteurs, de la taille de l'ion, de la facilité avec laquelle il est déshydraté (les ions de grande taille perdant plus facilement leurs molécules d'eau) mais aussi de la structure même du pore aqueux.

Il existe trois grandes familles de canaux ioniques en fonction de leur mode d'activation : les canaux activés par un stimulus mécanique (canaux mécanosenseurs), les canaux activés par un stimulus physique, comprenant par exemple les canaux thermosensibles, les canaux voltage-dépendants dont l'ouverture est activée par la variation du potentiel membranaire, et les canaux activés par un stimulus chimique, qui peut être intracellulaire comme pour les canaux potassiques ATP-dépendants activés par une augmentation de la concentration intracellulaire en ATP, ou extracellulaire dont l'activité des canaux est contrôlée par la fixation d'un ligand dans le domaine extracellulaire du récepteur. C'est ce dernier type de canaux qui sera étudié dans cette thèse.

En présence du stimulus spécifique du canal ionique étudié, le canal bascule d'un état fermé à un état ouvert. Ces facteurs de régulation peuvent favoriser ou diminuer le flux

d'ions au travers des canaux ioniques spécifiques. Ces variations d'activité et donc de passage d'ions à travers la membrane d'une cellule vont provoquer des variations de potentiel de membrane, comme expliqué précédemment. Il faut souligner que de très nombreux canaux peuvent adopter d'autres conformations que les conformations fermée ou ouverte. Ainsi, de nombreux canaux s'inactivent ou se désensibilisent (cas de nombreux récepteurs-canaux). Bien que les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'inactivation et la désensibilisation soient totalement différents, dans ces deux états les canaux ioniques sont non conducteurs.

4. Les récepteurs canaux (LGICs)

Les récepteurs canaux, aussi appelés LGICs pour « ligand gated ion channels », sont des canaux ioniques dont l'ouverture induisant le passage des ions est contrôlée par la liaison d'un agoniste dans le site de fixation situé dans le domaine extracellulaire. Ils sont principalement impliqués dans la médiation rapide de la transmission synaptique en réponse à un neurotransmetteur chimique spécifique comme l'acétylcholine ou le glutamate, entre autres.

Ces canaux reconnaissent et décodent les molécules messagères dans le but de transmettre un message. Ce mode de communication a été mis en évidence pour la première fois en 1857 par Claude Bernard grâce à un grand nombre d'expérience sur l'action toxique du curare. Il démontra que l'action paralysante du curare agit à la jonction entre nerf moteur et fibre musculaire, bloquant ainsi la transmission de l'influx nerveux (Bernard, 1856). Ce concept a été affiné grâce aux travaux des physiologistes John Langley et Paul Ehrlich, proposant l'idée de récepteur. En effet, J. Langley met en évidence la contraction musculaire localisée sous la terminaison nerveuse suite à une stimulation par la nicotine (Langley, 1906) et P. Ehrlich en s'intéressant à l'affinité de certains colorants pour certains constituants cellulaire (Ehrlich, 1913), confirme cette notion de récepteur. En parallèle à ces découvertes, Thomas Elliott détermine la notion de « sécrétion stimulatrice » qui suggère que la contraction musculaire est due à une sécrétion de molécule par le nerf (Elliott, 1904a ; Elliott, 1904b). Il faudra attendre 1970 pour que ces idées soient concrétisées grâce à la première purification d'un

Introduction

récepteur, le récepteur nicotinique à l'acétylcholine lié à l' α -bungarotoxine (Changeux et al., 1970).

L'exploration de ce nouveau système d'interaction ligand-récepteur a permis de mettre en évidence certaines similitudes entre les différents récepteurs, notamment leur assemblage multimérique dont les sous-unités participent à la formation du pore ionique transmembranaire ainsi que la présence du site de liaison du ligand dans le domaine extracellulaire. Toutefois, ils présentent également des différences, principalement dans leur stœchiométrie d'assemblage ce qui permet de les regrouper par famille. Il existe ainsi trois sous-groupes majeurs suivant leur caractéristiques structurales et fonctionnelles : les récepteurs pentamériques, les récepteurs tétramériques et les récepteurs trimériques (Figure 5) (Lemoine et al., 2012).

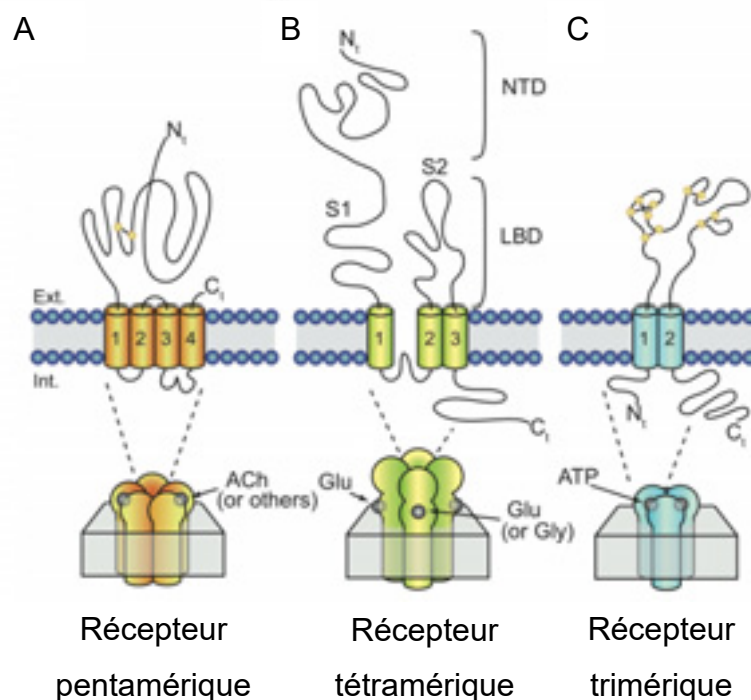


Figure 5 Représentation schématique des trois familles de canaux ioniques. A Représentation des récepteurs pentamériques dont les nAChRs, les 5-HT₃Rs, les GABAARs, les GlyRs et les ZAC, GluCl, GLIC, ELIC. B. Représentation de la famille des récepteurs tétramériques iGluRs incluant les rNMDAs, rAMPAs et rKAs. C. Famille des récepteurs trimériques dont font partie les récepteurs P2X. (Issu de Lemoine et al., 2012)

4.1 Les récepteurs pentamériques

La superfamille de récepteurs pentamériques est composée de deux types de récepteurs, des récepteurs excitateurs et inhibiteurs. Les récepteurs excitateurs pentamériques, perméables aux cations, se composent des récepteurs nAChRs, des récepteurs sérotoninergiques (5-HT₃) et des récepteurs activés par le zinc (ZAC). Les récepteurs inhibiteurs de cette super famille, perméables aux anions, sont les récepteurs γ -aminobutyric acide (GABA-A, GABA-C) et les récepteurs glycinergiques (GlyRs) (Nys et al., 2013).

Ces récepteurs pentamériques sont également appelés « cys-loop » chez les eucaryotes, en raison de la présence, pour chaque sous-unité, d'une boucle extracellulaire caractéristique formée de treize acides aminés hautement conservés maintenue par un pont disulfure. Cette boucle est essentielle à la communication entre les sites de liaison des neurotransmetteurs et le canal ionique membranaire. Ces récepteurs sont le plus souvent présent sous forme d'hétéropentamères et plus rarement sous forme homomérique.

Tous les récepteurs pentamériques partagent une architecture structurale commune, avec cinq sous-unités arrangées symétriquement suivant des règles d'assemblage strictes. Chaque sous-unité se divise en plusieurs domaines qui ont des fonctions bien précises : un large domaine extracellulaire formé par les parties N- et C-terminales, qui comprend le site de liaison de l'agoniste à l'interface entre deux sous-unités, et qui est une cible majeure des modulateurs allostériques ; un domaine transmembranaire qui est constitué de quatre hélices transmembranaires (TM1-TM4) avec les segments TM2 qui forment le pore ionique et qui est aussi la cible de modulateurs allostériques tels que les alcools ou les anesthésiants ; un domaine intracellulaire qui se compose d'une large boucle intracellulaire formée par TM3 et TM4, et qui joue un rôle important dans le transport du récepteur et de sa modulation (Corringer et al., 2012; Smart and Paoletti, 2012). L'ouverture de ces canaux est provoquée par un mouvement de torsion et de déformation du récepteur (Bocquet et al., 2009). La liaison des agonistes dans leur site de fixation induit une torsion du domaine extracellulaire qui conduit à des déformations de la structure tertiaire de chaque sous-unité permettant la perméation ionique.

Introduction

La multitude de combinaisons possibles entre les différentes sous-unités implique une grande richesse moléculaire et fonctionnelle *in vivo* (Sine and Engel, 2006).

4.2 Les récepteurs tétramériques

La superfamille des récepteurs canaux tétramériques est formée de récepteurs excitateurs ionotropiques du glutamate (iGluRs) et sont répartis en quatre sous-familles : les récepteurs AMPA (GluA1-4), les récepteurs NMDA (GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B) co-activés par la présence de glycine, les récepteurs kainate (GluK1-5), et les récepteurs delta (GluD1-2) (Mayer, 2005). Leur assemblage dépend de la nature du récepteur : les récepteurs AMPA et kainate peuvent être des homo- ou des hétéromères dont chaque sous-unité lie une molécule de glutamate alors que les récepteurs NMDA vont plutôt s'assembler en hétéromères composés obligatoirement de deux sous-unités GluN1 (liant la glycine) et de deux autres sous-unités, généralement GluN2, liant le glutamate (Paoletti and Neyton, 2007).

Ils présentent une architecture globale particulière puisqu'ils présentent un domaine extracellulaire composé de deux lobes dont un premier lobe composé des parties N-terminales qui est impliqué dans l'oligomérisation des iGluRs et dans la modulation de ceux-ci ; et un deuxième lobe qui est formé de deux sous-domaines contenant le site de fixation du glutamate. Ces deux lobes sont reliés entre eux par une chaîne flexible. Le domaine transmembranaire est composé de trois hélices α (TM1, TM3 et TM4) ainsi que d'une boucle réentrantante (TM2). Le pore ionique est formé par l'hélice TM3 et la boucle TM2 et les segments TM1 et TM4 servent d'interface entre les sous-unités (Paas, 1998).

Les iGluRs sont impliqués dans la transmission synaptique excitatrice. Cette transmission se fait de manière rapide, leurs cinétiques d'activation sont assez élevées pour répondre à une libération brève de glutamate, notamment au niveau de la synapse. Ces récepteurs sont également responsables de la plasticité synaptique.

4.3 Les récepteurs trimériques

La dernière famille de récepteurs canaux sont les récepteurs trimériques composée des récepteurs purinergiques P2X activé par la fixation extracellulaire de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP). Ils sont formés de l'assemblage homomérique ou hétéromérique de trois sous-unités, parmi l'existence de sept gènes (P2X1-P2X7). Elles présentent une homologie de séquence comprise entre 40 et 55% (North, 2002). Chaque sous-unité présente une architecture simple avec les parties N- et C-terminales dans la partie intracellulaire, suivies de deux domaines transmembranaires (TM1-TM2) liées entre elles par un large domaine extracellulaire riche en ponts disulfures contenant le site de fixation de l'ATP à l'interface entre deux sous-unités. Les différentes sous-unités P2X présentent des propriétés biophysiques et pharmacologiques variables (Gever et al., 2006) comme des affinités pour l'ATP différentes ou l'affinité de certaines sous-unités pour des modulateurs allostériques, comme le zinc et le cadmium (North, 2002).

5. Les récepteurs P2X

L'ATP est une molécule intracellulaire qui joue un rôle fondamental dans le métabolisme énergétique des cellules dont l'activité biologique a été décrite en 1929 par Karl Lohman. Il a fallu attendre les années 1990 pour que l'ATP soit considérée comme médiateur intercellulaire (Evans et al., 1992). L'ATP est présent dans le cytoplasme à une concentration de 3 à 5 mM et peut être libéré dans le milieu extracellulaire à la suite d'une lyse cellulaire, mais également suite à d'autres mécanismes non lytiques comme par le biais de canaux transmembranaires (canaux ABC (Praetorius and Leipziger, 2009) ou pannexines et connexines (Lazarowski, 2012) et même P2X7 (Pellegatti et al., 2005)), ou encore à l'exocytose de vésicules sécrétrices (Montana et al., 2006). La libération de l'ATP dans le milieu extracellulaire va permettre l'activation de récepteurs membranaires. En 1978, Geoffrey Burnstock a proposé une classification de ces récepteurs en deux grandes familles : les récepteurs P1, dont l'agoniste est l'adénosine, obtenue à partir de l'ATP, et les récepteurs P2, qui

Introduction

ont une grande affinité pour les nucléotides di- et triphosphates (Burnstock et al., 1978). Cette dernière famille se décompose en deux sous-familles de récepteurs membranaires purinergiques P2, les récepteurs métabotropiques liés aux protéines G, les P2Y, et les récepteurs canaux P2X (Figure 6).

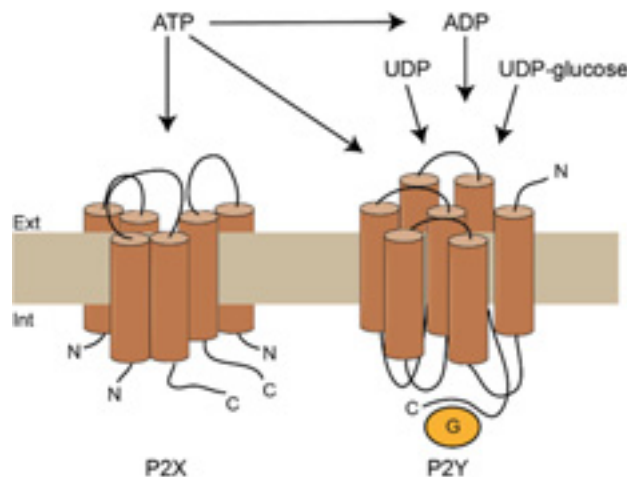


Figure 6 Schématisation de la signalisation purinergique des récepteurs P2X et P2Y.

5.1 Rôles physio-pathologiques des récepteurs P2X

L'activation des récepteurs P2X par l'ATP induit un flux cationique, généralement un influx de Ca^{2+} et de Na^{+} , et un efflux de K^{+} . Ces mouvements ioniques provoquent une dépolarisation de la membrane ainsi que l'activation subséquente d'autres canaux, notamment celle de canaux calciques voltage dépendants (Bean, 1992; Dubyak and el-Moatassim, 1993). L'entrée de calcium dans la cellule par le biais des récepteurs P2X et de ces canaux voltage dépendant est importante, notamment dans le transfert de l'influx nerveux et dans la contraction musculaire. Les récepteurs P2X étant exprimés dans de nombreux tissus, ils sont impliqués dans de multiples fonctions physio-pathologiques. Ils représentent donc un intérêt majeur. Voici quelques exemples non exhaustifs de leurs localisations et de leurs fonctions :

Introduction

5.1.1 Le récepteur P2X1

Le récepteur P2X1 a été isolé pour la première fois dans l'ovocyte de Xénope (Valera et al., 1994). Il a ensuite été retrouvé au niveau des vaisseaux sanguins des muscles lisses (vessie, spermiducte, intestins et artères) ainsi que dans les plaquettes (Burnstock and Knight, 2004). En raison de cette distribution, cet homomère est, entre autres, impliqué dans la contraction des muscles lisses, la régulation de la pression sanguine, l'agrégation plaquettaire et dans le fonctionnement de la vessie. En effet, des souris P2X1 KO présentent, par exemple, des taux réduits de thrombus et un temps de saignement plus long (Nurden, 2007; Oury et al., 2015) ou encore, une stérilité chez le mâle en raison d'une contraction des vésicules séminales insuffisante (Mulryan et al., 2000). Dans les cellules de muscles lisses d'artères mésentériques de souris, le récepteur P2X1 est responsable d'une vasoconstriction en réponse à l'ATP (Vial and Evans, 2002). Son implication dans la septicémie a également été démontré par des taux élevés de P2X1 responsable d'une réduction de l'hématocrite et des taux d'hémoglobine chez les patients présentant une bactériémie confirmée (Fagerberg et al., 2018).

5.1.2 Le récepteur P2X2

Le récepteur P2X2 de rat a été cloné à l'origine, à partir d'une lignée PC12 de phéochromocytome de cette espèce (Brake et al., 1994). Il est exprimé dans de nombreux organes des systèmes vasculaires, nerveux, neuroendocriniens et sensitifs. Il est donc principalement impliqué dans la nociception, la transduction gustative, et répond aux activités pré et post synaptiques (Ren et al., 2003). Cet homomère se retrouve en particulier dans la cochlée. Il a été rapporté qu'une exposition prolongée à un son continu induit une surexpression des récepteurs P2X2 suite à une sécrétion d'ATP dans la cochlée et que des souris déficientes pour P2X2 développent une presbyacousie (Yan et al., 2013). Ils sont aussi exprimés sur la surface épithéliale des cellules de soutiens de la partie vestibulaire de l'oreille interne ce qui leur confère un rôle dans l'équilibre. Les souris P2X2 déficientes montrent en effet des troubles significatifs de l'équilibre moteur ainsi qu'une diminution du réflexe vestibulo-oculaire

Introduction

(responsable de la stabilisation du regard sur un point fixe) (Takimoto et al., 2018). Les souris KO P2X2 présentent des douleurs inflammatoires, une chute du réflexe urinaire, une diminution de la sensibilité gustative et une diminution de la mobilité intestinale.

5.1.3 Le récepteur P2X3

Ce récepteur a été isolé à partir du ganglion spinal de rat (Chen et al., 1995). Son expression est principalement localisée au niveau des neurones sensitifs, nociceptifs et sympathiques (Burnstock and Knight, 2004) mais on le retrouve aussi dans la moelle épinière et le cœur (Garcia-Guzman et al., 1997). Ses rôles physiologiques sont orientés vers la sensation gustative et les réflexes vésicaux. Ils sont responsables, notamment de douleurs chroniques, impliqués dans l'épilepsie et l'hyperalgésie (Bechakra et al., 2017). Les souris déficientes P2X3 ont une diminution de la mobilité intestinale (Souslova et al., 2000) et d'un pont de vue vésical : une hyperactivité de la vessie et une augmentation de la miction et de la capacité de celle-ci (Cockayne et al., 2000).

5.1.4 Le récepteur P2X4

Quatre groupes de recherche ont isolé l'ADN du P2X4 de rat, à partir du ganglion cervical supérieur (Buell et al., 1996), dans le cerveau (Séguéla et al., 1996), dans l'hippocampe (Bo et al., 1995) et dans des cellules pancréatiques (Wang et al., 1996). Il est principalement exprimé dans la microglie activée, dans les cellules endothéliales et les glandes salivaires. Ils sont impliqués dans le remodelage vasculaire puisque ces récepteurs étant perméants au calcium vont permettre la vasodilatation. Des souris P2X4 KO présentent en effet une augmentation de la pression artérielle due à une réduction de l'influx calcique dans les cellules endothéliales qui induit une production plus faible du vasodilatateur oxyde nitrique (Yamamoto et al., 2006). Les récepteurs P2X4 sont également impliqués dans la douleur inflammatoire. Leur activation par l'ATP dans les macrophages entraîne une libération de prostaglandines qui joue un rôle majeur dans l'inflammation et dans la douleur (Ulmann et al., 2010). De même, la

Introduction

stimulation des récepteurs P2X4 neuronaux conduit à la libération de BDNF par la microglie activée conduisant à un état de douleur chronique inflammatoire (Ulmann et al., 2008). Des équipes ont aussi mis en évidence une augmentation de l'expression de P2X4 dans des modèles de douleur neuropathique (Nakai et al., 2010; Otoshi et al., 2010). Récemment, les récepteurs P2X4 ont été mis en cause dans la sensation de touché par le biais de la libération d'ATP par les kératinocytes. La délétion spécifique de ces récepteurs dans les neurones sensoriels diminue très nettement la sensibilité mécanique (Moehring et al., 2018).

5.1.5 Le récepteur P2X5

Le récepteur P2X5 a été caractérisé à partir de ganglion coélique (Collo et al., 1996) et de cœur (Garcia-Guzman et al., 1996) de rat. Il est largement exprimé dans les cellules endothéliales de l'intestin et de la peau, dans les cellules épithéliales de l'urètre et de la vessie et aussi dans les muscles lisses de l'intestin et la moelle épinière (Burnstock and Knight, 2004). Le récepteur P2X5 joue un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, notamment en l'inhibant, et induit la différenciation cellulaire. C'est le cas par exemple avec les cellules dites satellites dans les cellules souches musculaires. L'activation des récepteurs P2X5 exprimés dans ces cellules satellites va inhiber la prolifération et va stimuler les marqueurs de la différenciation des cellules musculaires (Ryten et al., 2002). Ainsi lors de lésion de la fibre musculaire, une partie des cellules satellites sera différenciée en cellules musculaires dans le but de la réparer. Ces récepteurs sont également impliqués dans la biologie osseuse, et pourraient notamment être impliqué dans la régulation de la perte osseuse liée à la parodontite (Kim et al., 2018).

5.1.6 Le récepteur P2X6

Le récepteur P2X6, cloné à partir d'un ganglion cervical supérieur (Collo et al., 1996) et de cerveau de rat (Soto et al., 1996), est la seule sous unité qui, assemblée en homotrimer, est sous forme silencieuse. Il n'est fonctionnel qu'en s'associant à

Introduction

d'autres sous-unités. Il est fortement exprimé au niveau du système nerveux central et dans les tissus périphériques. Les patients atteints d'insuffisance cardiaque accompagnée d'une augmentation du TNF- α présentent une surexpression du récepteur P2X6 dans leur myocarde (Banfi et al., 2005).

5.1.7 Le récepteur P2X7

Le premier clone de taille complète P2X7 a été construit à partir d'une banque d'ADN de cerveau de rat (Surprenant et al., 1996). Il est particulièrement exprimé dans les cellules immunitaires et les macrophages faisant de ce récepteur une cible thérapeutique très intéressante. On le retrouve également dans les cellules gliales, de la microglie et de la peau. Ils sont impliqués dans la perception de la douleur. D'un point de vue pathologie, les récepteurs P2X7 sont mis en cause dans les douleurs chroniques, les leucémies lymphocytaires chroniques et l'ostéoporose ainsi que dans la dépression (Deussing and Arzt, 2018) et l'arthrose (Hu et al., 2016). Les souris P2X7 déficientes présentent une inflammation via le ralentissement de la production de cytokine ce qui suggère que ce récepteur joue un rôle essentiel dans la cascade mécanistique de l'inflammation (Solle et al., 2001). De plus, il a été démontré qu'ils étaient impliqués dans la douleur, notamment dans celle du cancer osseux (Hansen et al., 2011). En outre, ces souris présentent aussi des anomalies du squelette ce qui suggère qu'ils sont également impliqués dans la formation et la résorption osseuse (Ke et al., 2003).

5.1.8 Les différents épissages

En plus des différentes sous-unités, certains récepteurs P2X peuvent provenir de différents types d'épissage. Ces variantes ont des propriétés pharmacologiques différentes. Ainsi, un variant d'épissage du récepteur P2X2 : P2X2-2, dont la séquence est plus courte de 207 paires de base, montre des cinétiques de désensibilisation plus rapide comparées à celles P2X2 (Brändle et al., 1997). Le récepteur P2X5 humain présente des fonctions physiologiques différentes entre la version complète de ce

Introduction

récepteur et sa version tronquée, notamment au niveau de l'activation des lymphocytes T et dans l'immunorégulation (Abramowski et al., 2014).

5.2 Exemple détaillé de l'implication des récepteurs P2X dans l'audition

5.2.1 Structures et transmission sonore

Structure de l'appareil auditif

La fonction auditive permet, chez les vertébrés, d'instituer entre les individus un moyen de communication à partir d'émissions sonores codées, pour lesquelles l'ouïe constitue le récepteur sensoriel. L'appareil auditif humain est un ensemble de structures anatomiques d'origine et de nature très différentes. Il est composé de trois parties consécutives distinctes : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne (Figure 7).

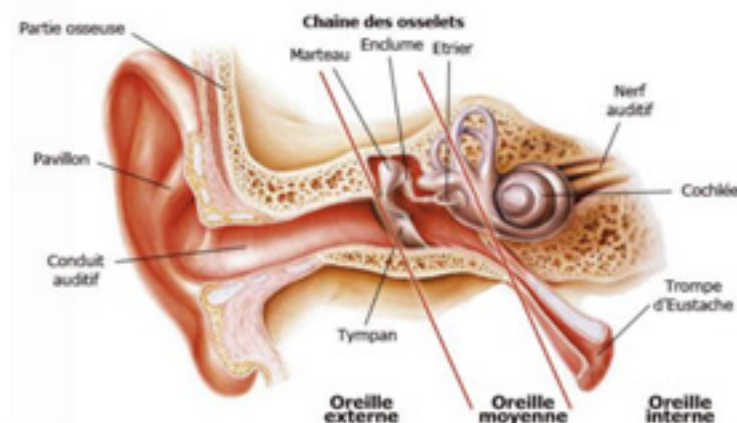


Figure 7 Coupe vertico-transversale de l'appareil auditif

L'oreille externe comprend le pavillon dont la partie centrale, la conque, donne accès au conduit auditif externe fermé par le tympan. Chez l'Homme, ce conduit a une longueur de 25 à 30 mm et un diamètre moyen de 7 mm. Du fait de sa géométrie et

Introduction

de la nature de ses parois, l'oreille externe ne transmet pas de la même manière toutes les fréquences. Son rôle est de capter, amplifier et focaliser les sons vers l'oreille moyenne.

L'oreille moyenne est essentiellement constituée de la caisse du tympan. Celle-ci est délimitée en dehors par le tympan et en dedans par la paroi interne de la caisse où s'ouvre dans la paroi osseuse la fenêtré ovale et la fenêtré ronde. L'air pénètre dans cette cavité par la trompe d'Eustache qui a pour rôle d'équilibrer la pression des deux côtés du tympan. Des fluctuations de pression dans le conduit auditif externe provoquent des mouvements de la membrane qui sont transmis à l'oreille interne par la chaîne des osselets. Celle-ci comprend le marteau, fixé par son manche sur le versant supérieur du tympan, l'enclume et l'étrier, dont la plaque s'insère dans la fenêtré ovale où elle est maintenue par un ligament annulaire élastique. Elle se comporte comme un levier qui pivote autour d'un axe passant par la tête du marteau et la tête de l'enclume. L'articulation entre les deux étant, chez l'Homme, assez rigide, tandis que la liaison de la base de l'enclume avec l'étrier est une rotule très mobile. Les oscillations du tympan se traduisent alors par un mouvement de piston de la plaque de l'étrier. Le rôle de ces osselets est donc d'amplifier mécaniquement les vibrations de la membrane du tympan et de les transmettre à l'oreille interne.

Cette dernière est formée de deux groupes d'organes : l'organe de l'audition, la cochlée ; et les organes de l'équilibre, comprenant le vestibule et les canaux semi-circulaires.

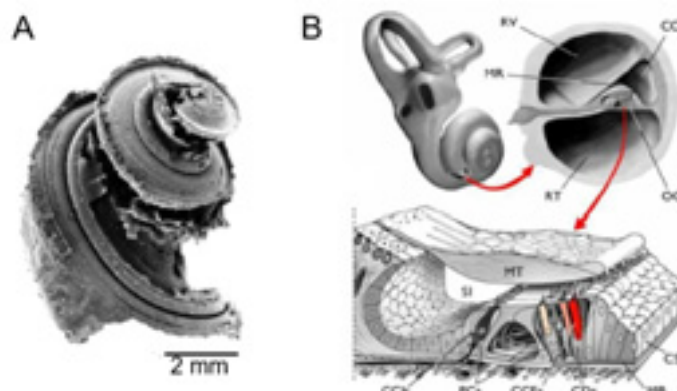


Figure 8 Organisation de la cochlée. A. Cochlée de rat en microscopie à balayage (par M. Lenoir). B. En haut, section du tour basal d'une cochlée humaine. RV : rampe vestibulaire ; RT : rampe tympanique ; MR : membrane de Reissner ; CC : canal cochléaire ; OC : organe de Corti. En bas, organisation de l'organe de Corti dans son ensemble ; SI : sillon interne ; MT : membrane tectoriale ; CCLs : cellules ciliées internes ; PCs : Piliers de Corti ; CCEs : cellules ciliées externes ; CDs : cellules de Deiters ; MB : membrane basilaire ; CSs : cellules de soutien.

Introduction

La cochlée est formée d'un tube osseux enroulé sur lui-même autour d'un axe creux et de section progressivement décroissante (Figure 8A). La longueur de cette cochlée de la base à l'apex (sommet de la cochlée) est d'environ 5 mm. La face interne de la paroi osseuse est recouverte d'un revêtement membraneux qui forme le tube limacéen qui est divisé en trois parties : les rampes vestibulaires, tympaniques et le canal cochléaire. La rampe vestibulaire est séparée du canal cochléaire par la membrane de Reissner et répond à la fenêtré ovale tandis que la rampe vestibulaire est séparée par la membrane basilaire et répond à la fenêtré ronde. Ces deux rampes sont remplies de liquide cortilymphatique de nature perilymphatique. Le canal cochléaire est délimité par les membranes basilaire et de Reissner et contient un grand nombre d'éléments formant l'organe de Corti (Figure 8B, en haut à droite), rempli de liquide endolympatique qui présente une composition ionique différentes des autres cellules avec une concentration élevée en K^+ (Morgenstern et al., 1982). La périlymphe se compose, lui, d'un milieu riche en Na^+ à l'inverse de l'endolymphe. Il existe donc une différence de potentiel entre l'endolymphe et la périlymphe comprise entre 80 et 110 mV, l'endolymphe étant positive par rapport à la périlymphe.

L'organe de Corti se compose d'éléments de soutien rigides : les piliers de Corti qui sont fixés à leur base sur la membrane basilaire et réunis à leur sommet ; des cellules de soutien telles que les cellules de Deiters, de Hensen et de Claudius ; mais se compose également de cellules nerveuses et de la membrane tectoriale.

Les cellules nerveuses sont les cellules ciliées internes (une rangée) et les cellules ciliées externes (trois ou quatre rangées) qui sont disposées de la base à l'apex de la cochlée en rangées parallèles et portent en leur sommet trois rangées de stéréocils reliés entre eux par différents types de liens apicaux et latéraux. L'extrémité des cellules ciliées externes portant les stéréocils les plus longs sont insérés dans la membrane tectoriale. Le potentiel de repos des cellules ciliées, par rapport à la périlymphe, est de -90 mV.

Les cellules ciliées, à leur pôle basal, sont connectées à des terminaisons nerveuses provenant de neurones dont les corps cellulaires sont localisés dans le ganglion spiral, lui-même situé dans l'axe de la cochlée et formant ainsi le système afférent radial. 90% des fibres constituant ces afférences établissent des contacts synaptiques avec les cellules ciliées internes. Chaque cellule ciliée interne reçoit une dizaine de fibres provenant du ganglion spiral mais chaque fibre du ganglion spiral n'innerve qu'une

Introduction

seule cellule ciliée. A l'inverse, chaque fibre du ganglion spiral innervant les cellules ciliées externes (10% des fibres), innerve plusieurs d'entre elles. De ce fait les cellules ciliées externe, bien que plus nombreuses, ne participent que très faiblement à la transmission auditive (Kim, 1986).

Transmission et réception sonores

L'oreille externe a pour rôle de capter les sons qui se propagent dans l'air et de les diriger vers la face externe de la membrane du tympan par augmentation de la pression. La membrane tympanique qui obture le fond du conduit auditif externe reçoit les vibrations sonores et les transmet aux osselets. Ces derniers, par un système de levier, font parvenir à la fenêtre ovale les vibrations sonores. Les vibrations de la fenêtre ovale sont transmises à la fenêtre ronde par l'intermédiaire des différents types de rampes. La mise en mouvement des fluides qui composent les rampes provoque la déformation des membranes qui limitent le canal cochléaire. Le mouvement relatif de la membrane basilaire et de la membrane tectoriale, provoque un fléchissement rythmique des cils des cellules réceptrices qui seront codés en un message sensoriel.

Grâce à des enregistrements électrophysiologiques, il a été démontré que les cellules ciliées provoquaient une variation du potentiel de repos en fonction du mouvement des stéréocils (Holton and Hudspeth, 1986). Une inclinaison des cils dans un sens induit une dépolarisation et, à l'inverse, une inclinaison dans le sens opposé provoque une hyperpolarisation. Il y a donc une oscillation du potentiel lors d'un mouvement vibratoire. La dépolarisation observée lors de mouvements des stéréocils, est due à la formation d'un courant entrant de K^+ . Ce courant est obtenu à la suite de l'ouverture de canaux mécanosenseurs spécifiques localisés dans la partie apicale des stéréocils. La force motrice du potassium entre l'endolymphe qui entoure ces stéréocils et le milieu intracellulaire favorise l'entrée de potassium dans les cellules ciliées. Cette entrée dans la cellule entraîne donc une dépolarisation de la membrane plus ou moins importante en fonction de l'intensité du son. Elle entraîne également l'ouverture de canaux Ca^{2+} tensio-dépendants localisés sur la membrane latérale des cellules ciliées. En plus du courant potassique entrant, il y a donc un courant calcique entrant qui s'établit, accentuant la dépolarisation. L'entrée de calcium induit l'ouverture de canaux potassiques Ca^{2+} dépendants provoquant la sortie d'ions K^+ , puisque la concentration

Introduction

intracellulaire devient supérieure à celle de la périlymphe. Par conséquent, cet efflux provoque la repolarisation de la cellule ciliée (Figure 9) (Hudspeth, 1985).

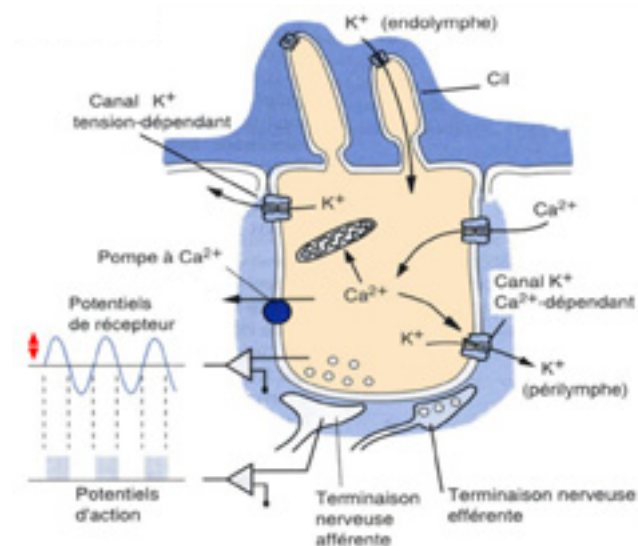


Figure 9 Cycle de dépolarisation-repolarisation de la cellule ciliée. Le mouvement des cellules ciliées entraîne une entrée de potassium et donc une dépolarisation. Le retour à l'état de repos entraîne une repolarisation par l'activation de canaux K^+ sensible au voltage et de canaux K^+ Na^{2+} -dépendant. (d'après Hudspeth, 1985)

Dans le cas des cellules ciliées externes, les variations de potentiels dues à la dépolarisation et à la repolarisation entraînent un changement de leurs propriétés mécaniques, en particulier la longueur de leurs cils. Quand elles sont dépolarisées, ces cellules raccourcissent et se rallongent lors de la repolarisation (Ashmore, 1987). Cette modification de la taille des cellules ciliées externes est due à la présence de prestine, qui est une protéine motrice présente à forte concentration dans les cellules ciliées externes (Zheng et al., 2000) dont la forme est influencée par le potentiel. Ces phénomènes permettraient de moduler la fréquence de résonance locale et donc la sensibilité des cellules ciliées internes. Ces cellules ciliées externes jouent donc un rôle d'oscillateurs qui amplifient très localement la vibration de la membrane basilaire.

Pour les cellules ciliées internes, le passage de l'excitation de ces cellules aux terminaisons afférentes s'effectue principalement grâce à la libération de L-glutamate (Altschuler et al., 1989). Ce glutamate libéré grâce à la dépolarisation des cellules ciliées, peut alors se lier sur les récepteurs post-synaptiques, par exemple sur les

Introduction

récepteurs NMDA ou AMPA qui sont des récepteurs ionotropiques assurant une transmission rapide. C'est alors qu'une dépolarisation des terminaisons nerveuses des fibres qui innervent les cellules ciliées internes a lieu. L'information auditive est alors codée en fréquence et transmise au cortex auditif par le biais du tronc cérébral et du thalamus.

5.2.2 Rôle des récepteurs P2X dans l'audition

Le récepteur P2X2 est abondamment exprimé dans l'appareil auditif. En 2000, l'équipe de Peter R. Thorne a réalisé une étude immunohistochimique sur des coupes de cochlée afin d'en décrire la localisation des récepteurs P2X2 (Järleback et al., 2000). Ils démontrent que ces récepteurs sont majoritairement présents dans les cellules tapissant le canal cochléaire, y compris dans les stéréocils des cellules ciliées, suggérant que les récepteurs P2X2 sont impliqués dans l'homéostasie cochléaire et dans la transduction du son. En effet, la présence d'ATP permet aux récepteurs P2X2 de réguler l'électromobilité des cellules ciliées externes (Yu and Zhao, 2008) et le recyclage du potassium (Zhu and Zhao, 2012). De plus, il a été démontré que lors de sons de forte intensité, de l'ATP est libéré dans le canal cochléaire : l'exposition de cobayes à 110 dB pendant 15 min provoque un doublement de la concentration en ATP dans l'endolymphe (Muñoz et al., 2001). Cette augmentation provoque une chute du potentiel endocochléaire. La mesure du potentiel endocochléaire suite à une microinjection d'ATP dans le canal cochléaire permet de mettre en évidence que cet ATP induit une chute significative de 42% de ce potentiel (Figure 10) (Thorne et al., 2004).

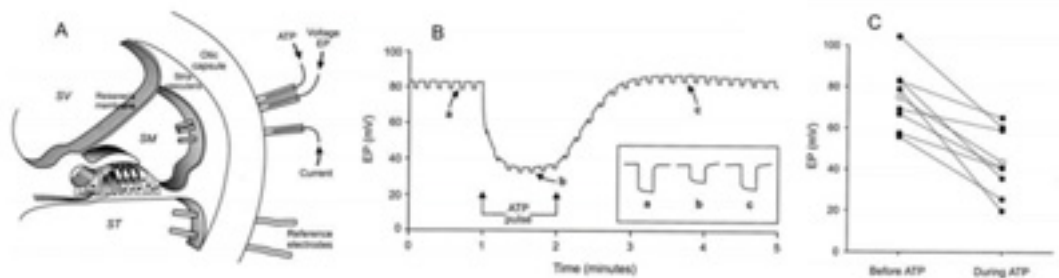


Figure 10 Influence de l'ATP sur le potentiel endocochléaire. A. Schéma de la microinjection d'ATP dans le canal cochléaire et de la mesure du potentiel endocochléaire (EP). B. Enregistrement du EP en fonction du temps, avant, pendant et après application d'ATP. C. Comparaison de la valeur du EP avant et pendant ATP pour chaque expérience. (Thorne et al., 2004)

Cette présence d'ATP va permettre l'activation des récepteurs P2X2 bordant les stéréocils des cellules ciliées qui baignent dans l'endolymphe. L'activation de ces récepteurs induit alors un rapide « court-circuit » du potassium lorsque celui-ci entre dans les cellules ciliées ce qui va rapidement provoquer cet effondrement du potentiel endocochléaire diminuant ainsi la sensibilité auditive. Les récepteur P2X2 peuvent ainsi limiter les dommages dus à la surstimulation sonore de la cochlée (Housley et al., 2002). Cette perte temporaire de l'ouïe due au déplacement du seuil auditif, est un mécanisme autoprotecteur contre la surstimulation. Cependant le mécanisme de cette autoprotection est encore inconnu.

L'étude immunohistochimique révèle également une expression étendue du récepteur P2X2 dans les cellules de soutien, en particulier dans les cellules de Deiters. Ce résultat concorde avec l'idée que la signalisation extracellulaire de l'ATP est impliquée dans le mécanisme cochléaire. La présence de P2X2 dans la strie vasculaire (composée des cellules épithéliales) implique un rôle dans la maturation cochléaire. Enfin, les récepteurs P2X2 se retrouvent dans le ganglion spiral et dans les synapses des cellules ciliées suggérant une implication importante dans l'innervation de l'épithélium et dans la neurotransmission auditive.

L'importance du récepteur P2X2 dans le processus d'audition a notamment été confirmée à la suite de découvertes de mutations localisées sur le gène de ce récepteur. Ces mutations, V60L et G353R entraînent une surdité non-syndromatique

Introduction

dominante chez les patients (Faletra et al., 2014; Yan et al., 2013) par un mécanisme non élucidé.

Les récepteurs P2X2 sont la principale sous-unité exprimée dans la cochlée. Cependant, d'autres sous-unités peuvent être retrouvées, notamment P2X1 et P2X4 dans les cellules ciliées externes avec une distribution homogène. Une faible expression de récepteurs P2X7 est également retrouvée dans la partie basale de ces cellules ciliées (Szücs et al., 2004).

5.3 Pharmacologie des récepteurs P2X

La grande diversité des rôles physio-pathologiques des récepteurs P2X peut être expliquée par les différences pharmacologiques des différentes sous-unités.

5.3.1 Cycle d'activation des récepteurs P2X

Tous les récepteurs canaux P2X ont le même fonctionnement de base. Leur activation résulte du passage d'un état fermé à un état ouvert suite à la liaison de l'ATP dans son site de fixation. Cette ouverture se fait avec un temps très court, de l'ordre de la milliseconde, et est suivie soit d'une désensibilisation, qui correspond à un réarrangement structural de la protéine avec l'ATP présent dans le site de fixation, soit à une désactivation qui correspond à une fermeture avec une sortie de l'ATP de son site de fixation (Figure 11).

Introduction

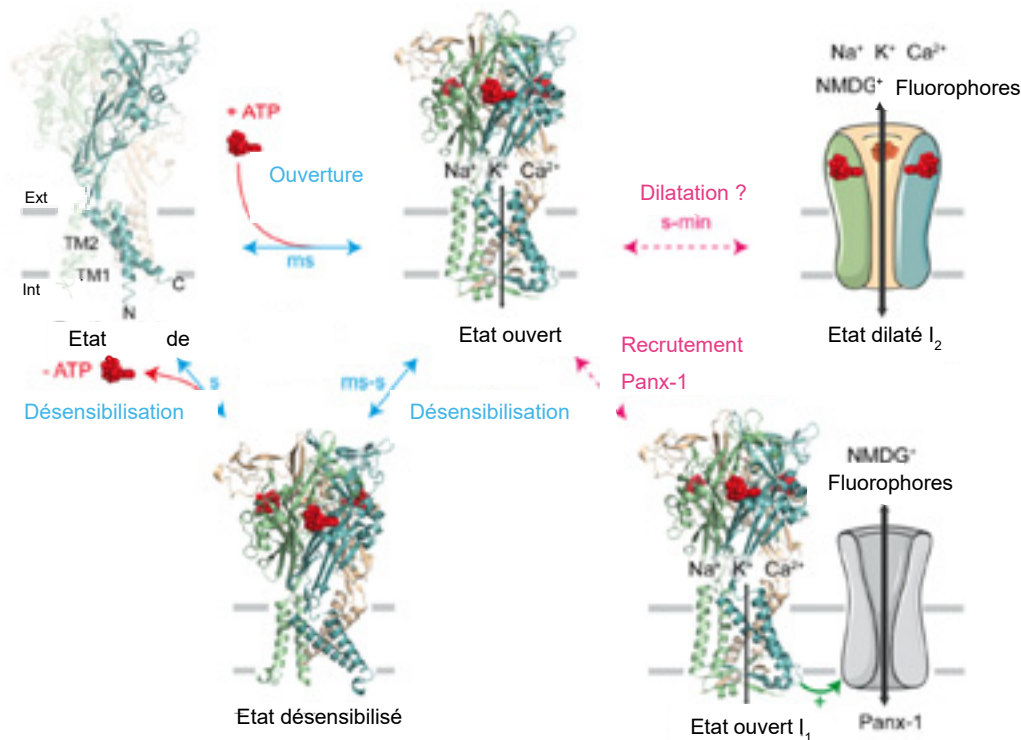


Figure 11 Cycle d'ouverture des récepteurs P2X

Les concentrations efficaces médianes d'ATP qui mènent à cette ouverture sont variables d'une sous-unité à l'autre. En effet, si l' EC_{50} moyen des récepteurs P2X de rat est entre 10 et 30 μM , elles sont seulement de 0,07 μM pour le récepteur P2X1 et de 0,5 μM pour P2X3, à l'inverse celle de P2X7 est supérieure à 100 μM (Soto et al., 1997). L'ouverture du pore permet, pour tous les P2X, la perméation de cations Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . Toutefois, là encore, des différences apparaissent entre les homomères. Le récepteur P2X5 a la particularité d'être également perméable aux ions chlorures (Bo et al., 2003). Les perméabilités relatives de ces cations sont différentes d'un homomère à l'autre, par exemple la perméabilité calcique relative par rapport au sodium est de 4,8 pour P2X1, de 2,5 pour P2X2, 1,2 pour P2X3 et de 4,2 pour P2X4 (North, 2002).

Chaque récepteur P2X présente ses propres cinétiques de désensibilisation et peuvent ainsi être classé en trois groupes : les récepteurs P2X1 et P2X3 qui présentent une forte désensibilisation ; les récepteurs P2X2, P2X4 et P2X5 qui ont une

Introduction

désensibilisation relativement lente ; et le récepteur P2X7, classé à part, qui montre une lente voire l'absence de désensibilisation (Figure 12).

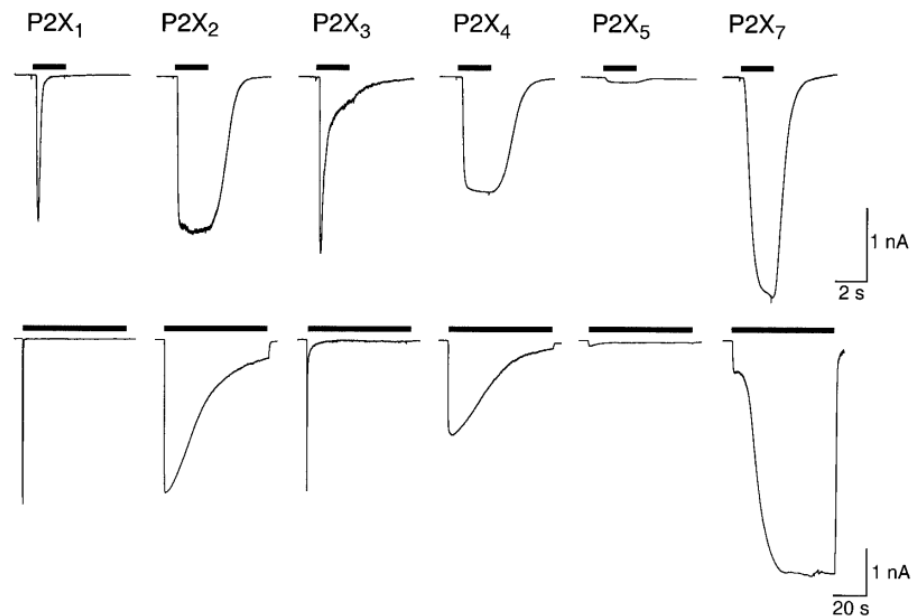


Figure 12 Profiles de désensibilisation des différents homomères de P2X. Désensibilisation induite après une courte application d'ATP (en haut) ou après une longue application (en bas). (North, 2002)

5.3.2 L'assemblage hétéromérique

Les récepteurs P2X en plus de leur forme homomérique, peuvent être fonctionnels sous forme hétéromérique. Toutes les sous-unités sont capables de former des hétéromères. Cependant, seuls quelques hétéromères sont retrouvés *in vivo*. C'est le cas des hétéromères P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5, P2X2/3, P2X2/5, P2X2/6, P2X4/6 et P2X4/7 (Saul et al., 2013).

L'hétéromère P2X1/2

La possibilité d'obtenir l'hétéromère P2X1/2 a été confirmée par sa co-purification dans des ovocytes de *Xenopus* (Aschrafi et al., 2004; Marquez-Klaka et al., 2009). Des études de radioactivité suggèrent que la stœchiométrie d'assemblage serait deux

Introduction

sous-unités P2X2 et une sous-unité P2X1 (Aschrafi et al., 2004). Electrophysiologiquement, la distinction la plus simple des homomères P2X1 et P2X2 de l'hétéromère P2X1/2 peut se faire par l'utilisation de solutions ATP à différents pH, les profils obtenus par des agonistes étant trop proche (Brown et al., 2002).

Les preuves de la présence de cet hétéromère dans les tissus natifs sont toutefois peu développées. Les sous-unités P2X1 et P2X2 sont largement distribuées et se chevauchent dans de nombreux tissus (Burnstock and Knight, 2004), par exemple dans les muscles lisses vasculaires. Les niveaux d'expression des deux sous-unités sont différents, suggérant qu'il n'y a qu'une faible contribution de l'hétéromère. Des études de patch-clamp et d'imagerie calcique sur cellules entières de neurones sympathiques de souris ont révélé des courants de type P2X2 et une population de récepteurs sensible à l' α,β -meATP, absente chez les souris P2X1 déficient (Calvert and Evans, 2004). Ce courant sensible à l' α,β -meATP est inhibé en présence de Ca^{2+} et à des pH basiques. Il s'en déduit qu'il y a bien hétéromère composé de sous-unité P2X1 et P2X2.

L'hétéromère P2X1/4

L'hétéromérisation entre les sous-unités P2X1 et P2X4 co-exprimées a été décrite dans une étude biochimique et électrophysiologique sur des sous-unités P2X1 et P2X4 exprimées par les ovocytes de *Xenopus* (Nicke et al., 2005). Les expériences de voltage-clamp à deux électrodes ont révélé des récepteurs P2X fonctionnels ayant des propriétés cinétiques ressemblant à des homomères P2X4 et un profil pharmacologique similaire aux récepteurs P2X1 homomères. Ainsi, l'application d' α,β -meATP entraîne un courant lentement désensibilisant sensible aux antagonistes suramine et TNP-ATP. Ces résultats suggèrent de manière fonctionnelle la formation de l'hétéromère. La co-expression des deux sous-unités a été trouvée dans les cellules musculaires lisses des artères de résistance rénale (Harhun et al., 2010). L'hétéromère P2X1/4 est également impliqué dans les contractions neurogéniques de la vessie (Kennedy et al., 2007) et pourrait probablement aussi jouer un rôle dans le muscle lisse de l'artère coronaire (Conant et al., 2008) et les érythrocytes (Skals et al., 2009).

Introduction

L'hétéromère P2X1/5

L'existence biochimique de l'hétéromère P2X1/5 a pu être révélée après co-transfection des deux sous-unités dans des cellules HEK293 (Lê et al., 1999; Torres et al., 1998b). L'hétéromère P2X1/5 présente des propriétés fonctionnelles distinctes fournissant des caractéristiques claires pour son identification, notamment un profil d'activation en ATP spécifique en deux phases avec un pic de désensibilisation puis un courant plateau qui ne désensibilise pas (Surprenant et al., 2000) et par l'utilisation de l'antagoniste suramine (Rettinger et al., 2005). La présence d'hétéromères P2X1/5 a été démontrée dans des astrocytes corticaux isolé (Lalo et al., 2008). Il pourrait y jouer un rôle dans l'excitabilité astrocytaire (Ase et al., 2010).

L'hétéromère P2X2/3

L'hétéromère P2X2/3 fut le premier à être identifié de manière fonctionnelle et biochimique (Lewis et al., 1995). Jusqu'à présent, il est l'hétéromère P2X le mieux caractérisé et il existe des preuves solides de son expression in vivo dans les neurones sensoriels et de son rôle fonctionnel dans la neurotransmission sensorielle (Khakh and North, 2012). La stœchiométrie d'assemblage hétéromérique a également été déterminée comme étant deux sous-unités P2X3 et une sous-unité P2X2 (Jiang et al., 2003; Wilkinson et al., 2006a). Il se distingue des homomères P2X2 et P2X3 en présentant des courants non désensibilisants en présence de l'agoniste α,β -meATP alors que l'homomère P2X2 n'y est pas sensible et que P2X3 présente des courants désensibilisants en présence de cette molécule (Lewis et al., 1995). Des études sur des souris P2X2/P2X3 déficientes ont démontré et confirmé la présence de l'hétéromère dans les neurones sensoriels et dans la fibre nerveuse afférente de la vessie (Cockayne et al., 2005). Ils sont impliqués dans la neurotransmission sensorielle et dans la sensation de douleur (Burnstock et al., 2011).

L'hétéromère P2X2/5

L'hétéromère P2X2/5 est pour le moment le dernier hétéromère à avoir été découvert. Des études de co-immunoprécipitation, de transfert d'énergie par résonance

Introduction

bioluminescente et de fluorescence bi-fonctionnelle ont prouvé son existence (Compan et al., 2012). Ces études ont montré que la stœchiométrie d'assemblage était aléatoire et peut comporter deux sous-unités P2X2 ou deux sous-unités P2X5. Des études de co-immunoprécipitation sur des extraits protéiques de cerveaux et de tronc cérébrale et d'immunohistochimie de ganglions de la racine dorsale, de neurones de la moelle épinière et du noyau mésencéphalique de souris a suggéré l'existence *in situ* de l'hétéromère P2X2/5 dans ces tissus (Compan et al., 2012).

L'hétéromère P2X2/6

La formation de l'hétéromère P2X2/6 a biochimiquement été mis en évidence par co-immunoprécipitation (Torres et al., 1999) et par électrophorèse (Hausmann et al., 2012). La stœchiométrie d'assemblage dépend du taux d'expression de chaque sous-unité. Lorsque l'expression de P2X2 prédomine les récepteurs contiennent principalement deux sous-unités P2X2 et une P2X6 alors qu'à l'inverse quand l'expression de P2X6 prédomine, le récepteur est composé de deux sous-unités P2X6 et une P2X2 (Barrera et al., 2007). Sa fonctionnalité a été démontrée en 2000, dans des ovocytes de *Xenopus* (King et al., 2000). L'expression des sous-unités P2X6 seules ne permet pas l'obtention de canaux fonctionnels. La co-expression des deux sous-unités a entraîné des courants induits par l'ATP qui ont une cinétique d'activation rapide et de désensibilisation lente similaire à celle de P2X2, mais ont présenté une diminution du courant en deux phases lors du lavage de l'ATP. Il pourrait être impliqué dans la différenciation neuronale, puisqu'une régulation simultanée de l'expression P2X2 et P2X6 a lieu (Resende et al., 2008; Schwindt et al., 2011).

L'hétéromère P2X4/6

L'obtention de l'hétéromère P2X4/6 a été réalisé dans les cellules HEK293 (Lê et al., 1998). Lors de la co-expression des sous-unités P2X4 et P2X6 dans les ovocytes de *Xenopus*, les récepteurs obtenus ont montré une sensibilité trois à cinq fois supérieure aux agonistes α,β -meATP et 2MeSATP comparée à celle de P2X4. Une amplitude de courant différente de P2X4 seul est également observée (Lê et al., 1998). Un marquage immunologique a mis en évidence la présence des deux sous-unités dans

Introduction

les épines dendritiques, suggérant la présence de l'hétéromère (Rubio and Soto, 2001) et un rôle possible dans la modulation de la transmission synaptique. Ces deux sous-unités sont aussi retrouvées dans les cellules épithéliales de différents organes, respiratoires et ombilicales par exemple. Par conséquent, il a été suggéré que l'hétéromère P2X4/6 pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'influx de Ca^{2+} en restaurant la sécrétion de Cl^- à travers l'épithélium des voies respiratoires. Une colocalisation des sous-unités P2X4 et P2X6 avec la VE-cadhérine dans les jonctions cellulaires de cellules endothéliales ombilicales humaines a été démontrée, suggérant une implication dans la modulation des processus d'adhésion cellulaire par la signalisation Ca^{2+} (Glass et al., 2002).

L'hétéromère P2X4/7

Les preuves biochimiques d'une association des sous-unités P2X4 et P2X7 ont été fournies à l'origine par une co-immunoprécipitation à partir de cellules HEK transfectées et de macrophages dérivés de la moelle osseuse (Guo et al., 2007). La co-expression de ces deux sous-unités réduit les courants P2X7 et lui confère une sensibilité à l'ivermectine et au TNP-ATP. Sa présence a notamment été caractérisée dans les cellules ciliées de voies aériennes de lapin (Ma et al., 2006). Toutefois, ces résultats sont controversés et des études ont remis en question l'existence de cet hétéromère (Antonio et al., 2011; Nicke, 2008). En effet, malgré l'obtention d'une co-immunoprécipitation après une co-transfection de chacune des deux sous-unités, l'utilisation du disuccinimidyl suberate comme agent de réticulation chimique n'a pas permis de mettre en avant la formation d'hétéromères entre P2X4 et P2X7. Une étude récente semble, au contraire, confirmer la présence de cet hétéromère, notamment par une technique de FRET et révèle que la coexpression des sous-unités ne donne pas lieu à un profil électrophysiologique discernable des autres P2X (Schneider et al., 2017).

5.3.3 Les agonistes

Il n'existe pas d'agonistes sélectifs des récepteurs P2X. Outre l'agoniste naturel, ils peuvent être activés par d'autres molécules. La plupart des agonistes de ces récepteurs sont des dérivés d'ATP en raison d'une activité très restrictive des récepteurs P2X. Ces agonistes agissent sur plusieurs P2X avec des efficacités différentes. Les modifications structurales de l'ATP qui mènent à des agonistes fonctionnels sont localisées au niveau de l'adénine, du ribose et des groupements phosphates (Figure 13).

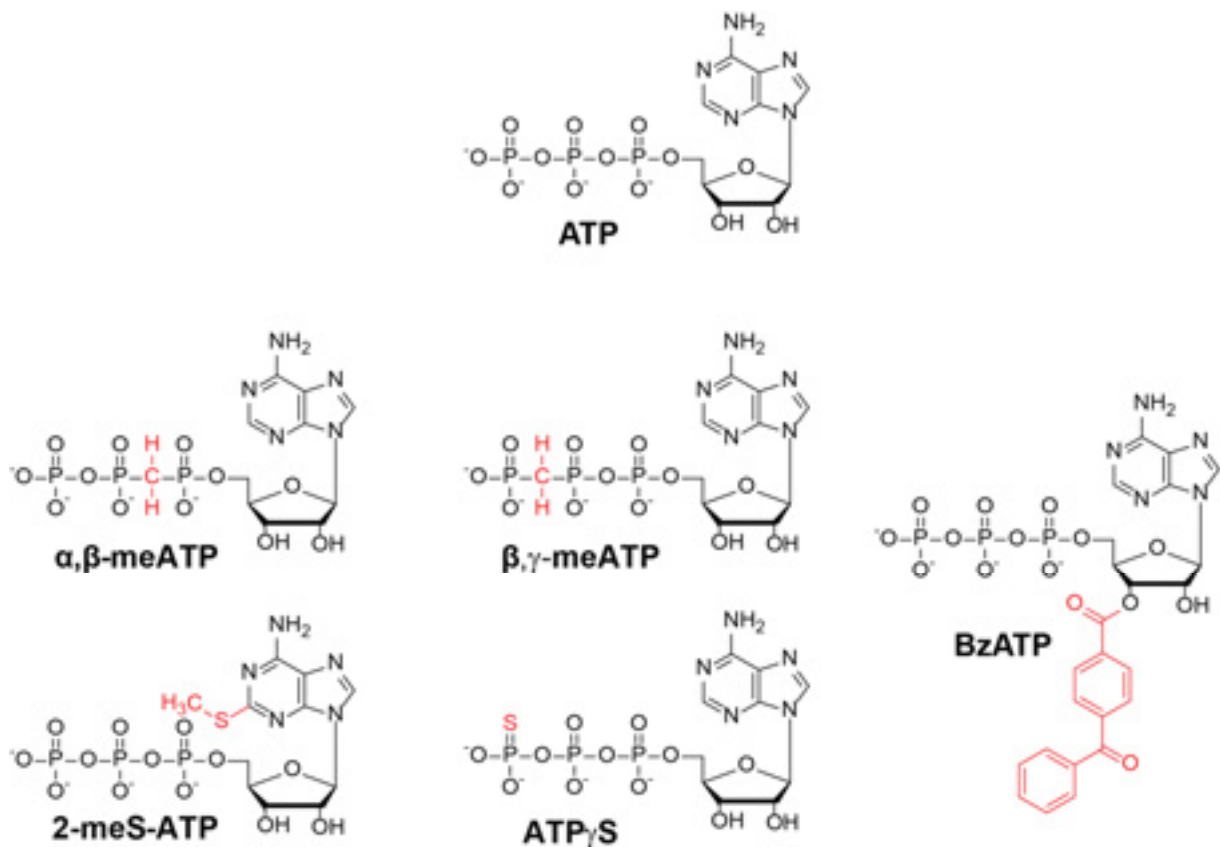


Figure 13 Structures chimiques de quelques agonistes de P2X dérivés d'ATP

La modification du triphosphate a généré plusieurs analogues qui sont des agonistes puissants des récepteurs P2X. Par exemple, le α,β-meATP et le β,γ-meATP sont des analogues d'acide phosphonique de l'ATP dans lesquels l'atome liant les phosphates

correspondants est remplacé par le groupement méthylène. Ces deux agonistes actives principalement les récepteurs P2X1 et P2X3 (Bianchi et al., 1999). La substitution d'un atome de soufre au niveau des phosphates terminaux conduit à plusieurs analogues dont l'ATP γ S. Cet agoniste active tous les P2X sauf le P2X7. La substitution du cycle adénine a entraîné la formation de 2-meS-ATP, l'agoniste le plus puissant des récepteurs P2X. Enfin, le BzATP, dérivé du ribose modifié, est un agoniste commun de ces récepteurs avec une efficacité particulière pour le récepteur P2X7 (Jarvis and Khakh, 2009).

5.3.4 Les antagonistes

Les antagonistes des récepteurs P2X (Figure 14) sont quant à eux de nature plus variée puisqu'ils se composent de molécules organiques qui peuvent être des dérivés de nucléotides ou non. Parmi les antagonistes généralement utilisés sur les récepteurs P2X, la suramine et le dérivé pyridoxal phosphate PPADS sont ceux les plus utilisés et les plus anciens.

La suramine et ses dérivés sont des urées polysulfatées symétriques. Cependant en plus des récepteurs P2X, elle inhibe les autres récepteurs purinergiques et certaines protéines G. Ses analogues NF449 et NF770 sont quant à eux plus spécifiques avec une haute sélectivité du récepteur P2X1 pour le premier (Kassack et al., 2004) et modérément sélectif de P2X2 pour le deuxième (Wolf et al., 2011). Il existe trois autres dérivés de suramine, le NF023, NF279 et NF864, qui vont également préférer P2X1 (Horner et al., 2005; Klapperstück et al., 2000; Soto et al., 1999).

Le PPADS est un dérivé du pyridoxal phosphate non-sélectif et agit de manière non-compétitive sur les récepteurs P2X1, P2X2, P2X3 et P2X5 (Collo et al., 1996). Toutefois, des analogues tels que MRS2220 spécifique de P2X1, MRS2257 sélectifs de P2X1 et P2X3 et MRS2159 sélectif de P2X1, P2X3 et P2X7 ont été développés et sont efficaces (Coddou et al., 2011).

L'analogue nucléotidique TNP-ATP est un antagoniste compétitif avec une affinité de l'ordre du nanomolaire pour les récepteurs P2X1, P2X3 et P2X2/3 (Virginio et al., 1998) et une affinité micromolaire pour les récepteurs P2X2 et P2X4 (King et al., 1997).

Introduction

D'autres molécules peuvent inhiber les récepteurs P2X. Par exemple, les dérivés de « reactive blue 2 » qui est un acide anthraquinone sulfonique, est un antagoniste des récepteurs P2, mais son efficacité est limitée. Des études ont néanmoins montré un blocage des réponses médiées par les récepteurs P2X dans les ganglions cervicaux chez le rat (Connolly and Harrison, 1994), dans le ganglion coélique du cobaye (Khakh et al., 1995) grâce à son utilisation. Des dérivés de cet antagoniste, PSB1011 et PSB10211, semblent quant à eux cibler les récepteurs P2X2 (Baqi et al., 2011).

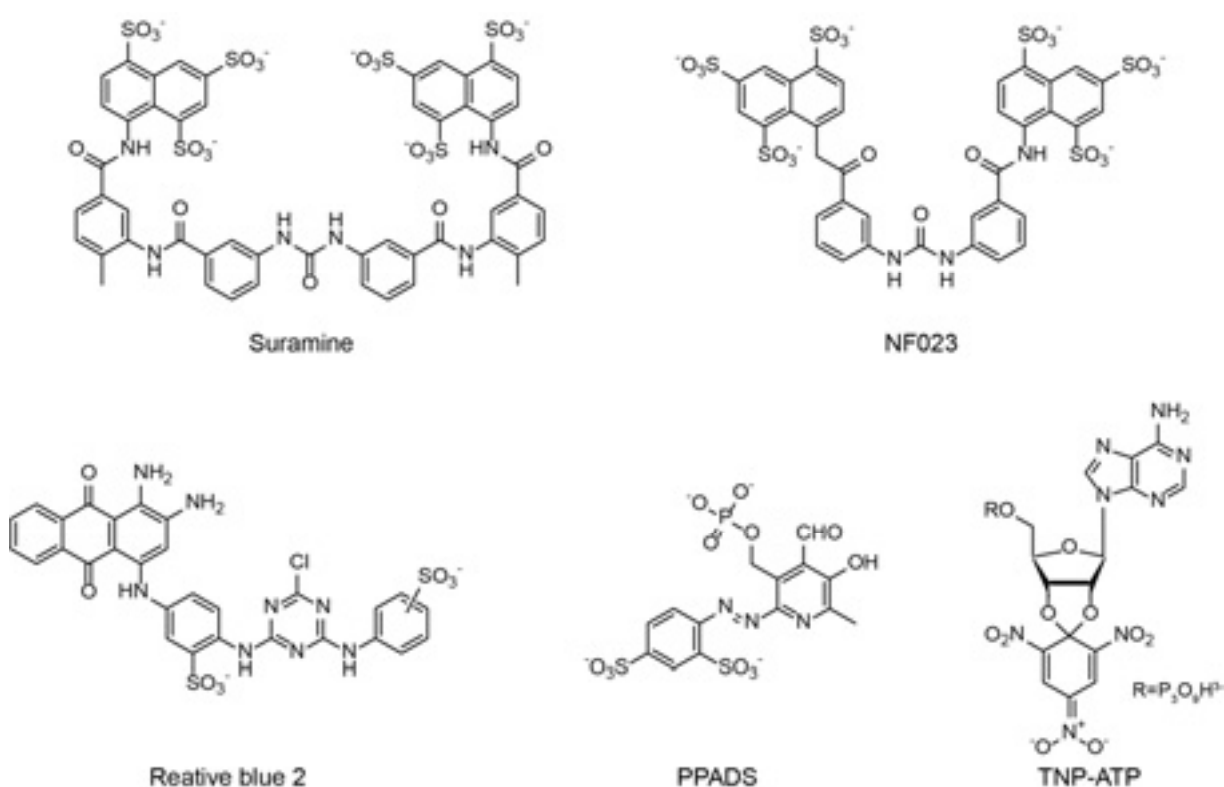


Figure 14 Structures chimiques de quelques antagonistes des récepteurs P2X.

Les récepteurs P2X1 et P2X3 sont également sensibles à l'antagoniste IpsI . Un autre antagoniste, A-317491, est une molécule non-nucléotidique sélective des récepteurs P2X3 et de la forme hétéromérique P2X2/3 (Jarvis et al., 2002).

5.3.5 Les modulateurs allostériques

L'activité des récepteurs P2X peut également être influencée par la présence de modulateurs allostériques agissant sur des sites localisés à distance du site de fixation de l'ATP.

Certains récepteurs P2X sont sensibles à certains métaux tels que Mg^{2+} qui inhibe l'activité des récepteurs P2X1, P2X3 et P2X7 alors qu'il n'a que de faibles effets sur P2X2 et sur l'hétéromère P2X2/3 (Li et al., 2013). C'est le cas également du Zn^{2+} et du Cu^{2+} qui modulent de manière allostérique les récepteurs P2X. Par exemple, P2X1 et 7 sont inhibés par la présence de Zn^{2+} , alors qu'il a des effets opposés en fonction de sa concentration sur les récepteurs P2X2, P2X3, P2X4 et P2X5. A de faible concentration, Zn^{2+} a un effet potentiateur sur ces récepteurs alors qu'à de fortes concentrations, il les inhibe (Coddou et al., 2011). Tout comme Zn^{2+} , Cu^{2+} module le récepteur P2X2 de rat de manière biphasique en présence d'une concentration saturante d'ATP. En revanche, il inhibe, pour toutes concentrations, l'homologue humain (Coddou et al., 2011). Les ions Ca^{2+} peuvent entraîner à des concentrations supérieures à 10 mM des courants inhibés sur les récepteurs P2X2, P2X3 et P2X7.

L'acidité du milieu extracellulaire peut également avoir une influence sur l'activité des récepteurs. Elle inhibe tous les homomères de P2X à l'exception de P2X2, ce qui fait de cette propriété un bon outil pour le discriminer des autres homomères.

Enfin, des molécules organiques, telle que l'ivermectine, peuvent avoir une influence sur les courants obtenus par les récepteurs P2X. L'ivermectine est un antiparasitaire dérivé de lactone macrocyclique ayant un effet potentiateur sur P2X4 aussi bien en homomère que sous sa forme hétéromérique (Khakh et al., 1999b). L'ivermectine est donc largement utilisée pour caractériser la présence d'une sous-unité P2X4. Son effet potentiateur est dû potentiellement à une diminution de l'endocytose de ces récepteurs (Toulmé et al., 2006) ou à la stabilisation de l'état ouvert (Priel and Silberberg, 2004). Son site de fixation se situe à l'interface des domaines transmembranaires TM1 et TM2 (Latapiat et al., 2017). Il a été mis en évidence par le biais d'études sur des chimères P2X2/P2X4 dans cette zone (Jelínková et al., 2006), de mutagénèse dirigée par l'introduction de cystéines ou de tryptophanes (Jelínková et al., 2008; Silberberg et al., 2007) ou encore via la mise en évidence de l'importance du résidu W46 dans

Introduction

l'efficacité de l'ivermectine (Popova et al., 2013). Enfin, les résidus proches des fenestrations latérales semblent également être impliquée dans la potentiation induite par l'ivermectine (Gao et al., 2015).

La progestérone est un autre potentiateur dont le mécanisme d'action est rapide, sélectif des récepteurs P2X2 faisant de cette molécule un outil intéressant pour l'étude de la distribution et des rôles de l'homomère P2X2. (De Roo et al., 2010).

	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X7
Agonistes (EC₅₀ µM)						
ATP	1	1-30	1	10	10	100
ADP	30	300	50	>100	300	>300
α,β-meATP	1-3	>300	1	>300	10	>300
β,g-meATP	10	>300	>300	>300	ND	>100
2-meSATP	1	3	0,3	10-100	10	10
ATPγS	10	1-30	1	ND	ND	
BzATP	3	30	5	>500	>500	3
Antagonistes (IC₅₀ µM)						
PPADS	1	1	1	>500	3	50
Suramine	1	10	3	>500		500
NF449	0,0005		3			40
NF770	0,94	0,019	0,074	>10		>10
NF023	0,2	0,1	1	>100		
NF279	0,02	0,75	1,6	>300		>300
TNP-ATP	0,006	1	0,001	15		
IP5I	0,003		2,8			
A-317491	10	50	0,22			
Composé pharmacologique (EC₅₀ µM)						
Ivermectine				0,25 (+)		
Ions divalents (EC₅₀ µM)						
Zn ²⁺		20 (+)		<10 (+) >30 (-)	1-100 (+)	<10 (-)
Ca ²⁺		87x10 ³ (-)	15x10 ³ (-)		7x10 ³ (-)	3x10 ³ (-)
Protons						
pH acide	-	+	-	-	-	-
pH basique		-				-

Tableau 1 Résumé des propriétés pharmacologiques des récepteurs P2X. (-) : inhibition et (+) : potentiation.
(Adapté de Gevert et al., 2006; Khakh et al., 2001; North and Surprenant, 2000)

5.3.6 Partenaires des récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont des complexes transmembranaires qui peuvent être associés à d'autres protéines. La partie C-terminale présente des longueurs et des natures d'acides aminés variables en fonction des sous-unités. Cette partie est impliquée dans le recrutement de protéines cytosoliques. Par exemple, le récepteur P2X2 peut interagir avec la protéine du cytosquelette β 3-tubuline dont les microtubules pourraient réguler ce récepteur (Gendreau et al., 2003) ou encore avec la protéine Fe65 qui est un précurseur de la β amyloïde co-localisé avec P2X2 et qui, *in vitro*, semble modifier les propriétés fonctionnelles du canal (Masin et al., 2006). Récemment, une interaction entre le récepteur P2X2 et le récepteur 5-HT₃ a été mise en évidence et est impliquée dans l'aide à l'adressage de ce dernier mais provoque aussi une inhibition réciproque des deux récepteurs (Emerit et al., 2016). Les récepteurs P2X peuvent également s'associer aux récepteurs gabaérgiques GABA_A et GABA_C. Dans les neurones des ganglions de la racine dorsale, les récepteurs P2X et GABA_A sont co-exprimés et modulent ensemble la libération de neurotransmetteurs (Labrakakis et al., 2003). De plus, dans la moelle épinière, une proportion significative de récepteurs P2X2 forment un complexe transitoire avec les récepteurs GABA_A, ce qui stabiliserait ces derniers et permettrait le co-adressage à la membrane (Shrivastava et al., 2011). La boucle intracellulaire des récepteurs GABA_C est capable d'interagir avec la partie C-terminale du récepteur P2X2 menant à une régulation fonctionnelle et au contrôle de l'activité synaptique (Boué-Grabot et al., 2004). Les récepteurs nicotiniques sont susceptibles de se lier entraînant une inhibition mutuelle dans les neurones myéliniques de cobaye (Zhou and Galligan, 1998). Enfin, les récepteurs P2X7 peuvent recruter les hémicanaux de type pannexine-1 pour former des complexes P2X7/PANX1 perméants à de grosses molécules allant jusqu'à 900 Da (Pelegrin and Surprenant, 2006). Ce complexe serait notamment impliqué dans la dépolarisation et la neuroinflammation (Chen et al., 2017).

Les récepteurs P2X sont modulés par les phospholipides membranaires et plus particulièrement par les phosphoinositides (PIP_n). Ils portent dans leur partie C-terminale deux blocs de résidus chargés positivement capables d'interagir avec ces PIP_n (Bernier et al., 2012). La mutation de ces acides aminés perturbe la fonctionnalité des récepteurs P2X. Ainsi, les récepteurs P2X1 (Bernier et al., 2008b), P2X2, P2X3

(Mo et al., 2009), P2X4 (Bernier et al., 2008a) et P2X7 sont potentialisés par la présence de PIP_n alors que P2X5 n'est pas influencé par leur présence ou absence (Ase et al., 2010).

5.4 Description structurale des récepteurs P2X

Depuis le clonage du premier récepteur P2X en 1994 (Brake et al., 1994; Valera et al., 1994), de nombreuses études ont été menées pour étudier la structure des récepteurs P2X. La résolution de la première structure cristallographique à haute résolution (3,1 Å) des récepteurs P2X a été réalisée en 2009 dans un état fermé du récepteur tronqué zfP2X4 (Kawate et al., 2009) et a été une avancée majeure dans la connaissance de ces récepteurs. Cette nouvelle structure a permis de confirmer les précédentes études structurales qui avaient été investiguées par le biais d'imagerie, de biologie moléculaire et biochimique, ainsi que des études électrophysiologiques et qui prédisaient un assemblage trimérique.

Depuis 2009, plusieurs études cristallographiques ont été publiées, dont celles de zfP2X4 dans un état fermé (avec une meilleure résolution de 2,9 Å) et ouvert (2,8 Å) (Hattori and Gouaux, 2012), de hP2X3 dans l'état fermé, ouvert et désensibilisé (Mansoor et al., 2016), du récepteur P2X7 de panda (3,5 Å) (Karasawa and Kawate, 2016) et de poulet (3,1 Å) (Kasuya et al., 2017), d'un récepteur P2X issu d'une variété de tique (Kasuya et al., 2016). Chacune de ces structures tendent vers une même structure globale des récepteurs. (Figure 15.A).

Leur large ectodomaine s'élève jusqu'à environ 70 Å au-dessus de la membrane et est suivi d'un domaine transmembranaire qui s'étend sur 28 Å au travers de la membrane. L'association de trois sous-unités forme le récepteur. Une sous-unité individuelle du récepteur P2X est assimilée à un dauphin sortant de l'eau. Ainsi, différents domaines d'une sous-unité composent ce dauphin : la tête, les nageoires dorsale, gauche et droite, le corps et la queue (Hattori and Gouaux, 2012). Cette comparaison imagée permet de distinguer structurellement chaque partie d'une sous-unité.

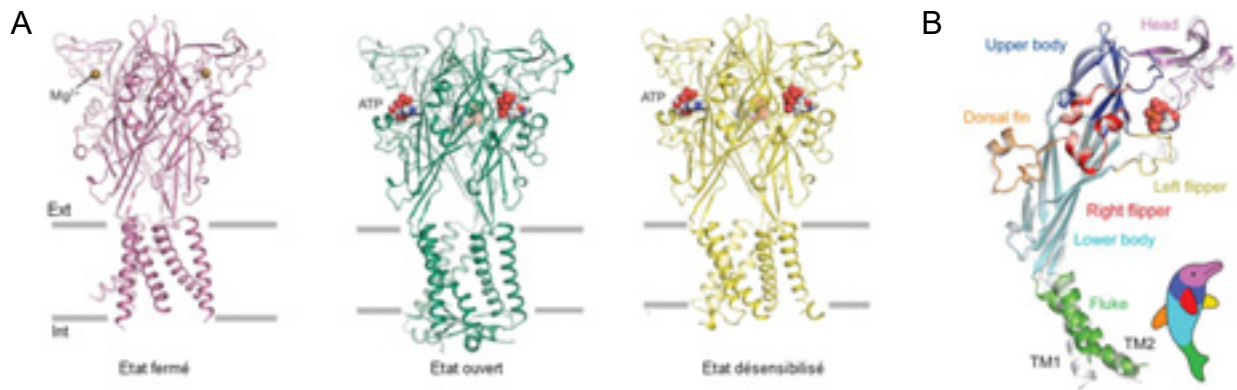


Figure 15 Structures globales des récepteurs P2X. A. Structures du récepteur P2X3 humain dans son état fermé, ouvert, et désensibilisé. (D'après Mansoor et al., 2016). B. Comparaison d'une sous-unité à un dauphin (Hattori and Gouaux, 2012)

5.4.1 Le domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire des récepteurs P2X représente la partie la plus imposante de chaque sous-unité et est composé de la tête, de la nageoire dorsale, et des nageoires gauche et droite. C'est un large ectodomaine glycosylé qui se compose de résidus hautement conservés, organisé en une structure rigide de feuillets β et stabilisé par cinq liaisons disulfures qui assurent le repliement structural. La suppression de 42 résidus dans « la tête » de P2X1, formant des blocs de résidus positifs, a entraîné la perte de la fonction de canal sans interférer avec l'adressage à la membrane (El-Ajouz et al., 2012). Certains antagonistes, comme la suramine ou le NF449 sur P2X1, se lient dans cette zone, bloquant l'action de la fixation de l'ATP (Sim et al., 2008). Ces résultats suggèrent que cette partie est impliquée dans l'activité du canal.

Les parties nageoire dorsale et nageoire gauche sont les domaines impliqués dans l'activation des récepteurs P2X. L'ATP entre directement en contact de la nageoire dorsale par une interaction entre son anneau purine et le résidu L217. La comparaison entre la structure de l'état de repos et celle de l'état ouvert, révèle que la nageoire gauche est repoussée du site de fixation (Hattori and Gouaux, 2012). Une étude a révélé que H286 sur le récepteur P2X4 humain, située dans la nageoire gauche, est essentielle à sa sensibilité au pH (Clarke et al., 2000).

Introduction

La nageoire droite est formée de trois hélices α qui ne subissent pas de changements conformationnels pendant l'activation des récepteurs P2X. Toutefois, il est impliqué dans l'effet potentiateur par les métaux. En effet, la mutation du résidu H245, situé dans cette partie du récepteur P2X2 de rat, réduit l'affinité pour Cu^{2+} et Zn^{2+} (Lorca et al., 2005). Cette nageoire contient également un site de glycosylation conservé qui s'est révélé être important dans la stabilité des canaux et sans l'adressage à la membrane (Torres et al., 1998a).

Le corps supérieur est une partie rigide qui maintient le récepteur, notamment lors des mouvements ayant lieu durant l'ouverture du canal. Le corps inférieur est composé de six feuillets β organisés en « sandwich ». Des études de alanine et cystéines scanning ont démontré que cette partie du récepteur était impliquée dans la fixation de l'ATP (Allsopp et al., 2011; Yan et al., 2006). Elle permet aussi la transition pendant les changements conformationnels. Cette une zone importante dans les mouvements moléculaires induisant l'ouverture des récepteurs P2X.

Site de fixation de l'ATP

Avant la résolution de la structure cristallographique, de nombreuses études se sont axées sur la compréhension du mécanisme de liaison de l'ATP. Des outils, tels que la mutagénèse dirigée couplée à l'électrophysiologie, ont fourni une grande partie des informations essentielles à la localisation du site de fixation de l'ATP (Chataigneau et al., 2013). Ainsi, huit résidus hautement conservés ont été mis en cause dans cette fixation : les résidus basiques K70, K72, R298 et K316, les résidus aromatiques F188 et F297 et les résidus polaires N296 et T189 (numérotation pour zfP2X4).

La substitution systématique de résidus en résidus cystéines est une stratégie couramment utilisée pour l'étude des protéines. Les acides aminés cystéines présentent l'avantage d'avoir une réactivité forte grâce à leur groupement thiol. Des agents chimiques, tels que les methanethiosulfonate (MTS) (Karlin and Akabas, 1998), peuvent alors se lier covalamment à la chaîne latérale d'une cystéine (Figure 16). Il existe de nombreuses propriétés physicochimiques de ces composés (hydrophobes, chargés, biotinylés...) ce qui permet de modifier les propriétés de la chaîne latérale si elle est accessible au composé chimique. Cette technique permet d'obtenir des informations sur le microenvironnement du résidu.

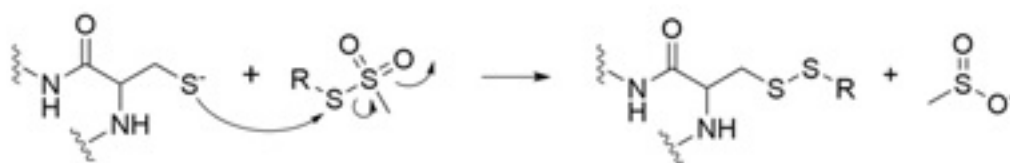


Figure 16 Schéma réactionnel entre une cystéine et un dérivé MTS

C'est de cette manière que les résidus K70 et K72 (zfP2X4) ont été mis en avant dans la fixation de l'ATP. Les mutations en cystéines de ces résidus réduisent de manière significative la sensibilité de l'ATP. L'application de MTSEA, aux propriétés semblables aux lysines, restaurent cette sensibilité (Ennion et al., 2000; Jiang et al., 2000a; Wilkinson et al., 2006b). De la même manière, K316, R298, F297, F188, T189 et N96 ont été révélés comme étant essentiels à la fixation de l'ATP (Ennion et al., 2000; Fischer et al., 2007; Jiang et al., 2000a; Roberts et al., 2008; Yan et al., 2006; Zemkova et al., 2007). Enfin, deux résidus non décrits précédemment ont été identifiés grâce à l'utilisation du NCS-ATP, un dérivé ATP réactif vis-à-vis des thiols, les résidus N140 et L186 (Jiang et al., 2011)

Des stratégies supplémentaires ont été utilisées pour déterminer d'autres résidus impliqués dans cette liaison de l'ATP, notamment des expériences de voltage-clamp fluorométrie basé sur l'incorporation d'un fluorophore réactif vis-à-vis des groupements thiols permettant d'obtenir des courants ioniques et des variations de fluorescence dues à une modification de l'environnement du fluorophore. Cette stratégie a permis de proposer une orientation du ribose de l'ATP dans la poche du ligand, mettant en avant le résidu E122 (Lörinczi et al., 2012).

La résolution de la structure cristallographique en présence d'ATP (Hattori and Gouaux, 2012), a confirmé ces précédentes études et a apporté quelques précisions. Le site de fixation est localisé à l'interface entre deux sous-unités dans une poche riche en résidus basiques. Elle est formée dans sa partie supérieure par la tête et la partie haute du corps d'une même sous-unité et sa partie inférieure est formée de la nageoire dorsale et la partie basse du corps d'une deuxième sous-unité (Figure 17.A). L'ATP, dans cette poche, adopte une forme de « U » stabilisée. Cette stabilisation est due aux interactions avec les résidus de la poche mais aussi avec une liaison hydrogène entre l'oxygène du phosphate γ et l'hydroxyle 2' du ribose. L'hydroxyle-3' pointe vers

Introduction

l'extérieur du site de fixation et explore le solvant. Ce ribose est aussi stabilisé par la leucine 217 de la nageoire dorsale, en créant un environnement hydrophobe. Les résidus chargés positivement décrits précédemment interagissent avec la queue triphosphate, et notamment la lysine K70 qui interagit avec les atomes d'oxygène des trois phosphates. L'adénine adopte une conformation « anti » par rapport au ribose et interagit par des interactions hydrophobes avec les carbones de la chaîne carbonée de K72. Cette lysine grâce à son ammonium, interagit également avec le phosphate γ. L'adénine interagit également avec T189 comme le suggérait certaines études (Figure 17.B).

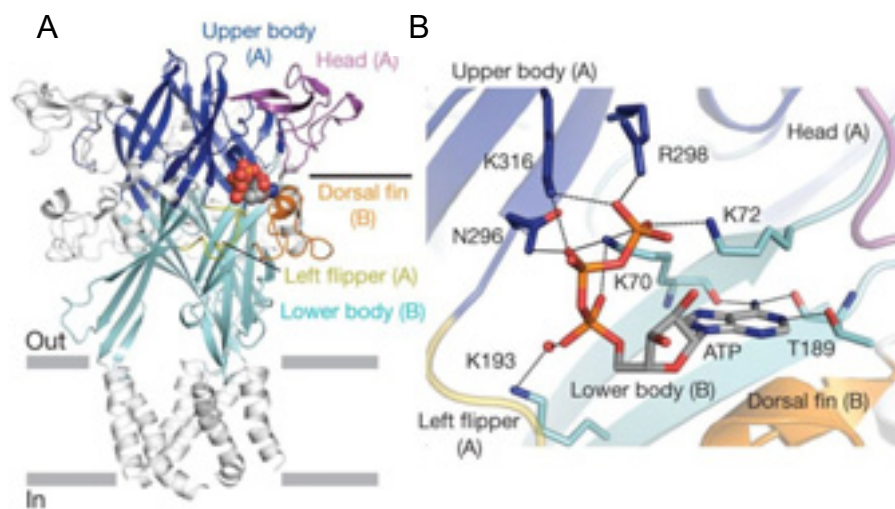


Figure 17 Site de fixation de l'ATP. A. Région correspondant au site de fixation de l'ATP. B. Zoom de la poche de fixation mettant en avant les différentes interactions protéine/ATP. (Issu de Hattori and Gouaux, 2012)

Fenestrations extracellulaires

A proximité de la membrane, dans le domaine extracellulaire, le récepteur présente trois fenestrations. Ces fenestrations en présence d'ATP, s'élargissent et constituent donc la voie de passage des ions extracellulaires vers le milieu transmembranaire. Les résidus acides du domaine extracellulaire, permettent de concentrer les cations à proximité de ces fenestrations. Ces constatations structurales ont confirmé les études d'accessibilité de cystéines préalablement réalisées (Kawate et al., 2011; Samways et al., 2011).

5.4.2 Le domaine transmembranaire

Les hélices TM1 et TM2

Les hélices TM1 et TM2 d'une sous-unité délimitent la queue du dauphin et sont suffisamment longues pour traverser la membrane cellulaire. Elles sont responsables de nombreuses propriétés du récepteur, comme sa conductance unitaire et les propriétés de rectification des courants (Cao et al., 2009), ou encore la désensibilisation (Werner et al., 1996).

Leur structure hélicoïdale avait été suggérée grâce à des mutations systématiques des résidus de ce domaine en cystéines (Egan et al., 1998), puis en alanines (Li et al., 2004) et tryptophanes (Silberberg et al., 2005).

Ces études ont aussi révélé que le segment transmembranaire TM1 ne joue pas un rôle crucial dans la perméation des cations. En effet, l'application de dérivés de MTS ne modifie pas les courants ATP, excepté pour la mutation V48C de rP2X2 (Jiang et al., 2001). De plus, la création de ponts disulfures entre TM1 et TM2 a révélé la proximité spatiale des deux hélices dans un état fermé (Jiang et al., 2001; Spelta et al., 2003). La résolution des structures cristallographique a confirmé ces résultats et suggère que TM1 participe à l'encrage et à la stabilisation de la protéine dans la membrane.

La mutation de l'isoleucine 328 sur l'hélice TM2 du récepteur rP2X2 en cystéine est accessible aux agents chimiques. L'application d'une solution de MTSP sur des cellules exprimant cette mutation permet d'obtenir des courants (Rothwell et al., 2014). De plus, l'incubation de ces cellules avec du MEA-TMA (Lemoine et al., 2013) ou du BMA (Browne et al., 2014), deux molécules réactives vis-à-vis des thiols, permettent de contrôler l'ouverture du canal par la lumière en absence d'ATP. Ces études révèlent donc l'importance de ces parties transmembranaires dans le processus d'ouverture des récepteurs P2X. Ce sont ces segments transmembranaires qui définissent le pore ionique, en forme de sablier, avec la zone la plus étroite située à mi-hauteur de la bicouche lipidique au niveau du résidu A344 (zfP2X4).

Introduction

Les crevasses transmembranaires

La résolution de la structure cristallographique de l'état ouvert de 2012 met en avant des crevasses transmembranaires dont le rôle est inconnu. Ces cavités semblent être imposantes, de l'ordre de 28 Å. Toutefois, les conditions de cristallogénèse sont loin des conditions physiologiques. L'utilisation de détergents pour solubiliser la protéine, l'utilisation de fortes concentrations en ligands et protéines, la création de troncatures dans les parties N- et C-terminales, et la mutation de certains sites de glycosylation, pourraient, en effet, générer des artefacts. L'utilisation de molécules photoisomérisables en tant que règle moléculaire, a permis d'affiner ce modèle en mesurant les distance entre les différentes sous-unités (Habermacher et al., 2016). Ainsi, la taille de ces cavités a pu être revue à la baisse et elles semblent plutôt mesurer 24,5 Å. De plus, la résolution de la structure cristallographique du récepteur P2X3 humain, confirme cette étude et propose une taille de ces crevasses comprises entre 24 Å et 25 Å (Mansoor et al., 2016) (Figure 18).

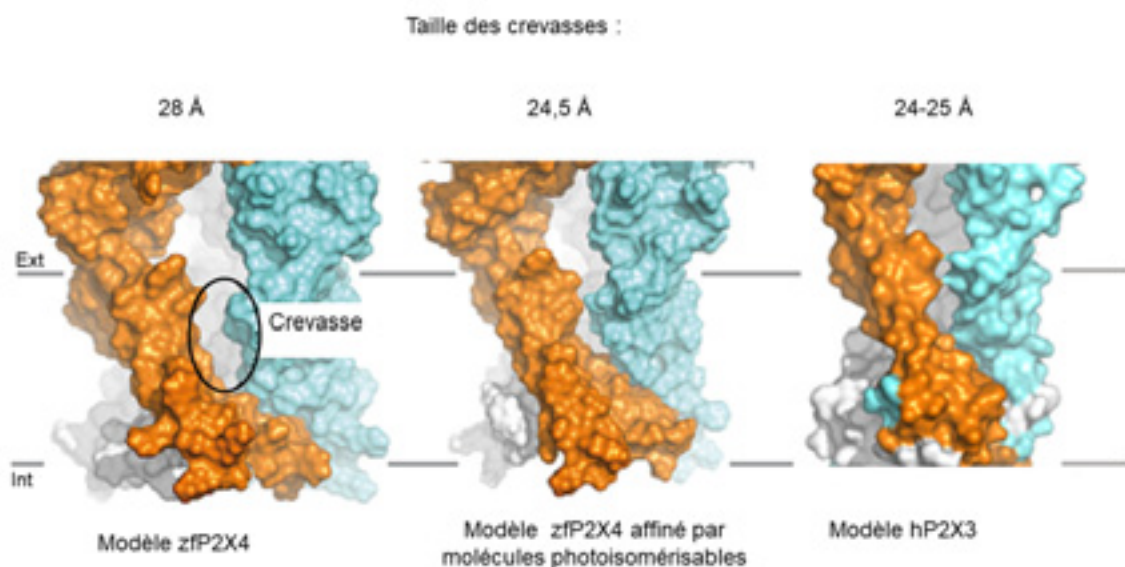


Figure 18 Crevasses transmembranaires en fonction des différents modèles. Taille des crevasses pour le modèle zfP2X4 (à gauche), pour le modèle affiné par l'utilisation de molécules photoisomérisables (au milieu), et pour le modèle hP2X2 (à droite)

Ces cavités, bien que plus petites qu'initialement décrites, pourraient tout de même accueillir des modulateurs allostériques, notamment l'ivermectine qui semble venir se loger dans ces poches transmembranaires.

5.4.3 Les parties intracellulaires

La longueur des parties N- et C-terminales varient entre les différents récepteur P2X. Pour obtenir des structures cristallographiques à haute résolution, ces parties ont jusqu'à très récemment, été tronquées, ne permettant pas leur visualisation. La résolution de la structure de hP2X3 de 2016 montre pour la première fois ces parties dans l'état ouvert. Elles forment un réseau que Mansoor et *al.* appellent « cytoplasmic cap » (Mansoor et al., 2016). Il est défini par un réseau de trois feuillets β situé sous le domaine transmembranaire. Le brin β de la partie C-terminale de chaque sous-unité interagit avec les brins β des parties N-terminales des deux autres sous-unités. Ce « cytoplasmic cap » est observé uniquement dans l'état ouvert, ce qui suggère que les parties N- et C-terminales sont flexibles et désordonnées dans l'état fermé.

La partie N-terminale est sujette aux phosphorylations puisqu'elle contient une séquence consensus pour les protéines kinase C (Thr-X-Lys/Arg) dont fait partie la thréonine conservée en position 18 de P2X2 de rat. La mutation de ce résidu entraîne des modifications de la cinétique de désensibilisation mais affecte aussi l'expression de surface du récepteur (Boué-Grabot et al., 2000). La mutation équivalente sur rP2X1 et rP2X3 provoque l'absence totale ou quasi-totale de courants ATP (Franklin et al., 2007; Liu et al., 2003). Le domaine N-terminal est donc important dans le bon fonctionnement du récepteur.

La partie C-terminale, comme mentionné plus tôt, possède deux blocs de résidus positifs capables d'interagir avec les PIP_n de la membrane cellulaire. Ces interactions permettent la régulation post-traductionnelle de l'activité des récepteurs P2X, en augmentant notamment les courants portés par ces récepteurs (Bernier et al., 2013). De plus, la séquence de cette extrémité révèle la présence d'un motif conservé chez tous les récepteurs P2X. Il est constitué de la séquence YXXXK. La tyrosine et la lysine de ce motif sont nécessaires pour stabiliser la sous-unité du récepteur P2X dans la membrane plasmique (Chaumont et al., 2004). C'est aussi grâce à la partie C-terminale que les récepteurs P2X sont capables d'interagir avec d'autres protéines, comme la Fe65 (Masin et al., 2006) ou de la protéine AP2 (Royle et al., 2005). Ces résultats confirment l'importance de ce fragment dans la fonction des récepteurs P2X.

Introduction

5.5 Dynamiques des mouvements durant le cycle d'activation

5.5.1 Passage de l'état fermé à l'état ouvert

La liaison de l'ATP dans son site de fixation induit une série de mouvements (Figure 19) qui mène à la perméation de cations. Les résolutions des structures cristallographiques de l'état ouvert de zfP2X4, puis de hP2X3, ont permis de mieux comprendre les mouvements moléculaires engendrés par cette fixation, notamment en comparant la position des différentes parties du récepteur.

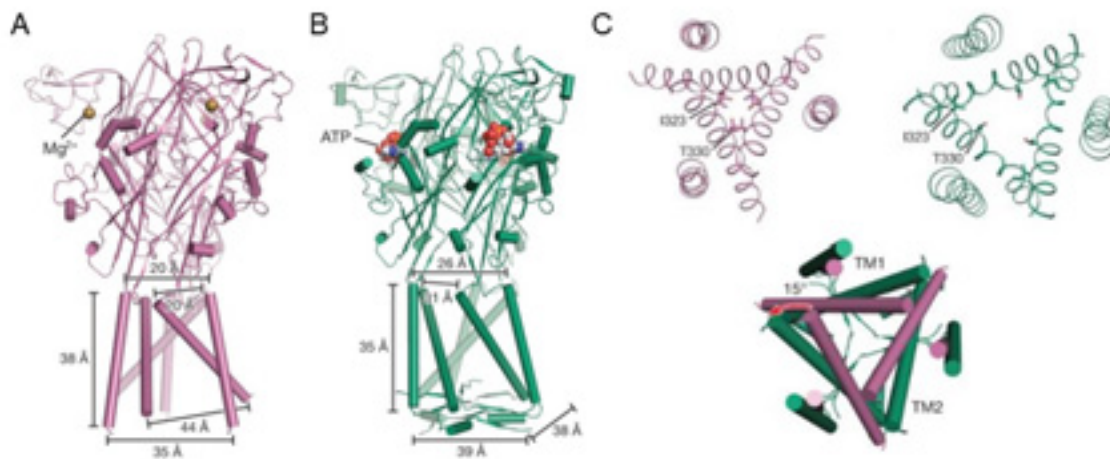


Figure 19 Passage de l'état fermé à l'état ouvert. Structure de l'état fermé (A) et ouvert (B) du récepteur hP2X3. C. Vue du dessus des domaines transmembranaires de l'état fermé (en violet) et de l'état ouvert (en vert). (D'après Mansoor et al., 2016)

Mouvement du domaine extracellulaire

La fixation de l'ATP dans son site de liaison entraîne, dans la partie extracellulaire, un mouvement de fermeture de l'espace entre la tête et la nageoire dorsale, mimant le mouvement d'une mâchoire. Le rapprochement de ses deux parties pousse la nageoire gauche vers l'extérieur. Ces deux parties du récepteur étant liées à la partie basse du corps, une flexion concomitante de la partie basse s'opère alors, provoquant l'élargissement d'environ 5-10 Å des fenestrations latérales bordées par deux parties

basses de deux sous-unités. Tout comme les changements conformationnels autour de la poche de liaison ATP, ce mouvement du domaine extracellulaire est conservé chez les récepteurs P2X. En effet, les structures cristallographiques des récepteurs P2X3, P2X4 et P2X7 présentent toutes les mêmes changements conformationnels lors de la liaison ATP. De plus, un certain nombre d'études fonctionnelles sur différents sous-types de P2X soutiennent systématiquement ce mouvement de flexion du domaine extracellulaire pendant l'activation (Allsopp et al., 2011; Rokic et al., 2013, 2014). Contrairement à la flexibilité de la partie basse, la partie haute du corps reste relativement statique durant l'activation des récepteurs P2X. Cette partie sert principalement de « charnière », nécessaire au pivotement des parties basses. En particulier, le pont salin entre R309 et D89 (rP2X4) ainsi que les interactions π -cations entre R309 et W164 (rP2X4) permettent la stabilisation de cette partie (Zhao et al., 2016). Cette succession de mouvements entraîne des mouvements de la zone transmembranaire.

Mouvements des domaines transmembranaires et intracellulaires

Lorsque le bas du corps fléchit, il entraîne une rotation similaire à celle d'un diaphragme, dans le sens antihoraire. La résolution de la structure zfP2X4 met en avant une rotation de 10° pour l'hélice TM1 et de 55° pour l'hélice TM2 autour d'un axe central du pore perpendiculaire au plan de la membrane. Cette rotation est accompagnée d'une inclinaison de 8° et de 2° pour TM1 et TM2, respectivement, autour d'un axe parallèle à la membrane. Ces mouvements entraînent alors une augmentation du diamètre du pore, de l'ordre de 3 Å. Ces données structurales obtenues en 2012, ont été nuancées en 2013 par une étude *in silico* qui, par le biais de la création d'un site de métalation au cadmium, propose que l'hélice TM2 subit une rotation de 5° dans le sens antihoraire et un déplacement léger de 1,3 Å par rapport à la structure cristallographique (Heymann et al., 2013). Enfin, la structure cristallographique de 2016 montre que l'hélice TM2 de hP2X3 effectue une rotation de 15° (Figure 19.C). De plus, une partie hélicoïdale de TM2, entre G333 et G335, se transforme en hélice 3₁₀. Ce changement de pas de l'hélice entraîne un élargissement de l'écart entre deux TM2, provoquant l'ouverture du canal.

Introduction

La résolution des structures ne permet pas de comparer la position des deux domaines N- et C-terminaux. Toutefois, l'élucidation du « cytoplasmic cap » dans l'état ouvert de hP2X3, absent dans l'état fermé, suggère un réarrangement de ces domaines suite à la fixation de l'ATP. Ce réseau est probablement maintenu par de nombreuses interactions, et favorise la stabilisation de l'état ouvert. En effet, afin d'obtenir cette structure cristallographique, les auteurs ont créé trois mutations (T13P, S15V et V16I) impliquées dans le ralentissement de la désensibilisation, qui confère une certaine rigidité à l'ensemble de la structure par le biais d'interactions hydrophobes. Ils suggèrent donc que la formation temporaire de ce réseau cytoplasmique joue un rôle crucial dans l'activation des récepteurs P2X en fournissant une base structurale stable qui est susceptible d'être désassemblée dans l'état fermé et désensibilisé.

5.5.2 Passage de l'état ouvert à l'état désensibilisé

Au début des travaux réalisés dans cette thèse, aucune structure de l'état désensibilisé des récepteurs P2X n'était disponible. L'obtention en 2016 de cet état a permis d'élucider partiellement les transitions moléculaires qui ont lieu dans ce processus.

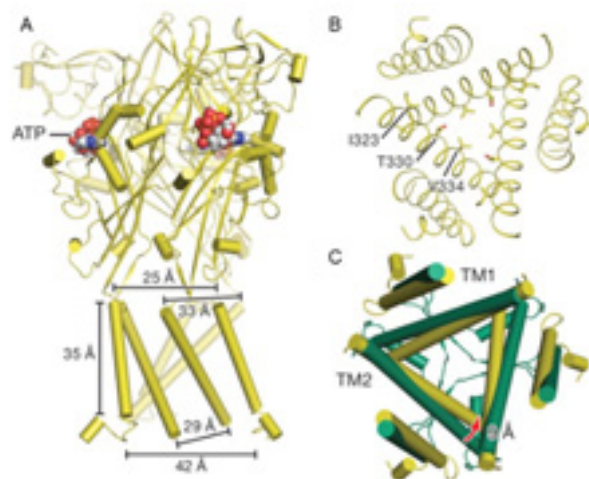


Figure 20 Structure de l'état désensibilisé. A. Vue parallèle à la membrane de la structure de l'état désensibilisé. B. Vue du dessus des domaines transmembranaires de l'état désensibilisé. C. Superposition vue du dessus des domaines transmembranaires de l'état ouvert (vert) et de l'état désensibilisé (en jaune).

Lors du passage de l'état ouvert à l'état désensibilisé, la partie basse de l'hélice TM2 subit une rotation de 9 Å dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. La courte hélice 3₁₀ formée lors de l'état ouvert, revient à une structure α , ce qui entraîne par conséquent un mouvement vers le haut de 4,4 Å et une rotation vers l'intérieur du résidu V334 qui devient alors la zone la plus étroite du pore conduisant à sa fermeture, empêchant le passage des ions. Ce mouvement, équivalent à celui d'un ressort, n'est possible que si la partie intracellulaire se déstabilise. Le « cytoplasmic cap » n'est pas observée dans l'état désensibilisé. Cependant, le début du domaine N-terminal est visible et semble s'éloigner de l'axe de symétrie du pore. Le « cytoplasmic cap » semble donc se déplier ou se désassembler alors que l'ATP est toujours dans son site de fixation (Figure 20). La présence de glycines conservées dans les parties N- (G24 pour hP2X3) et C-terminales (G349 pour hP2X3) chez les différents récepteurs P2X pourraient alors servir de charnières et fournir la flexibilité nécessaire à de tels changements conformationnels (Fujiwara et al., 2009).

5.6 Caractéristique des différents états allostériques

5.6.1 Etat ouvert : Passage des ions et perméabilité ionique

Suite à la fixation de l'ATP, les études électrophysiologiques montrent le passage d'ions au travers du récepteur P2X. La voie d'accès des ions dans le milieu extracellulaire se situe au niveau des trois fenestrations latérales, proche de la membrane cellulaire, formées par les différentes sous-unités. Le marquage de résidus bordant ces fenestrations en cystéines pour le marquage avec des dérivés MTS chargés positivement mène à l'inhibition des courants, qui est réversible en présence d'agents réducteurs (Kawate et al., 2011; Samways et al., 2011). Les structures cristallographiques dans l'état ouvert ont confirmé l'implication des fenestrations latérales dans l'accès extracellulaire des ions. De plus, l'environnement électrostatique près des ouvertures du pore peut produire des potentiels de surface localisés, qui pourraient contribuer à la sélectivité des ions en les attirant ou repoussant en fonction de leur charge.

Introduction

Les ions traversent ensuite le pore du récepteur. Celui-ci est bordé par les résidus des hélices α TM2 arrangées autour d'un axe de symétrie. Les résidus de TM1 sont quant à eux, peu impliqués dans la formation de ce pore. Des études ont révélé des résidus clés impliqués dans les propriétés de perméation des ions. Les acides-aminés N333, T336, T339 et S340 définissent la zone la plus étroite du pore (environ 7 Å) et sont dirigés dans la lumière du canal (Kracun et al., 2010; Li et al., 2008) suggérant une importance dans la sélectivité du canal. La mutation de T339 en lysine provoque, sur le récepteur P2X2, un changement de sélectivité du canal et devient perméant aux anions, et la mutation T339R inverse la perméabilité (Browne et al., 2011). Cependant, l'alignement de séquence des récepteurs P2X révèle que les résidus équivalents à celui-ci sont non-polaires et n'expliquent donc pas leur rôle dans la sélectivité. La question de la sélectivité du pore reste non résolue.

La mise en évidence du « cytoplasmic cap » dans l'état ouvert démontre que la sortie des ions du pore ne peut pas se produire le long de l'axe de symétrie du récepteur. Il présente néanmoins la formation de fenestrations cytoplasmiques, situées juste en dessous de la bicouche lipidique, faisant probablement office de porte de sortie des ions (Figure 21).

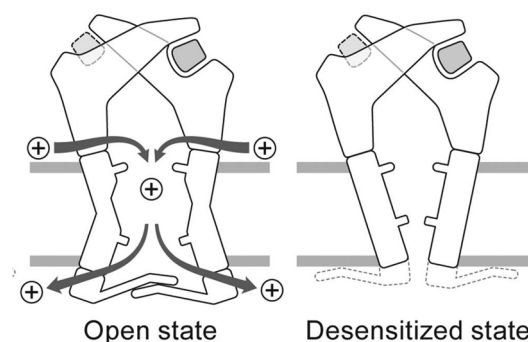


Figure 21 Représentation schématique du cycle d'activation des récepteurs P2X. Schéma mettant en avant les mouvements induits après activation par l'ATP et le chemin emprunté par les ions pour fluctuer au travers du pore.

5.6.2 Etat sous-conductant et phénomène de « flickering »

Lors de l'activation par l'ATP, les récepteurs P2X présentent, en configuration canal unique, des ouvertures plus ou moins longues dont la conductance est plus faible que la conductance unitaire de chaque P2X (Ding and Sachs, 1999). Ces états sous-conductants n'apparaissent que rarement.

Le phénomène de « flickering » correspond, quant à lui, à une augmentation du bruit de l'ordre de 30% lorsque le canal est ouvert et est caractéristique de la protéine elle-même puisque ce phénomène n'est pas dépendant des conditions expérimentales.

5.6.3 Etat désensibilisé : facteurs de modulation

A la suite d'une application prolongée d'ATP, les récepteurs P2X sont capables de se désensibiliser menant à une fermeture progressive du canal malgré la présence de l'agoniste dans son site de fixation. Comme décrit précédemment, les différentes sous-unités de récepteur P2X possèdent des cinétiques de désensibilisation qui leur est propre (Figure 12). Les mécanismes moléculaires contrôlant la désensibilisation ne sont pas élucidés mais les domaines intracellulaires, transmembranaire et une petite zone du domaine extracellulaire ainsi que les interactions avec des protéines ou des modulateurs intracellulaires, semblent moduler ces mouvements (Roberts et al., 2006; Stojilkovic et al., 2005).

Une analyse des chimères, composées de parties de récepteur désensibilisant, le récepteur P2X1, et de récepteur peu désensibilisant, le récepteur P2X2, a démontré que la désensibilisation portée par P2X1 peut être ralentie grâce à la présence de fragment de TM1 ou/et de TM2 du récepteur P2X2. De la même manière, la désensibilisation de P2X2 peut être augmentée, mais seulement en présence des deux fragments TM1 et TM2 de P2X1 ou P2X3 (Figure 22) (Werner et al., 1996).

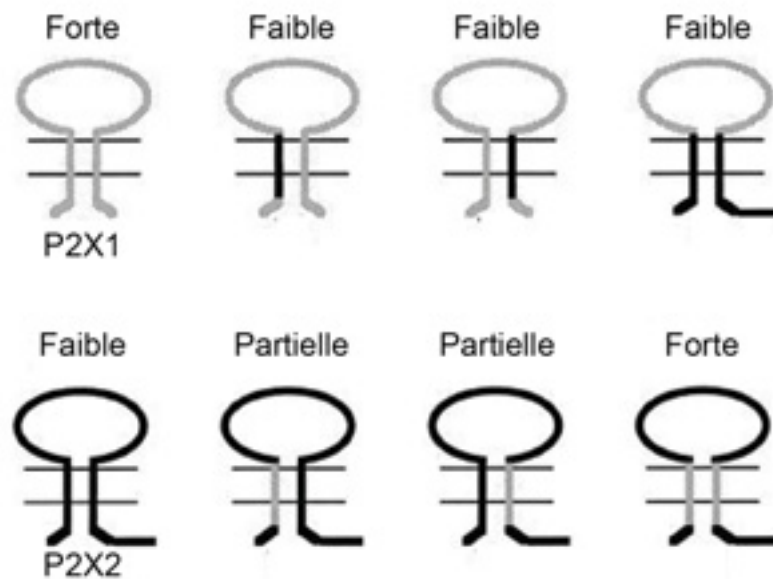


Figure 22 Représentation schématique des domaines nécessaires à la modulation de la désensibilisation de chimères P2X1 et P2X2. Les parties appartenant à P2X1 sont représentées en gris et les parties appartenant à P2X2 sont en noir. Au-dessus de chaque chimère est indiqué la désensibilisation du récepteur. (Adapté de Werner et al., 1996)

Cette étude montre également que le domaine extracellulaire n'est pas impliqué dans la cinétique de désensibilisation des chimères, et que les domaines TM1 et TM2 seuls ne suffisent pas à avoir une influence mais que quelques acides aminés de la partie « pré-TM1 » et « post-TM2 » en plus des domaines transmembranaires sont nécessaires.

Une étude supplémentaire basée sur la même stratégie de chimères, confirme que la région pré-TM1 est fortement impliquée dans la modulation de la cinétique de désensibilisation (Allsopp and Evans, 2011). Lorsque la partie N-terminale de P2X1 est remplacée par celle de P2X2, le récepteur chimérique présente une désensibilisation plus lente. La chimère inverse présente, quant à elle, une désensibilisation plus rapide. De plus, la substitution des segments transmembranaires TM1 et/ou TM2 de P2X1 par ceux de P2X2 entraîne un ralentissement de la désensibilisation. Cependant, l'inverse n'a que très peu d'influence sur cette cinétique.

L'ensemble de ces deux études suggère donc que le changement de profil de désensibilisation de P2X1 est fortement lié aux domaines intracellulaires mais ne

Introduction

reflète pas nécessairement que les domaines transmembranaires jouent un rôle majeur dans la désensibilisation et que ce changement résulte plutôt des changements structuraux ou à une influence sur d'autres régions du récepteur.

La comparaison de la désensibilisation du récepteur P2X2 avec sa variante d'épissage P2X2-2 montre que la partie C-terminale de cette dernière, en étant plus courte, augmente la cinétique de désensibilisation (Brändle et al., 1997). D'autres études utilisant des mutations ponctuelles dans la zone C-terminale ont démontré que les résidus V370 et P376 sont particulièrement importants dans la régulation de la désensibilisation (Fountain and North, 2006; Koshimizu et al., 1998, 1999). D'autres mutations ponctuelles dans la partie C-terminale ont eu une influence sur la désensibilisation. C'est le cas par exemple des mutations glutamine sur les résidus K365 et K369 (rP2X2) qui présentent une plus forte désensibilisation, probablement due à la déstabilisation des interactions avec les PIP_n (Fujiwara and Kubo, 2006). La partie N-terminale semble également avoir une influence sur la désensibilisation puisque la mutation des acides aminés V21S et I22V (rP2X2) accélèrent sa cinétique. La simple mutation S15V sur hP2X3 est suffisante pour abolir la désensibilisation (Hausmann et al., 2014). La mutation de l'acide aminé T18 en alanine augmente de manière significative la désensibilisation du récepteur P2X2. De plus, cette thréonine est située dans le site de reconnaissance de la protéine kinase C hautement conservé dans la partie N-terminale des récepteurs P2X. Dès qu'un des résidus de ce site est muté (T18A, T18N, K20T), les cinétiques de désensibilisation sont plus rapides, faisant de ce site une zone de régulation de la désensibilisation. En outre, des troncatures de la partie C-terminale augmentent aussi ces cinétiques. Cet effet est compensé par la stimulation de la protéine kinase C (Boué-Grabot et al., 2000). La phosphorylation de la thréonine 18 permet donc de moduler la désensibilisation des récepteurs P2X2. Ce même site de phosphorylation sur P2X1 a été étudié et confirme l'augmentation de la désensibilisation (10 fois plus) (Ennion and Evans, 2002).

Tous ces résultats convergent vers la même conclusion : les domaines intracellulaires sont une zone de modulation importante dans la désensibilisation. La récente résolution de la structure cristallographique semble confirmer ces observations. La formation du « cytoplasmic cap », où les parties N- et C-terminales de chaque sous-unités interagissent dans l'état ouvert et se désorganisent probablement dans l'état désensibilisé, semble régir la cinétique de désensibilisation (Kawate, 2017).

Introduction

Cependant, aucun mécanisme précis n'est disponible et les facteurs de transitions d'un état ouvert à un état désensibilisé sont encore méconnus.

5.6.4 Etat dilaté : un état controversé

Il y a encore peu de temps, un état ouvert conductant additionnel était décrit chez les récepteurs P2X, notamment P2X2, P2X2/3, P2X2/5, P2X4, et P2X7. Une augmentation progressive de la perméabilité aux plus gros cations était observée, pouvant aller jusqu'à une taille de 900 Da, à la suite d'une application prolongée d'ATP. C'est le cas par exemple du récepteur P2X7, où des molécules telles que le TRIS, le NMDG⁺, l'éthidium (Virginio et al., 1999a) ou encore des sondes fluorescentes comme le Fura-2 (Yan et al., 2008) peuvent entrer dans le milieu intracellulaire lors d'une application continue d'ATP. Deux hypothèses majeures ont été émises afin d'expliquer ce phénomène de perméation progressive (Figure 11). La première hypothèse est que les récepteurs P2X recrute un héli-canal transmembranaire, comme la pannexine-1, permettant le passage de plus gros cations. Cette protéine, lors d'une surexpression, augmente de manière significative l'incorporation de marqueurs fluorescents dans des cellules exprimant le récepteur P2X, en présence d'ATP. L'inhibition de cet héli-canal bloque également cette incorporation (Pelegri-n and Surprenant, 2006). Cependant cette hypothèse fait débat étant donné qu'une perméabilité au NMDG⁺ dans des cellules pannexine-1 déficientes fut observée en présence d'ATP (Yan et al., 2008).

La deuxième hypothèse serait qu'un changement conformationnel lent et progressif, appelé I₂, intrinsèque au récepteur P2X, a lieu. Cette hypothèse a été confortée à la suite d'enregistrements en microscopie à force atomique (Figure 23.A) (Shinozaki et al., 2009).

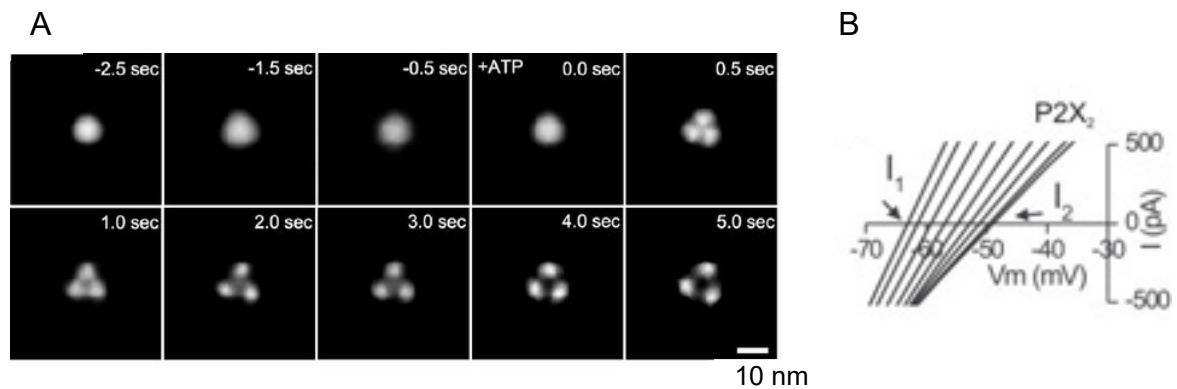


Figure 23 Caractérisation de l'état dilaté. A. Acquisitions des changements structuraux de P2X4 au microscopie à force atomique prises à différents temps avant et après application d'ATP. (D'après Shinozaki et al., 2009). B. Evolution du potentiel d'inversion du récepteur P2X2 en présence de NMDG⁺ en présence d'ATP (d'après Chaumont and Khakh, 2008)

Nous pouvons distinguer sur ces enregistrements qu'avant l'application d'ATP, le récepteur est circulaire puis une structure trimérique apparait dès l'application d'ATP. Une dilatation progressive est visible au bout de quelques secondes.

La caractérisation de ce deuxième état conductant a aussi été faite par le biais d'enregistrements électrophysiologiques en conditions bi-ioniques, par la détermination d'un potentiel d'inversion. Cette technique repose sur l'utilisation d'une solution extracellulaire riche en un ion donné, seule espèce capable de traverser le canal, dans cette étude le NMDG⁺ (NMDG⁺_{ext}), et d'une solution intracellulaire fortement concentrée avec une autre espèce ionique, ici l'ion sodium (Na⁺_{int}). Une rampe de voltages allant de -120 mV à +120 mV en 200 ms est appliquée avant et pendant l'application d'ATP, en présence d'une solution NMDG⁺, afin d'obtenir des courbes I/V. Au cours du temps, les potentiels d'inversions se décalent progressivement vers la droite (Figure 23.B). En se basant sur la loi GHK, les résultats ont été interprétés comme étant corrélés à une augmentation de la perméabilité relative du NMDG⁺ (Chaumont and Khakh, 2008). Cependant, plusieurs études reprenant ces conditions expérimentales ont montré des résultats variables, voire non reproductibles, notamment en fonction du type cellulaire (Fujiwara and Kubo, 2004).

L'incorporation de Yo-Pro-1 au travers des récepteurs P2X est également utilisée pour l'étude de cet état supposé dilaté. Il s'agit d'un cation de grande dimension, capable de s'insérer à l'ADN devenant alors fluorescent. L'augmentation de la fluorescence

Introduction

en présence d'ATP est alors corrélée avec le passage et l'intercalation de ce marqueur (Figure 24) (Virginio et al., 1999a).

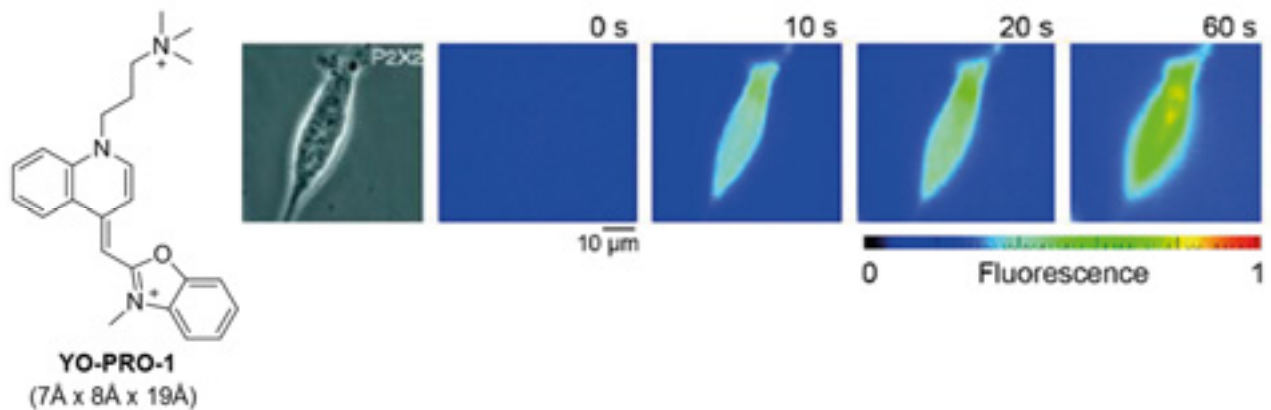


Figure 24 Incorporation de YO-Pro-1 au travers de P2X2. Structure chimique du Yo-Pro-1 et augmentation de la fluorescence en fonction du temps après application d'ATP 100 µM sur des cellules exprimant le récepteur P2X2 (d'après Virginio et al., 1999a)

L'ensemble de ces études ne permet pas de discriminer clairement une hypothèse par rapport à l'autre. Les deux hypothèses pourraient en effet coexister et dépendre du type cellulaire et du récepteur P2X étudié (Samways et al., 2014).

Toutefois, en 2015, l'équipe de K. Swartz a proposé une explication alternative du changement du potentiel d'inversion (Li et al., 2015a). Les auteurs démontrent que ces changements ne sont pas la conséquence d'un changement de perméabilité du canal dépendant du temps, mais plutôt par un changement des concentrations d'ions intracellulaires, qui peuvent varier de plus de 100 mM au cours des enregistrements. Des études électrophysiologiques et de modélisation mathématique ont permis de démontrer que l'activation prolongée de l'ATP entraîne une diminution du Na^+ intracellulaire, de 140 mM à environ 20 mM, et une augmentation de celle du NMDG^+ , de 0 mM à plus de 200 mM. En outre, des paramètres physiques tels que la densité des canaux, la conductance des pores, le volume de la cellule et la résistance à l'accès entre la cellule et l'électrode de la pipette peuvent modifier directement les concentrations d'ions à l'intérieur de la cellule après une longue application d'ATP. En raison de ces changements, l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz ne peut pas être

utilisée pour déterminer de façon fiable la perméabilité relative des ions. Cette étude a donc prouvé que le décalage temporel des potentiels d'inversion mesurés en conditions bi-ioniques est un artefact dû à la méthode employée, et qu'il faut faire preuve d'une extrême prudence lors de la mesure des changements de perméabilité.

Malgré une connaissance de plus en plus étendue des récepteurs P2X, de nombreuses questions restent en suspens, notamment sur le passage des différents états allostériques.

6. Etude des récepteurs P2X par l'utilisation de molécules photoisomérisables

La lumière est un outil privilégié pour la manipulation non-invasive de systèmes biologiques, puisqu'elle est orthogonale à la plupart des processus cellulaires. Son utilisation offre un haut niveau de contrôle spatial et temporel et ne produit aucun déchet. Le contrôle de l'intensité et de la longueur d'onde utilisée permet d'éviter les effets néfastes des UV sur les tissus ce qui fait de cette technique une méthode en plein essor, notamment par le développement de l'optogénétique et de la photopharmacologie.

Les récepteurs P2X manquent d'outils pharmacologiques sélectifs. C'est pourquoi l'utilisation de la lumière s'est avérée être une alternative pour obtenir des données structurales précises.

6.1 Conception d'outils photoisomérisables pour l'application biologique

Une molécule dite « photoswitch » est un composé chimique contenant un chromophore qui peut s'intervertir entre plusieurs configurations. Les changements structuraux de cette molécule sont déclenchés par la lumière, et/ou dans certains cas par énergie thermique (Ciardelli et al., 2011). Les composés qui présentent ces

Introduction

caractéristiques les plus utilisés en biologie sont les azobenzènes, les stilbènes, les spiropyranes et les diaryléthylènes (Figure 25).

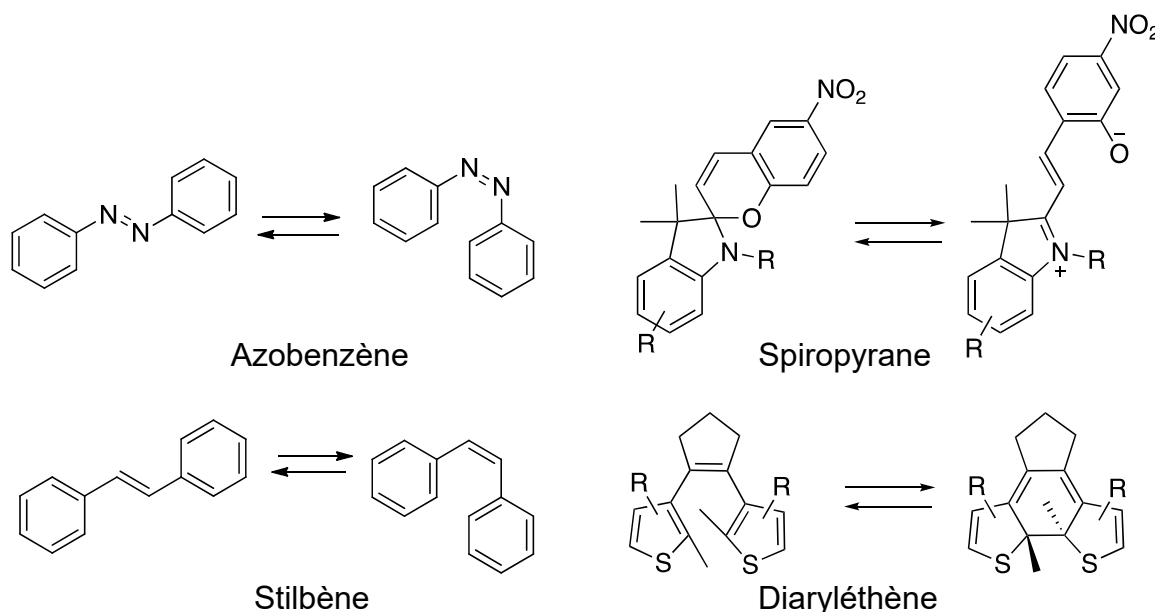


Figure 25 Structures chimiques des principaux groupements structurellement modifiables par la lumière

Les azobenzènes et les stilbènes subissent une isomérisation *cis-trans*, tandis que les diaryléthylènes et les spiropyranes s'intervertissent entre les formes ouvertes et fermées. D'autres photoswitches comme les hémithioindigos et les thiophénefulgides ont été utilisés pour la modification de peptides et peuvent être de bons candidats pour la régulation d'oligonucléotides (Wiedbrauk and Dube, 2015; Yokoyama et al., 2011).

6.1.1 Généralités sur les azobenzènes

En 1937, Hartley a rapporté des preuves de la formation de *cis*-azobenzène après avoir observé un manque de reproductibilité dans les mesures d'absorbance lorsque l'azobenzène était exposé à la lumière (Hartley, 1937). En utilisant des méthodes d'extraction par solvant, il a été en mesure d'isoler la forme *cis* de cet azobenzène. Depuis, un grand nombre de travaux ont fait de l'azobenzène le photoswitch le mieux

Introduction

caractérisé (Rau, 1973; Tiberio et al., 2010). Les azobenzènes ont l'avantage d'être des composés stables, et sont insensibles aux oxydations ou aux cyclisations contrairement aux stilbènes.

La superposition des spectres UV des azobenzènes *cis* et *trans* non-substitués (Figure 26.C) révèle qu'une irradiation du *trans*-azobenzène dans le domaine de l'UV permet d'obtenir le *cis*-azobenzène et réversiblement, une irradiation dans le visible ou une simple relaxation thermique permet le retour au *trans*-azobenzène (Bandara and Burdette, 2012). Ces changements structuraux se produisent à l'échelle de la picoseconde. Le rapport *cis/trans* à l'état photostationnaire est d'environ 80/20 pour un azobenzène non-substitué (Fischer, 1960; Wagner-Wysiecka et al., 2018).

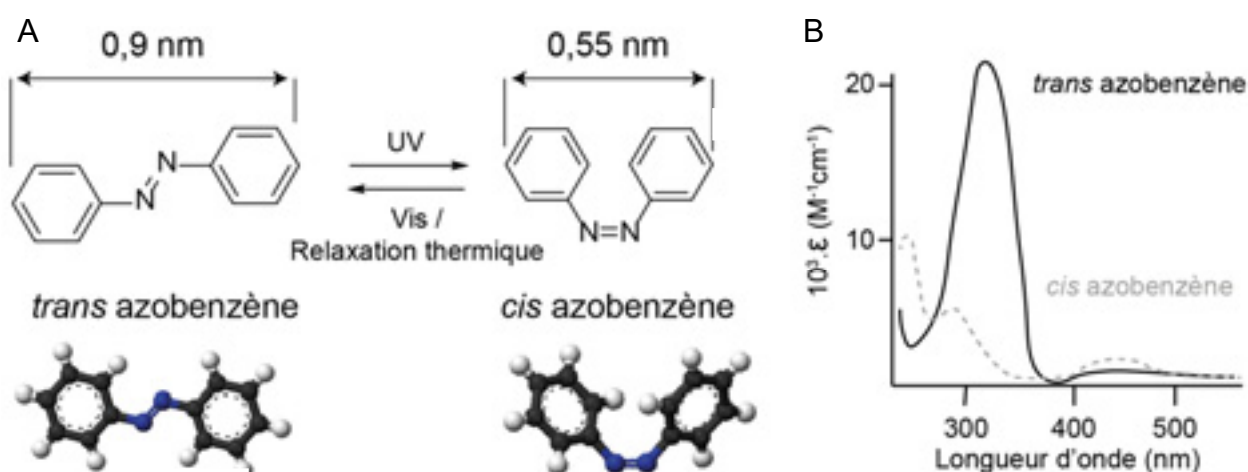


Figure 26 Isomérisation de l'azobenzène. A. Structures des états conformationnels de l'azobenzène et modèles de potentiels électrostatiques. B. Spectres UV des deux isomères *cis* et *trans* d'un azobenzène (Adapté de Wagner-Wysiecka et al., 2018)

La conformation *trans* de l'azobenzène est 10-12 kcal/mol plus stable que l'isomère *cis*, indiquant que, dans l'obscurité et à l'équilibre, l'isomère *trans* est l'isomère majoritaire (Dias et al., 1992). La conformation *trans* est plane et présente un moment dipolaire proche de 0 Debye (D) alors que l'isomère *cis* adopte une conformation courbée avec ses anneaux phényle torsadés hors du plan du groupement azo (Figure

26.B) et présente un moment dipolaire d'environ 3 D (Fliegl et al., 2003). Outre ces changements, la distance entre chaque extrémité de la molécule est différente entre les deux isomères, puisqu'une modification de 3,5 Å a lieu entre les deux carbones en position para (Beharry and Woolley, 2011).

6.1.2 Mécanisme de l'isomérisation

Il existe quatre mécanismes, dont deux principaux pouvant expliquer la *cis/trans*-isomérisation : la rotation et l'inversion (Bandara and Burdette, 2012).

La rotation est obtenue après rupture de la liaison π entre les deux atomes d'azote permettant la libre rotation autour de la liaison N-N. L'inversion, quant à elle, est issue de l'aplanissement de l'angle N=N-C (Figure 27). Les deux autres mécanismes postulés sont l'inversion concertée, où les deux angles C-N=N et N=N-C augmentent jusqu'à 180°, et une inversion couplée à une rotation où les deux mouvements ont lieu simultanément.

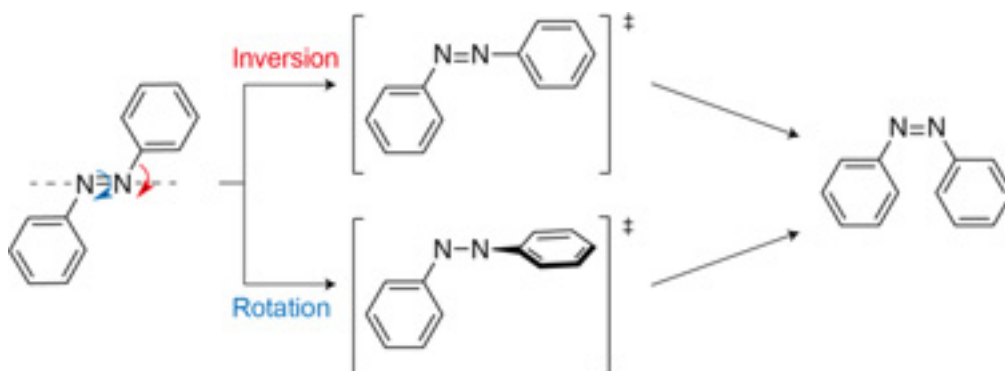


Figure 27 Illustration des mécanismes de rotation et d'inversion des azobenzènes. (Adapté de Bandara and Burdette, 2012)

Les deux mécanismes prépondérants, de rotation et d'inversion, peuvent à priori être effectués lors des transitions *cis/trans* et le mouvement privilégié dépendrait de la famille d'azobenzènes étudiés ainsi que des conditions de pression et température

mais aussi de la viscosité et de la polarité des solvants, du mode d'excitation et des longueurs d'ondes utilisées (Malkin and Fischer, 1962).

6.1.3 Utilisation des azobenzènes dans des systèmes biologiques

Afin de pouvoir appliquer ces dérivés azobenzènes aux tissus biologiques, ils doivent répondre à certains critères pour ne pas altérer le système biologique d'intérêt. Parmi eux, la stabilité dans le milieu biologique est nécessaire. Les azobenzènes possèdent cet avantage puisque leur utilisation n'entraîne quasiment pas de photo-bleaching et ne produit pas de sous-produits toxiques, ce qui permet des isomérisations répétées. Des modifications structurales par l'ajout de groupements chimiques sur les phényles permettent, de plus, de modifier les propriétés photochimiques pour une meilleure biocompatibilité, notamment en décalant les longueurs d'ondes vers des longueurs d'ondes de plus faible énergie permettant une meilleure pénétration des tissus et de diminuer les effets délétères des rayonnements UV. L'intensité lumineuse nécessaire à l'isomérisation des dérivés azobenzènes est relativement basse en raison de leur fort coefficient d'extinction molaire et rendements quantiques, ce qui facilite l'exploration de systèmes biologiques. Enfin, le temps de photo-conversion des azobenzènes est un avantage puisqu'il est plus rapide que la plupart des phénomènes biologiques étudiés.

Ces molécules modifiables structurellement par la lumière ont été appliquées avec succès dans les systèmes biologiques et plus particulièrement sur les canaux ioniques. Plusieurs stratégies basées sur l'incorporation de ces dérivés azobenzènes ont été développées pour leur étude.

C'est le cas de la stratégie PCL, basée sur l'utilisation de ligands photochromiques. Ce ligand, qu'il soit agoniste ou antagoniste, est lié à un groupement structurellement sensible à la lumière. Son activité biologique doit cependant rester efficace pour l'un des isomères. Le premier ligand photochromique est le Bis-Q (Bartels et al., 1971), utilisé pour contrôler l'activité des récepteurs à l'acétylcholine de membranes électrogéniques (Figure 28).

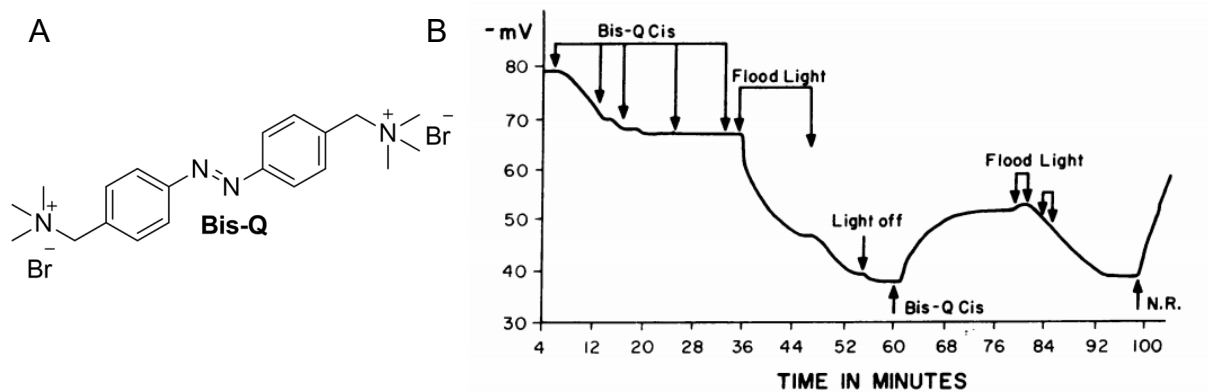


Figure 28 Photocontrôle des récepteurs de l'acétylcholine par le Bis-Q. A. Structure chimique du Bis-Q. B. Influence de la lumière sur une membrane électrogénique. Une solution pré-irradiée dans l'UV, appelée ici Bis-Q *cis* est appliquée sur la membrane provoquant une légère activité due aux états photostationnaires. L'irradiation dans le visible entraîne une activité franche de la membrane et l'application d'une nouvelle solution fraîchement irradiée Bis-Q *cis* inhibe cette activité (D'après Bartels et al., 1971).

Ce ligand photochromique active ces récepteurs dans l'état *trans* alors que l'activité biologique est presque totalement inhibée dans l'état *cis*. D'autres molécules ont ainsi été conçues pour le contrôle d'autres récepteurs canaux. C'est le cas par exemple des composés 4-GluAzo (Volgraf et al., 2007), MPC088 (Yue et al., 2012) et AP2 (Stein et al., 2012), et des dérivés de AAQ (Banghart et al., 2009; Mourot et al., 2011) ciblant les récepteurs AMPA, GABA_A, et les canaux potassiques dépendant du voltage, respectivement. Cette stratégie basée sur l'utilisation de PCL permet donc un contrôle de l'activité des récepteurs mais nécessite, toutefois, de présenter une activité significativement différente entre les deux isomères.

Une deuxième stratégie repose sur l'utilisation de PTL, reposant sur l'utilisation de ligand synthétique sensible à la lumière. La partie « ligand » de la molécule va pouvoir être rapprochée ou éloignée du site de fixation en fonction de la conformation de la molécule qui est liée covalamment à une protéine génétiquement modifiée. Le premier PTL efficace développé est le MAQ (Figure 29), ciblant les canaux potassiques SPARK (Banghart et al., 2004) dont les azobenzènes chargés positivement sont connus pour bloquer ces canaux (Blaustein et al., 2000).

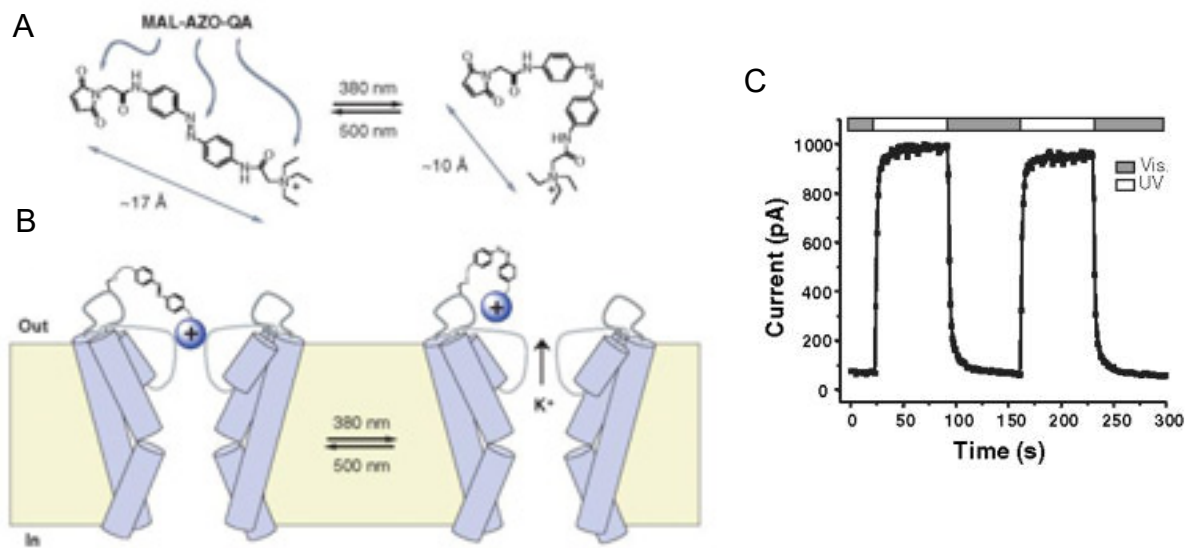


Figure 29 Photocontrôle des canaux SPARK par le MAQ. A. Structures chimiques des deux conformations du MAQ. B. Schéma d'action du MAQ sur les canaux SPARK. C. Enregistrements en configuration Inside-out d'un ovocyte prétraité avec du MAQ lors d'irradiations lumineuses. (D'après Banghart et al., 2004)

La liaison covalente du MAQ à proximité du canal entraîne un blocage de celui-ci dans l'état *trans* par encombrement stérique et électrostatique, et un déblocage dans l'état *cis*. L'utilisation de cette molécule a ensuite été étendue à d'autres canaux potassiques, tels que les Kv (Fortin et al., 2011). D'autres molécules ont par la suite été développées basées sur ce principe. C'est le cas du MAG pour le contrôle des récepteurs du glutamate (Volgraf et al., 2006), des composés MAACH et MAHoCh pour le contrôle par la lumière des récepteurs de l'acétylcholine (Tochitsky et al., 2012) et de MAB-0 pour les récepteurs GABA_A (Lin et al., 2014).

A ma connaissance, aucune de ces stratégies appliquées au récepteurs P2X n'a été publiée.

6.2 Applications des dérivés azobenzènes sur les récepteurs P2X

Au laboratoire, deux autres stratégies ont été développées afin d'étendre le contrôle de canaux ioniques aux récepteurs P2X : l'optogating qui est une alternative à la stratégie de PTL en supprimant l'étape de modification du ligand, et l'utilisation

Introduction

d'agrafe moléculaire, une technique déjà décrite sur d'autres protéines, comme la tyrosine kinase Fyn (Zhang et al., 2009) ou sur l'enzyme de restriction PvuII (Schierling et al., 2010).

6.2.1 Optogating

La stratégie d'optogating est basée sur la conception d'un dérivé azobenzène, proche de la structure du MAQ, le MEA-TMA qui s'isomérisé de l'état *trans* à l'état *cis* après irradiation à 365 nm et revient rapidement dans son état *trans* après irradiation à 530 nm ou lentement par relaxation thermique à l'obscurité. En plus de l'azobenzène central, la molécule est formée d'un maléimide à une extrémité permettant la liaison covalente de la molécule sur la protéine préalablement génétiquement modifiée pour porter une cystéine au point d'encrage souhaité. Le groupement thiol de la cystéine et le maléimide du MEA-TMA peuvent ainsi se lier covalamment par réaction de Michael à la suite d'une addition 1,4 (Figure 30).

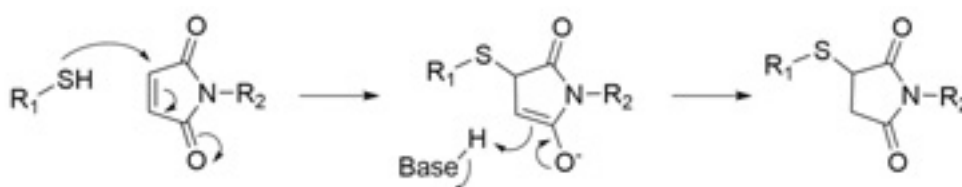


Figure 30 Réaction entre une cystéine et le maléimide du MEA-TMA. Réaction de Michael (addition 1,4)

L'autre extrémité est un groupement triméthylammonium, chargé positivement, augmentant l'efficacité de marquage de la molécule (Figure 31.A). Contrairement au PTL, cette stratégie ne cible pas le site de fixation du ligand mais le domaine extracellulaire des domaines transmembranaires TM1 et TM2.

Après avoir muté les trois cystéines endogènes du récepteur P2X2 de rat en thréonine (rP2X2-3T), un criblage de dix-neuf résidus dans TM1 et TM2 a permis de révéler un

Introduction

contrôle par la lumière de huit de ces mutants cystéines, où les deux mutations V48C et I328C présentent les courants les plus robustes et I328C les plus stables (Figure 31.B) (Lemoine et al., 2013).

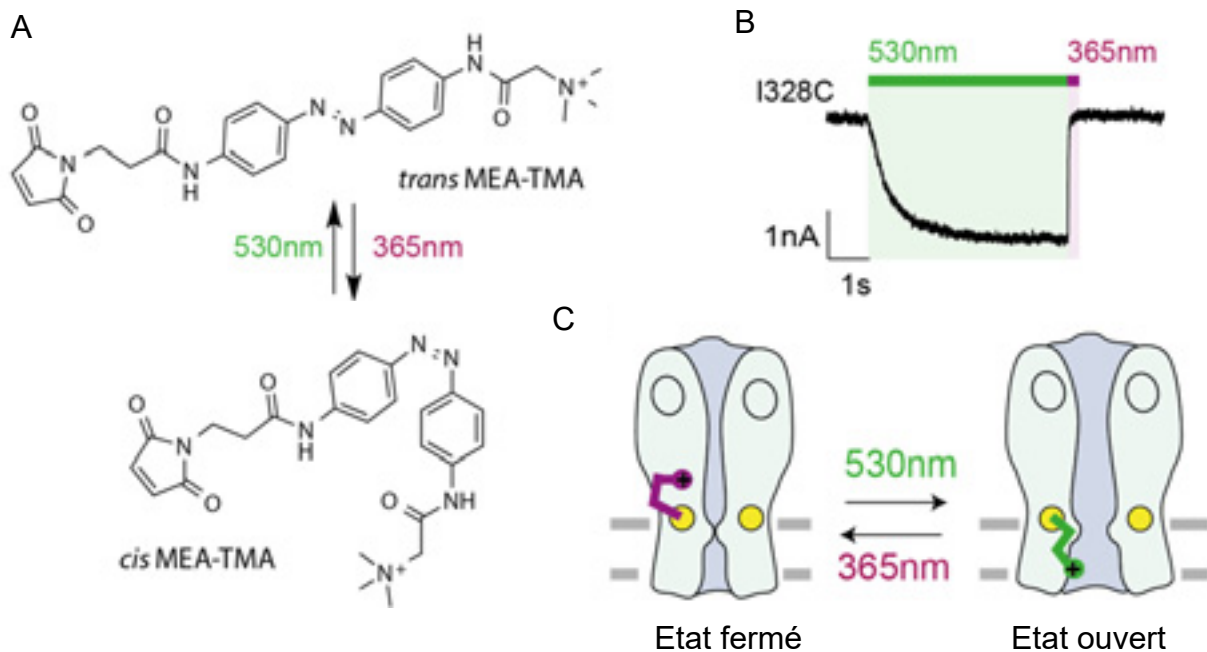


Figure 31 Action du MEA-TMA sur le récepteur P2X2-3T. A. Structures chimique des deux isomères de MEA-TMA. B. Traces électrophysiologiques en configuration cellule entière pour le récepteurs rP2X2 I328C, après irradiations aux longueurs d'ondes indiquées. C. Schéma de fonctionnement du MEA-TMA sur rP2X2 I328C. La mutation I328C est représentée en sphère jaune.

Cet outil est donc capable d'activer les récepteurs P2X2 en absence totale d'ATP. Les courants induits par la molécule sur I328C sont stables, pendant une courte ou une longue irradiation et à l'obscurité dans l'état *cis* ou *trans* (Figure 32) (Lemoine et al., 2013). Cette bistabilité n'est pas retrouvée sur le récepteur P2X2 puisqu'une longue application d'ATP provoque la désensibilisation.

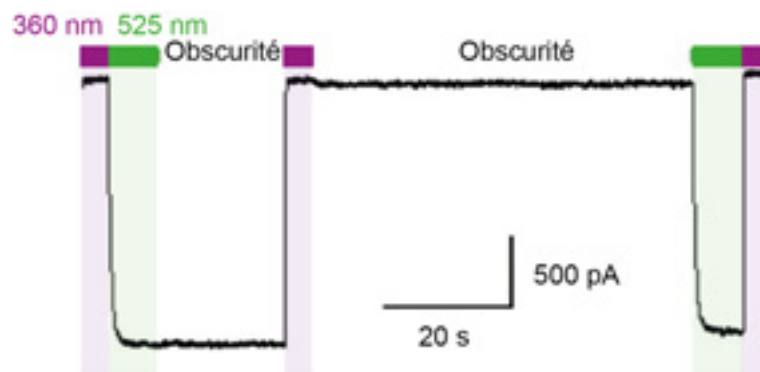


Figure 32 Bistabilité des courants induits par le MEA-TMA. (Adapté de Lemoine et al., 2013)

De plus, l'étude des courbes dose-réponses semble montrer que le mécanisme engendré par la lumière n'est pas le même que celui induit par l'ATP. La stœchiométrie de marquage ainsi que le mécanisme d'action de cette molécule sur le récepteur ne sont pas résolus. Le mécanisme hypothétique serait que la charge du MEA-TMA déstabilise les interactions entre TM1 et TM2, permettant l'ouverture partielle du canal.

Le MEA-TMA dans l'état *trans*, outre sa capacité à ouvrir le canal en absence d'ATP, induit une réduction des courants obtenus après ouverture du canal par l'ATP. C'est le phénomène d'optoblock (Figure 33).

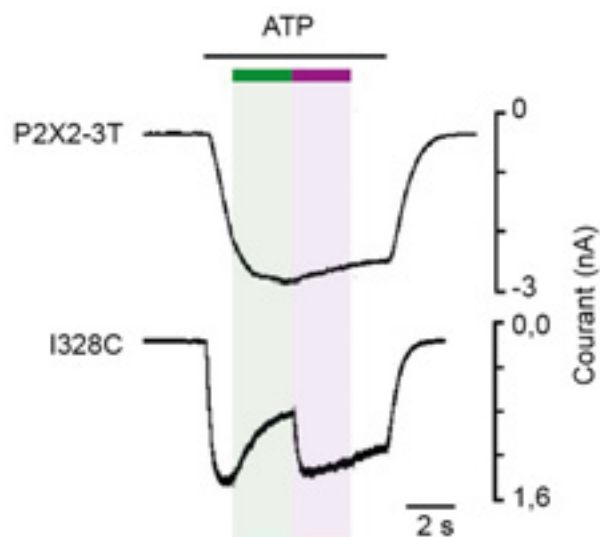


Figure 33 Optoblock par le MEA-TMA sur I328C. (Adapté de Lemoine et al. 2013)

Introduction

Ce processus semble indiquer que la charge du MEA-TMA repousse le flux cationique.

Cet outil a été étendu à d'autres homologues du récepteur P2X2. Cette molécule est fonctionnelle sur tous les récepteurs P2X, à l'exception du récepteur P2X7.

6.2.2 Agrafes moléculaires

L'utilisation d'agrafes moléculaires sur les récepteurs P2X repose sur l'incorporation d'un MAM, composée comme le MEA-TMA, d'un azobenzène central. Il est substitué par un bras espaceur suivie d'un maléimide à chacune des deux extrémités. De la même manière que précédemment, les deux maléimides de la molécule vont se lier covalamment sur les cystéines préalablement introduites par mutagenèse dirigée. Cette fois-ci, les deux maléimides de la molécule vont permettre un ancrage sur deux sous-unités adjacentes du récepteur P2X (Figure 34).

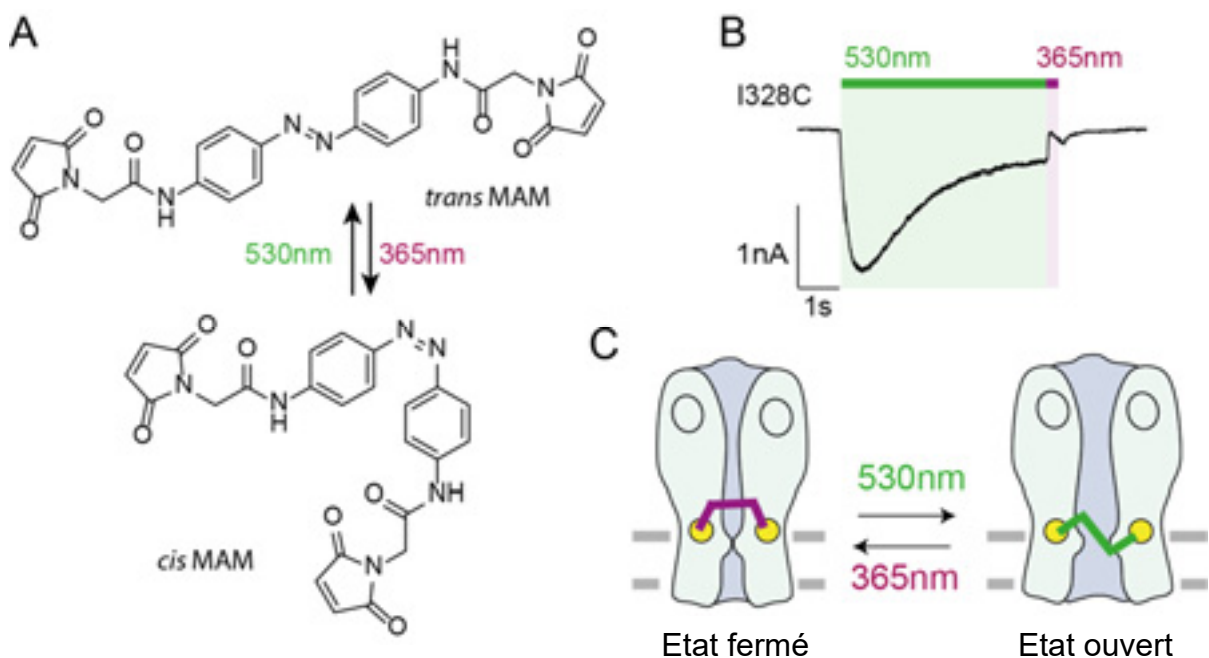


Figure 34 Fonctionnement du MAM. A. structures chimiques des états *trans* et *cis* du MAM. B. Trace électrophysiologique obtenue en configuration cellule entière de cellules exprimant le récepteur I328C sous irradiation lumineuse. C. Schéma du mode d'action du MAM avec la mutation I328C représentée en sphère jaune.

Introduction

Les changements de configurations de la molécule vont transmettre ces mouvements dans la protéine. Ainsi, deux campagnes de criblages dans la zone transmembranaire ont été réalisées dans le but de trouver les mutations les plus efficaces : une première campagne de simples mutants cystéines où un seul résidu de chaque sous-unité est modifié en cystéine permettant l'incorporation d'une seule molécule de MAM et une deuxième campagne avec l'introduction de deux mutations cystéines sur chaque sous-unité, où trois molécules de MAM peuvent potentiellement se lier. Huit et douze constructions du premier et du deuxième groupe ont montré un contrôle de l'activité par la lumière. Parmi elles, la position I328C présente, comme pour le MEA-TMA, le profil de photorégulation le plus robuste ainsi que la double mutation I328C/S345C (Habermacher et al., 2016). Ces deux récepteurs présentent des profils de photorégulation très différents (Figure 35).

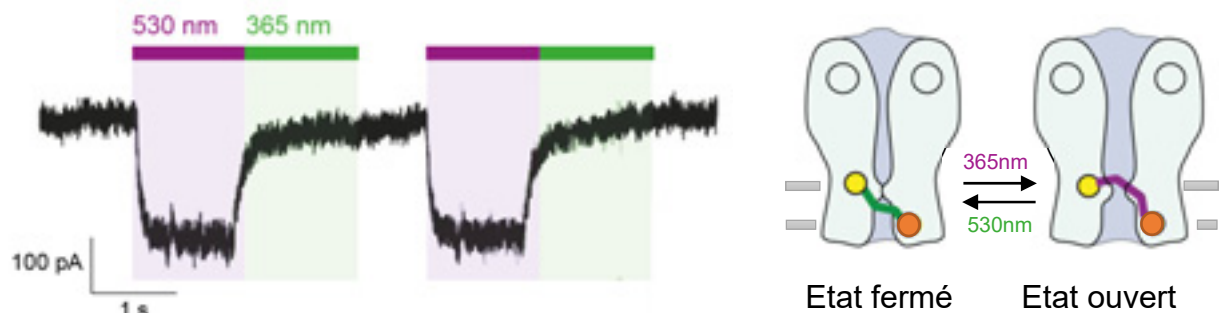


Figure 35 Profil de la photorégulation de I328C/S345C et schéma fonctionnel. I328C est représentée en jaune et S345C en orange

Dans le cas du simple mutant I328C, le passage de l'état *cis* à l'état *trans* après irradiation dans le visible, engendre l'ouverture du canal. Contrairement à celle du MEA-TMA, son ouverture n'est pas stable et une désensibilisation progressive du canal est observée. Une irradiation dans l'UV permet de refermer le canal. L'ouverture du canal induite par le MAM semble être proche de celle provoquée par l'ATP. En effet, les mouvements due à une expansion des extrémités extracellulaire des domaines transmembranaires par la contrainte mécanique imposée par le MAM pourraient mimer ceux de l'ATP, comme le décrivent les structures cristallographiques de l'état ouvert des récepteurs.

Introduction

Pour le marquage du MAM sur le double mutant I328C/S345C, l'ouverture est, à l'inverse, observée après une irradiation dans l'UV. I328C se trouvant dans la partie extracellulaire de l'hélice transmembranaire et S345C dans la partie proche de la partie intracellulaire, cette observation suggère qu'un rapprochement de ces deux résidus a lieu lors de cette ouverture, la molécule étant alors dans son état *cis*, le plus court. Ce rapprochement n'est possible que grâce à la flexion de l'hélice par la glycine en position 342. La modification de cette glycine en proline a en effet confirmé l'hypothèse d'une torsion de l'hélice lors de l'ouverture du canal. Des études d'affinité pour l'ATP ont démontré que ce mouvement induit par la lumière se répercute sur l'ensemble de la protéine et notamment sur le site de liaison de l'ATP, ce qui est en accord avec une hypothèse selon laquelle ce mouvement est proche de celui induit par l'ATP. Il est à noter que les courants dans cette configuration, ne désensibilisent pas, la contrainte imposée par le MAM en position verticale empêche donc un réarrangement structural présent lors d'une liaison horizontale du MAM et lors de l'ouverture induite par l'ATP. Enfin, le passage de l'état *cis* à l'état *trans* provoque la fermeture du canal.

Ainsi, une gamme de MAM a été synthétisée dont la taille du bras espaceur est incrémentée (Figure 36)

Ces deux outils MEA-TMA et MAM sont donc deux très bons outils pour l'exploration fonctionnelle des récepteurs P2X.

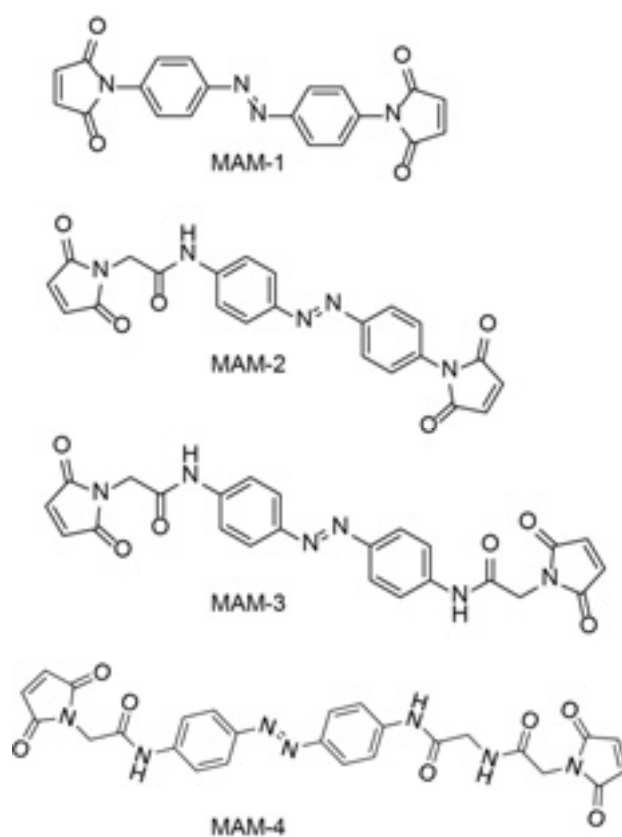


Figure 36 Structures chimiques de quelques MAM

Objectifs de la thèse

Les récepteurs P2X, par leur grande distribution dans l'organisme et par leurs nombreux rôles physiologiques et pathologiques, représentent une cible thérapeutique intéressante. Une connaissance détaillée de leur mode de fonctionnement est donc une priorité afin de développer des agents pharmacologiques sélectifs et efficaces. La résolution des structures cristallographiques dans les différents états allostériques a permis une meilleure compréhension de la position des différentes parties du récepteur mais ne permet pas de comprendre les facteurs permettant la modulation des différentes transitions allostériques. Le développement d'outils optochimiques au laboratoire ouvre une voie d'exploration mécanistique de ces récepteurs.

Les travaux de cette thèse sont principalement axés sur l'utilisation des deux outils photoisomérisables MAM et MEA-TMA couplée à l'électrophysiologie patch-clamp dans le but d'étudier les récepteurs P2X d'un point de vue fonctionnel et structural avec trois objectifs majeurs :

L'étude du phénomène de désensibilisation :

Les profils de photorégulation du MEA-TMA et du MAM sont différents, notamment au niveau de la désensibilisation induite par la lumière. Cette différence fait de ces outils une nouvelle stratégie pour l'étude du phénomène de désensibilisation des récepteurs P2X. Leur utilisation a permis de mettre en avant l'implication des cavités transmembranaires dans la modulation de la désensibilisation de ces récepteurs.

Etude de la relation structure fonction de deux mutants du récepteurs P2X2 humain

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la fonction des récepteurs P2X dans l'audition. Leur répartition au sein de la cochlée a révélé un rôle crucial de ces récepteurs dans le processus d'audition. La récente découverte de patients atteints de surdité non-syndromatique liée à l'âge dont le gène P2X2 est porteur de mutations, a soulevé des questions de l'ordre de la relation structure/fonction de ces mutations sur le phénotype observé. L'utilisation de l'agrafe moléculaire MAM sur ces

Introduction

récepteurs nous a permis de collecter des informations biophysiques afin de proposer une explication du phénotype des patients.

Etude de la perméabilité de gros cations

Enfin, une étude annexe a été menée sur la conductance unitaire de gros cations tels que le NMDG⁺ et la spermidine afin de mieux comprendre leur passage au travers du pore ionique des récepteurs P2X.

CHAPITRE 1 : ETUDE DU MECANISME DE DESENSIBILISATION DES RECEPTEURS P2X

1. Contexte

Le phénomène de désensibilisation est un état allostérique qui est retrouvé chez de nombreux canaux ioniques, comme les canaux AMPA ou kainate-type GluR (Plested, 2016) mais la désensibilisation des récepteurs P2X reste mal comprise, notamment d'un point de vue de la régulation de la transition de l'état ouvert à l'état désensibilisé.

Au début de ce projet, la résolution de la structure cristallographique de 2016 du récepteur P2X₃ humain n'était pas encore publiée. Celle de la structure cristallographique de l'état ouvert de 2012 du récepteur zfP2X₄ a soulevé des questions quant à l'absence d'interaction au niveau transmembranaire, ce qui suggérerait que la structure quaternaire du récepteur P2X ne serait stabilisée que par le domaine extracellulaire de la protéine. Les segments transmembranaires seraient alors contraints uniquement par les lipides membranaires qui les entourent. Les crevasses formées entre ces segments pourraient accueillir ces lipides, obstruant le pore. Cette description ne semble donc pas en accord avec un état fonctionnel du récepteur P2X. Des données expérimentales supplémentaires ont démontré que ces crevasses n'étaient pas aussi larges que décrites dans cette structure, notamment grâce à l'utilisation de l'agrafe photoisomérisable développée au laboratoire (Habermacher et al., 2016). Toutefois, le rôle de ces crevasses reste encore mal compris. Ces crevasses pourraient accueillir des modulateurs allostériques, comme c'est probablement le cas pour l'ivermectine, en condition physiologique menant à la stabilité de l'état ouvert. Elles pourraient donc jouer un rôle important dans la désensibilisation.

2. Stratégie

Les deux dérivés azobenzènes qui, bien que basés sur le même squelette structural, présentent des profils de désensibilisation différents. L'exploration du mode de fonctionnement de ces outils pourraient donc nous donner des informations sur le mécanisme de la désensibilisation. Nous avons donc exploité la réactivité des résidus cystéines introduits par mutagénèse dirigée pour marquer spécifiquement le récepteur par les maléimides des dérivés azobenzènes mais également des dérivés du methanethiosulfonate (MTS).

3. Matériel et méthodes

Culture cellulaire et transfection

Les cellules HEK-293 sont cultivées dans du milieu Dullbecco's modified eagle (DMEM) supplémenté de 10% de sérum foetal de bovin (Invitrogen), du Glutamax 1x, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Invitrogen). Les cellules sont lavées avec du tampon PBS 1x stérile puis traitées avec de la trypsine-EDTA (Invitrogen) jusqu'au détachement du tapis cellulaire. Elles sont ensuite séparées les unes des autres avec du milieu frais avant d'être déposées sur des lamelles de verre prétraitées à la poly-L-lysine (Sigma Aldrich) dans des plaques six puits. Les plaques sont placées dans l'incubateurs à 37°C en présence de 5% de CO₂ entre 1h et 24h avant transfection.

La technique de transfection utilisée est la méthode de précipitation au phosphate de calcium avec 0,3 µg de plasmide codant les différentes constructions et 0,3 µg de plasmide codant la GFP. 24 h après la transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais puis les cellules sont utilisées 1h à 24h plus tard.

Utilisation des molécules photoisomérisables

Les solutions de MEA-TMA et des différents MAMs sont préparées à partir d'une solution stock de 1-5 mM dans du DMSO. Les solutions sont ensuite diluées juste avant incubation dans la solution extracellulaire NES à une concentration de 200 μ M pour le MEA-TMA et de 10 μ M pour les MAM-1 et MAM-2 et de 5 μ M pour le MAM-3, respectivement. 50 μ L de ces solutions sont délicatement déposées sur les cellules pendant 5 min pour le MEA-TMA, 10 min pour le MAM-1 et le MAM-2 et 20 min pour le MAM-3.

Enregistrements patch-clamp

Les courants sont enregistrés par la technique de patch clamp en configuration cellule entière sur des cellules fluorescentes et isolées. Les pipettes de patch sont étirées de manière à ce qu'elles aient une résistance de 3-5 M Ω . Elles contiennent une solution intrapipette KCl, composée de 140 mM de KCl, 5 mM d'EGTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM d'HEPES et ajustée à pH 7,3 par NaOH. Après avoir atteint le gigaseal entre la pipette et la membrane cellulaire, cette dernière est rompue et un potentiel de membrane de -60 mV est maintenu par l'amplificateur EPC-10 (HEKA). Les enregistrements sont réalisés grâce au logiciel PATCHMASTER (HEKA). La solution extracellulaire appelée NES, pour natural extracellular solution, est composée de 140 mM de NaCl, 2,8 mM de KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de tampon HEPES, et 10 mM de glucose et est ajustée à pH 7,3 par NaOH, additionnée ou non d'ATP (sel de sodium, Sigma Aldrich) 30-100 μ M ou de ATP et H₂O₂ à 0,3%, suivant l'expérience. Ces solutions sont appliquées par l'intermédiaire d'un système de perfusion constitué de trois tubes parallèles placés au-dessus de la cellule sélectionnée. Le système SF77B Perfusion Fast step (Warner) permet de contrôler l'application des solutions avec un délai de décalage des tubes de 5 à 10 ms. Le système d'irradiation composé de LEDs à 365 nm et 530 nm est directement couplé au microscope et contrôlé par l'amplificateur. Les puissances d'irradiation en sortie d'objectif sont de 17,7 mW/mm² pour la LED de 363 nm et 13,3 mW/mm² pour la LED de 530 nm. L'analyse des données est effectuée via le logiciel FitMaster (HEKA Electroniks, version V2x69) et les valeurs sont des moyennes accompagnées du SEM (erreur standard à la moyenne). Le pourcentage de désensibilisation est calculé grâce au ratio des courants maximums obtenus en

début de protocole et l'amplitude des courants finaux avant refermeture du canal par irradiation à 365 nm ou à la fin de l'application de l'ATP. Les cinétiques de désensibilisation sont déduites de l'équation de décroissance exponentielle :

$$I_t = I_0 + Ae^{(-t/\tau)} \text{ (équation 5)}$$

où I_0 est le courant résiduel, A est l'amplitude maximale, t le temps en seconde et τ la constante de temps.

Pour les doubles incubations avec le MEA-TMA et le MAM, 50 μ L d'une solution de MAM sont déposés sur les cellules pendant 20 min, 1 mL de NES est ajouté pour arrêter l'incubation puis le tout est délicatement aspiré. Les 50 μ L de MEA-TMA peuvent alors être appliqués sur les cellules pendant 5 min. Dans le cas de la double incubation avec le MAM et les différents MTS, le MAM est incubé sur les cellules comme décrit précédemment, puis les courants induits par la lumière sont enregistrés. Une solution contenant 1 mM de MTS-EA, MTS-ET ou MTS-PT est ensuite perfusée pendant 2 min puis les courants sont de nouveau enregistrés.

Analyses des données

Les courants obtenus sont analysés via les logiciels FitMaster (HEKA Electronics, v2x69) et IgorPro (WaveMetrics, v6.32A). Chaque expérience est obtenue après trois transfections indépendantes, au minimum. Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne $\pm$ SEM. Tous les tests statistiques sont réalisés par des tests d'analyses de variance ANOVA non-appariés ou appariés dans le cas de la comparaison de la désensibilisation induite par le MAM avant ou après réaction avec le MTS.

Mutagenèse dirigée

Le gène du récepteur sauvage rP2X2 a été inséré dans le plasmide de clonage pCDNA3.1(+) qui est un vecteur eucaryotique contenant entre autres le promoteur CMV et un gène de résistance à l'ampicilline. Les oligonucléotides sont conçus de

manière à introduire la mutation ponctuelle souhaitée dans la séquence et un site de restriction enzymatique qui va permettre de discriminer les colonies positives. La mutagenèse est réalisée avec le Kit KAPA HiFi HotStart (Kapa Biosystems). Le mélange obtenu après la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est digéré par l'enzyme DpnI pendant 1 h à 37°C puis dialysé 30 min sur filtre Millipore à 0,025 µm. Il est ensuite transformé par électroporation à 2,5 V dans des bactéries *E.Coli* de souche DH5α compétentes. Les bactéries sont alors incubées toute la nuit à 37°C sur boîte de Pétri de LB-Agar supplémenté d'ampicilline (Amp) à 100 µg/mL. Des colonies sont sélectionnées et mises en culture dans du milieu LB-Amp stérile à 37°C toute la nuit. L'ADN plasmidique est purifié par l'utilisation du kit Nucleobond XtraMaxi (Macherey-Nagel) et une fraction est digérée par l'enzyme de restriction choisie lors de la conception de l'oligonucléotide. Les profils de digestion sont analysés sur gel d'agarose 1% contenant du BET. La concentration du plasmide d'une colonie positive est déterminée par spectroscopie UV selon la formule $[ADN] = 0,05 \times \text{facteur de dilution} \times A_{250 \text{ nm}}$ et sa séquence vérifiée par séquençage (GATC Biotech).

Tous les mutants cystéines sont réalisés sur le récepteur rP2X2-3T où les trois cystéines endogènes C9, C348 et C430, ont été mutées en thréonine afin d'éliminer un marquage non-spécifique par les dérivés azobenzènes.

Marquage des protéines de surface

Le marquage des protéines de surface est réalisé sur des cellules HEK293 transfectées la veille avec 10 µg des différents plasmides pCDNA3.1(+) de rP2X2. Les récepteurs sont porteurs d'un tag Cmyc dans la partie C-terminale. Après trois lavages au PBS⁺ à 4°C et à pH 8,0 contenant 154 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 4,2mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄ supplémenté de 1 mM MgCl₂ et 0,4 mM CaCl₂, les cellules sont incubées 30 minutes avec 2 mM de sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate (sulfo-NHS-SS-Biotine) dans le PBS⁺. Les cellules sont rapidement rincées au PBS⁺ et incubées 10 minutes avec une solution de Tris 20 mM dans du PBS⁺ pour éliminer l'excès de Sulfo-NHS-SS-Biotine. Après trois lavages, les cellules sont récoltées et solubilisées dans 200 µL de tampon de lyse (100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 20 mM HEPES, pH 7.4, contenant des inhibiteurs de protéases (ThermoScientific) et incubées 2h à 4°C sous forte agitation. Après

centrifugation à 12000 rpm pendant 10min, le surnageant est ajouté à 55 μ L de billes de Neutravidine-Agarose (ThermoScientific) préalablement lavées avec du tampon de lyse et incubé toute la nuit à 4°C sous agitation douce. Après lavages, les billes sont incubées à 95°C pendant 10min avec 40 μ L de LDS sample buffer (Invitrogen) contenant 70 mM de DTT. Les échantillons de protéines de surface sont chargés sur gel SDS-PAGE (4-15%, Biorad) afin de faire migrer les protéines par électrophorèse dénaturante (150 V, 35min). Les échantillons sont transférés par western-blot grâce à une cellule de transfert semisec à 25 V pendant 15 minutes. La membrane de nitrocellulose est saturée par du TPBS (PBS supplémenté de 1% protéines de lait, 0.5% albumine de sérum bovin et 0.05% Tween 20) et incubée toute la nuit à 4°C avec un anticorps anti-Cmyc de souris dilué au 1/5000 et un anticorps de souris dirigé contre la β -actine au 1/2500. Après trois lavages, un anticorps secondaire anti-souris de mouton, HRP conjugué, dilué au 1/10000 est appliqué sur la membrane pendant 2h à température ambiante. Les bandes de protéines sont révélées avec un kit de détection ECL (GE Healthcare).

Pour le marquage des protéines de surface avec le MAM-1 en intracellulaire, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS⁺ à pH 7,0 puis sont incubées 15 min avec une solution à 10 μ M de MAM-1 en présence d'ATP 3 μ M. L'excès de MAM-1 est neutralisé avec une solution de NACME à 10 mM pendant 15 min. La biotinylation peut alors être réalisée comme décrit précédemment.

4. Résultats

4.1 Etude des outils MEA-TMA et MAM

Comme décrit précédemment, le MEA-TMA induit des courants stables au cours du temps tandis que le MAM, à l'inverse, présente des courants qui diminuent au cours du temps, faisant d'eux de bons outils pour l'étude du phénomène de désensibilisation des récepteurs P2X.

Nous nous sommes donc intéressés plus en détail à la caractérisation de la désensibilisation ou non induite par ces molécules (Figure 37).

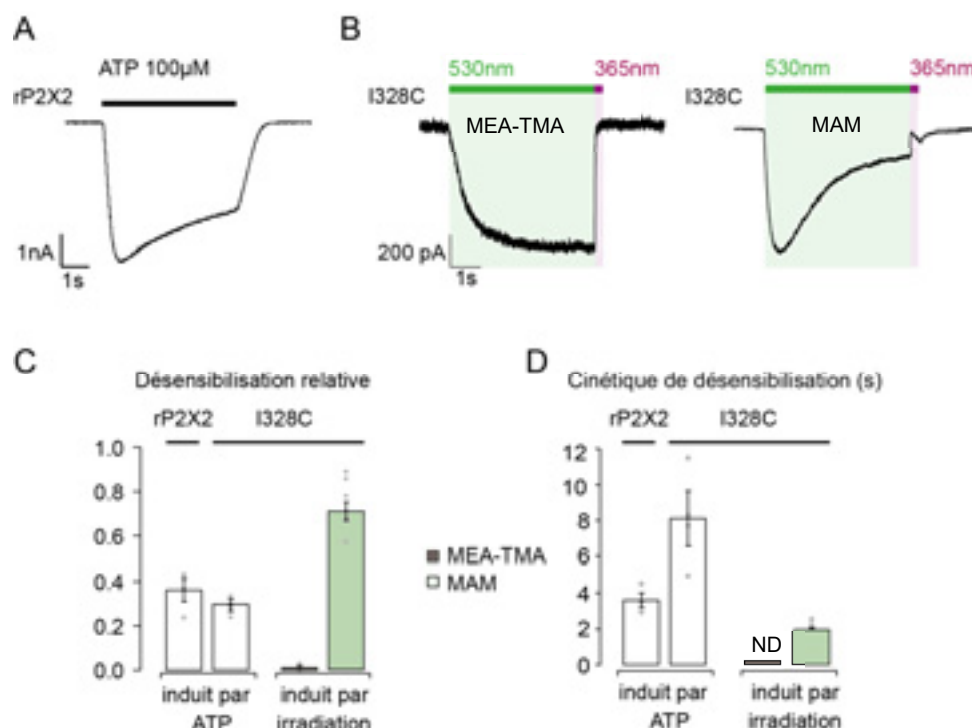


Figure 37 Caractérisation de la désensibilisation du MAM et du MEA-TMA. A Trace électrophysiologique en configuration cellule entière montrant une faible désensibilisation induite par l'ATP sur le récepteur rP2X2. B. Enregistrements en configuration cellule entière sous irradiations lumineuses à 530 nm et 365 nm après incubation au MEA-TMA (à gauche) et au MAM (à droite) de cellules surexprimant le récepteurs rP2X2-I328C. C. Quantification de la désensibilisation. D. Analyse des cinétiques de désensibilisation. ND : non déterminé

Les courants induits par une application d'ATP sur le récepteur P2X2-3T de rat présentent une faible désensibilisation (Figure 37.A). Son pourcentage de désensibilisation, calculé par un ratio des courants en fin de protocole (après 5 s de stimulation) de ceux obtenus au début, est en moyenne de $36,2 \pm 5,1$ % (Figure 37.C) avec une cinétique de désensibilisation $\tau = 3,61 \pm 0,39$ s ($n=4$) (Figure 37.D). L'introduction de la mutation I338C modifie légèrement ces caractéristiques. En effet, le pourcentage de désensibilisation est de $29,3 \pm 2,6$ % (Figure 37.C), quasiment identique à rP2X2-3T, mais la cinétique de désensibilisation est plus lente et passe à $8,11 \pm 1,55$ s ($n=4$) (Figure 37.D). La désensibilisation obtenue après incubation du MEA-TMA sur des cellules surexprimant ce mutant (Figure 37.B, à gauche), après 5 s

d'irradiation à 530 nm, représentent $0,9 \pm 0,4$ % (n=9) (Figure 37.C), trop faible pour calculer une cinétique de désensibilisation. La présence de cette molécule sur le récepteur bloque totalement la désensibilisation.

A l'inverse, ces cellules incubées avec le MAM présentent un pourcentage de désensibilisation de $71,0 \pm 4,0$ % (Figure 37.C) et une cinétique associée de $1,90 \pm 0,15$ s (n=9) (Figure 37.D). Le MAM augmente donc la désensibilisation du récepteur I328C.

4.2 Influence de la taille du MAM sur la désensibilisation

Au laboratoire, différentes tailles de MAM dont le MAM-1, le MAM-2 et le MAM-3 ont été synthétisées mesurant respectivement dans l'état *trans* environ 16 Å, 21 Å et 23 Å en solution (Figure 38.A).

Dans le but de voir l'influence de l'incrémentation progressive de la taille du bras espaceur entre les deux maléimides sur la désensibilisation, j'ai incubé des cellules surexprimant le récepteur I328C avec chacune des trois molécules (Figure 38.B). Les traces électrophysiologiques révèlent une désensibilisation différente pour chaque molécule.

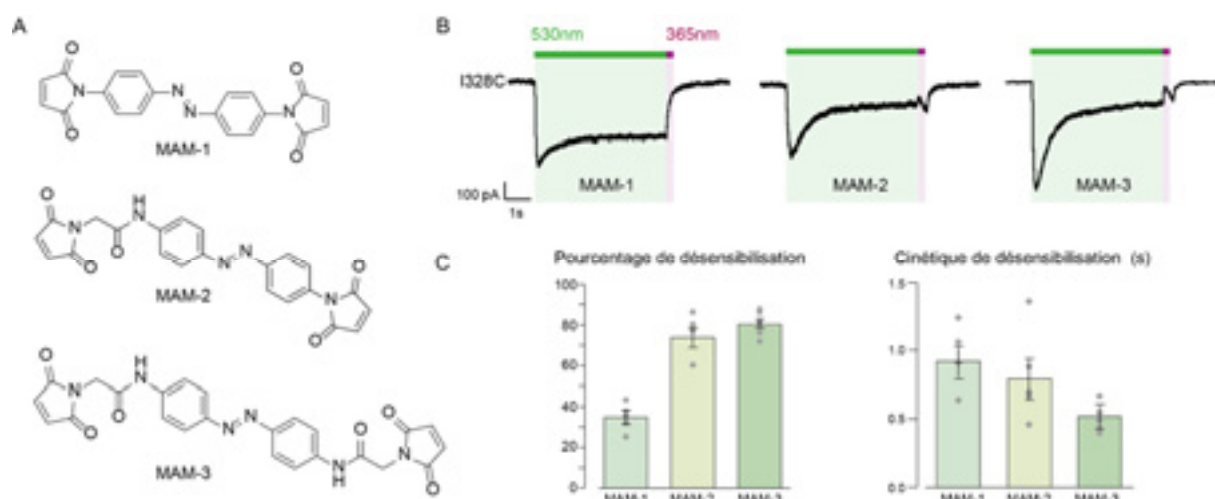


Figure 38 Utilisation de MAMs de taille croissante. A. Structures chimiques des trois MAMs utilisés. B. Traces électrophysiologiques enregistrées en configuration cellule entière sur des cellules exprimant le récepteur rP2X2-I328C préincubées avec l'un des trois MAMs. C. Quantification du pourcentage de désensibilisation (à gauche) et de la cinétique associée (à droite).

En effet, l'analyse du pourcentage de désensibilisation confirme ce résultat. Ce pourcentage est de $36,8 \pm 3,45$ % ($n=5$) pour le MAM-1, $73,6 \pm 4,9$ % ($n=6$) pour le MAM-2 et de $80,6 \pm 2,3$ % ($n=7$) pour le MAM-3 (Figure 38.C, à gauche). Plus l'écartement imposé par le MAM dans l'état *trans* est important, plus la désensibilisation est importante. De même, plus cet écartement est grand, plus la désensibilisation est rapide puisqu'elle est de $0,90 \pm 0,13$ s, de $0,79 \pm 0,14$ s et de $0,53 \pm 0,03$ s pour le MAM-1, le MAM-2 et le MAM-3, respectivement (Figure 38.C, à droite). La plus forte désensibilisation observée avec ces molécules est obtenue par le MAM-3.

4.3 Incubation séquentielle de MAM puis de MEA-TMA

Le MAM-3, dit MAM dans la suite du manuscrit, est donc un outil intéressant pour étudier la désensibilisation.

Le MEA-TMA induit des courants portés par les récepteurs P2X2 qui ne désensibilisent plus. Nous avons donc voulu voir l'influence de cette molécule sur des cellules préalablement incubées avec le MAM.

Le MAM se lie covallement sur deux des trois cystéines en position 328 du récepteur, laissant libre la troisième cystéine. Ainsi, l'incubation consécutive de MAM puis de MEA-TMA devrait permettre l'obtention d'une population de récepteurs majoritaire ayant réagi avec les deux molécules (Figure 39.A).

Les courants obtenus sous 5 s d'irradiation à 530 nm puis 5 s à l'obscurité par les cellules préincubées avec le MAM puis MEA-TMA, présentent une désensibilisation quasiment réduite de moitié (Figure 39.B). En effet, cette désensibilisation pour la double incubation est de $50,2 \pm 3,2 \%$ ($n=14$), comparée à celle obtenue par le MAM seul $90,3 \pm 2,4 \%$ ($n=7$) (Figure 39.C, à gauche). La diminution progressive des courants est également observée, avec en moyenne une cinétique de $0,20 \pm 0,02$ s ($n=14$) en comparaison avec $0,12 \pm 0,04$ s ($n=7$) pour le MAM seul (Figure 39.C, à droite).

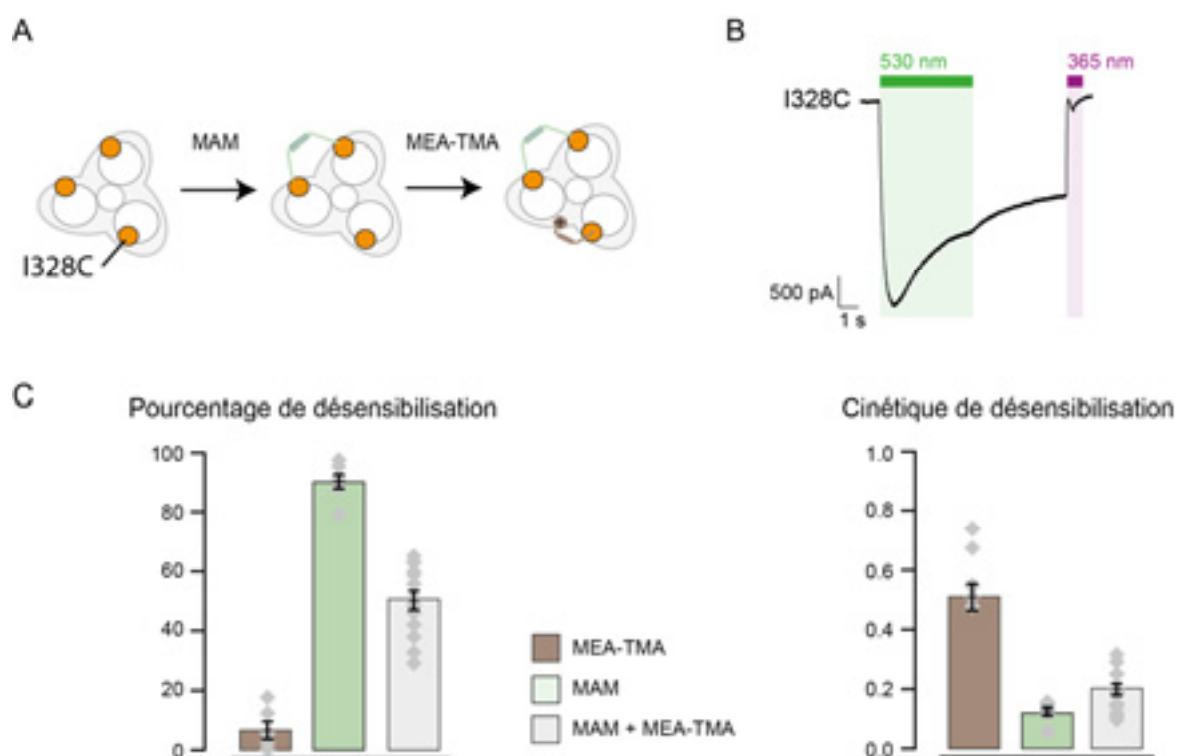


Figure 39 Incubation séquentielle de MAM et de MEA-TMA. A. Schéma représentatif de l'incubation successive du MAM puis du MEA-TMA sur I328C (sphère orange) sur chaque sous-unité. B. Trace électrophysiologique en configuration cellule entière représentative de cette double incubation. C. Analyse du pourcentage (à gauche) et de la cinétique (à droite) de désensibilisation pour le MEA-TMA seul (en marron), du MAM seul (en vert) et des deux molécules (en gris).

Ces résultats montrent que la présence de MEA-TMA sur le récepteur ralentit et diminue la désensibilisation induite par le MAM.

L'analyse du pourcentage de désensibilisation en fonction de la cinétique permet de mettre en évidence que la cinétique de désensibilisation de la double incubation est d'abord induite par le MAM (cinétique proche de celle obtenue pour le MAM seul) puis la présence du MEA-TMA diminue le pourcentage de désensibilisation (Figure 40.A).

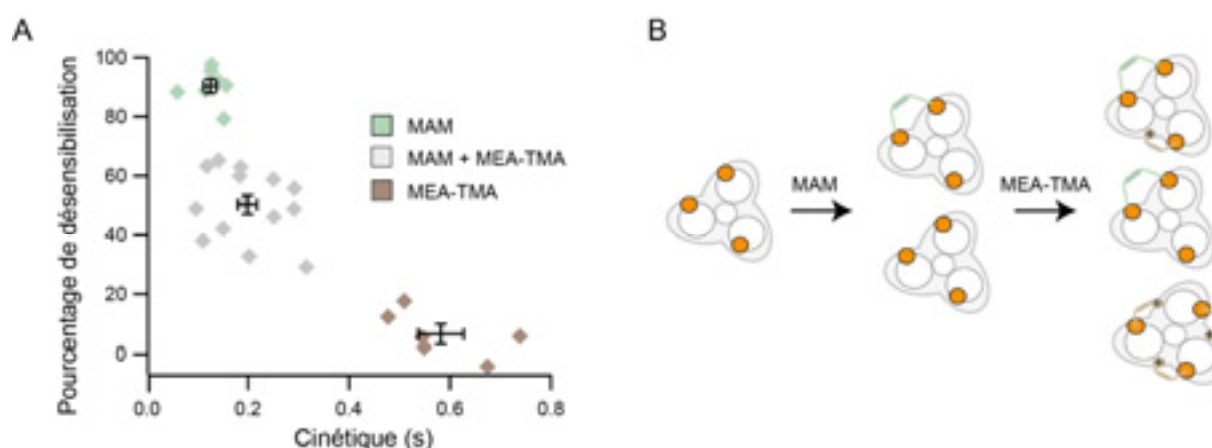


Figure 40 Variabilité de marquage. A. Graphique du pourcentage de désensibilisation en fonction de la cinétique pour le MAM seul (en vert), le MEA-TMA seul (en marron) et pour la double incubation (en gris). B. Représentation schématique de la variabilité de marquage.

Néanmoins, les profils obtenus lors de cette expérience révèlent également une grande variabilité. En effet, plusieurs cellules issues de l'incubation séquentielle présentent un courant identique à celui obtenu pour les cellules seulement incubées avec le MAM. Et à l'inverse, certaines d'entre elle présentent un profil proche de celui obtenu pour des cellules préincubées avec le MEA-TMA seul. Ce résultat suggère que la double incubation ne permet pas d'avoir une seule population majoritaire de récepteurs I328C contenant les deux molécules mais trois populations majoritaires : une avec les deux molécules liées sur le récepteur ; une population de récepteurs où le MEA-TMA ne s'est pas fixé ; et enfin des récepteurs qui n'ont pas réagi avec le MAM, ayant donc les trois cystéines 328 disponibles pour la liaison avec le MEA-TMA (Figure 40.B).

De plus, il est également probable que par encombrement stérique, le MEA-TMA ne puisse pas atteindre la troisième cystéine disponible sur le récepteur et que les courants obtenus sont l'addition des populations de récepteurs liés avec le MAM seul et de ceux liés avec le MEA-TMA seul. Pour le vérifier, j'ai additionné ces courants et extrait le profil de courant théorique ainsi obtenu (Figure 41).

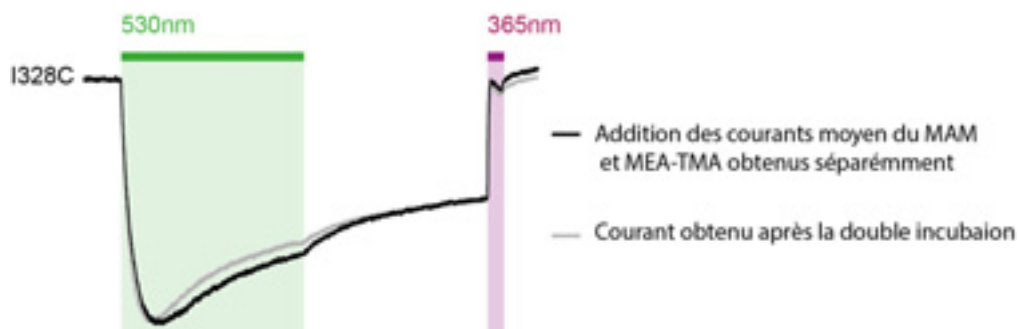


Figure 41 Addition des courants induits par le MAM et le MEA-TMA. En gris, trace électrophysiologique obtenue expérimentalement après co-incubation des cellules par le MAM suivie du MEA-TMA et en noir le courant calculé par l'addition des courants moyens du MAM et du MEA-TMA

Effectivement, après normalisation, les courants obtenus expérimentalement après la double incubation, sont parfaitement superposables à ceux calculés.

Un désavantage de cette expérience est également l'absence de comparaison avant et après réaction du MEA-TMA sur une même cellule et ainsi de voir l'effet concret de cette molécule sur celui du MAM. De plus, les deux molécules sont activées en même temps, ce qui ne permet pas une activation du récepteur spécifique de l'une des deux molécules.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à d'autres agents chimiques.

4.4 Incubation séquentielle du MAM puis de MTS

Les MTS (methanethiosulfonate) sont des agents chimiques non activables par la lumière, capables également de se lier covalamment aux groupements thiol des

cystéines et notamment, dans notre cas, sur la troisième cystéine en position 328. Ces molécules commercialisées ont l'avantage d'exister avec des tailles et des propriétés multiples. Nous avons donc choisi trois MTS chargés positivement et de taille croissante, afin de retrouver les propriétés électrochimiques du MEA-TMA tout en explorant l'effet de la taille du MTS sur la désensibilisation induite par le MAM. Les MTS choisis sont le MTS-EA, le plus petit, le MTS-ET, de taille intermédiaire et enfin le MTS-PT, le plus grand (Figure 42.A). J'ai pu comparer la désensibilisation induite par le MAM avant et après ligation du MTS d'intérêt grâce à la perfusion contrôlée de ce dernier (Figure 42.B).

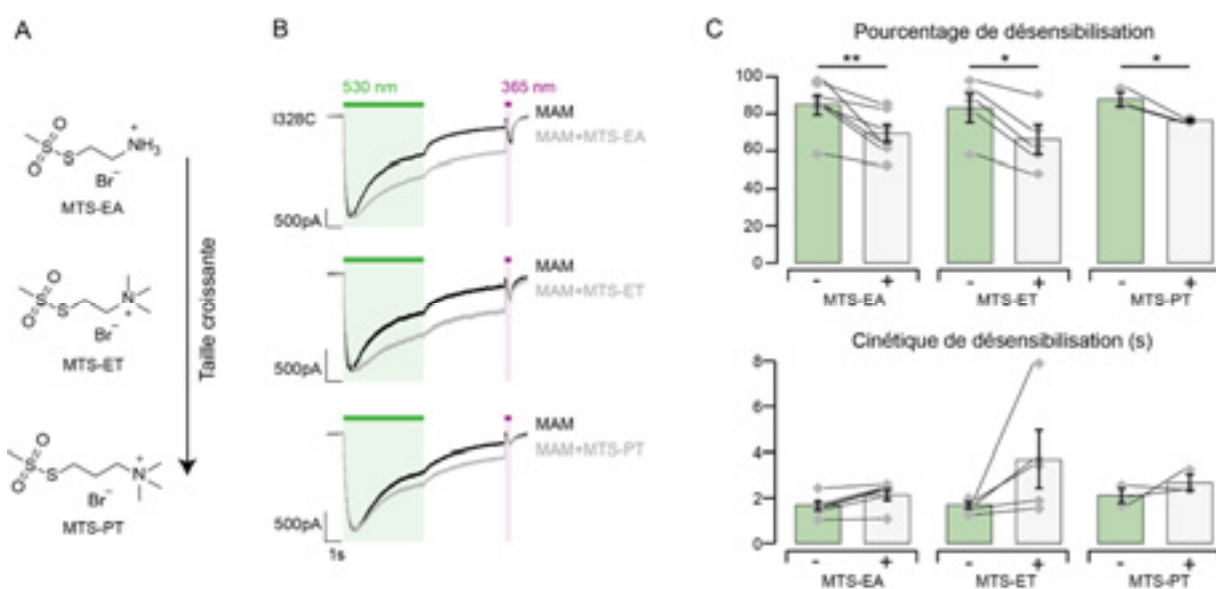


Figure 42 Effet des MTS sur la désensibilisation induite par le MAM. A. Structures chimiques des MTS choisis. B. Traces électrophysiologiques obtenues avant et après perfusion du MTS d'intérêt. Pour chaque cas, les enregistrements sont réalisés sur la même cellule. C. Quantification du pourcentage de désensibilisation (en haut) pour chaque MTS et de la cinétique (en bas). Les traits relient les résultats obtenus pour une même cellule. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$

Ainsi, pour chaque MTS, nous observons une diminution statistiquement significative de la désensibilisation ainsi qu'un ralentissement de celle-ci.

L'application de MTS-EA réduit le pourcentage de désensibilisation de $84,7 \pm 5,3$ % obtenu pour le MAM seul à $69,3 \pm 4,8$ % après perfusion de MTS-EA, soit une diminution de 18% de la désensibilisation du MAM ($n=7$). La présence de cet agent

chimique sur les récepteurs I328C, ralentit également leur désensibilisation puisqu'elle passe de $1,7 \pm 0,2$ s à $2,1 \pm 0,2$ s.

Avant l'utilisation du MTS-ET, la désensibilisation des récepteurs est de $82,3 \pm 7,8$ %. L'application de cet agent diminue la désensibilisation pour atteindre un pourcentage de $66,2 \pm 7,9$ % (n=5). La cinétique de désensibilisation est aussi ralentie, étant de $1,7 \pm 0,1$ s avant MTS-ET puis de $3,7 \pm 1,3$ s.

Enfin, la réaction de l'agent chimique MTS-PT a lui aussi un effet sur le ralentissement de la désensibilisation : étant de $87,7 \pm 3,9$ % en présence du MAM seul, puis de $76,2 \pm 0,9$ % (n=3) après sa perfusion. La cinétique quant à elle est de $2,0 \pm 0,3$ s au départ puis est de $2,7 \pm 0,4$ s après perfusion du MTS-PT (Figure 42.C).

Dans tous les cas, la présence d'un agent chimique sur la troisième cystéine 328 réduit et ralentit la désensibilisation. Toutefois il est à noter que la taille du MTS ne semble pas avoir d'influence sur la modulation de la désensibilisation.

Ces résultats démontrent que l'occupation de la position 328 par un agent chimique influence la désensibilisation. Le résidu I328, et donc la mutation I328C, est placée proche des crevasses transmembranaires révélées par les structures cristallographiques. Ces poches sont suffisamment grandes pour accueillir des molécules chimiques. Les MTS utilisés ici pourraient donc s'y loger et jouer le rôle de modulateur allostérique, bloquant partiellement le réarrangement protéique qui a lieu lors de la désensibilisation.

4.5 Etude du positionnement du MEA-TMA

4.5.1 Exploration de la stœchiométrie de marquage du MEA-TMA

Le MEA-TMA ne présentant pas de courants désensibilisants, il est donc intéressant de comprendre son mécanisme d'action, notamment par la détermination de la stœchiométrie de marquage de la molécule sur le récepteur dans le cas de l'optogating et de l'optoblock. Pour ce faire, des concatémères ont préalablement été conçus sur lesquels le nombre et la position des cystéines ont pu être contrôlés. Ainsi, un gène

unique formé de la répétition du gène monomérique permet d'obtenir les trois sous-unités liées covalamment par un bras espaceur polypeptidique, permettant le contrôle de l'insertion de chaque cystéine. De cette manière, une série de sept concatémères portant une, deux ou trois cystéines en position 328 a été obtenue (Figure 43).

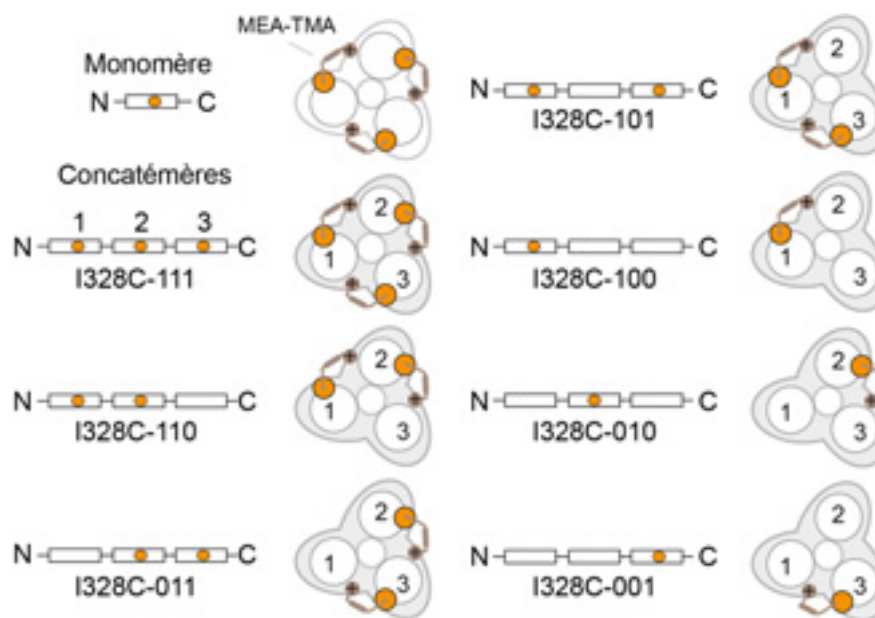


Figure 43 Schéma et nomenclature des différents concatémères. Chaque sphère orange représente la mutation I328C, portée sur la première, la deuxième et/ou la troisième sous-unité. 1 représente la présence de la mutation I328C et 0 son absence. La fixation d'une, deux ou trois molécules de MEA-TMA est également schématisée. L'assemblage homomérique est représenté par un récepteur à fond blanc et les concatémères par un fond gris,

Chaque concatémère a dans un premier temps été testée en électrophysiologie patch-clamp afin de vérifier leur fonctionnalité. Toutes les constructions répondent à une application d'ATP, avec des courants saturants pour une concentration de 100 μ M. L'incubation de cellules surexprimant l'une des sept constructions a donc été réalisée pour mesurer leur amplitude de courant de photorégulation. Après une courte irradiation dans l'UV pour basculer les molécules de MEA-TMA dans leur état *cis*, une irradiation dans le visible puis de nouveau dans l'UV suivie d'une application saturante d'ATP ont été appliquées (Figure 44).

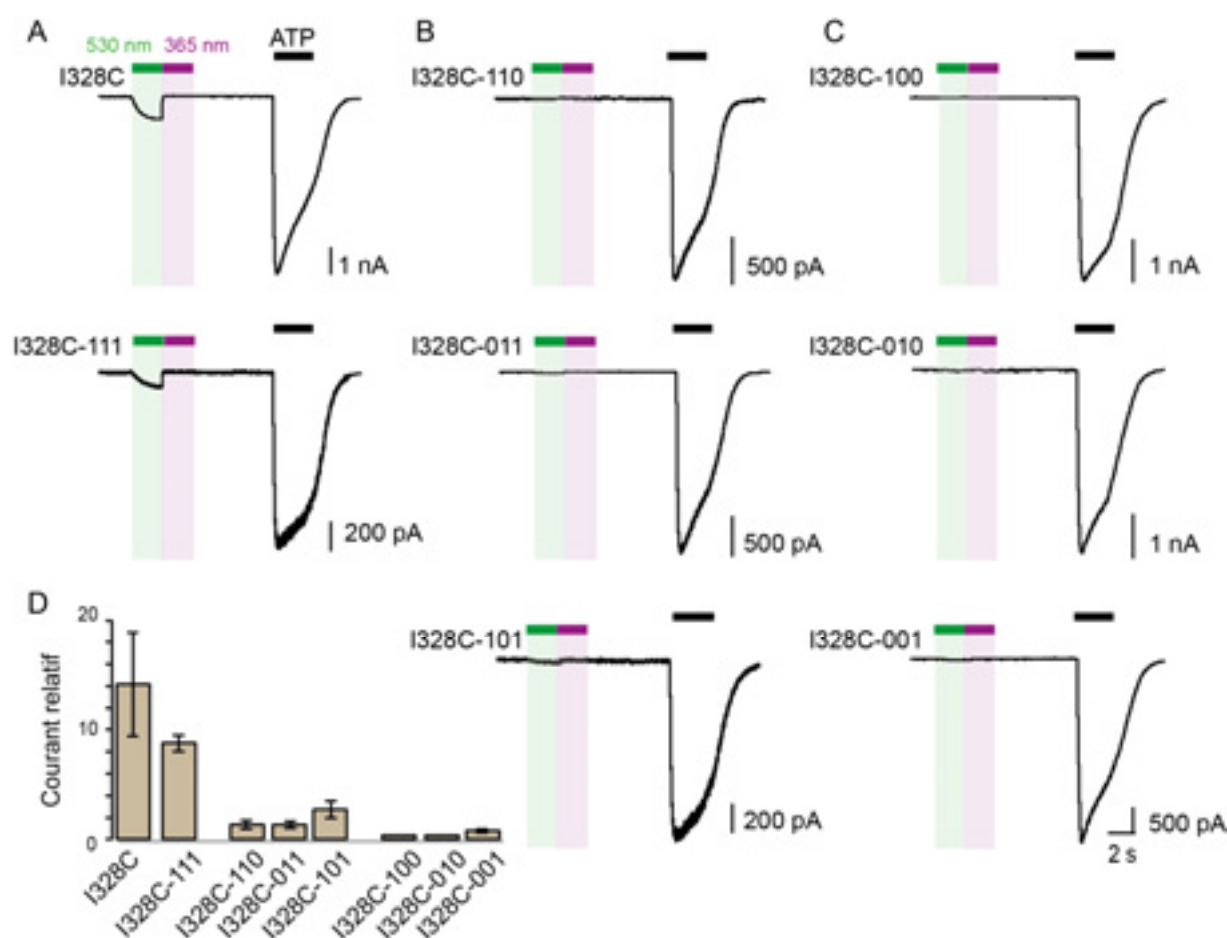


Figure 44 Etude de l'optogating. A, B, C Traces électrophysiologiques enregistrées sur des cellules exprimant l'une des différentes constructions marquées par le MEA-TMA sous irradiations puis sous application d'ATP 100 μ M pour trois cystéines (A) pour deux cystéines (B) et pour une seule cystéine (C). D. Histogramme du courant de photorégulation par rapport à une réponse ATP saturante.

La construction contrôle est le concatémère I328C-111 où chaque sous-unité porte la mutation cystéine I328C. Les courants de photorégulation lors de l'irradiation dans le visible pour cette construction représentent $8,8 \pm 0,7$ % ($n = 7$) des courants ATP contre $14,1 \pm 4,8$ % ($n = 4$) pour l'homomère rP2X2-3T (Figure 44.A et D). La formation du concatémère a donc un impact sur l'efficacité du MEA-TMA mais les courants obtenus sont suffisants pour la suite de la détermination de la stœchiométrie de marquage.

Lorsque le nombre de cystéine sur le récepteur diminue, l'intensité des courants de photorégulation est réduite. Cette réduction semble indépendante de la position de la cystéine introduite. Ainsi, pour les constructions I328C-110, I328C-011 et I328C-101

les courants obtenus sous irradiation dans le visible sont respectivement de $1,3 \pm 0,4$ % ($n = 5$), $1,3 \pm 0,3$ % ($n = 8$) et $2,7 \pm 0,8$ % ($n = 6$) (Figure 44.B et D).

Lorsque les constructions ne portent qu'une seule cystéine, les courants de photorégulation ne sont pas discernables du bruit de fond excepté pour la construction I328C-001 où ils ne représentent que $0,8 \pm 0,1$ % ($n = 5$) (Figure 44.C et D).

Le même protocole d'irradiations a été réalisé mais lors d'une application d'ATP saturante afin d'étudier l'optoblock. A l'inverse de l'optogating, un effet de la lumière est observé pour toutes les constructions (Figure 45).

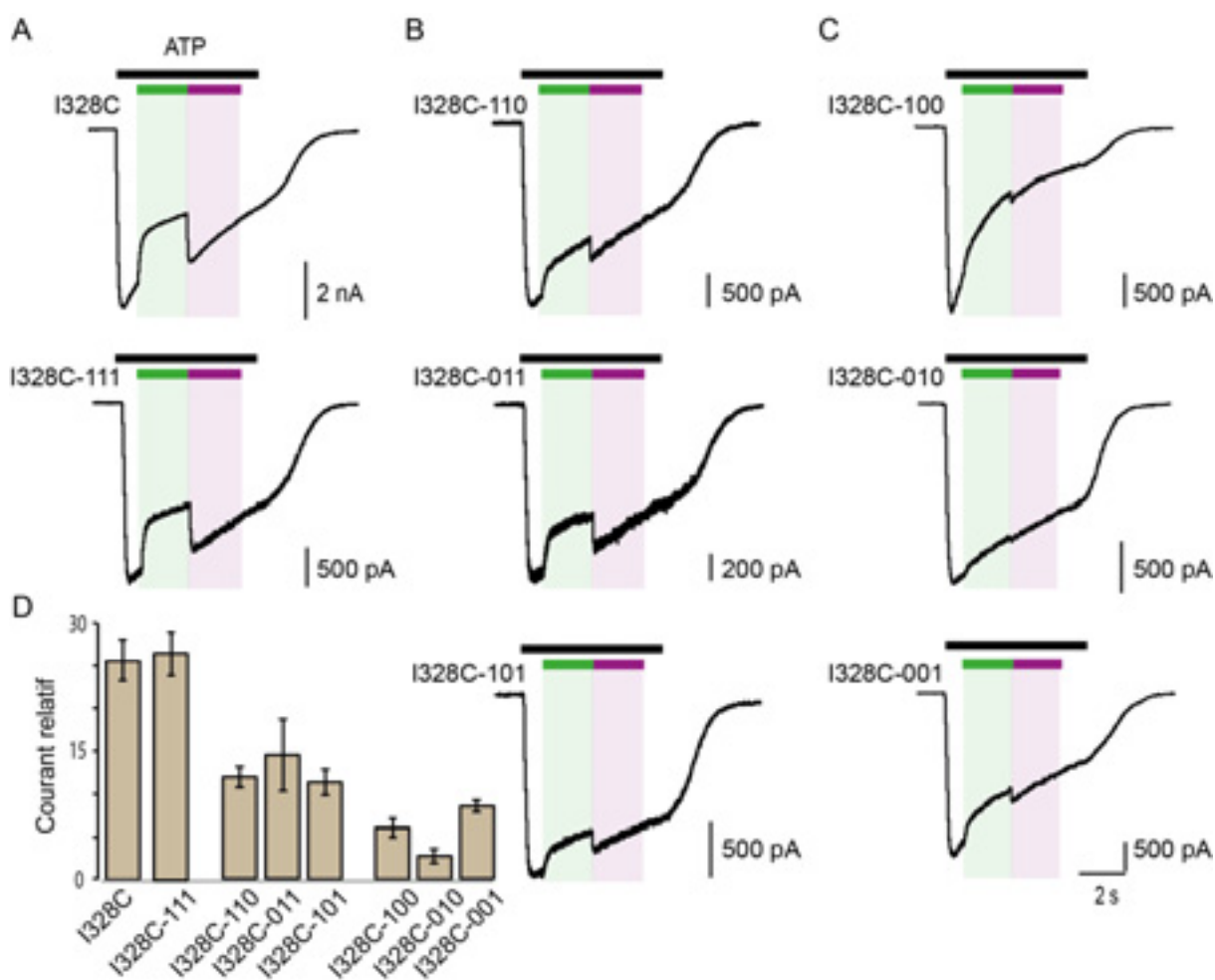


Figure 45 Etude de l'optoblock. A, B, C Courants obtenus par les différentes constructions marquées par le MEA-TMA lors d'une irradiation sur des canaux ouverts par l'application d'ATP saturant. A. pour trois cystéines B. pour deux cystéines et C pour une cystéine. D. Histogramme de la proportion de courant de photorégulation par rapport aux courants ATP.

Cette fois-ci la technique de concaténation n'a que très peu d'effet sur l'optoblock puisque le MEA-TMA dans l'état *trans* bloque les courants ATP à hauteur de $25,5 \pm 2,4$ % ($n = 6$) pour le contrôle rP2X2-3T/I328C comparé à $25,9 \pm 2,4$ % ($n = 7$) pour le concatémère I328C-111 (Figure 45.A et D).

Le blocage des courants ATP par la lumière est de $11,8 \pm 1,2$ % ($n = 7$), $14,4 \pm 4,2$ % ($n = 6$) et $11,3 \pm 1,5$ % ($n = 4$) pour les constructions I328C-110, I328C-011 et I328C-101 respectivement (Figure 45.B et D).

Enfin, la présence d'une seule cystéine et donc d'une seule molécule de MEA-TMA sur le récepteur provoque le blocage de l'ordre de $6,0 \pm 1,1$ % ($n = 4$) pour la construction I328C-100, de $2,8 \pm 0,8$ % ($n = 4$) pour I328C-010 et $8,4 \pm 0,7$ % ($n = 10$) pour I328C-001 (Figure 45.C et D).

En présence d'ATP, l'élimination d'une cystéine provoque donc une chute d'environ 50 % sur l'efficacité du blocage puis encore de 50 % lorsqu'une deuxième cystéine est enlevée.

Ces différences entre l'optogating et l'optoblock suggèrent que deux mécanismes distincts ont lieu lors de ces deux phénomènes. Nous proposons cependant, en accord avec ces résultats, que dans l'état *trans* l'azobenzène de la molécule glisse entre les hélices transmembranaires de manière à occuper les crevasses hydrophobes de cette zone, tout comme les dérivés MTS, comme expliqué précédemment.

4.5.2 Influences de mutants tryptophanes dans les cavités transmembranaires sur l'activation par la lumière induite par le MEA-TMA

Afin de vérifier si ces molécules chimiques se placent effectivement dans les poches transmembranaires, j'ai créé par mutagenèse dirigée deux mutations tryptophanes dans les domaines transmembranaires TM2 se trouvant deux, A335W, et quatre, V343W, tours d'hélice plus bas comparé à I328C et pointant en direction de ces crevasses (Figure 46.A), le tryptophane étant un acide aminé imposant.

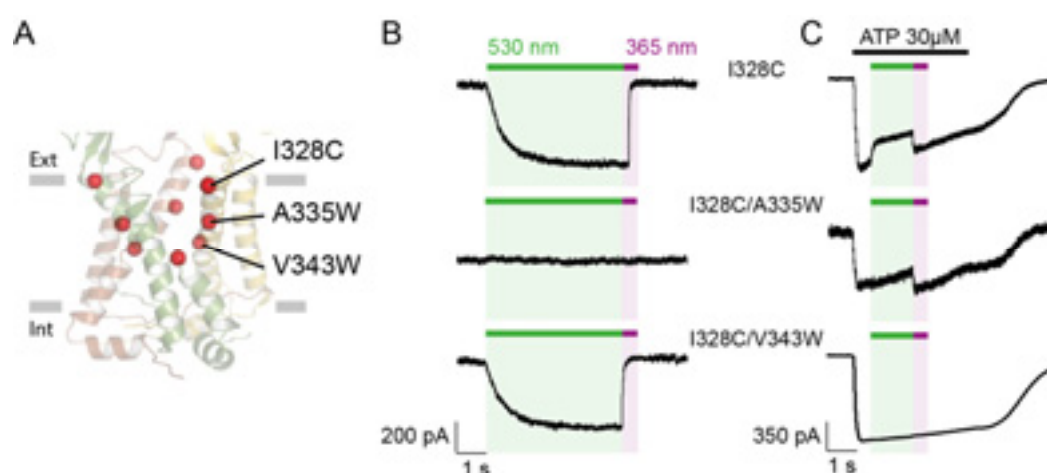


Figure 46 Mutations tryptophanes dans les crevasses transmembranaires. A. Positionnement des deux mutations A335W et V343W par rapport à I328C (sphères rouges). B. Traces électrophysiologiques obtenues après incubations avec le MEA-TMA de cellules exprimant les constructions I328C, I328C/A335W ou I328C/V343W sous irradiation lumineuse. C. Enregistrements des courants pour ces mêmes cellules en présence d'ATP.

L'enregistrement des courants de cellules transfectées avec I328C/A335W après incubation avec le MEA-TMA, démontre que la présence du tryptophane empêche le MEA-TMA d'ouvrir le canal dans l'état *trans* puisqu'aucun courant n'est enregistré. Ce résultat suggère que cet acide aminé empêche bien la molécule de se placer dans les cavités transmembranaires (Figure 46.B, au milieu). Afin de vérifier que l'absence de photorégulation est bien due au tryptophane et pas à un défaut de marquage, l'irradiation lumineuse a été réalisée en présence d'ATP. Les cellules exprimant I328C/A335W présentent bien un profil d'optoblock indiquant que le MEA-TMA est bien covalamment lié sur la cystéine 328 (Figure 46.C, au milieu).

La mutation V343W, quant à elle, n'affecte pas les courants induits par le MEA-TMA sur I328C. Les densités de courants sont de $28,12 \pm 5,78$ (n=4) comparé aux $39,32 \pm 8,99$ (n=10) obtenu pour rP2X2-I328C (Figure 46.B, en bas).

En revanche, nous pouvons constater que le MEA-TMA sur I328C/V343W n'a pas d'effet lorsque le récepteur est activé par l'ATP (Figure 46.C, en bas).

Le récepteur P2X7 est le seul récepteur non activable par les changements conformationnels du MEA-TMA. L'idée est donc de savoir si un acide aminé empêcherait l'action de la molécule, comme dans le cas de A335W.

L'alignement de séquence révèle la présence d'une tyrosine en position 343 des récepteurs P2X7, équivalente de la position 340 sur le récepteur rP2X2. Elle est donc placée entre les deux acides aminés testés précédemment. Cette tyrosine est conservée chez tous les homologues P2X7 et est absente sur les récepteurs P2X2 et P2X3, qui présentent, à la place, une sérine (Figure 47.A). J'ai alors introduit par mutagenèse dirigée la mutation Y343S sur rP2X7 déjà porteur de l'équivalent de la mutation I328C (=I331C).

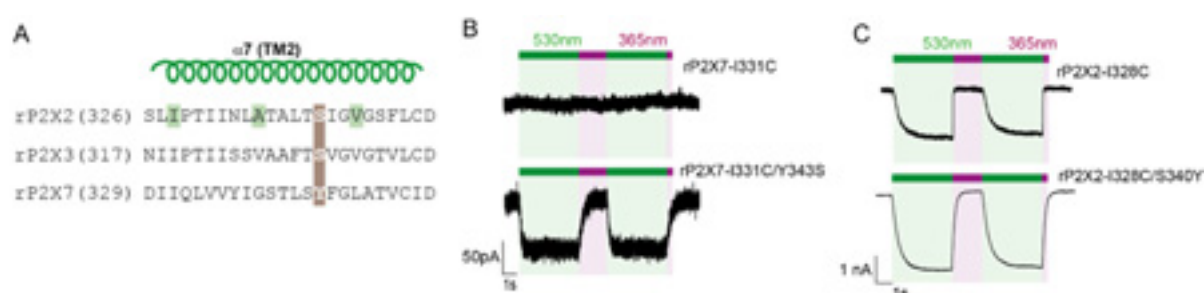


Figure 47 Influence de la tyrosine sur l'action du MEA-TMA. A. Alignement de séquence des parties transmembranaires TM2 de rP2X2, rP2X3 et rP2X7 (adapté de (Kawate et al., 2009)). B. Photorégulation du récepteur rP2X7 par le MEA-TMA avec ou sans la tyrosine 343. C. Courant induit après incubation de cellules exprimant les récepteurs I328C ou I328C/S340Y.

Comme attendu, le MEA-TMA ne permet pas l'ouverture du canal P2X7-I331C. En revanche, la présence d'une sérine à la place de la tyrosine permet d'obtenir des courants ayant en moyenne une densité de courant de $2,34 \pm 0,59$ (n=6). La libération des cavités transmembranaires, permettrait au MEA-TMA de s'y glisser dans son état *trans* et d'ouvrir le canal (Figure 47.B).

Sur le récepteur rP2X2, la mutation S340Y (équivalent à Y343 sur rP2X7) a un effet surprenant. A l'inverse du rP2X7, elle a un effet potentiateur. Les courants obtenus sont deux fois plus importants que pour I328C seul : les densités de courant pA/pF obtenues sur I328C étaient de $39,32 \pm 8,99$ (n=10) alors qu'avec S340Y elles sont de $82,29 \pm 25,25$ (n=5) (Figure 47.C).

Tous ces résultats concordent avec l'hypothèse d'une occupation des cavités transmembranaires par le MEA-TMA dans l'état *trans*. L'occupation de ces dernières

par un résidu encombrant empêche, en effet, un contrôle du récepteur par la lumière efficace.

4.6 Exploration de la partie cytoplasmique dans la désensibilisation

Les résultats précédents semblent montrer que les cavités transmembranaires peuvent jouer un rôle important dans la modulation de la désensibilisation. Néanmoins, la récente résolution de la structure cristallographique du récepteur hP2X3 (Mansoor et al., 2016) révèle pour la première fois la présence d'un réseau d'interactions cytoplasmique des parties N- et C-terminales dans l'état ouvert (Figure 48).

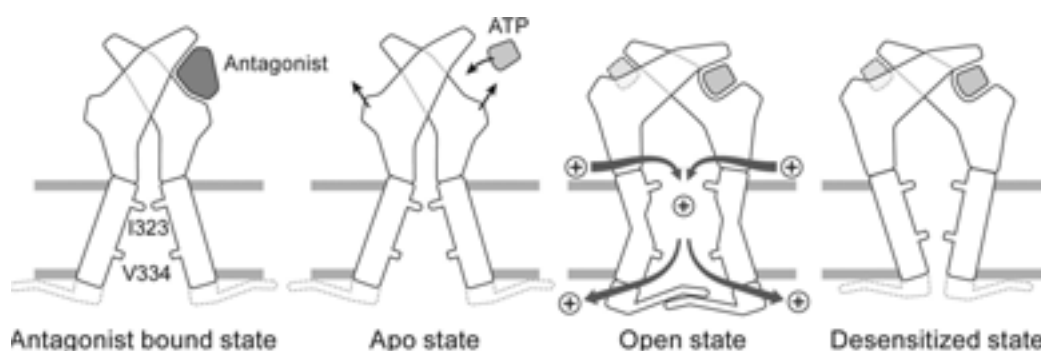


Figure 48 Schéma structural de la nouvelle structure cristallographique du récepteur hP2X3 (Mansoor et al.), 2016)

Ce réseau ne semble plus être présent dans l'état de repos ni dans l'état désensibilisé. Malheureusement la résolution de la structure ne permet de le confirmer.

Notre hypothèse est donc que ces interactions des parties intracellulaires formées dans l'état ouvert stabiliseraient cet état. L'idée est donc d'intégrer un couple de mutation cystéine disposé dans ce réseau afin de créer un pont disulfure entre les cystéines et ainsi voir l'influence de cette liaison sur la fonctionnalité et la stabilité de

l'état ouvert. La distance entre les deux carbones β de deux résidus cystéines devant être suffisamment proches, 17 couples ont été créés ainsi que la simple mutation P19C, proche de l'axe de symétrie du pore (Figure 49).

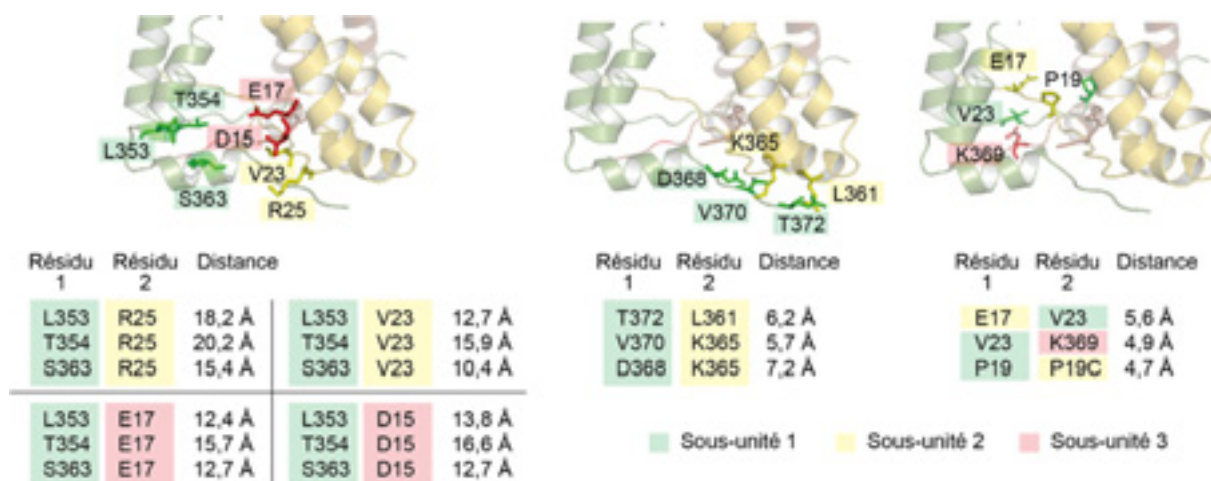


Figure 49 Position des différents couples de cystéines. Les résidus cytoplasmiques sélectionnés sont associés par paire en fonction de leur distance et mutés en cystéine pour la formation de pont disulfure

Après avoir introduit par mutagenèse dirigée une première cystéine sur le récepteur P2X2 de rat, la deuxième y est ajoutée. Ainsi les 18 paires ont pu être créées. Afin de vérifier que ces constructions sont adressées en surface, un marquage des protéines de surface par biotinylation puis une révélation grâce au western blot ont pu être réalisés. La révélation des membranes montre que toutes les constructions sont bien exprimées en surface (Figure 50).

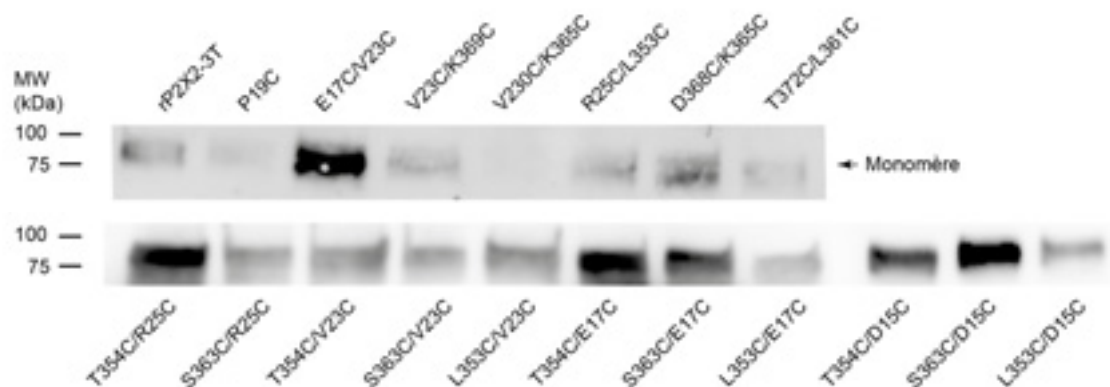


Figure 50 Expression de surface des 18 mutants cystéines

Comme les mutants sont bien exprimés en surface, nous avons pu les étudier en patch-clamp. Par manque de temps, seules deux constructions ont pu être testées : P19C, et E17C/V23C. Les deux sont fonctionnelles en présence d'ATP, mais ne présentent pas de profils d'activation et de désensibilisation différents du récepteur rP2X2 sauvage.

Une fois activé par l'ATP nous avons donc ajouté un agent oxydant, l' H_2O_2 , dans le but de favoriser la formation du pont disulfure. Néanmoins, les courants obtenus après cette addition d'eau oxygénée ne présentent pas non plus de profil différent (Figure 51).

L'application d'une solution à 0,3 % de H_2O_2 pendant l'application d'ATP crée un effet de solution dû à un potentiel de jonction à cause d'une différence ionique. Cet effet de solution ne permet pas de visualiser directement l'effet de l'agent oxydant sur la réponse ATP (Figure 51.A). La comparaison des profils électrophysiologiques avant et après application de H_2O_2 est alors la solution pour quantifier un effet de la potentielle formation d'un pont disulfure entre les cystéines.

Cependant, la rapide analyse des cellules obtenues pour la double mutation E17C/V23C (Figure 51.B) et de P19C (Figure 51.C) révèlent que ni la vitesse ni le taux de désensibilisation ne semblent être modifiés, ce qui suggèrent que la formation du pont disulfure n'a pas eu lieu ou que s'il a eu lieu, n'a aucune influence sur la stabilisation de l'état ouvert (Figure 51.D).

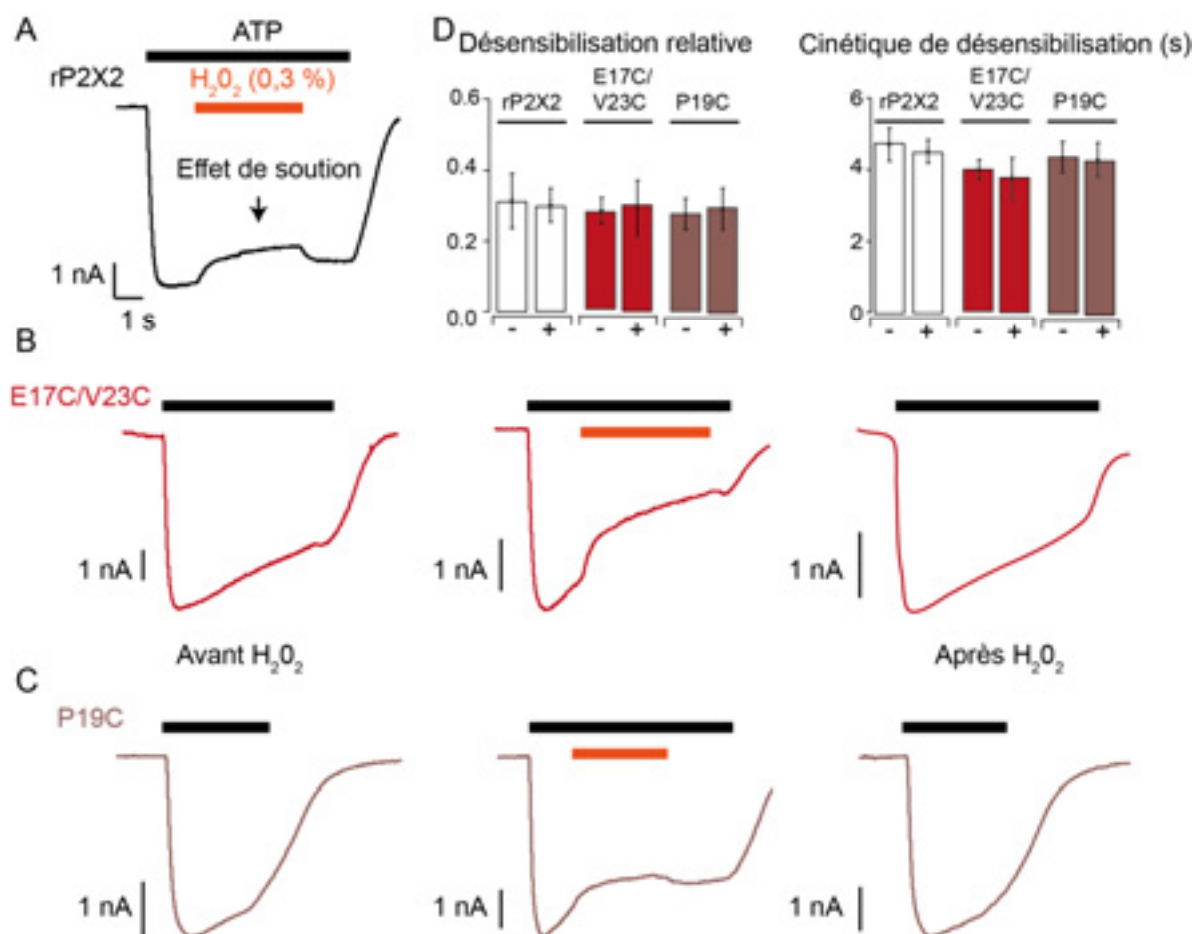


Figure 51 Etude de la formation de pont disulfure dans le domaine intracellulaire. A. Trace électrophysiologique obtenue sur rP2X2 en présence d'ATP et lors de la co-application de l'ATP et H₂O₂ mettant en avant un potentiel de jonction au moment de l'application de l'agent oxydant. B.C Enregistrements électrophysiologiques des constructions E17C/V23C (B) et P19C (C) avant, pendant et après application de H₂O₂ en présence d'ATP. D. Histogrammes de la désensibilisation relative calculée en mesurant les courants restants en fin de protocole comparés aux courants initiaux, et de la cinétique de désensibilisation pour chaque conditions (- : avant H₂O₂; + : après H₂O₂)

Afin de savoir si un pont disulfure s'est effectivement créé, nous avons ajouté du DTT avant et pendant l'application d'ATP. Cette fois encore, aucune différence n'est observée, suggérant l'absence d'un pont disulfure. Toutefois, il ne s'agit ici que d'une étude préliminaire dont le nombre de cellules n'est pas suffisant pour affirmer les résultats obtenus (n = 2) et les autres paires de cystéines restent à être testées.

5. Discussion

Les deux dérivés azobenzènes dont nous disposons, bien que basés sur le même squelette moléculaire, présentent des profils de désensibilisation différents.

Malgré la contrainte mécanique apportée par le MAM un réarrangement de la protéine s'opère, bloquant progressivement le passage des ions et qui s'apparente au profil de désensibilisation du récepteur P2X en présence d'ATP. L'écartement contraint de deux sous-unités ne permet donc pas de stabiliser l'état ouvert du récepteur. De plus, l'utilisation de MAM de taille croissante a permis de mettre en évidence que plus cet écartement est grand, plus la désensibilisation est rapide et importante, dans le cas des MAM-1, MAM-2 et MAM-3. L'utilisation de MAM plus longs aurait pu être effectuée mais la flexibilité des molécules pourrait poser problème. D'un point de vue physiologique, l'écartement de la partie haute du domaine transmembranaire ne semble cependant pas être corrélée avec le processus de désensibilisation. En effet, l'écartement mesuré sur la structure cristallographique de l'état ouvert d'une version tronquée de zfP2X4 n'est pas différent de celui obtenu sur la structure de P2X3 humain alors que les désensibilisations des deux récepteurs sont différentes, avec une forte désensibilisation pour P2X3 et une désensibilisation beaucoup plus lente pour P2X4. Les caractéristiques de la désensibilisation induite par les différents MAM ne semble donc pas être corrélées avec celles de la désensibilisation physiologique des récepteurs P2X.

Cependant, le MAM est placé dans la partie supérieure du domaine transmembranaire, forçant et maintenant ainsi son écartement dans l'état *trans* de la molécule, ce qui suggère que le réarrangement protéique pourrait s'effectuer dans la partie inférieure des récepteurs P2X. Il est à noter que la liaison verticale du MAM en position I328C/S356C permet l'obtention de courants stables, le réarrangement est bloqué par la contrainte mécanique imposée par la molécule. S356C est localisée en bas de l'hélice transmembranaire, le MAM maintient donc un certain écartement entre la partie haute de l'hélice d'une sous-unité et la partie basse d'une deuxième sous-unité. L'absence de désensibilisation dans ce cas est en accord avec l'idée d'un réarrangement dans la partie basse. La résolution de la structure cristallographique dans l'état désensibilisé semble également valider cette hypothèse puisque l'équipe

du Dr Gouaux décrit que les mouvements de la transition entre l'état ouvert et l'état désensibilisé se font au niveau de la surface cytoplasmique (Mansoor et al., 2016).

En conséquence, la partie basse des domaines transmembranaires semble être une zone importante dans la désensibilisation. Les cavités présentes sur les structures cristallographiques entre les hélices transmembranaires pourraient également être une zone de modulation dans la transition état ouvert – état désensibilisé. L'utilisation des agents chimiques MTS chargés positivement nous a permis de ralentir et de diminuer la désensibilisation provoquée par le MAM. Il est connu que les MTS ont accès au canal ainsi qu'à la partie transmembranaire (Kawate et al., 2011; Rassendren et al., 1997; Spelta et al., 2003). Nous pouvons donc supposer qu'ils prennent place dans ces cavités. La modulation de la désensibilisation par ces agents reste faible, la présence d'une charge positive dans les parties transmembranaires n'étant pas favorable. La perfusion de MTS aux propriétés hydrophobes, tels que le MTS-BE (tert-butyl-MTS), MTS-P (propyl-MTS) ou MTS-E (éthyl-MTS), aurait pu être faite dans le but d'augmenter la probabilité d'une occupation des cavités par le MTS et ainsi moduler de manière plus importante la désensibilisation induite par le MAM.

Si les crevasses transmembranaires sont capables d'accueillir des MTS, ces résultats suggèrent également que le MEA-TMA pourrait s'y positionner.

L'étude des deux phénomènes de photorégulations induites par le MEA-TMA, l'optogating et l'optoblock, révèlent deux mécanismes différents. Concernant l'optogating, les résultats suggèrent que la présence de trois molécules sur le récepteur sont nécessaires à son activation. En effet, les intensités de courants de photorégulation sont trop faibles voire inexistantes pour une ou deux cystéines introduites. En raison d'un phénomène d'optoblock observé pour ces constructions, nous pouvons exclure la possibilité d'un défaut de marquage. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la présence d'un mélange de populations : une population ayant réagi avec le MEA-TMA et une autre population sur laquelle le MEA-TMA ne s'est pas lié au récepteur ou ne s'est lié que partiellement. Concernant l'optoblock, une seule molécule est nécessaire pour induire une réduction des courants ATP, avec une augmentation de l'efficacité proportionnelle au nombre de cystéines portée par le récepteur. En accord avec ces résultats, nous pouvons proposer que la charge du MEA-TMA dans l'état *trans*, lorsque que le canal est ouvert par l'ATP, se positionne à

proximité de la voie de passage des ions, gênant le passage des ions par répulsion électrostatique et/ou stérique. En absence d'ATP, le MEA-TMA dans l'état *trans* pourrait déstabiliser les interactions inter sous-unités entre les hélices. Deux mécanismes principaux pourraient expliquer l'action du MEA-TMA en accord avec les structures cristallographiques : soit l'isomère *trans* positionne sa charge entre les hélices et les contraint à s'éloigner par gêne stérique soit la molécule entière s'insère entre les hélices.

L'introduction de tryptophanes en direction de ces poches transmembranaires perturbe l'action du MEA-TMA, valorisant l'hypothèse d'un positionnement de cette molécule dans cet espace. Dans l'état *cis*, le moment dipolaire de l'azobenzène de la molécule est d'environ 3,1 D, faisant du MEA-TMA une molécule hydrophile dans cette conformation (Lerch et al., 2018). En revanche, dans l'état *trans*, son moment dipolaire est quasiment nul en raison de sa symétrie, augmentant ainsi ses propriétés hydrophobes et favorise son positionnement dans les cavités.

Afin de le vérifier par d'autres moyens cette hypothèse, nous avons perfusé des cellules exprimant le récepteur rP2X4-I319C, équivalent de rP2X2-I328C, préincubées avec le MEA-TMA avec une solution d'ivermectine. L'ivermectine est un potentiateur des courants portés par rP2X4 et il a été démontré que cette molécule interagit avec le domaine transmembranaire (Jelínková et al., 2008) suggérant un positionnement dans les poches transmembranaires. L'ivermectine pourrait alors gêner le bon fonctionnement du MEA-TMA dans la conformation *trans*. Cependant, les données préliminaires obtenues ne sont pas démonstratives. En effet, les courants enregistrés induits par le MEA-TMA ne sont pas clairement différents de ceux enregistrés après perfusion de l'ivermectine. L'effet de cette molécule sur le MEA-TMA peut néanmoins être en partie masqué par l'internalisation des récepteurs P2X4.

Les résultats collectés concernant le mode de fonctionnement du MEA-TMA tendent à montrer que le MEA-TMA glisse entre les sous-unités dans les poches transmembranaires. L'occupation de ces cavités semble donc être importante dans la modulation et notamment dans la stabilisation de l'état ouvert. Néanmoins, Les mouvements provoqués par les molécules ne sont peut-être pas les mêmes que les mouvements physiologiques, en particulier la désensibilisation induite par le MAM et celle induite par l'ATP. Afin de confirmer que les cavités transmembranaires modulent

la désensibilisation dans les conditions physiologiques, il faudrait, par exemple, étudier l'influence des mutations tryptophanes de l'hélice transmembranaire sur les caractéristiques de la désensibilisation produite par l'ATP.

La récente résolution des structures cristallographiques dans les trois états allostériques du récepteur P2X₃ humain et notamment dans l'état ouvert, révèle la présence d'un réseau d'interactions entre les différentes parties N- et C-terminales du récepteur. L'introduction de couple de cystéines proches les unes des autres pourraient permettre la formation de ponts disulfures et ainsi stabiliser l'état ouvert. Les premiers essais en patch-clamp ne permettent pas de mettre en évidence la bonne formation d'un pont disulfure. Ces liaisons sont favorisées dans un milieu oxydant, or le cytoplasme n'est pas oxydant. L'ajout de H₂O₂ ou de DTT n'a pas d'effet sur la réponse ATP. L'électrophysiologie patch-clamp ne nous permet donc pas de conclure sur la bonne formation d'un pont disulfure. Des essais de crosslinking par le MAM-1 sur les mutants cystéines suivis d'un marquage des protéines de surface et d'un western blot n'ont pas permis l'observation de dimères ou de trimères. Cette observation peut être expliquée par une absence de marquage du MAM-1 soit à cause de conditions qui ne permettent pas à ce MAM d'accéder et de réagir avec les cystéines, soit au fait que les cystéines sont bien impliquées dans un pont disulfure. Les techniques utilisées au laboratoire n'ont, pour le moment, pas permis de confirmer l'importance de ce réseau d'interactions dans la stabilisation de l'état ouvert du récepteur. Cependant, seuls deux mutants cystéines ont été testé, d'autres couples cystéines pourraient se comporter différemment en patch-clamp.

CHAPITRE 2 : ETUDES BIOPHYSIQUES DE DEUX MUTANTS P2X2 HUMAIN RESPONSABLES D'UNE FORME DE SURDITE

1. Contexte

Récemment, il a été mis en évidence par deux équipes de recherches, deux mutations dominantes responsables d'une surdité héréditaire non syndromatique liée à l'âge, c'est-à-dire qui ne présente pas d'autres symptômes. Ce type de surdité représente 75% des surdités héréditaires.

Ces deux mutations ont été localisées sur le gène codant le récepteur P2X2 de l'homme, sur un seul allèle. Les patients atteints de ces mutations sont donc hétérozygotes hP2X2/V60L (Yan et al., 2013) ou hP2X2/G353R (Faletra et al., 2014).

La mutation V60L a été découverte chez une première famille, présente sur six générations, vivant en Chine. L'interprétation des tests auditifs révèle une perte auditive bilatérale et symétrique avec un âge d'apparition allant de 12 à 20 ans. Cette perte d'audition est progressive et touche toutes les fréquences. Elle est généralement accompagnée d'acouphènes pour les hautes fréquences. Lors des études de séquençage, une deuxième famille chinoise porteuse de cette mutation a été découverte. V60L se trouve en haut de l'hélice transmembranaire TM1 du récepteur humain P2X2. L'étude de cette mutation révèle que le récepteur muté est bien exprimé à la surface des cellules ciliées, comme le récepteur sauvage. En revanche, cette mutation affecte les courants obtenus pendant l'application d'ATP (Figure 52) ainsi que la perméabilité au fluorophore FM 1-43 (Yan et al., 2013) .

La deuxième mutation, G353R, a été recensée chez neuf italiens d'une même famille, sur quatre générations. Elle implique les mêmes symptômes : une perte d'audition progressive et bilatérale qui apparaît dans la deuxième décennie de leur vie, touchant toutes les fréquences. Cette mutation se localise au milieu de l'hélice TM2, au niveau du pore ionique.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette deuxième partie de ma thèse.

2. Stratégie

Le but de ces recherches est de mieux comprendre l'influence de ces mutations sur les propriétés biophysiques de ces récepteurs, afin d'établir un lien structure/fonction du récepteur dans le processus d'audition. Comme ces mutations sont non-fonctionnelles en présence d'ATP, l'idée serait de les activer par la lumière, grâce à l'utilisation du MAM afin de s'affranchir de cette caractéristique. Cette stratégie nécessite de vérifier préalablement que les mutations n'affectent pas l'adressage en surface et que nous sommes capables d'activer par la lumière le récepteur P2X2 humain, puisque nous n'avons jamais testé cette molécule sur cet homologue de rP2X2.

3. Matériel et méthodes

Marquage des protéines de surface

Le marquage des protéines de surface est réalisé sur des cellules HEK293 transfectées la veille avec 10 µg des différents plasmides (pCMV6-mGFP-hP2X2, V60L et G353R) en suivant le protocole décrit dans le chapitre 1. La membrane de nitrocellulose récupérée après le western blot et le transfert est incubée toute la nuit à 4°C avec un anticorps anti-mGFP de souris dilué au 1/500 et un anticorps de souris dirigé contre la β -actine au 1/2500. Après trois lavages, un anticorps secondaire anti-souris de mouton, HRP conjugué, dilué au 1/10000 est appliqué sur la membrane pendant 2h à température ambiante. Les bandes de protéines sont révélées avec un kit de détection ECL (GE Healthcare).

Mutagenèse dirigée

La mutation I339C a été intégrée par mutagenèse dirigée selon la méthode expliquée dans le chapitre 1, sur les plasmides pCMV6-mGFP-hP2X2, V60L et G353R donnés

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

par le Dr. Zhao Hong-Bo et contenant un gène de résistance à l'ampicilline. Les séquences ont été vérifiées par séquençage (GATC Biotech). Une deuxième cystéine a également été introduite sur les nouveaux plasmides pCMV6-mGFP-hP2X2-I339C, V60L-I339C et G353R-I339C de la même manière.

Sous-clonage

Le plasmide pZac2-eGFP-Kir4.1 a été acheté chez Addgene. Le vecteur ne contient pas le promoteur CMV (cytomegalovirus), il a donc fallu sous-cloner le gène eGFP-Kir4.1 dans pcDNA-3.1(+). Après avoir digéré l'insert et le vecteur par les enzymes NotI et AflII, les bandes fluorescentes de tailles voulues obtenues après migration sur gel agarose 0,7% BET 1% sont découpées au scalpel. L'ADN y est extrait grâce au kit Nucleospin Gel & PCR clean up (Macherey-Nagel) avec un volume d'élution de 35 μ L. Les concentrations d'ADN de l'insert et du vecteur sont mesurées par un nanodrop. Une ligation est ensuite réalisée avec 200 ng d'insert et 50 ng de vecteur, 1 μ L d'enzyme T4 DNA ligase, 2 μ L de tampon et une quantité d'H₂O mQ pour un volume final de 20 μ L. La ligation d'un témoin négatif ne contenant pas d'insert est également préparée. Les deux échantillons sont incubés à 16°C toute la nuit. Les produits de ligation sont ensuite dialysés 30 min sur filtre VSWP 0,025 μ m puis concentrés au SpeedVac et électroporés dans des bactéries DH5 α électrocompétentes. Ces bactéries sont mises en culture sur boîtes de pétri LB agarose en présence d'ampicilline une nuit à 37°C et l'ADN y est extrait par le kit d'extraction Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel). Le résultat de ligation est vérifié par séquençage (GATC-BioTech).

Culture cellulaire et transfection

La culture cellulaire des cellules HEK293 et la transfection des différentes constructions sont réalisées comme décrit dans le chapitre 1. Pour les co-transfection, différents ratios ont été testés. Le ratio 1:1 correspond à la transfection de 0,3 μ g du wild-type hP2X2 et de 0,3 μ g du mutant G353R ou du mutant V60L, ou 0,06 μ g du plasmide codant Kir4.1 selon l'expérience. Les ratios 0,3:1 ; 0,3:2 ; et 1:3

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

correspondent quant à eux à la transfection de 0,1  g de WT et 0,3  g de G353R ; 0,1  g de WT et 0,6  g de G353R ; et enfin 0,3  g de WT et 0,9  g de G353R respectivement.

Marquage des cellules par le MAM

Le MAM est dilué dans une solution stock de DMSO à 5 mM. La solution d'incubation est réalisée peu de temps avant l'enregistrement. Elle contient 30  M de MAM, 1% de DMSO, et 3  M d'ATP. Cette solution est appliquée sur les cellules surexprimant le r ecepteur d'intérêt pendant 20 min.

Electrophysiologie

Les enregistrements en configuration cellule entière sont effectués de la même manière que décrite précédemment. La composition des solutions en présence de canaux Kir4.1 est la suivante : la solution intracellulaire, dite KCl, est composée de 140 mM de KCl, 5 mM d'EGTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM d'HEPES supplémentée ou non de 10mM de spermidine et la solution extracellulaire de 112 mM NaCl, 30 mM KCl, 5 mM Hepes, 2 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, toutes les deux ajustées à pH 7,3 avec NaOH. Sur la base de cette dernière solution, une deuxième solution contenant 100  M de BaCl₂.(H₂O)₂ a été réalisée. Les canaux Kir4.1 induisant des courants de fuite, le potentiel de membrane est maintenu à -40 mV, proche du potentiel d'équilibre. Les courants induits par les canaux Kir4.1 sont obtenus en soustrayant l'intensité des courants obtenus en absence de Ba²⁺ des courants obtenus en présence de Ba²⁺ aux potentiels indiqués et en présence ou non d'ATP. Les expériences de patch perforés sont réalisées grâce à une solution intrapipette KCl contenant 1,5 mg/mL d'amphotéricine B. Le patch est obtenu en suivant la méthode décrite par le docteur J.D. Lippiat (Lippiat, 2008) au bout de 15 min.

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

Mesure des perméabilités

Pour les mesures de perméabilités, un pont agar contenant 3M de KCl est ajouté entre l'électrode de référence et le bain extracellulaire dans lequel baignent les cellules. La solution intrapipette contient 147 mM NaCl, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, solution ajustée à pH 7,3 par NaOH. La solution standard se compose de 147 mM NaCl, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM HEPES et 13 mM glucose et est ajustée à pH 7,3 par NaOH. La composition des solutions extracellulaires est résumée dans le Tableau 2.

Solution	NaCl	KCl	CaCl ₂	Iséthionate	Mannitol	Spermidine	HEPES	Glucose
Potassium	–	147	0,3	–	–	–	10	13
Calcium	–	–	110	–	–	–	10	13
Mannitol	10	–	0,3	137	–	–	10	13
Iséthionate	40	–	0,3	–	200	–	10	13
Spermidine	–	–	0,3	–	–	33	10	13

Tableau 2 Composition des solutions extracellulaires utilisées pour les mesures de perméabilités. Les valeurs indiquées sont en mM.

Les enregistrements sont d'abord réalisés en condition contrôle : solutions concentrées en sodium identiques dans le milieu intracellulaire et extracellulaire. Deux rampes sont appliquées : une première rampe est appliquée avant l'ouverture du canal (avant ATP ou en absence d'irradiation, suivant l'expérience) ; une deuxième rampe est réalisée pendant l'ouverture du canal (en présence d'ATP ou sous irradiation à 365 nm). Les rampes ont une durée de 200 ms et explorent une gamme de voltage allant de -120 mV à +120 mV. La solution extracellulaire est ensuite rapidement changée par une des solutions décrite dans le Tableau 2. Le même protocole est alors appliqué. Les potentiels d'inversion sont calculés en soustrayant les courants des rampes obtenus dans l'état ouvert du canal de ceux obtenus lorsque que le canal est fermé. Les perméabilités sont calculées après avoir déduit du potentiel de membrane, le potentiel de jonction calculé par le logiciel IgorPro.

Modélisation moléculaire

Le modèle choisit pour la modélisation du récepteur P2X2 humain par homologie est la structure du récepteur hP2X3 de l'état ouvert (Mansoor et al., 2016). Après optimisation de la structure par les logiciels Modeler et Scwrl, la taille du pore pour le récepteur P2X2 humain sauvage et muté a été déterminé grâce au programme Hole.

Fluorescence

Les cellules HEK sont déposées sur des lamelles de verre de 12 mm préalablement traitées à la poly-lysine avant d'être transfectées comme précédemment par un plasmide codant hP2X2, G353R ou V60L ou par des co-transfections. 24h après transfection, l'incorporation de YO-Pro-1 est testée. Une lamelle est placée sur le portoir du vidéomicroscope, dans 100 μ L d'une solution NES + YO-Pro-1 à 10 μ M. Une première acquisition d'images de 6min avec un intervalle de 5 s est réalisée grâce au logiciel MetaMorph (Molecular Devices). La solution est ensuite aspirée puis remplacée par 300 μ L d'une solution NES + YO-Pro-1 + ATP 30 μ M. Une deuxième acquisition est alors immédiatement lancée sur une durée de 15 min avec un intervalle de 5 s entre chaque image. Les 256 images sont ensuite analysées sous ImageJ, où l'augmentation de la fluorescence est mesurée pour en moyenne 6 cellules par champ.

4. Résultat

4.1 Etude électrophysiologique des deux mutations V60L et G353R

Nos collaborateurs, l'équipe du Dr H.B. Zhao, ont commencé l'étude de la mutation G353R d'un point de vue électrophysiologique sur des cellules surexprimant ces récepteurs.

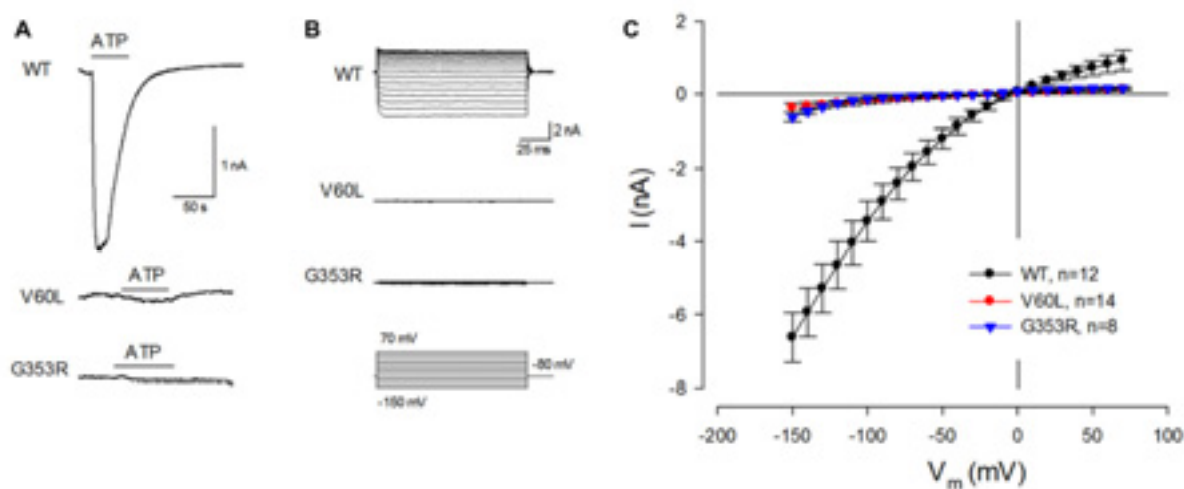


Figure 52 Etude électrophysiologique des mutants V60L et G353R. A. Traces électrophysiologiques en configuration cellule entière du récepteur sauvage hP2X2 et des mutants obtenues en présence d'ATP 36  M. B. Courants ATP obtenus sous une gamme de voltage allant de -150 mV à +70 mV. C. Courbes I/V correspondant aux courants ATP obtenus sous différents potentiels.

Comme la mutation V60L, G353R affecte la réponse ATP. En effet, l'application de 36  M d'ATP provoque un courant entrant important dans les cellules surexprimant le récepteur hP2X2 alors que ceux provoqués par cette même concentration d'ATP pour les cellules transfectées par V60L ou G353R sont largement diminués. En effet, à -80 mV, les courants entrants pour hP2X2, V60L et G353R sont de $-2,42 \pm 0,43$ nA ($n = 12$), $-0,15 \pm 0,05$ nA ($n = 14$) et $-0,07 \pm 0,01$ nA ($n = 8$), respectivement (Figure 52). Cette diminution des courants ATP est également observée pour une concentration plus élevée d'ATP (1mM).

Ils ont ensuite testé les courants ATP pour des cellules co-transfectées par l'un des deux mutants et par le récepteur sauvage. Avec un ratio de co-transfection de 1:1, le courant induit par l'ATP dans ces cellules co-transfectées par hP2X2 et V60L représente la moitié du courant enregistré pour hP2X2 pour des voltages négatifs, puis la différence de courants de cette co-transfection diminue. Pour la co-transfection hP2X2 et G353R, le courant ATP obtenu est équivalent à celui de récepteur hP2X2 seul (Figure 53).

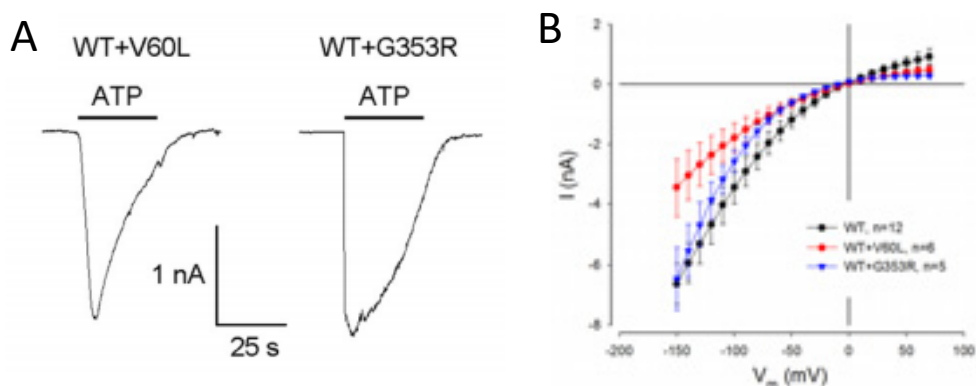


Figure 53 Etude électrophysiologique des co-transfections. A. Traces électrophysiologiques obtenues en configuration cellule entière pour la co-transfection hP2X2 et V60L ; et pour hP2X2 et G353R avec un ratio de 1:1. B. Courbes I/V correspondantes obtenues pour chaque co-transfections et pour hP2X2 seul

Ces résultats suggèrent que ces deux mutations dominantes n'ont pas d'effet négatif sur le récepteur hP2X2 sauvage.

4.2 Expression de surface

Les mutants responsables d'une surdité décrits précédemment sont non-fonctionnels en présence d'ATP. Cette observation peut être expliquée par une faible expression de surface d'une part, d'une liaison non efficace de l'ATP ou d'un défaut dans le mécanisme d'ouverture du récepteur, d'autre part. Nous avons donc vérifié l'expression de surface de ces récepteurs mutés, par deux méthodes.

Dans un premier temps, une GFP a été fusionnée en C-terminale du récepteur sauvage hP2X2 et des deux mutants V60L et G353R, afin de visualiser la fluorescence  mise par cette GFP en microscopie confocale, après transfection dans des cellules HEK. Sous irradiation, cette fluorescence est bien localisée à la surface des cellules pour les trois constructions (Figure 54.D-F). De plus, l'analyse de l'intensité de fluorescence ne révèle pas de différence d'expression de surface entre les trois

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

configurations. En effet, hP2X2 présente une intensité de fluorescence de $167,8 \pm 29,3$; V60L une intensité de $168,0 \pm 22,3$; et G353R une intensité de $163,3 \pm 19,3$ (Figure 54.G). Ces trois intensités de fluorescence ne sont statistiquement pas différentes.

L'expression de surface a également été vérifiée en réalisant un marquage des protéines de surface par biotinylation puis par migration sur gel SDS-PAGE et western blot. Cette expression a été contrôlée grâce au marquage de l'expression totale et du marquage de la β -actine en parallèle (Figure 54.B). L'analyse de l'expression de surface obtenue après révélation démontre que les deux mutants V60L et G353R sont exprimés en surface de la membrane cellulaire de manière statistiquement similaire au récepteur sauvage P2X2 (Figure 54.C).

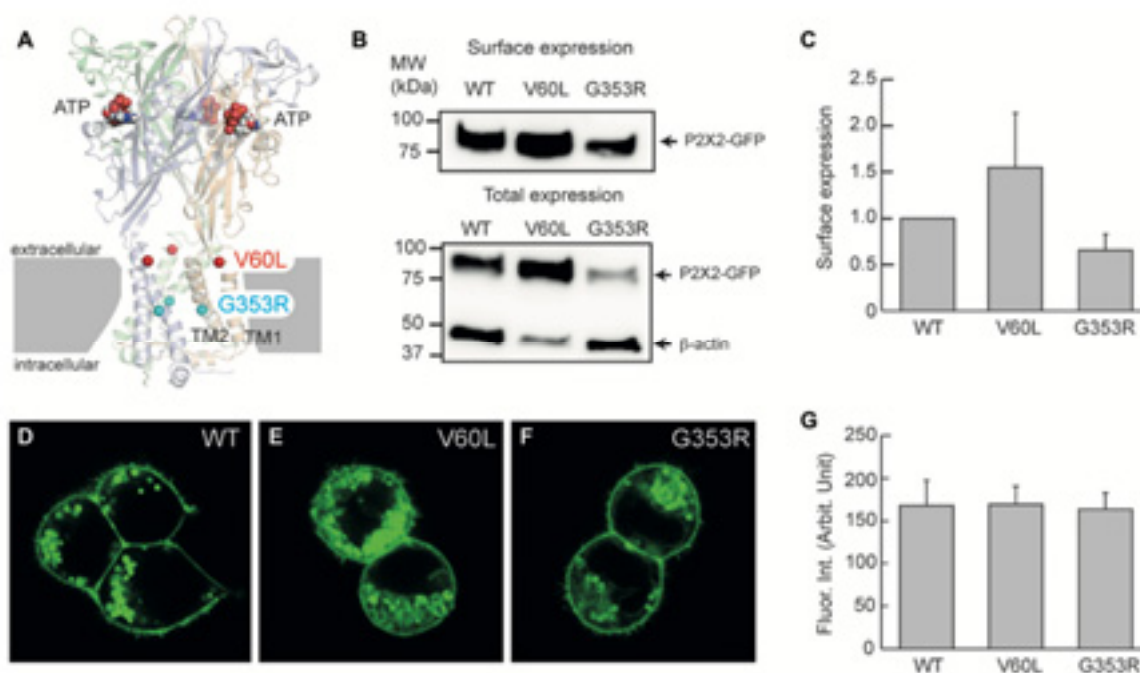


Figure 54 Expression de surface des récepteurs hP2X2, V60L et G353R. A. Localisation équivalente des mutations hP2X2 V60L (sphère rouge) et G353R (sphère bleue) sur la structure cristallographique du récepteur hP2X3. B. Marquage des protéines de surface par biotinylation et western blot de hP2X2, V60L et G353R (n=4 transfections), en haut, et marquage de l'expression totale, en bas. C. Analyse de l'expression de surface pour les trois récepteurs. D, E, F. Images de microscopie confocale de cellules HEK exprimant les constructions hP2X2-GFP, V60L-GFP, G353R-GFP. G. Analyses quantitatives de l'intensité de fluorescence des trois constructions.

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

Les deux méthodes utilisées ici démontrent que l'expression de surface est intacte pour les deux mutants non fonctionnels en présence d'ATP. Il semblerait donc que cette absence de courants ATP serait due à un défaut dans le processus d'ouverture du récepteur.

4.3 Utilisation de la molécule photoisom risable MAM

La mutation V60L se situe dans la partie haute de l'hélice transmembranaire TM1 et G353R au milieu de l'hélice transmembranaire TM2. Ces deux mutations se trouvent relativement éloignées du site de fixation de l'ATP présent dans le domaine extracellulaire du récepteur P2X2. Ce constat suggère que la molécule d'ATP est capable d'atteindre son site de fixation et de se lier à celui-ci suggérant que cette absence de courants pourrait être expliquée par un processus d'ouverture du récepteur probablement affecté. L'utilisation du MAM, et donc de la lumière, pourrait être une alternative afin d'explorer les propriétés biophysiques de ces récepteurs sans avoir recourt à leur agoniste physiologique.

Nous savons que les molécules photoisomérisables développées au laboratoire, notamment le MAM, sont fonctionnelles sur le récepteur P2X2 de rat, en particulier sur la position I328C pour un marquage horizontal et sur I328C/S345C pour un marquage vertical (Figure 35). Nous avons voulu étendre cette technique sur le récepteur P2X2 humain.

J'ai introduit par mutagénèse dirigée l'équivalent de ces mutants cystéines sur le récepteur sauvage hP2X2, I339 correspondant à I328 et S356   S345. Les différentes constructions hP2X2 sauvage, hP2X2-I339C et hP2X2-I339C/S356C ont été transfectées dans des cellules HEK. Ces cellules ont ensuite été incubées en présence de MAM puis étudiées en électrophysiologie patch-clamp.

L'utilisation du MAM sur le récepteur P2X2 de rat a été réalisée sur la version 3T du récepteur. Nous avons donc vérifié, dans un premier temps, si le récepteur sauvage P2X2 humain présente des courants de photorégulation d  à un marquage des

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

cystéines endogènes du récepteur, auquel cas la mutation de ces cystéines en thréonine aurait été nécessaire.

L'incubation par le MAM suivie d'une irradiation des cellules exprimant le récepteur sauvage P2X2 humain, à 365 nm ou à 530 nm n'engendrent pas son activation. Ce résultat n'exclue pas un possible marquage du MAM sur le récepteur, mais, s'il a lieu, celui-ci ne provoque pas l'ouverture du canal par la lumière (Figure 55).

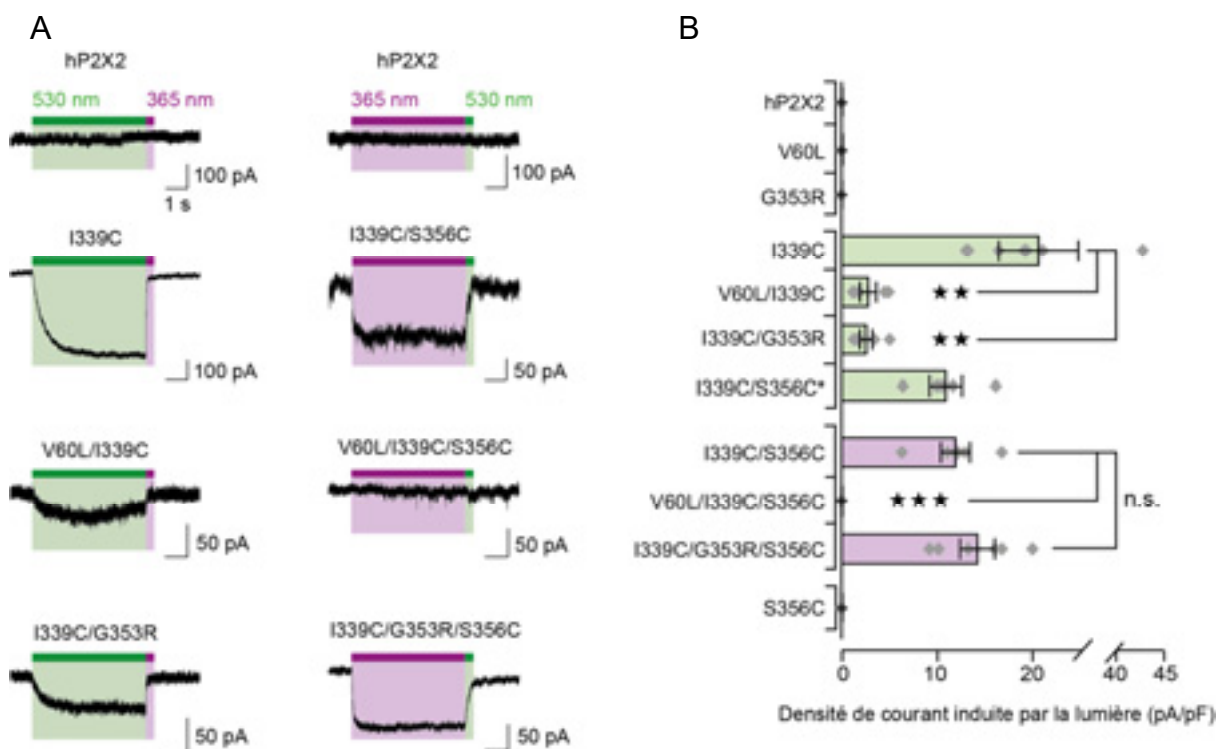


Figure 55 Ouverture par la lumière des récepteurs humains P2X2. A. Enregistrements patch-clamp en configuration cellule entière de cellules exprimant les différents mutants pendant irradiations lumineuses à des longueurs d'onde spécifiques. B. Densités de courant induit par la lumière pour chaque configuration. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

L'introduction d'une cystéine en position 339 sur chaque sous-unité du récepteur permet l'obtention de courant sous irradiation dans le domaine du visible, indiquant un pontage horizontal du MAM sur ce récepteur. Ces mouvements horizontaux présentent une densité de courant moyenne de $20,6 \pm 4,2$ pA/pF ($n = 4$).

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

L'ajout d'une deuxième cystéine en position 356 induit, cette fois-ci, une ouverture du canal après irradiation dans le domaine de l'UV avec une densité de courant moyenne de $11,8 \pm 1,5$ pA/pF ($n = 4$) (Figure 55), signature d'un marquage vertical de la molécule. Cependant, ce récepteur I339C/S356C mène à une grande variabilité de marquage. En effet, une partie des cellules analysées (44/92, 48%) montrent une ouverture après irradiation à 365 nm, comme attendu pour un encrage vertical de la molécule. Toutefois, nous observons deux autres types de profils : un marquage horizontal (ouverture dans le visible) d'une densité de courant de $10,9 \pm 1,7$ (35 cellules /92, 38%) et un mélange quasiment equi-proportionnel des deux marquages, qui active le récepteur à la fois lors d'une irradiation dans l'UV et dans le visible (13/92, 14%). Différentes conditions d'incubations ont été testées afin de favoriser le marquage vertical (concentration et temps d'incubation modifiés), en vain. Il est à noter que les densités de courant pour le marquage horizontal et vertical sont quasiment identiques.

Grâce à l'introduction de cystéines sur le récepteur humain P2X2, nous sommes en mesure d'activer, pour la première fois, ce dernier par la lumière. Nous avons donc également introduit ces cystéines sur les deux mutants responsables de la surdité.

Pour le mutant V60L, la liaison du MAM sur le récepteur V60L/I339C présente de faibles densités de courants de photorégulation avec en moyenne $2,83 \pm 0,90$ pA/pF ($n = 6$). La double mutation cystéine sur 60L, V60L/I339C/S356C, ne permet pas le contrôle par la lumière de ce récepteur (Figure 55). En effet, aucune densité de courant n'est mesurable. Le changement de la valine 60 en leucine, en plus d'affecter l'action de l'ATP, affecte les courants induits par la lumière. Les courants obtenus lors du marquage horizontal sur I339C ne sont pas suffisants pour étudier les propriétés biophysiques de ce mutant.

La mutation I339C sur le mutant G353R présente le même profil que V60L/I339C, avec une densité de courant moyenne de $2,53 \pm 0,64$ pA/pF ($n = 5$). Cette configuration ne permet pas non plus l'exploration biophysique de ce mutant. En revanche, la présence des deux cystéines I339C et S356C sur le récepteur G353R pour un marquage vertical, rétablit les courants de photorégulation avec une densité de courant moyenne statistiquement identique à celle du récepteur I339C/S356C ($n = 6$). Les mouvements induits par les changements conformationnels du MAM ne sont pas affectés par la

présence de l'arginine. Il est également à noter que le mélange de marquage précédemment obtenu pour le récepteur I339C/S356C ne se retrouve plus pour ce récepteur I339C/G353R/S356C.

Afin de vérifier le marquage du MAM sur les différentes cystéines, un marquage des protéines de surface préalablement incubées avec le MAM a été réalisé (Figure 56).

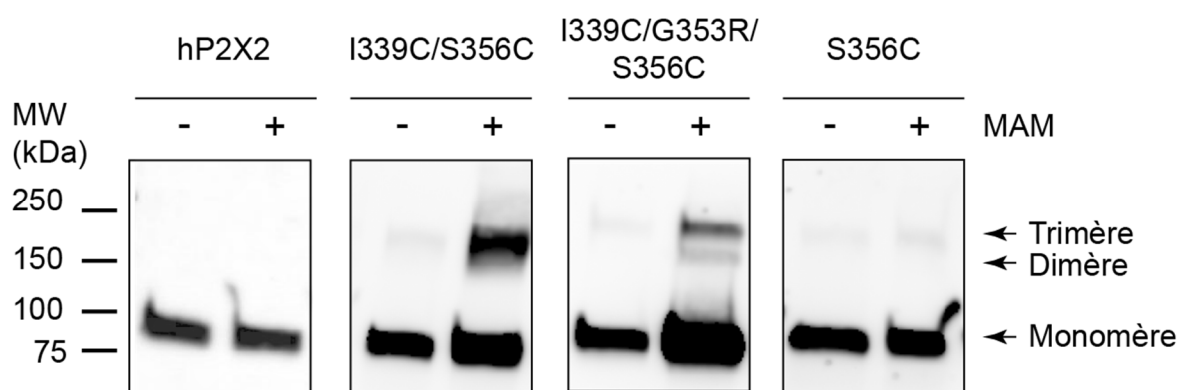


Figure 56 Mise en évidence du marquage des récepteurs P2X par le MAM. Révélation du western blot pour des cellules HEK293 transfectées par l'une des constructions préalablement incubées (+) ou non (-) par le MAM

Le monomère présente une taille de 80 kDa. Nous pouvons observer une bande présentant un poids moléculaire d'environ 160 kDa, correspondant au dimère, visibles pour les constructions I339C/S356C et I339C/G353R/S356C. Pour cette dernière construction, un trimère apparait également, d'une taille de 240 kDa. Pour les deux contrôles hP2X2 et S356C, seul le monomère est présent. Ce marquage confirme le bon marquage horizontal ou vertical du MAM sur les mutants cystéines.

Le marquage vertical sur le mutant G353R induit des courants de photorégulation qui présentent une amplitude assez importante pour l'étude biophysique de ce récepteur.

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

4.4 Etudes du mutant G353R

4.4.1 Etude de l'impact de la mutation G353R sur les courants induits par l'ATP ou la lumière

Comme décrit précédemment, la construction I339C/G353R/S356C présente des courants de photorégulation de même densité que le contrôle I339C/S356C pour un potentiel de membrane maintenu à -60 mV. Nous avons décidé d'étudier les courants obtenus pour une gamme de potentiels.

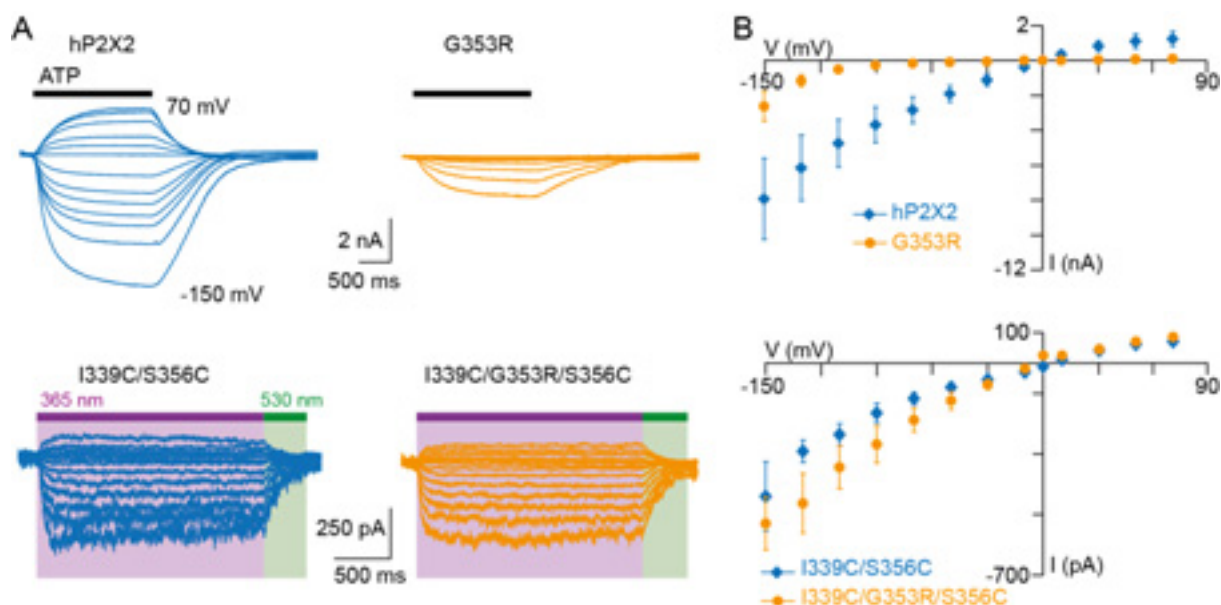


Figure 57 étude des différences de courants en ATP et en lumière pour hP2X2 et G353R. A. Superposition des traces électrophysiologiques en configuration cellule entière obtenues à différents potentiels, de -150 mV à +70 mV. En haut, courants obtenus pendant application d'ATP 30 M pour le récepteur sauvage (n=5) et pour G353R (n=4) et en bas en présence de MAM sur les récepteurs double cystéines correspondants (I339C/S356C (n=5) et I339C/G353R/S356C (n=6)). B. Courbes I/V correspondantes pour chaque cas.

En réalisant des enregistrements électrophysiologiques en présence d'ATP à différents voltages, nous avons retrouvé les résultats obtenus par nos collaborateurs.

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

En effet, en appliquant des voltages allant de -150 mV à +70 mV, nous obtenons des courants ATP fortement diminués pour G353R pour les potentiels négatifs comparés à hP2X2 et une absence de courants sortants pour les potentiels positifs. La superposition des deux courbes I/V correspondantes met en évidence les différences d'intensités de courant lorsque la glycine 353 est remplacée par une arginine (Figure 57, en haut). G353R affecte les courants ATP à différents potentiels.

Cependant, en utilisant la lumière et les doubles mutants cystéines, les profils de courants obtenus sont différents. En effet, la superposition des courbes I/V pour I339C/S356C et I339C/G353R/S356C en présence de MAM à 365 nm, ne met pas en avant de différences significatives (Figure 57, en bas). La mutation G353R n'affecte donc plus le flux cationique lorsque l'ouverture est contrainte par les changements conformationnels du MAM, ce qui va nous permettre d'étudier les propriétés biophysiques de ce récepteur.

4.4.2 Perméabilité relative de petits ions

La présence d'une charge positive portée par l'arginine orienté vers le pore ionique pourrait avoir une influence sur la perméabilité des cations ou encore sur la sélectivité du pore ionique. En effet, l'équipe de North, en 2011, a démontré que sur le récepteur P2X2 de rat, la mutation de la thréonine 339 en lysine sur une, deux ou trois sous-unités augmente progressivement la perméabilité de l'ion chlorure (Browne et al., 2011). Cette position 339 est l'équivalent de la position 350 sur P2X2 humain, située un tour d'hélice plus haut que la mutation G353R. Nous avons décidé de mesurer la perméabilité relative des ions potassium, calcium et chlorure par rapport à la perméabilité sodique.

Ces valeurs de perméabilité relative n'étant pas connues sur le récepteur sauvage P2X2 humain, je les ai d'abord mesurées, en présence d'ATP (Figure 58.A).

En utilisant les conditions standards bioniques $\text{Na}^+_{\text{int}}/\text{X}^{n+}_{\text{ext}}$ (X^{n+} étant le cation d'intérêt), la variation rapide du potentiel de -120 mV à +120 mV en 200ms, en présence d'ATP, permet d'obtenir un potentiel d'inversion pour ces conditions. En

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

utilisant l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz, la mesure du potentiel d'inversion permet de la relier à la valeur de perméabilité relative.

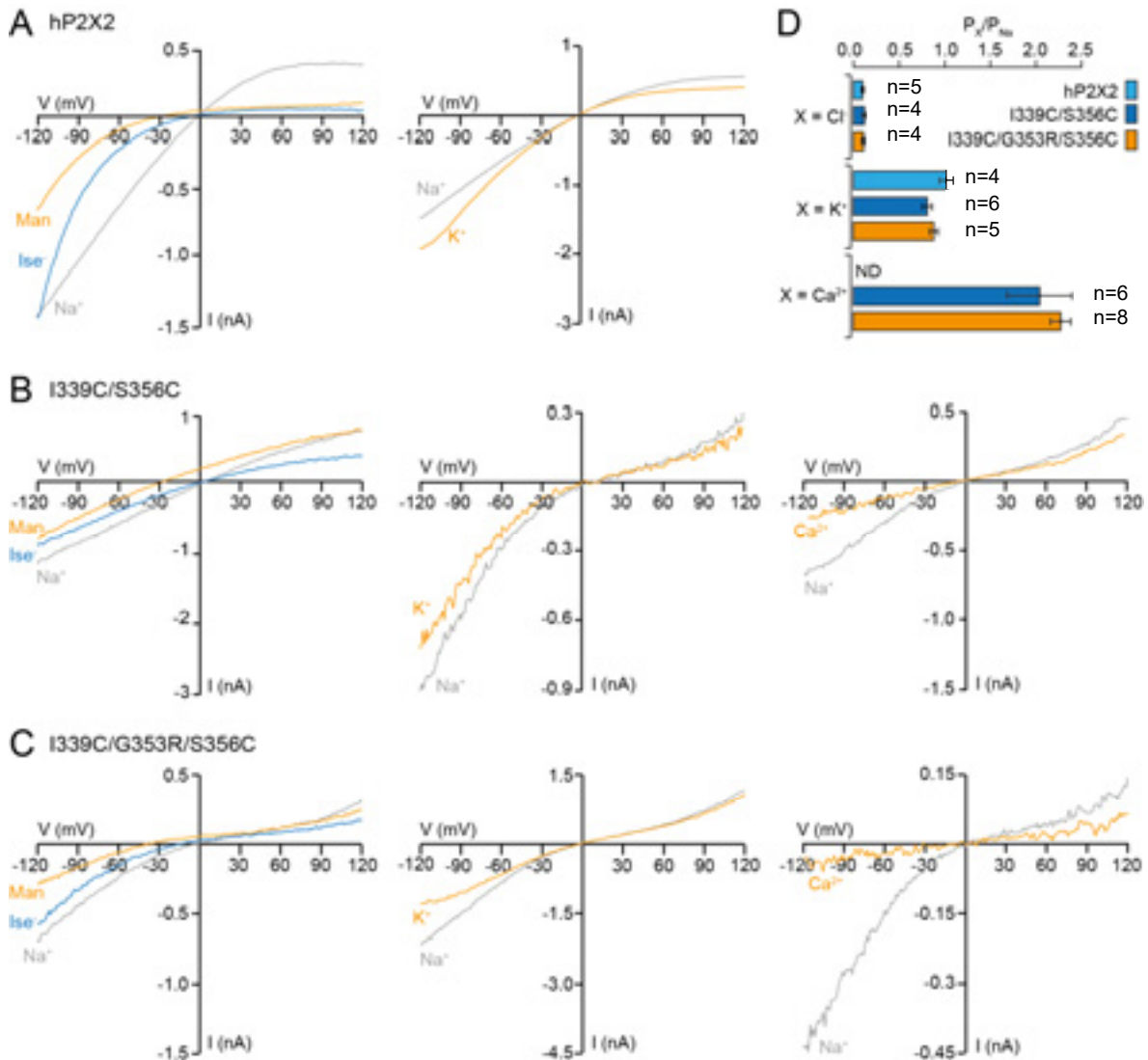


Figure 58 Perméabilités relatives de petits ions. A. Courbes I/V en présence d'ATP 30 μM obtenues pour le récepteur hP2X2. A gauche, courbes I/V en conditions sodium, Iséthionate de sodium et mannitol et à droite, en condition sodium et potassium. B et C. Courbes I/V pendant irradiation lumineuse à 365 nm en conditions sodium, Iséthionate de sodium et mannitol ; sodium et potassium ; sodium et calcium de gauche à droite. B. Courbes obtenues pour I339C/S356C. C. Courbes obtenues pour I339C/G353R/S356C. D. Diagramme des perméabilités relatives correspondantes pour chaque condition. ND = non déterminé

Ainsi, en considérant le potassium comme ion d'intérêt, la valeur moyenne du potentiel d'inversion est de $-2,5 \pm 2,0$ mV, correspondant à une perméabilité relative P_{K^+}/P_{Na^+} de $1,0 \pm 0,1$. Cette perméabilité est semblable à celle obtenue pour le récepteur P2X2 de rat qui présente une perméabilité relative au potassium de $1,0 \pm 0,2$ (Evans et al., 1996). De la même manière, la valeur moyenne du potentiel d'inversion pour l'ion

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

chlorure est de $-25,5 \pm 0,7$ indiquant que la perméabilité relative est de $0,1 \pm 0,0$, ce qui confirme que le récepteur P2X2 humain est bien sélectif au cations (Figure 58A et D).

En revanche, la mesure de la perméabilité relative du calcium n'a pas pu être déterminée dans ces conditions. En effet, il est connu que l'ion calcium, à de fortes concentrations, inhibe les courants ATP (Krishtal et al., 1988) par un effet allostérique supposé, sur les récepteurs P2X2 de rat. Il semble donc que le calcium à de fortes concentrations inhibe également les courants ATP du récepteur P2X2 humain. Nous avons essayé d'autres méthodes de mesure, par exemple en inversant les solutions intracellulaires et extracellulaires : le calcium à haute concentration se trouve alors dans le milieu intracellulaire n'altérant plus les courants ATP. Cependant, dans ces conditions, nous observons une grande variabilité des valeurs de potentiel d'inversion ainsi qu'une déplétion ionique dans la majorité des cas, modifiant donc la concentration en ion dans le milieu intracellulaire. La mesure d'une perméabilité relative n'a donc pas été possible.

Nous avons ensuite mesuré les perméabilités ioniques du récepteur P2X2 humain par la lumière, grâce à la fixation du MAM sur le double mutant cystéine I339C/S356C. Seules les données obtenues lors d'une ouverture dans l'ultra-violet (marquage vertical) ont été analysées dans le but de les comparer à celles obtenues pour le mutant I339C/G353R/S356C qui ne présente que le marquage vertical. Le même protocole de variation de voltage a été appliqué mais cette fois-ci sous irradiation à 365 nm. Les potentiels d'inversion obtenus pour les ions potassium, calcium et chlorure sont respectivement, $-3,25 \pm 1,6$ mV ; $1,3 \pm 3,1$ mV ; et $-24,6 \pm 1,2$ mV (Figure 58.B) correspondant à des perméabilités $P_K/P_{Na} = 0,8 \pm 0,1$, $P_{Ca}/P_{Na} = 2,0 \pm 0,4$, $P_{Cl}/P_{Na} = 0,1 \pm 0,0$ (Figure 58.D). Les perméabilités relatives calculées pour les ions potassium et chlorure sont semblables à celles obtenues en ATP sur le récepteur humain P2X2 sauvage, la présence du MAM n'affecte donc pas le passage des ions. En utilisant la lumière, nous avons pu dépasser l'effet inhibiteur du calcium et déterminer une perméabilité relative de l'ion calcium.

En utilisant le même protocole que précédemment, les perméabilités du mutant G353R ont pu être déterminées. Les potentiels d'inversion obtenus sont de $-0,8 \pm 1,4$ mV pour

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

le potassium soit une perméabilité relative de $0,9 \pm 0,0$; $5,6 \pm 1,3$ mV pour le calcium correspondant à une perméabilité relative de $2,3 \pm 0,1$; et $-25,2 \pm 0,8$ mV équivalent à $0,1 \pm 0,0$ comme perméabilité relative pour l'ion chlorure (Figure 58.C et D).

Les perméabilités mesurées sont similaires à celles obtenues pour le contrôle I339C/S356C. Il n'y a donc pas d'influence de l'arginine sur la perméabilité de ces petits cations (Figure 58D).

4.4.3 Perméabilité relative de plus gros cations

L'année dernière, nous avons démontré que le récepteur P2X2 de rat était perméant à de plus gros cations en présence d'ATP, tels que la spermidine et le NMDG⁺ (Harkat et al., 2017). La spermidine est une polyamine issue de l'activité enzymatique de l'ornithine décarboxylase (ODC) qui transforme l'ornithine provenant du cycle de l'urée, en putrescine. Cette petite polyamine est ensuite transformée en spermidine par la spermidine synthétase. La spermidine est impliquée dans de nombreux rôles physiopathologiques comme dans la neuromodulation, l'autophagie, l'inflammation, la division cellulaire ou encore la régulation de l'expression de gènes. L'ornithine décarboxylase est présente en grande quantité dans la cochlée (Brock and Henley, 1994) et l'utilisation de DFMO (difluorométhylornithine), un inhibiteur de l'ODC, provoque une perte de l'audition sévère chez l'homme pour 70% des personnes ayant administrés pendant huit semaines cet inhibiteur (Splinter and Romijn, 1986). La spermidine semble ainsi jouer un rôle important dans le bon fonctionnement de l'appareil auditif. Nous avons donc mesuré la perméabilité relative de ce polycation par l'usage du MAM dans un premier temps, puis grâce à l'utilisation des hétéromères.

4.4.3.1 Mesure de la perméabilité de la spermidine par l'utilisation du MAM

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier que le contrôle I339C/S356C en présence de MAM permettait l'entrée de spermidine dans la cellule au travers du pore ouvert par la lumière.

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

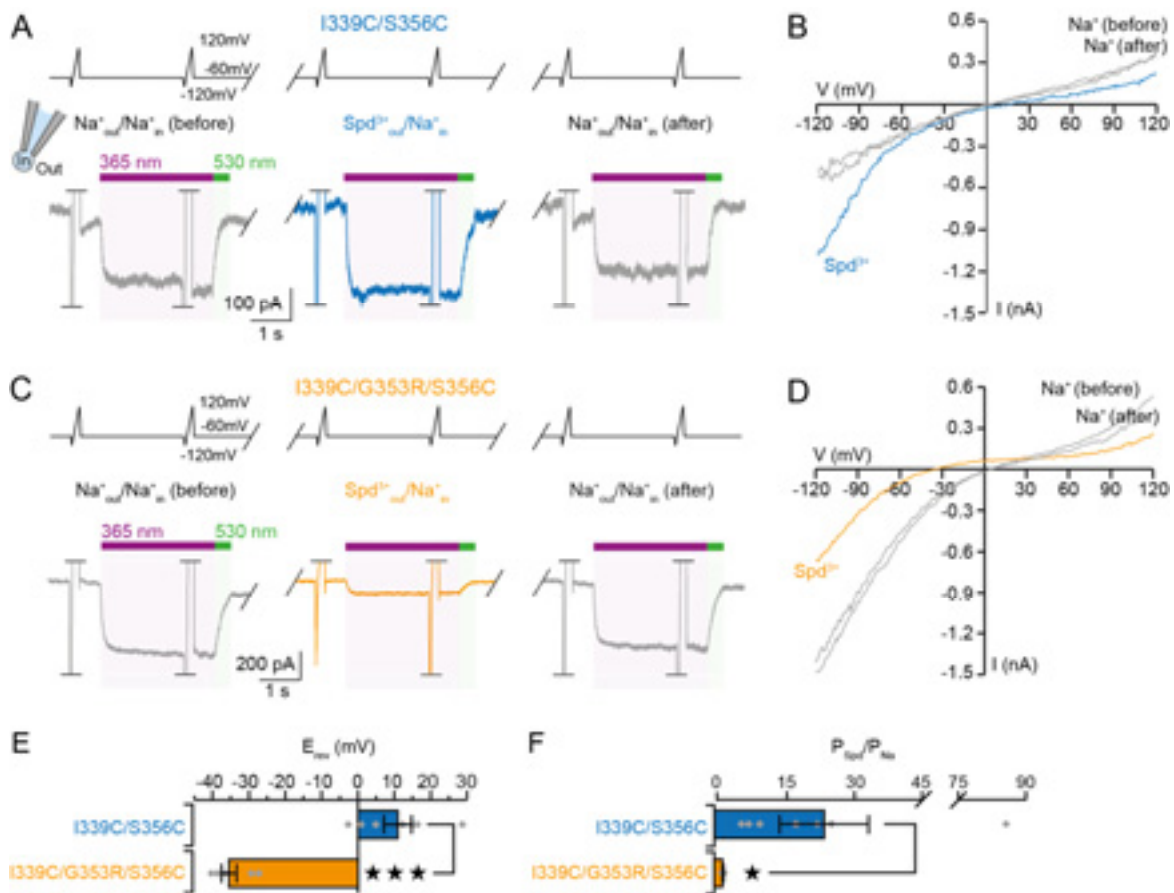


Figure 59 Mesure de la perméabilité relative de la spermidine par la lumière. A et C Traces électrophysiologiques en configuration cellule entière en condition sodium symétrique ou en spermidine extracellulaire pour la détermination d'une perméabilité relative de la spermidine par l'utilisation du MAM. A. Courants obtenus pour I339C/S356C. C. Traces obtenues pour la construction I339C/G353R/S356C. B et D Courbes I/V correspondant aux variations de potentiel appliquées pendant l'enregistrement électrophysiologique. B. Courbes I/V pour le mutant I339C/S356C. D. Courbes I/V du mutant I339C/G353R/S356C. E. Bilan des potentiels d'inversion mesurés pour I339C/S356C et I339C/G353R/S356C. F. Bilan des perméabilités relatives P_{Spd}/P_{Na} pour les deux constructions. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$

Le passage d'une solution extracellulaire composée d'une concentration en sodium égale à celle du milieu intracellulaire, à une solution concentrée en spermidine, provoque une augmentation du potentiel d'inversion mesuré de 0 mV à $10,96 \pm 3,50 \text{ mV}$. Cette valeur correspond à une perméabilité relative P_{Spd}/P_{Na} de $23,26 \pm 9,71$ signifiant que la spermidine est capable de fluctuer par le récepteur P2X2 activé par la lumière ($n = 9$) (Figure 59.B).

En 2015, l'équipe de K. Swartz a mis en évidence que les mesures de potentiels d'inversion pour les gros cations en conditions standards bioniques, et plus

particulièrement pour le NMDG, nécessitent des contrôles supplémentaires. En effet, il y a une modification au cours du temps de la concentration des ions intracellulaires (Li et al., 2015b). Cette déplétion entraîne des variations du potentiel d'inversion et donc une valeur de perméabilité relative erronée, comme expliqué dans l'introduction.

Il est donc indispensable de vérifier que la concentration intracellulaire dans nos conditions n'a pas été modifiée au cours des enregistrements. Pour cela, j'ai vérifié le potentiel d'inversion en conditions symétriques, c'est à dire avec une solution sodium extracellulaire identique à celle du milieu intracellulaire, au début et à la fin du protocole d'enregistrement (Figure 59.A). Les concentrations de part et d'autre de la cellule étant égales, le potentiel d'inversion devrait donc être proche de 0 mV dans les deux cas. J'obtiens en moyenne $-0,29 \pm 2,07$ mV avant la mesure du potentiel d'inversion en condition spermidine, et $-0,09 \pm 2,14$ mV après cette mesure (Figure 59.B). Il n'y a donc pas de déplétion ionique dans nos conditions, ce qui nous autorise à utiliser l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz pour la détermination de la perméabilité relative.

Afin de voir l'influence de l'arginine sur la perméabilité relative de la spermidine, j'ai répété l'expérience dans les mêmes conditions que précédemment avec le mutant I339C/G353R/S356C. Le potentiel d'inversion en conditions symétriques est de $6,29 \pm 0,78$ mV, en conditions spermidine de $-35,48 \pm 2,07$ mV et le retour en conditions symétriques permet l'obtention d'un potentiel d'inversion de $6,85 \pm 1,78$ mV (Figure 59.C et D). La perméabilité relative calculée à partir du potentiel d'inversion en condition spermidine est de $0,66 \pm 0,07$ mV ($n = 6$).

Il y a donc une réduction claire du potentiel d'inversion lorsque l'arginine est présente (Figure 59.E) ce qui se répercute sur la valeur de la perméabilité relative qui chute de 97 % (Figure 59.F).

4.4.3.2 Mesure de la perméabilité de la spermidine par l'utilisation des hétéromères

Les mesures de ces perméabilités relatives ont été réalisées dans des conditions expérimentales qui ne sont pas proches de conditions physiologiques puisque nous utilisons une agrafe moléculaire qui force mécaniquement l'ouverture du canal sous

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

irradiation lumineuse. Nous avons donc voulu vérifier si la perturbation du passage de la spermidine était également retrouvée sur les hétérotrimères hP2X2 : G353R en présence d'ATP.

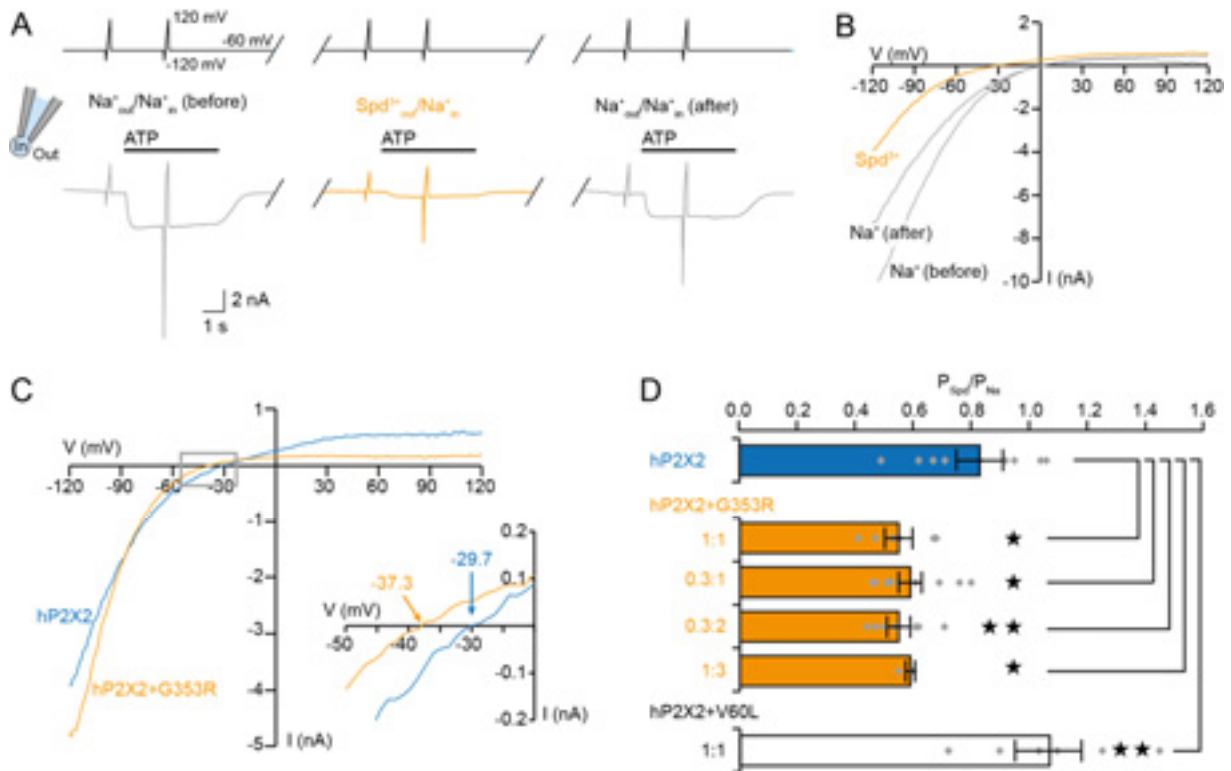


Figure 60 Mesure de la perméabilité relative de la spermidine des hétéromères hP2X2 : G353R. A. Traces électrophysiologiques en configuration cellule entière de cellules HEK exprimant le récepteur hP2X2 en présence d'ATP 30 μ M en fonction des différentes conditions d'enregistrements : solution sodium symétrique ou passage à une solution extracellulaire riche en spermidine. B. Courbes I/V correspondantes pour les différentes conditions obtenues pour l'homomère hP2X2 pour la détermination des potentiels d'inversion. C. Superposition des courbes I/V en condition spermidine extracellulaire / sodium intracellulaire obtenue pour l'homomère hP2X2 (en bleu) et pour l'hétéromère hP2X2 : G353R (en orange) obtenu après co-transfection du vecteur cDNA codant hP2X2 et cDNA codant G353R avec un ratio de 1 : 1. D. Résumé des perméabilités relatives obtenues pour différents ratios de co-transfection de hP2X2 et G353R (en orange) comparées à celle obtenue pour hP2X2 et pour hP2X2 : V60L (en blanc). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

La valeur de perméabilité de la spermidine n'étant pas connue sur le récepteur sauvage hP2X2, il a fallu la mesurer tout en s'assurant qu'il n'y avait pas de changement de concentration intracellulaire, comme précédemment. Le potentiel

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

d'inversion en condition contrôle symétrique sodium intracellulaire et extracellulaire est de $3,58 \pm 1,44$ mV. Le passage de la solution sodium à la solution spermidine décale vers les potentiels négatifs le potentiel d'inversion qui vaut alors $-30,88 \pm 1,92$ mV. Le retour à la solution extracellulaire contrôle de départ permet l'obtention d'un potentiel d'inversion de $3,98 \pm 1,14$ mV démontrant, là encore, qu'il n'y pas de changement de concentration ionique dans le milieu intracellulaire (Figure 60.A et B). La valeur du potentiel d'inversion en condition spermidine permet de calculer une perméabilité relative $P_{\text{Spd}}/P_{\text{Na}}$ de $0,83 \pm 0,08$ mV (Figure 60.D).

De la même manière, les potentiels d'inversion pour les cellules exprimant l'hétéromère hP2X2 : G353R après co-transfection de hP2X2 et G353R avec un ratio de 1:1 ont pu être mesurés. Ainsi, en condition sodium symétrique, la valeur du potentiel d'inversion moyen est de $3,34 \pm 2,25$ mV. Le changement du milieu extracellulaire provoque une diminution du potentiel d'inversion à $-38,39 \pm 1,51$ mV. Le retour aux conditions symétriques donne un potentiel d'inversion de $3,90 \pm 3,71$ mV (Figure 60.C). La perméabilité relative associée à ces valeurs est de $0,56 \pm 0,05$ (Figure 60.D).

L'hétéromère hP2X2:G353R (ratio 1:1) présente donc une perméabilité à la spermidine plus faible que l'homomère hP2X2, statistiquement significative.

Différents ratios de co-transfections ont ensuite été expérimentés dans le but de voir l'influence de ceux-ci sur la perméabilité de la spermidine, soit en diminuant la quantité transfectée de hP2X2, soit en augmentant la quantité transfectée de G353R ou les deux. Après avoir vérifié pour chaque cas que le potentiel d'inversion au début et la fin du protocole en conditions symétriques n'était pas modifié, les perméabilités relatives ont été calculées en présence de spermidine à partir du potentiel d'inversion obtenu. Pour un ratio hP2X2:G353R de 0,3:1, la perméabilité relative moyenne est de $P_{\text{Spd}}/P_{\text{Na}} = 0,60 \pm 0,04$ mV ; pour le ratio 0,3:2, $P_{\text{Spd}}/P_{\text{Na}} = 0,56 \pm 0,04$; enfin pour 1:3, $P_{\text{Spd}}/P_{\text{Na}} = 0,60 \pm 0,02$ (Figure 60.D). Pour chaque condition de co-transfections, il y a donc une influence de G353R sur le passage de la spermidine. Cette influence ne varie cependant pas en fonction des ratios.

La co-transfection des plasmides hP2X2 et V60L a également été réalisée dans le but de mettre en évidence que la chute de la perméabilité relative de la spermidine

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

observée pour l'hétéromère hP2X2:G353R est bien due à la présence de l'arginine. La perméabilité relative calculée est de $1,08 \pm 0,12$. Cette valeur est légèrement supérieure à celle obtenue pour l'homomère hP2X2.

L'arginine G353R est donc responsable de la diminution de la perméabilité de la spermidine au travers du récepteur qui la porte.

4.4.4 Etude de la rectification des courants

Au cours des enregistrements des différentes courbes I/V, nous avons constaté que la présence de l'arginine dans les hétéromères formés, présentait une rectification des courants sortants plus importantes et donc de plus faible intensité que pour le récepteur sauvage hP2X2.

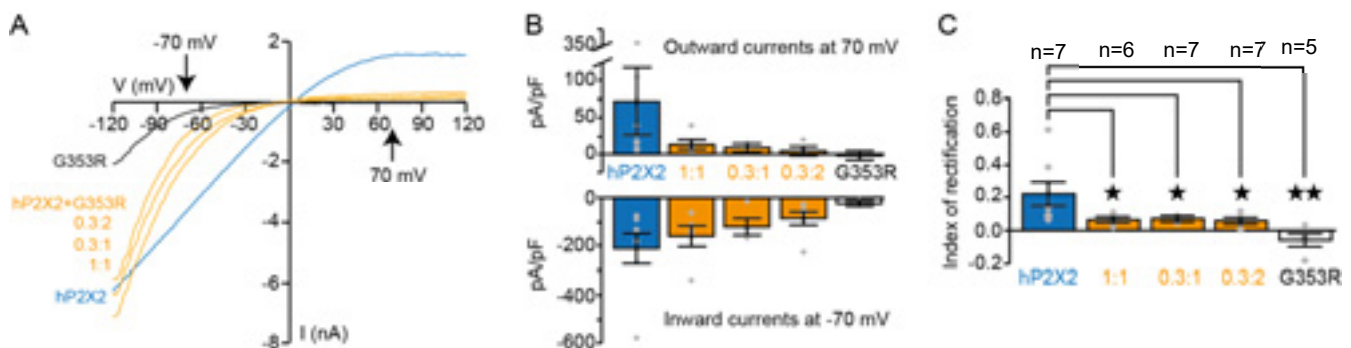


Figure 61 Rectification des courants. . A. Courbes I/V obtenues en condition Na^+ intra et extracellulaire pour le récepteur sauvage hP2X2, pour les hétéromères et pour l'homomère G353R. B. Analyse des courants sortants à +70 mV normalisés par rapport à ceux obtenus pour l'homomère sauvage, en haut et de ceux obtenus à -70 mV, en bas. C. Calcul de l'index de rectification issu du rapport des courants à 70 mV par rapport aux courants entrants à -70 mV.

L'intensité des courants entrants à -70 mV ainsi que les courants sortants à +70 mV révèle une diminution de ceux-ci dès lors que le récepteur se compose d'au moins une sous-unité G353R (Figure 61.A). En effet, les densités de courant de la co-transfection avec un ratio 1:1 à -70 mV sont de $-158,3 \pm 42,2$ et de $12,5 \pm 5,9$ +70 mV. En ce qui

concerne la co-transfection 0,3:1, les densités de courants entrants sont de $-121,1 \pm 34,6$ à -70 mV, et les densités de courants sortants sont de $8,0 \pm 2,6$ à $+70$ mV. Enfin pour le ratio de co-transfection 0,3:2, les courants entrants sont de $-85,1 \pm 27,5$ et les densités de courants sortants sont de $5,5 \pm 2,6$. Les courants obtenus pour l'homomère muté G353R sont quasiment nuls, notamment pour les courants sortants (Figure 61.B).

Le taux de plasmides transfecté codant G353R a donc une influence progressive sur les courants, qu'ils soient entrants ou sortants, puisqu'ils sont inférieurs aux densités de courants obtenus pour le récepteur hP2X2 sauvage ($-208,5 \pm 63,9$ à -70 mV ; $71,9 \pm 46,2$ à 70 mV). Plus la quantité de G353R est importante, moins il y a de courants, et plus particulièrement de courants sortants.

A partir de ces données, l'index de rectification a été calculé en faisant un rapport des densités de courants sortant à 70 mV et celles à -70 mV. Il diminue de $0,22 \pm 0,07$ pour le récepteur sauvage à $0,07 \pm 0,01$; $0,07 \pm 0,01$; $0,06 \pm 0,01$ pour les co-transfections 1:1 ; 0,3:1 ; et 0,3:2, respectivement. La mutation G353R, en plus de présenter des courants plus faibles, expose une rectification entrante significativement plus importante.

4.4.5 Etude de la perméabilité à de gros cations par la fluorescence

Comme décrit précédemment, la présence de G353R sur le récepteur P2X2 affecte la perméabilité de la spermidine. Nous avons donc voulu voir l'influence cette mutation sur le passage de gros cations par une autre technique que le patch-clamp, la fluorescence. Le YO-Pro-1 est un marqueur fluorescent de l'ADN. C'est un cation de taille importante ($7\text{\AA} \times 8\text{\AA} \times 19\text{\AA}$) qui s'intercale à l'ADN devenant alors fluorescent lorsqu'il complexe l'ADN. Grâce à la vidéomicroscopie, l'incorporation de YO-Pro-1 a pu être observée au cours du temps (*acquisition des données réalisée par le docteur Thierry Chataigneau*). Après avoir vérifié que les cellules non-transfectées n'émettaient pas de signal de fluorescence, due à l'absence d'incorporation de YO-Pro-1, j'ai pu mesurer l'incorporation du cation pour chaque image acquise pour les

cellules exprimant le récepteur hP2X2, l'hétéromère hP2X2 : G353R obtenu avec un ratio de co-transfection 1:1 et sur l'homomère G353R, avant et après application d'ATP (Figure 62).

Le récepteur sauvage P2X2 montre une incorporation importante du YO-Pro-1 au travers de son pore, après application d'ATP. En revanche, cette incorporation est beaucoup plus faible pour les cellules exprimant l'hétéromère hP2X2 : G353R. Pour le mutant G353R, il n'y a plus d'incorporation, l'allure de la courbe $\Delta F/\Delta t$ étant presque superposable au contrôle réalisé en absence d'ATP. Une fois de plus, la présence de l'arginine sur le récepteur affecte le passage de gros cations, ici le YO-Pro-1.

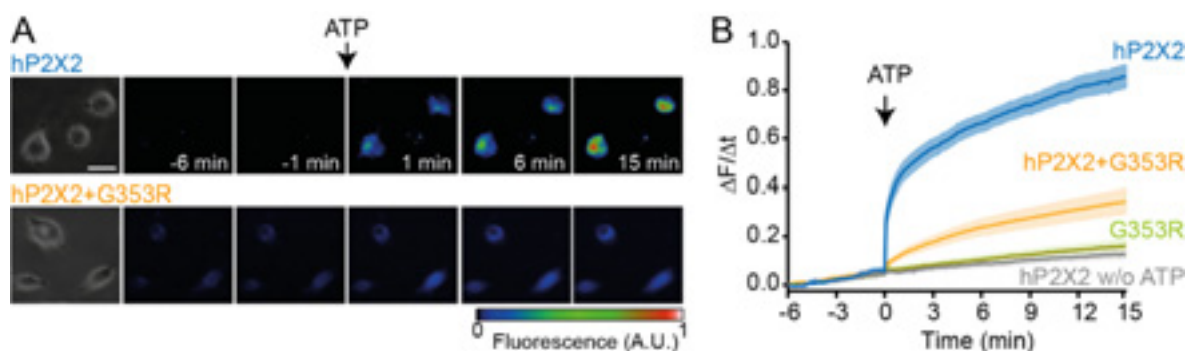


Figure 62 Etude de l'incorporation du YO-Pro-1 et de l'effet de la mutation G353R. A. Séries de photographies au cours du temps montrant l'augmentation progressive de la fluorescence due à l'incorporation du YO-Pro-1 après une application d'ATP sur les récepteurs hP2X2 et hP2X2 : G353R. B. Courbes de la variation de la fluorescence en fonction du temps pour hP2X2 (en bleu), hP2X2 : G353R (en orange), G353R (en vert) et pour le contrôle hP2X2 sans ATP (en gris).

Nous avons également été curieux de voir l'incorporation de ce fluorophore sur l'hétéromère hP2X2 : V60L (Figure 63). Comme cet hétéromère présente une perméabilité à la spermidine quasiment identique à celle de l'homomère hP2X2, nous nous attendions à retrouver ce résultat et observer une augmentation de fluorescence du même ordre que le récepteur sauvage.

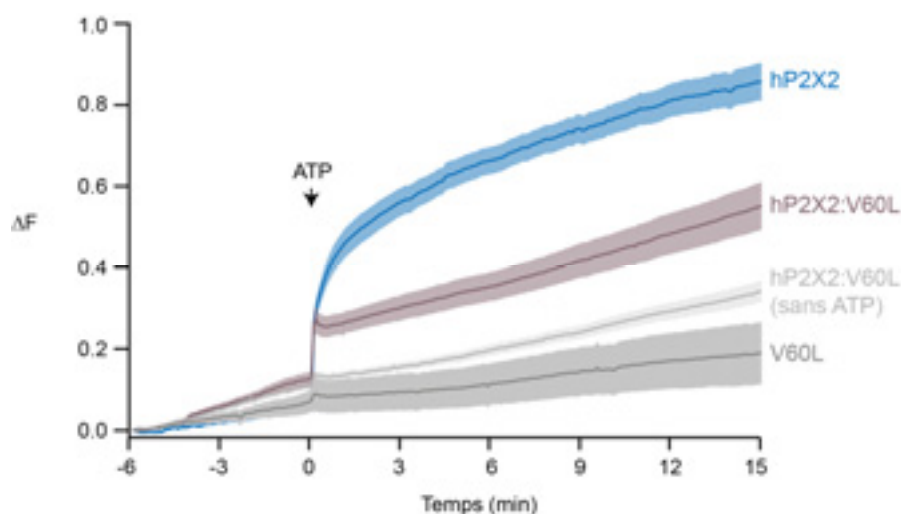


Figure 63 Incorporation de YO-Pro-1 sur V60L. Courbes représentatives de l'augmentation de la fluorescence en fonction du temps pour les différents récepteurs.

De manière surprenante, la présence de V60L sur l'hétéromère affecte également l'incorporation du YO-Pro-1. L'hétéromère présente une intensité de fluorescence plus faible que hP2X2 et l'homomère V60L ne permet pas au YO-Pro-1 de passer au travers du pore. Cette dernière observation est certainement due à l'absence quasi-totale d'ouverture en présence d'ATP.

4.4.6 Modélisation des récepteurs hP2X2 et G353R

L'hétéromère obtenu après co-transfection avec un ratio 1:1 présente donc une diminution du passage de gros cations. Nous nous sommes demandés si cette observation était due à un rétrécissement du pore ionique. En effet, la position G353 se trouve un tour d'hélice plus bas par rapport à la position la plus étroite du canal. De plus, l'arginine est un acide aminé plus imposant en terme de longueur que la glycine. Le docteur Antoine Taly a pu modéliser le récepteur hP2X2, sur la base de la structure

cristallographique du récepteur hP2X3, ainsi que son équivalent muté, le récepteur G353R.

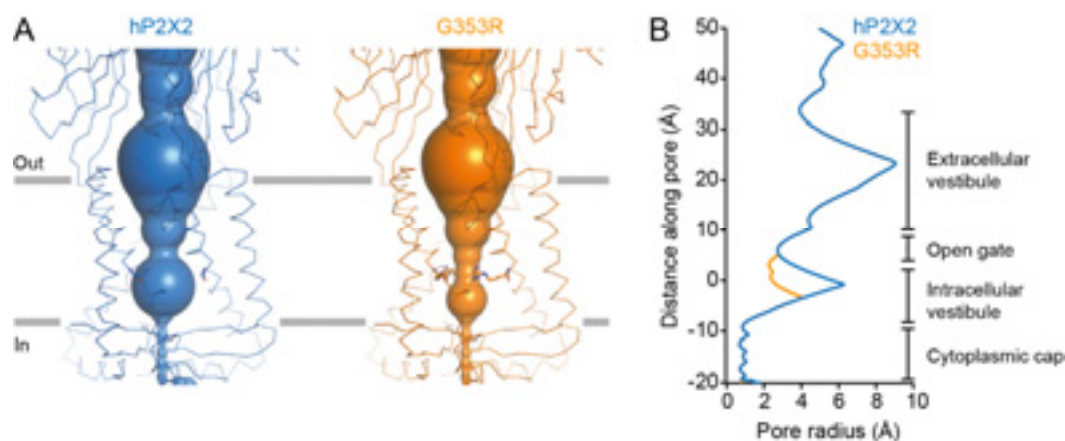


Figure 64 Modélisation du pore ionique. A. Représentation du volume du canal de hP2X2 (  gauche) et de G353R (  droite). B. Graphique représentant le diamètre du pore selon la position dans le pore.

La représentation du volume du canal montre un rétrécissement au niveau de la mutation (Figure 64.A). Cette observation est confirmée lors de l'analyse, où la superposition des deux courbes représentant le rayon du pore le long du canal, montre nettement un rétrécissement, de l'ordre de 1 à, due à l'arginine en position 353. Le diamètre du canal du récepteur sauvage dans sa zone la plus étroite est de 5,5   et chute à 4,6   pour le récepteur G353R. Il est toutefois important de préciser qu'il ne s'agit pas ici d'une moyenne des conformations possibles mais d'un état fig  du récepteur car aucune simulation de dynamique moléculaire n'a été réalisée.

Toutefois, l'ensemble de ces résultats démontrent que la mutation G353R, en réduisant le diamètre du pore ionique, affecte le passage de gros cations tels que la spermidine et le YO-Pro-1 mais n'a pas d'influence sur la perméabilité des petits cations.

4.5 Etude d'un possible lien dynamique entre les canaux Kir4.1 et hP2X2

Comme décrit précédemment, la mutation G353R affecte la perméabilité de la spermidine. Il est décrit dans la littérature que les polyamines sont importantes dans le maintien du potentiel endocochléaire (Wang et al., 2009). L'absence de polyamines dans la cochlée provoque une complète surdité chez les souris traitées. L'explication liée à ce résultat serait l'importance des polyamines dans la régulation de canaux Kir. Ces canaux n'ont pas de sensibilité propre au potentiel et n'ont pas de seuil d'activation (Nichols and Lopatin, 1997). Ils sont ouverts à tous les potentiels, mais leur conductance diminue lorsque le potentiel de membrane dépasse le potentiel d'équilibre de l'ion K^+ , et augmente quand le potentiel de membrane est inférieur à ce potentiel d'équilibre. Dans les conditions physiologiques, ce sont les courants sortants qui prédominent et qui participent ainsi à l'établissement et au maintien du potentiel de repos. Lors d'une dépolarisation, la rectification entrante permet de limiter l'efflux de potassium. Les polyamines sont connues pour entraîner une forte rectification des courants de ces canaux (Lopatin et al., 1995). L'importance des canaux Kir dans le maintien du potentiel endocochléaire a également été établit notamment via l'étude du canal Kir4.1 (Marcus et al., 2002; Rozengurt et al., 2003). En effet, chez des souris où le gène KCNJ10 (Kir4.1) est inactivé, le potentiel endocochléaire est de 0 mV (comparé à +80 mV en condition physiologique). La spermidine et les canaux Kir4.1 jouent donc un rôle crucial dans le processus d'audition et notamment dans le contrôle du potentiel endocochléaire.

Ces canaux Kir4.1 sont principalement présents au niveau du canal cochléaire, dans les cellules de Deiters (Rozengurt et al., 2003) et de Hensen (Eckhard et al., 2012), mais leur présence dans les cellules ciliées n'a pas été démontrée. Les récepteurs P2X2 sont également présents dans ces cellules supportrices mais aussi dans les cellules ciliées (Housley et al., 1999) et permettent la fluctuation de la spermidine.

Notre hypothèse est donc la suivante : il pourrait y avoir un système de régulation de la rectification par la spermidine des canaux Kir4.1 par les récepteurs P2X2. Pour un son normal, en absence d'ATP, les récepteurs P2X2 seraient fermés, ne permettant pas la sortie de spermidine qui bloquerait alors partiellement les canaux potassiques

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

des cellules ciliées. L'entrée de potassium par les stéréocils dans la cellule induit donc une dépolarisation menant à la transmission synaptique (Figure 65.A). Dans le cas d'un excès sonore, l'ATP libéré dans l'endolymphe activerait alors les récepteurs P2X2 ce qui permettrait la sortie de spermidine et ainsi le déblocage des canaux Kir4.1, permettant la sortie massive de potassium menant à l'effondrement du potentiel endocochléaire et à l'arrêt de la transmission synaptique (Figure 65.B). En présence de la mutation G353R, seule une faible quantité de spermidine pourrait sortir, une majeure quantité continuerait alors à bloquer les canaux potassiques. L'influx de potassium ne pourrait pas être court-circuité, induisant la dépolarisation de la cellule et la transmission auditive (Figure 65.C). L'excès sonore transmis serait alors responsable de l'endommagement de l'appareil auditif expliquant le phénotype des personnes porteuses de cette mutation.

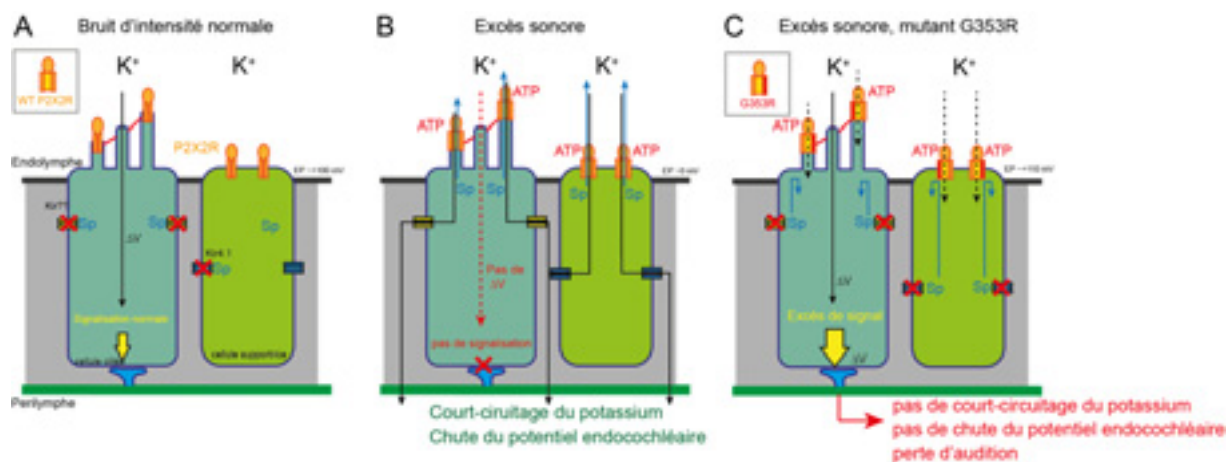


Figure 65 Hypothèse d'un lien dynamique entre Kir4.1 et hP2X2. A. Hypothèse pour un son d'intensité normale avec des canaux potassiques inhibés par la spermidine induisant une voie de signalisation normale. B. Lors d'un son de forte intensité l'ATP activerait les récepteurs P2X2 laissant sortir la spermidine permettant le court-circuitage du potassium et le blocage de la dépolarisation. C. La présence de G353R empêcherait partiellement la spermidine de sortir induisant la dépolarisation et la transmission de l'excès sonore.

Nous avons donc souhaité explorer cette hypothèse. Pour cela, dans un premier temps, l'obtention et la caractérisation des canaux Kir4.1 a été nécessaire. Suite à l'achat d'un plasmide contenant le gène codant Kir4.1 fusionné à une GFP, un sous-

clonage dans un vecteur possédant un promoteur adapté à nos cellules a été nécessaire. La visualisation de fluorescence au niveau de la membrane cellulaire a permis de confirmer le bon adressage en surface des canaux, après transfection. L'application d'une gamme de voltage permet d'obtenir des courants (Figure 66).

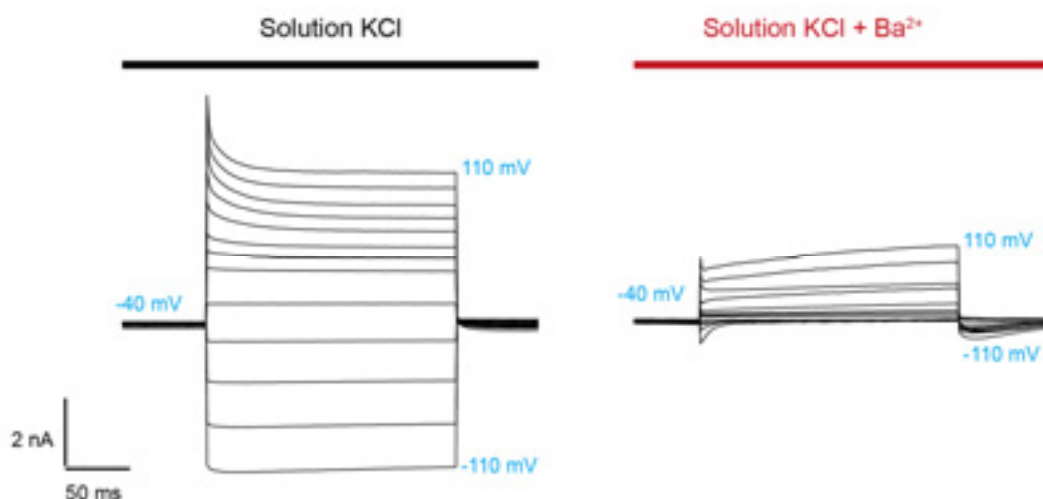


Figure 66 Traces électrophysiologiques des canaux Kir4.1. Courants obtenus pour une gamme de potentiel allant de -110 mV à 110 mV en présence d'une solution riche en potassium (à gauche) et en présence de potassium et de barium (100 μ M) (à droite)

Contrairement aux récepteurs P2X, les canaux Kir4.1 provoquent des courants de fuite puisqu'ils sont en permanence ouverts. La stabilité du patch est donc obtenue en se plaçant au potentiel d'équilibre de ces canaux, soit aux alentours de -40 mV. Lors de l'application de la gamme de voltage allant de -110 mV à 110 mV en présence de la solution dite KCl, des courants « pics » sont observables notamment pour des potentiels positifs, profils caractéristiques des canaux Kir4.1.

Toutefois, les courants obtenus lors des variations de potentiels se compose des canaux Kir4.1 surexprimés mais aussi des canaux voltage dépendant ubiquitaires à la cellule. Il est donc nécessaire de pouvoir discriminer les courants portés par les canaux Kir4.1, des autres canaux. Les canaux Kir4.1 sont connus pour être spécifiquement régulés par des cations extracellulaires, dont les ions Ba²⁺ (Edvinsson et al., 2011). En présence d'une solution KCl supplémentée de chlorure de barium, une majeure partie

des courants est effectivement inhibée. Les courants induits par les Kir4.1 correspondent donc à la soustraction des courants totaux et des courants restant en présence de bariure.

Nous avons ensuite vérifié que nous retrouvons l'inhibition des Kir4.1 par la spermidine dans des cellules co-exprimant les canaux Kir4.1 et hP2X2. Pour cela, l'analyse des courants sur une gamme de potentiels allant de -100 mV à +90 mV (Figure 67.A) et plus précisément à +50 mV, en présence ou en absence de spermidine intracellulaire a été réalisée (Figure 67.B).

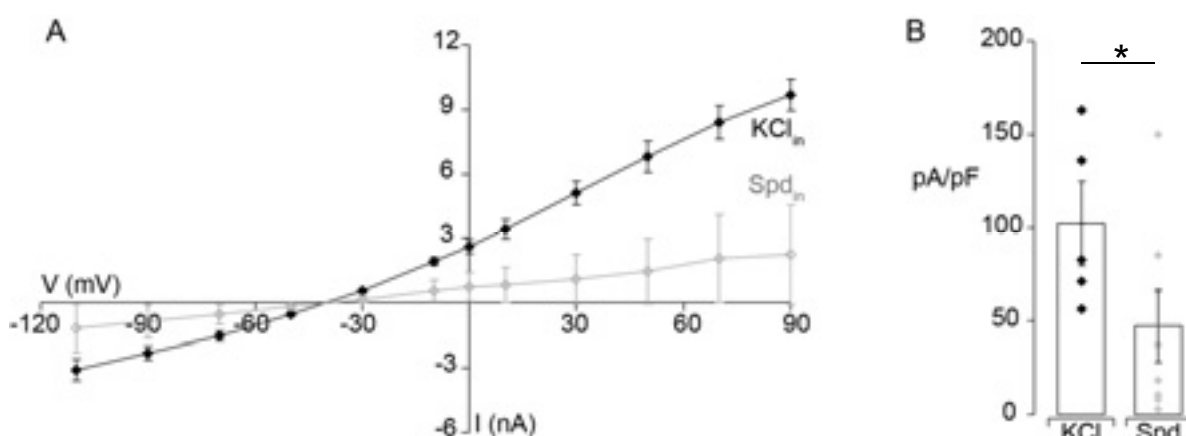


Figure 67 Inhibition partielle des Kir4.1 par la spermidine. A. Courbes I/V des courants Kir4.1 avec une solution KCl intracellulaire (en noir, n= 3) ou une solution KCl-Spermidine (en gris, n=5). B. Analyses des densités de courants correspondantes, à +50 mV. *, p < 0,05

Les densités de courants portés par les canaux Kir4.1 en absence de spermidine sont de $101,7 \pm 22,7$ (n = 5) à +50 mV alors que ceux obtenus en présence de spermidine sont de $47,3 \pm 19,3$ (n = 7). Nous observons bien une inhibition partielle significative des canaux Kir4.1 en configuration cellule entière. Il est à noter que l'inhibition par la spermidine intracellulaire est plus ou moins efficace en fonction des cellules (Figure 67.B).

L'idée est donc de voir si nous sommes capables d'enregistrer une déplétion transitoire de la spermidine en présence des récepteurs P2X2 qui serait plus faible en présence de l'hétéromère hP2X2 : G353R. Les courants induits par Kir4.1 à +50 mV ont été mesurés pendant 200 à 400 ms en présence d'ATP sur des cellules co-exprimant les récepteurs Kir4.1 et hP2X2 ou Kir4.1 et hP2X2:G353R (ratio 1:1) (Figure 68.A).

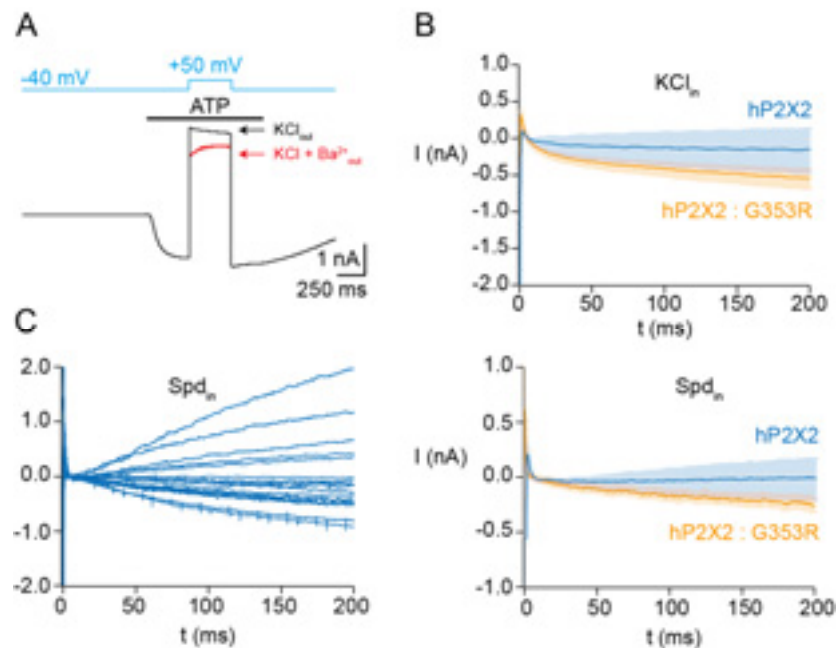


Figure 68 Évolution au cours du temps des courants portés par Kir4.1. A. Protocole utilisé pour la mesure des courants Kir4.1. Un pulse électrique à +50 mV est appliqué pendant 200 ou 400 ms après ouverture des récepteurs P2X2 par l'ATP. Les enregistrements en configuration cellules entières sont réalisés avec une solution extracellulaire KCl puis KCl + Ba²⁺ avec une solution intracellulaire KCl ou Spd pour des cellules exprimant Kir4.1 et hP2X2 ou Kir4.1 et hP2X2 : G353R. B. Analyses des courants obtenus en condition KCl intracellulaire (en haut) (n=6 pour hP2X2 et n=9 pour hP2X2 : G353R) ou en condition Spd intracellulaire (en bas) (n=17 pour hP2X2 et n=10 pour hP2X2 : G353R). C. Variabilité des courants portés par Kir4.1 en présence de hP2X2. Chaque courbe représente une cellule.

En conditions contrôles, c'est-à-dire sans spermidine dans le milieu intracellulaire, nous n'observons pas d'évolution au cours du temps de ces courants que ce soit en présence ou en absence de G353R (Figure 68.B, en haut).

En présence de spermidine intracellulaire, les résultats obtenus ne sont pas aussi clairs. En effet, bien que la moyenne de la totalité des cellules analysées exprimant Kir4.1 et hP2X2 ne montre pas d'augmentation des courants Kir4.1 au cours du temps (Figure 68.B, en bas), l'étude individuelle des cellules présente une grande variabilité. Une partie des cellules montrent une augmentation de l'intensité des courants Kir4.1

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

au cours du temps pendant l'enregistrement en présence d'ATP. Cependant, nous observons également des cellules n'ayant pas d'évolution au cours du temps mais également certaines dont les courants Kir4.1 diminuent (Figure 68.C). Cette grande variabilité n'est pas présente pour les cellules surexprimant les canaux Kir4.1 et l'hétéromère hP2X2 : G353R, où aucune évolution temporelle n'est enregistrée.

Nous avons ensuite décidé de réaliser cette expérience avec des conditions inversées, c'est-à-dire avec une solution extracellulaire contenant de la spermidine et un milieu intrapipette qui n'en contient pas. Par conséquent, l'entrée de spermidine via les récepteurs P2X2 en présence d'ATP pourrait inhiber les canaux Kir4.1. Les courants Kir4.1 avant et après application d'ATP ont donc été mesurés. Malheureusement, malgré des temps d'application d'ATP longs ou répétés, aucune inhibition au cours du temps n'est observée.

Nous n'avons donc pas réussi à mettre en évidence un lien dynamique clair entre les deux canaux. L'électrophysiologie patch-clamp en condition cellule entière en est peut-être la cause. En effet, dans cette configuration le milieu intracellulaire est rapidement et en continu dialysé par le milieu intrapipette. Ainsi, si des molécules de spermidine débloquent les Kir4.1 en sortant par hP2X2, d'autres molécules pourraient instantanément les remplacer et masquer l'interaction entre les deux canaux. De la même manière, la spermidine entrant par hP2X2 est sans doute rapidement dialysée et ne peut pas inhiber les canaux Kir4.1.

C'est pourquoi, nous avons décidé d'utiliser la méthode de patch perforé. C'est une variante du patch-clamp en configuration cellule entière, mais à la place de rompre la membrane cellulaire par succion, le patch se réalise par la création progressive de pores dans la membrane par l'utilisation d'un antibiotique dans le milieu intrapipette, ici l'amphotéricine B (Figure 69). Les pores créés sont perméants aux petits ions monovalents tels que l'ion Na^+ , l'ion K^+ et l'ion Cl^- et ne permettant pas, à priori, le passage d'ions divalents ou plus, comme la spermidine. La formation des pores donne accès aux modifications électriques afin de pouvoir enregistrer les fluctuations ioniques. De cette manière, le milieu intracellulaire n'est pas dialysé par le milieu intrapipette. La concentration de spermidine ubiquitaire aux cellules HEK293 ne sera donc pas modifiée.

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

Après perforation de cellules surexprimant Kir4.1 et hP2X2, les courants Kir4.1 ont été mesurés avant l'application d'ATP afin de vérifier que la spermidine ubiquitaire a un effet inhibiteur sur les Kir4.1. Cependant, le profil et l'intensité des courants obtenus ne permettent pas de confirmer la présence d'une inhibition. En effet, les courants moyens sont de $1,7 \pm 0,9$ nA, parfaitement identiques à ceux obtenus en cellule entière avec une solution intracellulaire sans spermidine ($1,7 \pm 0,9$ nA). Toutefois, l'inhibition peut être faible et la sortie de spermidine pourrait augmenter ces courants. Nous avons donc mesuré les courants Kir4.1 avant et après application d'ATP afin d'observer une déplétion de la spermidine par les P2X2 et d'observer la désinhibition des canaux potassiques.

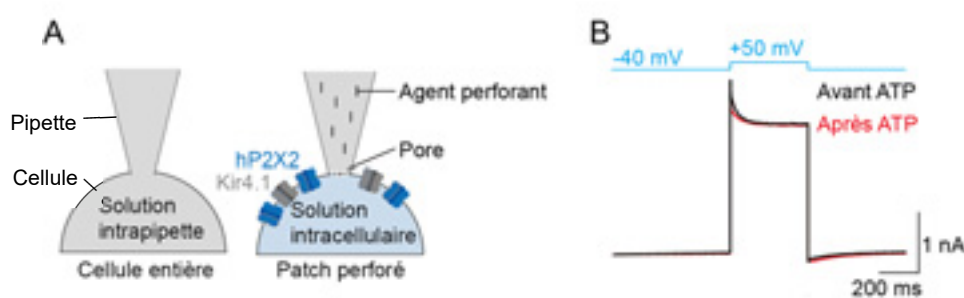


Figure 69 Étude d'un lien dynamique par l'utilisation du patch perforé. A Schéma illustrant le patch perforé en comparaison avec le patch-clamp en configuration cellule entière. B. Courants potassium des canaux Kir4.1 avant (en noir) et après (en rouge).

Malheureusement, les courants obtenus sont de même intensité au début et à la fin du protocole, aucune augmentation au cours du temps n'est observée, malgré des applications d'ATP de plus en plus longues ($n=3$) (Figure 69).

Nos outils ne nous permettent pas de mettre en évidence un lien dynamique entre les canaux Kir4.1 et les récepteurs hP2X2.

5. Discussion

Les personnes porteuses des mutations V60L ou G353R sur leur récepteur P2X2 présentent une forme de surdité non syndromique liée à l'âge. Afin de mieux comprendre le phénotype induit par ces mutations, l'étude des propriétés biophysiques a été investiguée. Les deux mutants présentent une expression de surface semblable à celle de l'homomère sauvage et pourtant l'énergie apportée par l'ATP lié sur le récepteur muté ne permet pas l'ouverture de son canal. L'utilisation d'une agrafe moléculaire nous a permis d'outrepasser cette observation. En effet, en forçant l'écartement des différentes sous unités par le changement conformationnel du MAM, nous restituons le flux cationique au travers du canal des récepteurs mutés et plus efficacement pour la mutation G353R. Le comportement de V60L et de G353R en présence de MAM étant différent, nous pouvons suggérer que les deux mutations présentent des mécanismes différents.

Comme décrit précédemment, le récepteur contrôle I339C/S356C présente une grande variabilité dans les profils de marquage qui n'est plus présente pour le récepteur I339C/G353R/S356C. Cette observation suggère que l'arginine modifie probablement la structure de l'hélice transmembranaire. En effet, il est connu que la glycine, par son absence de chaîne latérale, apporte de la flexibilité dans les structures des protéines, son absence pourrait donc rigidifier l'hélice. De plus, l'arginine est un acide aminé polaire et chargé positivement qui pourrait apporter des interactions électrostatiques supplémentaires avec d'autres acides aminés de l'hélice, la rigidifiant.

La comparaison des perméabilités relatives du récepteur sauvage P2X2 en présence d'ATP et celles obtenues en irradiation lumineuse dans l'UV du récepteur contrôle I339C/S356C démontre que le MAM n'a pas d'influence sur le passage des petits ions au travers du pore, faisant de lui un bon outil pour l'étude du récepteur G353R. De plus, contrairement à l'utilisation de co-transfection, l'utilisation du MAM permet d'avoir un contrôle dans la stœchiométrie d'assemblage des trois sous-unités du récepteur, puisque seul le plasmide codant le récepteur I339C/G353R/S356C est transfecté.

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

Dans le cas de co-transfection de deux plasmides, ici celui codant hP2X2 et celui codant G353R, quatre stœchiométries d'assemblage peuvent être obtenues : l'homomère hP2X2, l'homomère G353R et deux hétéromères hP2X2 : G353R, l'un avec une seule sous-unité mutée et l'autre avec deux sous-unités mutées. Statistiquement, ces récepteurs sont répartis selon la loi binomiale. Ainsi avec un ratio 1:1, la probabilité d'obtenir l'homomère sauvage est de 12,5%, celle d'un hétéromère est de 75% et 12,5% pour l'homomère G353R. Au sein des hétéromères la moitié des 75% correspond à l'hétéromère portant une seule sous-unité mutée et les 37,5% restant à l'hétéromère portant deux sous-unités mutées. Au sein d'une même cellule, il y a donc une variabilité de récepteurs P2X2.

Il est tout de même intéressant de les étudier puisque d'un point de vue physiologique, la co-transfection mime le génotype des patients atteints de ces mutations qui sont hétérozygotes.

Il existe des mutations qui auraient pu nous permettre de discriminer les différents récepteurs. En effet, sur le récepteur P2X2 de rat, la mutation K69A abolit la réponse ATP du récepteur (Jiang et al., 2000b). La co-transfection de l'équivalent de cette mutation sur le récepteur humain, K80A, et de G353R aurait pu permettre l'obtention de l'homomère K80A, inactif en présence d'ATP, l'homomère G353R, faiblement fonctionnel et l'hétéromère K80A : G353R, qui présenterait probablement des courants ATP normaux. Par manque de temps, je n'ai pas pu finir d'obtenir le plasmide codant K80A, néanmoins j'ai tenté la co-transfection de K69A (rP2X2) et de G353R (hP2X2). Malheureusement, les cellules co-transfectées ne présentent pas de courants ATP. Il est connu également que la mutation K366A sur le récepteur rP2X2 ne permet pas l'adressage en surface de ce mutant (Chaumont et al., 2004), l'équivalent K377A pourrait éliminer la formation de cet homomère en surface. Malheureusement, après avoir testé différentes conditions de mutagénèse dirigée (oligonucléotides différents, matrices différentes, concentrations différentes...), je n'ai pas pu obtenir ce mutant. Enfin, une alternative aurait pu être de générer des concatémères afin de choisir le nombre de mutations portées par le trimère alors formé mais leur conception demande du temps.

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

Enfin, aucune étude ne prouve que les mutants V60L et G353R forment bien des hétéromères avec le récepteur sauvage hP2X2. En effet, le fait de retrouver une réponse ATP équivalente à hP2X2 non muté pour V60L et G353R ne permet pas de confirmer la formation d'hétéromère puisque la formation de l'homomère hP2X2 et des homomères V60L ou G353R dans une même cellule pourrait également expliquer ce résultat.

L'utilisation du MAM permet d'étudier qu'un type de récepteur : l'homomère I339C/G353R/S356C et ainsi éviter cette variabilité et le questionnement sur l'existence de l'hétéromère. Son utilisation a permis de mettre en évidence que la mutation G353R, de manière surprenante, n'affecte pas la perméabilité aux petits cations et n'inverse pas la sélectivité du pore ionique. En effet, la présence d'une charge positive dans la zone la plus étroite du pore, sur le récepteur P2X2 de rat inverse sa sélectivité (Browne et al., 2011). Cela ne semble pas être le cas pour l'homologue humain.

Par ailleurs, le MAM nous a permis de déterminer une perméabilité à la spermidine fortement réduite pour la mutation G353R comparé au contrôle. Cependant la valeur obtenue par la lumière pour I339C/S356C est de $P_{\text{Spd}}/P_{\text{Na}} = 23,26 \pm 9,71$. Cette valeur signifie que pour le passage d'un ion sodium, environ 23 ions spermidine entrent dans la cellule, ce qui est surprenant car il s'agit d'un gros cation. Cette valeur de perméabilité relative est loin d'être similaire à celle obtenue en condition physiologique (ATP) pour hP2X2 qui est de $0,83 \pm 0,08$ mV. Le MAM pourrait donc exagérer le passage de la spermidine au travers du pore par des mouvements différents de ceux induits par l'ATP. Toutefois son utilisation nous a permis de constater cette chute de perméabilité.

L'utilisation de co-transfection nous a permis de nous placer dans des conditions plus physiologiques, afin d'activer les récepteurs par l'agoniste naturel. Malgré la variabilité possible dans l'assemblage des hétéromères, la diminution de la perméabilité relative de la spermidine est de nouveau observée pour les différents ratios de co-transfection testés. L'absence de baisse de cette perméabilité pour la co-transfection avec V60L, confirme que l'arginine est bien mise en cause dans la perturbation du passage de la spermidine.

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

Le YO-Pro-1 est connu comme étant un fluorophore capable d'entrer dans la cellule est de s'insérer à l'ADN en présence de récepteurs P2X. Nous retrouvons ici ce résultat pour des cellules transfectées avec le récepteur P2X2 humain. La co-transfection avec la mutation G353R fait chuter de manière significative la fluorescence suggérant une forte diminution de la perméabilité du YO-Pro-1. L'absence de fluorescence pour la transfection de G353R seul, est sans doute due à l'effet combiné d'une réponse ATP beaucoup plus faible que celle du récepteur sauvage et de la gêne créée par la présence de trois arginines dans le canal.

De plus, de manière surprenante, la co-transfection hP2X2 et V60L affecte également l'incorporation du YO-Pro-1. Ce résultat suggère que, de manière allostérique, la mutation de la valine en leucine modifie le pore ionique. La spermidine étant plus petite et dans une conformation plus allongée que le YO-Pro-1, cette modification n'affecte pas sa perméabilité mais affecte celle du YO-Pro-1, plus encombrant.

La diminution de la perméabilité aux gros cations tels que la spermidine et le YO-Pro-1 pour la mutation G353R évoque un rétrécissement du diamètre du pore, plus important que pour la mutation V60L. La modélisation de l'homomère G353R révèle effectivement une réduction de presque 60% comparée à la taille du canal mesuré pour hP2X2. Le diamètre du pore en position 353 de l'hétéromère devrait être de taille intermédiaire et suffit à perturber le passage de gros cations au travers de celui-ci.

Cette perturbation pourrait donc avoir un rôle important dans le contrôle du potentiel endocochléaire en cas d'excès de stimulation sonore, qui expliquerait le phénotype des personnes atteintes de cette mutation. C'est pourquoi nous avons voulu explorer un possible lien entre cette diminution de la perméabilité de la spermidine et la perte d'audition. Il est connu que la spermidine, dans l'organe de Corti, est importante dans le maintien du potentiel endocochléaire via la régulation des canaux Kir4.1. La co-transfection de cellule avec les canaux Kir4.1 et les récepteurs hP2X2, sauvage ou muté nous a permis de retrouver cette régulation des canaux potassiques. Toutefois, nos enregistrements en présence d'ATP ne permettent pas de confirmer la désinhibition de ces canaux. Aucune augmentation des courants potassiques n'est observée. Il est probable que la technique de patch clamp en configuration cellule entière ne rende pas possible la visualisation. La dialyse qui s'opère entre le milieu

intrapipette et le milieu intracellulaire implique une concentration constante en spermidine. Ainsi, il est possible que même très localement, les mouvements de la spermidine soient compensés par la présence continue de spermidine contenue dans la solution intracellulaire masquant les possible déplétion transitoires. L'utilisation de la méthode de patch perforé n'a pas permis de remédier à ce problème technique. Néanmoins, l'utilisation d'une solution extracellulaire contenant de la spermidine aurait pu être utilisée en patch perforé dans le but de d'augmenter la concentration intracellulaire de spermidine par les récepteurs P2X2 et ainsi observer une diminution des courants potassiques. Par manque de temps, je n'ai pas pu tester cette expérience. La concentration ubiquitaire de spermidine dans les cellules HEK, au vu de nos résultats, n'est sans doute pas suffisante pour inhiber les canaux potassiques. L'activité de l'ornithine décarboxylase est très active dans la cochlée, la concentration en spermidine y est donc probablement plus élevée. Notre hypothèse pourrait donc être vérifiée par des enregistrements sur des lignées de cellules ciliées transfectées avec Kir4.1 et hP2X2 ou avec l'hétéromère hP2X2 : G353R ou encore directement sur l'organe de Corti de souris porteuses de la mutation G353R et de souris saines. L'utilisation d'un inhibiteur de l'ornithine décarboxylase permettrait, en outre, de confirmer un possible lien entre Kir4.1-spermidine-P2X2.

Chapitre 2 : Études biophysiques de deux mutants P2X2 humain responsables d'une forme de surdité

CHAPITRE 3 : ETUDE DE LA CONDUCTANCE UNITAIRE DU NMDG⁺

Partie I : Mesure de la conductance unitaire du NMDG⁺ (avec le Dr. Laurie Peverini)

1. Contexte

Depuis plusieurs années, l'état ouvert des récepteurs P2X était décrit comme étant d'abord un état permettant la perméation des petits cations (état I₁) sodium, potassium et calcium, puis que l'application prolongée d'ATP permettait la perméation progressive de plus gros cations tels que le NMDG⁺ ou certains fluorophores (état I₂) (Khakh et al., 1999a). Cependant le mécanisme relatif à ces changements de conductances est débattu et controversé.

La perméabilité des cations volumineux est mesurée par électrophysiologie patch-clamp (Khakh et al., 1999a; Virginio et al., 1999b). Cette méthode indirecte permet la mesure de potentiels d'inversion grâce à des conditions dites bi-ioniques, où le NMDG⁺ est le seul ion perméant présent à l'extérieur de la cellule et le Na⁺ le seul cation perméable présent dans la solution intracellulaire. Selon l'équation de courant de Goldman-Hodgkin-Katz, un changement du potentiel d'inversion correspond à un changement dans la perméabilité membranaire à condition que les concentrations d'ions de chaque côté de la membrane restent inchangées. L'évolution progressive et positive du potentiel d'inversion mesuré pendant de longues applications d'ATP a été interprétée comme étant un changement de la perméabilité relative du NMDG⁺ par rapport au Na⁺.

En 2015, l'équipe de Swartz explique que ces mesures de potentiel d'inversion qui caractérisaient cet état dilaté sont artefactuelles et n'ont pas été réalisées dans les bonnes conditions. La modification du potentiel d'inversion n'est en réalité pas due à un changement progressif de la perméabilité mais à une modification de la

concentration ionique intracellulaire (Li et al., 2015a). L'hypothèse est donc que l'état I_1 est directement perméant aux gros cations. Au laboratoire, le Dr Laurie Peverini et le Dr Mahboubi Harkat ont démontré, par l'utilisation de conditions NMDG⁺ symétrique (intracellulaire et extracellulaire) et par l'application des molécules photoisomérisables, que l'état dit « dilaté » n'est pas un état conformationnel distinct mais que moins de NMDG⁺ semblait traverser le pore comparé au passage des petits cations. De plus, des enregistrements en canaux multiples en configuration outside-out ont été également réalisés. Ils tendent à montrer que la cinétique d'ouverture en condition NMDG⁺ extracellulaire (183 ms) est identique à celle en condition sodium extracellulaire (123 ms) (Figure 70) (Harkat et al., 2017).

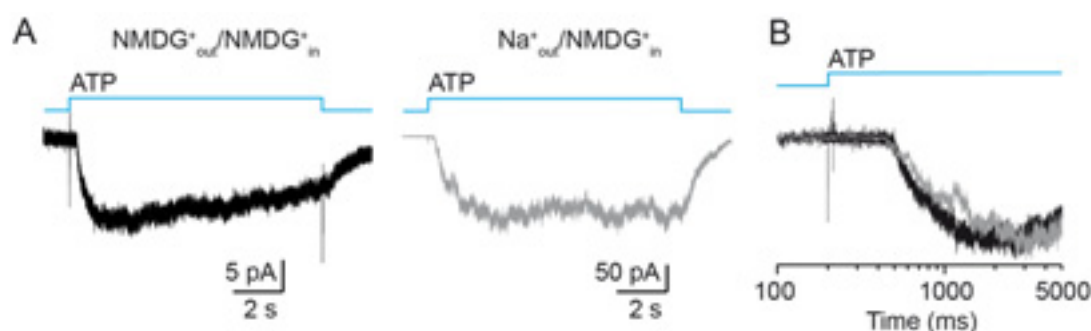


Figure 70 Cinétique d'ouverture en condition outside-out multi canaux sur *rP2X2-3T*. A. Enregistrements en conditions symétriques NMDG⁺_{int}/NMDG⁺_{ext} (à gauche) et en NMDG⁺_{int}/Na⁺_{ext} (à droite) sur une même cellule. B. Superposition des deux enregistrements NMDG⁺_{ext} (en noir) et Na⁺_{ext} (en gris) après normalisation

2. Stratégie

Les cinétiques d'ouverture dans les deux conditions décrites précédemment étant identiques, nous avons voulu déterminer la conductance unitaire, caractérisant le flux ionique, de cet état supposé dilaté. En binôme avec le Dr. Laurie Peverini, nous avons donc réalisé des enregistrements en configuration outside-out canal unique en conditions NMDG⁺_{int}/NMDG⁺_{ext} et NMDG⁺_{int}/Na⁺_{ext}.

3. Matériel et méthodes

Culture cellulaire et transfection

Les cellules sont cultivées de la même manière que dans le chapitre 1. La quantité déposée de cellules sur les lamelles en verre est adaptée de manière à obtenir des amas cellulaires, facilitant techniquement l'obtention d'un patch en configuration canal unique. La quantité de plasmide codant rP2X2-3T transfecté est entre 50 ng et 100 ng.

Enregistrements canal unique

Les courants sont enregistrés par la technique de patch clamp en configuration canal unique sur des cellules fluorescentes prises dans un amas cellulaire. Les pipettes de patch (15-30 M Ω) contiennent une solution NMDG⁺_{int} composée de 132,6 mM de NMDG, 10 mM d'EDTA, 10 mM d'HEPES ajustée à pH 7.3 avec une solution de HF. Après avoir atteint le gigaseal entre la pipette et la membrane cellulaire, la membrane est rompue par succion puis étirée jusqu'à dissociation avec la cellule. Un potentiel de membrane de -120 mV est appliqué par l'amplificateur. Le patch est obtenu en présence d'une solution extracellulaire NES_{canal unique} composée de 132,6 mM de NaCl, 0,3 mM de KCl, 0,25 mM de MgCl₂, 10 mM d'HEPES et ajustée à pH 7,3 avec une solution de NaOH. Cette solution est ensuite changée pour une solution NMDG⁺_{ext} composée de 132,6 mM de NMDG, 0,3 mM de KCl, 0,25 mM de MgCl₂, 10 mM d'HEPES et ajustée à pH 7,3 avec une solution de HCl en présence ou en absence d'ATP (1-30 μ M) ; ou peut être changée pour une solution Na⁺_{ext} composée de 132,6 mM de NaCl, 0,3 mM de KCl, 0,25 mM de MgCl₂, 10 mM d'HEPES ajustée à pH 7,3 avec une solution de NaOH supplémenté ou non d'ATP (1-30 μ M).

Les données sont échantillonnées à 10 kHz, et un filtre à 2.9 kHz est appliqué. Lors de l'analyse, les données sont de nouveau filtrées pour obtenir au final une fréquence cutoff de 1 kHz ou 100 kHz. Les événements d'ouverture sont détectés en utilisant le logiciel TAC (Bruxton Co.) et les conductances sont mesurées après analyse gaussienne des histogrammes de distribution d'amplitude.

4. Résultats

Nous avons réussi à enregistrer pour la première fois des courants portés par des canaux unitaires en conditions NMDG⁺ symétriques (Figure 71).

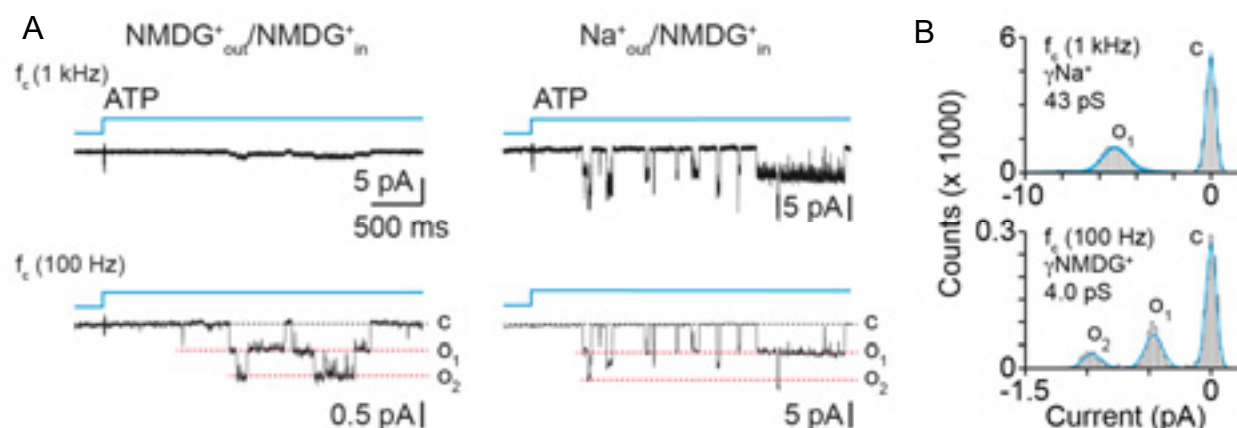


Figure 71 Mesure de la conductance unitaire de NMDG⁺. A. Enregistrements de canaux uniques en configuration outside out après application d'ATP sur rP2X2-3T en conditions symétriques NMDG⁺int/NMDG⁺ext (à gauche) et en NMDG⁺int/Na⁺ext (à droite) sur une même cellule. c correspond à l'état fermé et les états O1 et O2 correspondent respectivement à l'ouverture d'un premier canal et d'un deuxième canal. B. Histogramme de l'analyse des conductances correspondant aux traces du panel A.

Ceci nous a permis de déterminer une conductance unitaire du NMDG⁺ à partir de ces courants. Il est à noter que les courants obtenus après l'application d'ATP 1 μ M en NMDG⁺ symétriques sont à peine visibles alors que ceux obtenus en Na⁺ extracellulaire sont plus robustes (Figure 71.A, en haut). Les conductances en conditions sodiques peuvent alors être déduites et sont de 44 ± 8 pS ($n=7$) (Figure 71.B, en haut).

L'application d'un filtre à 100 kHz permet sur les deux conditions d'enregistrements de discerner de manière claires les ouvertures unitaires (Figure 71.A, en bas), et en particulier celles obtenues en NMDG⁺ symétrique ce qui nous a permis de mesurer une conductance de ce cation qui est de $3,3 \pm 0,6$ pS ($n=6$) (Figure 71, en bas).

Cette conductance NMDG⁺ représente donc 7,5% des courants unitaire porté par le cation sodium.

Nous avons également testé différentes concentrations d'ATP afin d'en voir l'influence sur l'amplitude des courants et donc sur la conductance (Figure 72).

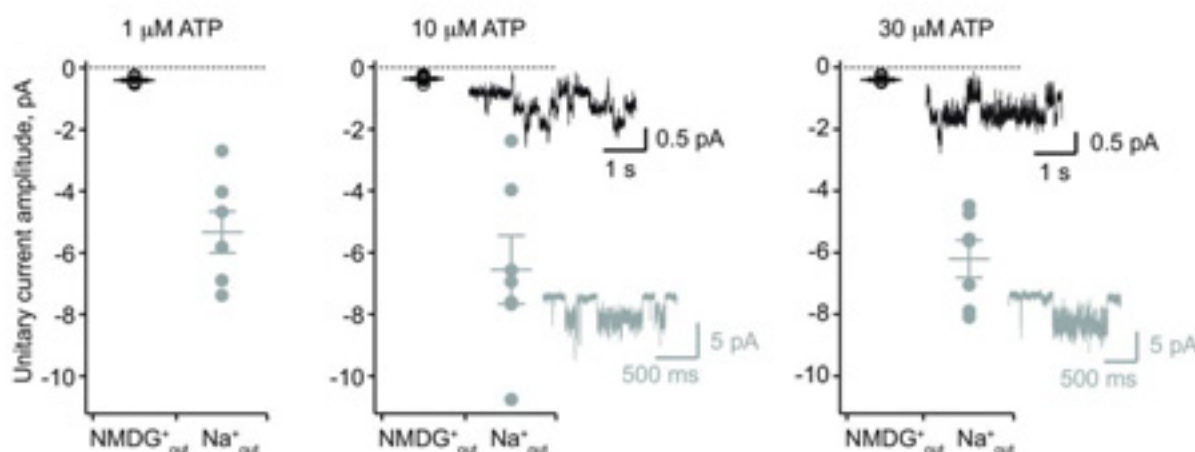


Figure 72 Influence de la concentration d'ATP sur la conductance unitaire de rP2X2-3T. Moyenne de l'amplitude des courants obtenus pendant une application d'ATP à 1 μ M à gauche, 10 μ M au milieu et à 30 μ M à droite pour des conditions NMDG⁺_{int}/ NMDG⁺_{ext} (en noir) et NMDG⁺_{int}/ Na⁺_{ext} (en gris).

L'application d'ATP à 10 μ M et 30 μ M ne modifie pas de manière significative l'intensité des courants obtenus, ce qui implique que le ratio de la conductance en NMDG⁺ symétrique reportée à celle en condition Na⁺_{ext} n'est pas modifié non plus. L'absence d'évolution des courants unitaires lors de l'augmentation d'ATP signifie que le fait de se placer dans des conditions proches des conditions saturantes en ATP n'augmente pas la conductance du NMDG⁺.

L'utilisation d'une solution NMDG⁺ intracellulaire n'a pas non plus d'influence sur la conductance du sodium. Nous avons mesuré la conductance sodique en condition sodium symétrique et nous obtenons une valeur de conductance de 43 ± 6 pS (n=4) comparable à celle obtenue en conditions NMDG⁺_{int}/ Na⁺_{ext}.

5. Discussion

Ces données démontrent que les ions NMDG⁺ circulent à travers le pore avec plus de difficulté que les ions Na⁺. Avec un potentiel de -120 mV et une concentration ionique extracellulaire de 132,6 mM, le nombre d'ions par seconde pour le NMDG⁺ déduit est d'environ $2,5 \times 10^6$ pour chaque canal et est d'environ 32×10^6 pour le Na⁺ mettant en avant que le flux de NMDG⁺ est beaucoup plus lent que celui du Na⁺. La modélisation moléculaire de la perméation du NMDG⁺ au travers du pore qui a été réalisée comme expérimentation complémentaire par l'équipe du Dr Cecchini, confirme ses résultats et révèle que pour entrer dans la cellule la molécule a besoin de s'orienter d'une manière précise, en conformation linéaire avec l'atome d'azote orienté vers le bas.

Les enregistrements en canal unique ainsi que l'étude des cinétiques en multi canaux, mettent en avant l'absence d'augmentation de la perméabilité des gros cations au court du temps et valident donc que la dilatation du pore ionique des récepteurs P2X n'est pas une propriété intrinsèque du canal lui-même. Cependant, nous n'excluons pas la possibilité que la dilatation des pores existe, mais si tel était le cas, elle doit exiger un élément de régulation externe au pore P2X qui serait perdu dans nos conditions expérimentales.

Partie II : Influence de la modification potentielle du pore ionique sur la conductance du NMDG⁺ (avec le Dr. Laurie Peverini)

1. Contexte

Après la publication des travaux décrits dans la partie I, les caractéristiques cinétiques et de conductivités ont ouvert des pistes quant à l'exploration de la perméation du NMDG⁺. Nos données ainsi que la modélisation moléculaire tendent à montrer que la contrainte stérique imposée par le pore ionique pourrait être la raison de la difficulté du NMDG⁺ à fluctuer au travers du canal, et plus particulièrement au niveau des résidus localisés dans la zone la plus étroite du canal. L'idée est donc de voir l'influence de certains acides-aminés dans cette zone sur la conductivité du NMDG⁺.

Il est connu que les mutations I328C, N333C et T336C sont accessibles aux agents chimiques de type MTS et que leur réactivité sur ces cystéines inhibe partiellement la réponse ATP (Rassendren et al., 1997). En combinant ces résultats avec l'étude des structures cristallographiques, nous pouvons conclure que ces résidus sont orientés vers l'intérieur du pore ionique et que la position 339 semble être dans la partie la plus étroite. Nous avons donc décidé de muter les acides aminés N333, T336 et T339 d'abord avec un acide aminé de petite taille, l'alanine afin de sélectionner la position la plus efficace. Sur cette position d'autres acides aminés ont été introduit pour en voir l'effet sur la conductance.

2. Matériel et méthodes

Mutagenèse dirigée

Les mutations N333A, T336A, T339A, T33G et T339Q ont été introduite sur le récepteur rP2X2 de la même manière que décrite dans le chapitre 1.

Enregistrements cellules entières et canaux uniques

Les enregistrements en configuration cellule entières ont été réalisé avec une solution intrapipette NMDG⁺_{int} composée de 140 mM de NMDG⁺, 10 mM d'HEPES, 10 mM d'EDTA, ajustée à pH 7,3 avec une solution de HCl. Les solutions externes NMDG⁺_{ext} et Na⁺_{ext} sont constituée respectivement de 140 mM de NMDG⁺, 10mM d'HEPES, ajustée à pH 7,3 avec du HCl et de 140 mM de NaCl, 10 mM d'HEPES, ajustée à pH 7,3 avec une solution de NaOH.

Les enregistrements en configuration canal unique sont réalisés dans les mêmes conditions que dans la partie I de ce chapitre dans tous les cas sauf pour rP2X4 où 3 μ M d'ivermectine a dû être ajouté dans les solutions extracellulaires.

3. Résultats

Les enregistrements en configuration cellule entière démontrent que la présence d'une alanine à la place de N333, T336 ou de T339 augmente les ratios des courants obtenus en NMDG⁺_{ext} par rapport à ceux obtenus en Na⁺_{ext}.

En effet, une rapide analyse des ratios $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$ montre qu'ils passent de 10% pour le récepteur rP2X2 à 15 % pour la mutation N333A (n=3), à 16 % (n=3) pour T336A et augmente en moyenne jusqu'à 24 % (n=6) pour T339A (Figure 73).

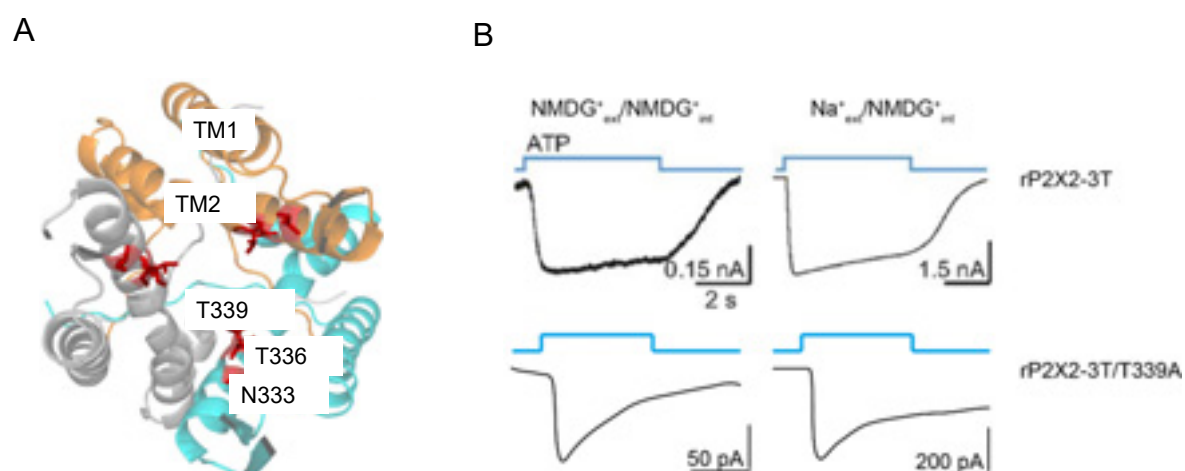


Figure 73 Influence de la mutation T339A. A. Positionnement des différents résidus mutés orientés vers le pore. B. Enregistrements en configuration cellule entière en conditions NMDG+ext/NMDG+int (à gauche) puis Na+ext/NMDG+int (à droite) pour rP2X2-3T (en haut) et rP2X2-3T/T339A (en bas).

La mutation de cette thréonine en alanine à l'endroit le plus étroit du pore permet un passage plus important du NMDG⁺. Cette position est donc intéressante pour l'étude de la conductance du NMDG⁺ en fonction de l'acide aminé qui y est muté. Nous nous attendons à ce que plus l'acide aminé est gros, plus le pore sera étroit et va donc créer des contraintes supplémentaires dans le passage du gros cation. A l'inverse plus il sera petit, plus le pore sera large, facilitant le passage du NMDG⁺.

Ainsi, nous avons réalisé les mutations T339G et T339Q puis les enregistrements en configuration canal unique ont été faits pour T339A, T339Q et T339G et rP2X2 (Figure 74).

L'analyse des conductances révèle que la mutation de la thréonine en alanine augmente de manière statistiquement significative la conductance unitaire du NMDG⁺. Elle est de $3,9 \pm 0,1$ pS (n=7) pour rP2X2 et augmente à $6,4 \pm 0,1$ pS (n=13) pour T339A (Figure 74, en haut). L'étude statistique des mutations T339Q et T339G ne révèle pas de différences avec les conductances obtenues pour le récepteur sauvage. Cependant, nous pouvons remarquer qu'une tendance semble se dégager pour la mutation T339Q. La conductance obtenue pour cette mutation est de $2,4 \pm 0,1$ pS (n=8) (Figure 74.B, en haut).

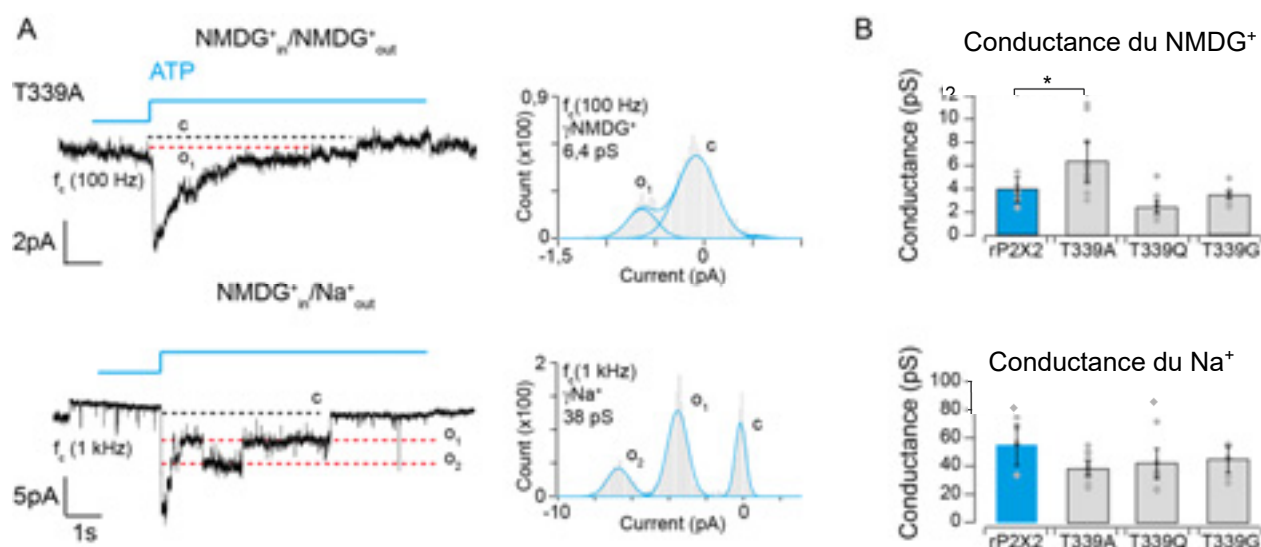


Figure 74 Influence des acides aminés en position 339 sur la conductance unitaire du canal. A. Enregistrements et analyses en configuration canal unique pour la mutation T339A en conditions symétriques NMDG⁺_{int}/NMDG⁺_{ext} (en haut) et en NMDG⁺_{int}/Na⁺_{ext} (en bas) sur une même cellule. c correspond à l'état fermé et les états O₁ et O₂ correspondent respectivement à l'ouverture d'un premier canal et d'un deuxième canal. B. Diagrammes des conductances obtenues pour chaque condition. *, p<0,05

Concernant les conditions bi-ioniques NMDG⁺_{int}/Na⁺_{ext}, les mutations ne semblent pas avoir d'influence sur la conductance unitaire du sodium (Figure 74.B, en bas). Conséquemment, les ratios $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$ suivent l'évolution observée lors de la mesure des conductances du NMDG⁺ : ils sont de $7,4 \pm 1,0$ % pour rP2X2, de $18,4 \pm 2,6$ % pour T339A, de $6,8 \pm 1,7$ % pour T339Q et de $8,2 \pm 1,0$ % pour T339G.

Il semble donc que nous arrivons à modifier le diamètre du pore grâce aux mutations et que celui-ci influe directement sur la conductance unitaire du NMDG⁺, notamment pour l'augmentation du canal par la mutation T339A.

Nous savons que les récepteurs P2X sont également perméant à la spermidine³⁺. Nous avons donc été curieux de voir la conductance unitaire de ce gros cation sur les mutants créés lors de l'étude de la conductance du NMDG⁺ et de les comparer à celle obtenue sur rP2X2 (Figure 75).

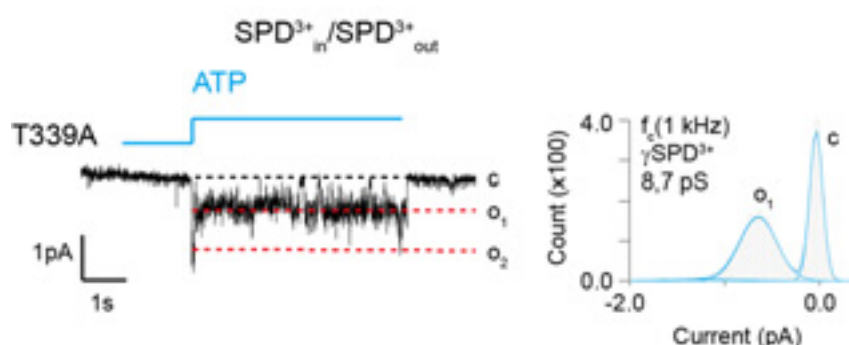


Figure 75 Enregistrement préliminaire en canal unitaire de T339A en conditions symétriques SPD³⁺. Deux ouvertures sont observables sur cet enregistrement indiquées par O₁ et O₂ en présence d'ATP. L'histogramme correspond à l'analyse des conductances de cet enregistrement.

Les études préliminaires en conditions spermidine symétrique révèlent que là aussi, la présence de l'alanine à la place de la thréonine à un effet sur la conductance de ce gros cation. En effet, pour le récepteur P2X2, nous obtenons une conductance unitaire de $6,8 \pm 0,2$ pS ($n = 2$). La mutation T339A entraîne une augmentation de 21% et devient $8,7 \pm 0,1$ ($n = 2$).

Cependant, après plusieurs tentatives et la préparation d'une solution intracellulaire SpdF, seuls de rares patchs ont pu être obtenus, les autres étant trop instables. Nous avons donc abandonné l'idée de mesurer ces conductances pour les autres mutations.

Les résultats précédant sur la conductance du NMDG⁺ étant intéressants, nous avons voulu les corrélérer avec un aspect plus physiologique. L'alignement de séquence montre que l'acide aminé équivalent à T339 (rP2X2) sur rP2X4 est une alanine, sur rP2X1 une arginine et sur rP2X7 une sérine. Le récepteur rP2X3 porte également une thréonine en cette position (Figure 76).

		$\alpha 7$ (TM2)
rP2X4 (330)		DIIPTMINVGSGGLALLGVATVLC
rP2X1 (326)		DIIPTMTTIGSGIGIFGVATVLC
hP2X2 (336)		SLIPTIINLATALTSVGVSFLC
rP2X2 (325)		SLIPTIINLATALTSIGVGSFLC
rP2X3 (316)		NIIPTIISSVAAFTSVGVGTVLC
rP2X7 (328)		DIIQLVVYIGSTLSYFGLATVCI

Figure 76 Alignement de séquence de la partie TM2

Nous avons donc tenté d'enregistrer des courants unitaires pour ces récepteurs. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à obtenir d'enregistrements exploitables pour rP2X1, rP2X3 et rP2X7.

Toutefois, en ajoutant de l'ivermectine dans les solutions extracellulaires, comme décrit dans une publication récente (Wang et al., 2017), nous avons obtenu des enregistrements en canal unique pour le récepteur rP2X4. Le récepteur hP2X2 dont nous disposons a également été étudié (Figure 77).

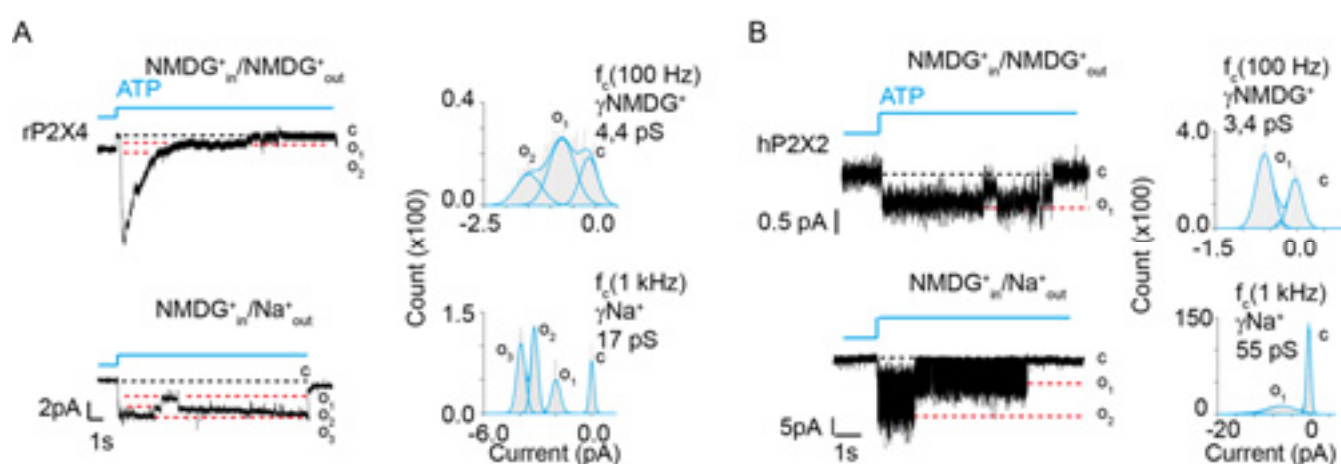


Figure 77 Etude de la conductivité unitaire de rP2X4 et hP2X2. A Enregistrements en configuration canal unique en conditions symétriques NMDG⁺_{ext}/NMDG⁺_{in} ou bi-ioniques NMDG⁺_{ext}/Na⁺_{in} pour rP2X4 avec les histogrammes de l'analyse. B. La même chose pour hP2X2.

Les conductances pour rP2X4 sont de $4,4 \pm 0,1$ pS (n=6) pour le NMDG⁺ et de $16,5 \pm 0,4$ pS (n=6) pour le Na⁺ soit un ratio $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$ d'en moyenne 31,6 %. Concernant hP2X2, nous obtenons une conductance NMDG⁺ de $3,4 \pm 0,0$ pS (n=5) et de $55,2 \pm 0,9$ pS (n=5) pour Na⁺, soit un ratio de 6,5 %.

Pour résumer, pour rP2X2 qui présente une thréonine, ce ratio est de 7,4 %. Le récepteur hP2X2 présente ce même résidu, pour lequel nous avons obtenu un ratio proche de celui de rP2X2, de 6,5 %. Enfin, le récepteur rP2X4, qui porte une alanine en cette position, voit son ratio augmenté à 31,6 %.

4. Discussion

L'étude des conductances démontre que l'encombrement stérique de la partie la plus étroite du pore a une influence sur la facilité du NMDG⁺ à fluctuer au travers du pore ionique. En effet, c'est principalement lors du désencombrement de celui-ci que l'effet est le plus flagrant. Le ratio des conductances obtenues en condition symétrique NMDG⁺ par rapport à ceux obtenus en conditions bi-ioniques représente une augmentation de 149% entre le récepteur sauvage et la mutation T339A. De la même manière l'augmentation entre rP2X2 et rP2X4 est de 327%. Cette augmentation semble donc être corrélée avec la présence d'une alanine dans la partie la plus étroite. Toutefois, pour rP2X4, les enregistrements ont été réalisés en présence d'ivermectine. Ce potentioteur allostérique pourrait modifier les propriétés biophysiques du récepteur et donc avoir une influence sur les conductances NMDG⁺ et Na⁺. De plus, les conductances en conditions symétriques pour ces deux récepteurs sauvages ne sont pas si différentes l'une de l'autre ($3,9 \pm 0,1$ pour rP2X2 contre $4,4 \pm 0,1$ pS pour rP2X4), ce qui signifie que la grande différence des ratios $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$ est principalement due à une modification de la conductance unitaire du sodium ($54,8 \pm 1,4$ pour rP2X2 et $16,5 \pm 0,4$ pS pour rP2X4). Ces résultats suggèrent néanmoins que la structure du pore et notamment le diamètre de celui-ci sont différents pour les deux récepteurs P2X2 et P2X4.

Les enregistrements en condition spermidine symétrique manquent de stabilité ce qui suggère que cette molécule physiologique est probablement responsable d'interactions qui défavorisent le maintien du patch. Toutefois, les résultats préliminaires semblent concorder avec les résultats obtenus en présence du NMDG⁺, ils pourraient alors expliquer le rôle spécifique des différents P2X dans certaines voies physiologiques impliquant la modulation par de gros cations physiologiques.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ces travaux de thèse, l'utilisation des outils photoisomérisables utilisés par le laboratoire a permis de mieux comprendre certains aspects biophysiques des récepteurs P2X.

Dans un premier temps, l'étude mécanistique du MEA-TMA covalamment lié sur le récepteur P2X2 a permis de proposer l'hypothèse selon laquelle cette molécule se glisse entre les hélices transmembranaires dans l'isomère *trans*. En raison de l'hydrophobicité de l'azobenzène dans cet état, nous supposons que ce groupement chimique se logerait alors dans les crevasses transmembranaires. L'occupation de ces crevasses stabiliserait l'état ouvert des récepteurs P2X, qui représenteraient donc une zone intéressante pour la modulation de la désensibilisation. L'exploration de ce domaine ainsi que celle du réseau d'interactions formé dans les parties intracellulaires reste à être approfondie afin de comprendre précisément quels sont les résidus impliqués et quelles sont les interactions qui stabilisent l'état ouvert ou favorisent le réarrangement protéique qui a lieu lors de la désensibilisation.

Dans un second temps, l'utilisation d'agrafes moléculaires sur des mutants du récepteur P2X2 humain responsables d'une surdité non-syndromatique a permis d'une part de s'affranchir de l'utilisation de l'ATP, qui ne permet pas d'activer ces mutants, et d'autre part d'étudier leurs propriétés biophysiques. L'incorporation du MAM sur le récepteur P2X2 humain et sa version mutée G353R a été obtenue avec succès, ne révélant pas d'influence de la mutation G353R sur la perméabilité aux petits cations. En revanche, l'utilisation du MAM a mis en avant une chute significative de la perméabilité de la spermidine pour ce mutant. Cette diminution a été confirmée dans des conditions plus physiologiques en mimant le génotype des patients (hétérozygotes) par l'étude d'hétéromères. Deux mécanismes ont ainsi pu être mis en évidence : la mutation G353R entraîne une forte rectification qui altère l'activité de ces hétéromères à des potentiels positifs et cette chute de la perméabilité de la spermidine, probablement par une réduction de la taille du diamètre du pore, comme le suggèrent fortement la diminution de l'incorporation de YO-Pro-1 et la modélisation moléculaire. Comme des mouvements de polyamines, telles que la spermidine, sont nécessaires à la fonction auditive, ces changements de perméabilité pourraient donc expliquer le

Conclusion

phénotype observé, notamment en créant un lien entre les récepteurs P2X et la fonction auditive. La confirmation de cette hypothèse par des expériences *in vivo* reste une nécessité. La mutation V60L doit, quant à elle, être exploitée. En affectant également les courants induits par la lumière, cette mutation ne semble donc pas présenter le même mécanisme que G353R.

Enfin, les agrafes moléculaires ont été d'une aide précieuse pour remettre en cause le phénomène de dilatation progressive des récepteurs P2X en révélant qu'ils sont perméant aux gros cations directement après l'application d'ATP. L'étude en configuration canal unique a révélé que la conductance du NMDG⁺ semble être due à une limitation structurale du pore ionique. La substitution du résidu le plus proche de l'axe de symétrie en résidus plus ou moins encombrants semble avoir tendance à diminuer ou augmenter la conductance unitaire des gros cations. Cette tendance pourrait expliquer des différences de perméabilités aux gros cations en fonction des différents P2X, pouvant induire des rôles physiologiques différents.

De manière générale, l'utilisation d'outils photochimiques ainsi que la technique d'électrophysiologie patch-clamp ont permis de connaître un peu plus la relation structure/fonction des récepteurs P2X.

BIBLIOGRAPHIE

- Abramowski, P., Ogradowczyk, C., Martin, R., Pongs, O., 2014. A truncation variant of the cation channel P2RX5 is upregulated during T cell activation. *PloS One* 9, e104692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104692>
- Allsopp, R.C., El Ajouz, S., Schmid, R., Evans, R.J., 2011. Cysteine scanning mutagenesis (residues Glu52-Gly96) of the human P2X1 receptor for ATP: mapping agonist binding and channel gating. *J. Biol. Chem.* 286, 29207–29217. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.260364>
- Allsopp, R.C., Evans, R.J., 2011. The Intracellular Amino Terminus Plays a Dominant Role in Desensitization of ATP-gated P2X Receptor Ion Channels. *J. Biol. Chem.* 286, 44691–44701. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.303917>
- Altschuler, R.A., Sheridan, C.E., Horn, J.W., Wenthold, R.J., 1989. Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 42, 167–173. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(89\)90142-1](https://doi.org/10.1016/0378-5955(89)90142-1)
- Antonio, L.S., Stewart, A.P., Xu, X.J., Varanda, W.A., Murrell-Lagnado, R.D., Edwardson, J.M., 2011. P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1069–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01303.x>
- Aschrafi, A., Sadtler, S., Niculescu, C., Rettinger, J., Schmalzing, G., 2004. Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J. Mol. Biol.* 342, 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.092>
- Ase, A.R., Bernier, L.-P., Blais, D., Pankratov, Y., Séguéla, P., 2010. Modulation of heteromeric P2X1/5 receptors by phosphoinositides in astrocytes depends on the P2X1 subunit. *J. Neurochem.* 113, 1676–1684. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06734.x>
- Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 2013. K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 660–669. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.166>
- Ashmore, J.F., 1987. A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J. Physiol.* 388, 323–347.
- Auerbach, A., 2015. Agonist activation of a nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology* 96, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.004>
- Bandara, H.M.D., Burdette, S.C., 2012. Photoisomerization in different classes of azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* 41, 1809–1825. <https://doi.org/10.1039/c1cs15179g>
- Banfi, C., Ferrario, S., De Vincenti, O., Ceruti, S., Fumagalli, M., Mazzola, A., D' Ambrosi, N., Volontè, C., Fratto, P., Vitali, E., Burnstock, G., Beltrami, E., Parolari, A., Polvani, G., Biglioli, P., Tremoli, E., Abbracchio, M.P., 2005. P2 receptors in human heart: upregulation of P2X6 in patients undergoing heart transplantation, interaction with TNFalpha and potential role in myocardial cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 929–939. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.09.002>

- Banghart, M., Borges, K., Isacoff, E., Trauner, D., Kramer, R.H., 2004. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat. Neurosci.* 7, 1381–1386. <https://doi.org/10.1038/nn1356>
- Banghart, M.R., Mouroto, A., Fortin, D.L., Yao, J.Z., Kramer, R.H., Trauner, D., 2009. Photochromic blockers of voltage-gated potassium channels. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 48, 9097–9101. <https://doi.org/10.1002/anie.200904504>
- Baqi, Y., Hausmann, R., Rosefort, C., Rettinger, J., Schmalzing, G., Müller, C.E., 2011. Discovery of potent competitive antagonists and positive modulators of the P2X2 receptor. *J. Med. Chem.* 54, 817–830. <https://doi.org/10.1021/jm1012193>
- Barrera, N.P., Henderson, R.M., Murrell-Lagnado, R.D., Edwardson, J.M., 2007. The stoichiometry of P2X2/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels. *Biophys. J.* 93, 505–512. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.101048>
- Bartels, E., Wassermann, N.H., Erlanger, B.F., 1971. Photochromic activators of the acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 1820–1823.
- Bean, B.P., 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 451–465. <https://doi.org/10.1038/nrn2148>
- Bean, B.P., 1992. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 87–90.
- Bechakra, M., Schüttenhelm, B.N., Pederzani, T., van Doorn, P.A., de Zeeuw, C.I., Jongen, J.L.M., 2017. The reduction of intraepidermal P2X3 nerve fiber density correlates with behavioral hyperalgesia in a rat model of nerve injury-induced pain. *J. Comp. Neurol.* 525, 3757–3768. <https://doi.org/10.1002/cne.24302>
- Beharry, A.A., Woolley, G.A., 2011. Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* 40, 4422–4437. <https://doi.org/10.1039/c1cs15023e>
- Bernard, C., 1856. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences / publiés... par MM. les secrétaires perpétuels [WWW Document]. Gallica. URL <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k2999t> (accessed 7.31.18).
- Bernier, L.-P., Ase, A.R., Chevallier, S., Blais, D., Zhao, Q., Boué-Grabot, E., Logothetis, D., Séguéla, P., 2008a. Phosphoinositides regulate P2X4 ATP-gated channels through direct interactions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 12938–12945. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3038-08.2008>
- Bernier, L.-P., Ase, A.R., Séguéla, P., 2013. Post-translational regulation of P2X receptor channels: modulation by phospholipids. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 226. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00226>
- Bernier, L.-P., Ase, A.R., Tong, X., Hamel, E., Blais, D., Zhao, Q., Logothetis, D.E., Séguéla, P., 2008b. Direct modulation of P2X1 receptor-channels by the lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Mol. Pharmacol.* 74, 785–792. <https://doi.org/10.1124/mol.108.047019>
- Bernier, L.-P., Blais, D., Boué-Grabot, É., Séguéla, P., 2012. A dual polybasic motif determines phosphoinositide binding and regulation in the P2X channel family. *PloS One* 7, e40595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040595>
- Bianchi, B.R., Lynch, K.J., Touma, E., Niforatos, W., Burgard, E.C., Alexander, K.M., Park, H.S., Yu, H., Metzger, R., Kowaluk, E., Jarvis, M.F., van Biesen, T., 1999. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 376, 127–138.
- Blaustein, R.O., Cole, P.A., Williams, C., Miller, C., 2000. Tethered blockers as molecular “tape measures” for a voltage-gated K⁺ channel. *Nat. Struct. Biol.* 7, 309–311. <https://doi.org/10.1038/74076>

- Bo, X., Jiang, L.-H., Wilson, H.L., Kim, M., Burnstock, G., Surprenant, A., North, R.A., 2003. Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Mol. Pharmacol.* 63, 1407–1416. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1407>
- Bo, X., Zhang, Y., Nassar, M., Burnstock, G., Schoepfer, R., 1995. A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett.* 375, 129–133.
- Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J.-P., Delarue, M., Corringer, P.-J., 2009. X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* 457, 111–114. <https://doi.org/10.1038/nature07462>
- Bogatov, N.M., Grigoryan, L.R., Ponetaeva, E.G., Sinisyn, A.S., 2014. Calculation of action potential propagation in nerve fiber. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 114, 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.03.002>
- Boué-Grabot, E., Archambault, V., Séguéla, P., 2000. A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J. Biol. Chem.* 275, 10190–10195.
- Boué-Grabot, E., Toulmé, E., Emerit, M.B., Garret, M., 2004. Subunit-specific coupling between gamma-aminobutyric acid type A and P2X2 receptor channels. *J. Biol. Chem.* 279, 52517–52525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410223200>
- Brake, A.J., Wagenbach, M.J., Julius, D., 1994. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371, 519–523. <https://doi.org/10.1038/371519a0>
- Brändle, U., Spielmanns, P., Osteroth, R., Sim, J., Surprenant, A., Buell, G., Ruppersberg, J.P., Plinkert, P.K., Zenner, H.P., Glowatzki, E., 1997. Desensitization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett.* 404, 294–298.
- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., Carafoli, E., 2013. The plasma membrane calcium pump in health and disease. *FEBS J.* 280, 5385–5397. <https://doi.org/10.1111/febs.12193>
- Brock, M., Henley, C.M., 1994. Postnatal changes in cochlear polyamine metabolism in the rat. *Hear. Res.* 72, 37–43.
- Brown, S.G., Townsend-Nicholson, A., Jacobson, K.A., Burnstock, G., King, B.F., 2002. Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 673–680.
- Browne, L.E., Cao, L., Broomhead, H.E., Bragg, L., Wilkinson, W., North, R.A., 2011. P2X receptor channels show three-fold symmetry in ionic charge selectivity and unitary conductance. *Nat. Neurosci.* 14, 17–18. <https://doi.org/10.1038/nn.2705>
- Browne, L.E., Nunes, J.P.M., Sim, J.A., Chudasama, V., Bragg, L., Caddick, S., North, R.A., 2014. Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 521–526. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318582111>
- Buell, G., Lewis, C., Collo, G., North, R.A., Surprenant, A., 1996. An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J.* 15, 55–62.
- Burnstock, G., Knight, G.E., 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240, 31–304. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3)
- Burnstock, G., Krügel, U., Abbracchio, M.P., Illes, P., 2011. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog. Neurobiol.* 95, 229–274. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.08.006>

- Burnstock, G., Straub, R., Bolis, L., 1978. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach*. New York: Raven Press 107–118.
- Calvert, J.A., Evans, R.J., 2004. Heterogeneity of P2X receptors in sympathetic neurons: contribution of neuronal P2X1 receptors revealed using knockout mice. *Mol. Pharmacol.* 65, 139–148. <https://doi.org/10.1124/mol.65.1.139>
- Cao, L., Broomhead, H.E., Young, M.T., North, R.A., 2009. Polar residues in the second transmembrane domain of the rat P2X2 receptor that affect spontaneous gating, unitary conductance, and rectification. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 14257–14264. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4403-09.2009>
- Changeux, J.P., Kasai, M., Lee, C.Y., 1970. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 67, 1241–1247.
- Chataigneau, T., Lemoine, D., Grutter, T., 2013. Exploring the ATP-binding site of P2X receptors. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 273. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00273>
- Chaumont, S., Jiang, L.-H., Penna, A., North, R.A., Rassendren, F., 2004. Identification of a Trafficking Motif Involved in the Stabilization and Polarization of P2X Receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 29628–29638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403940200>
- Chaumont, S., Khakh, B.S., 2008. Patch-clamp coordinated spectroscopy shows P2X2 receptor permeability dynamics require cytosolic domain rearrangements but not Panx-1 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 12063–12068. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803008105>
- Chen, C.C., Akopian, A.N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., Wood, J.N., 1995. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377, 428–431. <https://doi.org/10.1038/377428a0>
- Chen, S.-P., Qin, T., Seidel, J.L., Zheng, Y., Eikermann, M., Ferrari, M.D., Maagdenberg, V.D., M, A.M.J., Moskowitz, M.A., Ayata, C., Eikermann-Haerter, K., 2017. Inhibition of the P2X7–PANX1 complex suppresses spreading depolarization and neuroinflammation. *Brain* 140, 1643–1656. <https://doi.org/10.1093/brain/awx085>
- Ciardelli, F., Bronco, S., Pieroni, O., Pucci, A., 2011. Photoswitchable Polypeptides, in: *Molecular Switches*. Wiley-Blackwell, pp. 321–360. <https://doi.org/10.1002/9783527634408.ch10>
- Clarke, C.E., Benham, C.D., Bridges, A., George, A.R., Meadows, H.J., 2000. Mutation of histidine 286 of the human P2X4 purinoceptor removes extracellular pH sensitivity. *J. Physiol.* 523 Pt 3, 697–703.
- Cockayne, D.A., Dunn, P.M., Zhong, Y., Rong, W., Hamilton, S.G., Knight, G.E., Ruan, H.-Z., Ma, B., Yip, P., Nunn, P., McMahon, S.B., Burnstock, G., Ford, A.P.D.W., 2005. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J. Physiol.* 567, 621–639. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.088435>
- Cockayne, D.A., Hamilton, S.G., Zhu, Q.M., Dunn, P.M., Zhong, Y., Novakovic, S., Malmberg, A.B., Cain, G., Berson, A., Kassotakis, L., Hedley, L., Lachnit, W.G., Burnstock, G., McMahon, S.B., Ford, A.P., 2000. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407, 1011–1015. <https://doi.org/10.1038/35039519>

- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J.P., Stojilkovic, S.S., 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* 63, 641–683. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003129>
- Collo, G., North, R.A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A., Buell, G., 1996. Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 2495–2507.
- Compan, V., Ulmann, L., Stelmashenko, O., Chemin, J., Chaumont, S., Rassendren, F., 2012. P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 4284–4296. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6332-11.2012>
- Conant, A.R., Theologou, T., Dihmis, W.C., Simpson, A.W.M., 2008. Diadenosine polyphosphates are selective vasoconstrictors in human coronary artery bypass grafts. *Vascul. Pharmacol.* 48, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.01.005>
- Connolly, G.P., Harrison, P.J., 1994. Reactive blue 2 discriminates between responses mediated by UTP and those evoked by ATP or alpha,beta-methylene-ATP on rat sympathetic ganglia. *Eur. J. Pharmacol.* 259, 95–99.
- Corringer, P.-J., Poitevin, F., Prevost, M.S., Sauguet, L., Delarue, M., Changeux, J.-P., 2012. Structure and Pharmacology of Pentameric Receptor Channels: From Bacteria to Brain. *Structure* 20, 941–956. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.05.003>
- De Roo, M., Boué-Grabot, E., Schlichter, R., 2010. Selective potentiation of homomeric P2X2 ionotropic ATP receptors by a fast non-genomic action of progesterone. *Neuropharmacology* 58, 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.12.002>
- Deussing, J.M., Arzt, E., 2018. P2X7 Receptor: A Potential Therapeutic Target for Depression? *Trends Mol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.07.005>
- Dias, A.R., Minas Da Piedade, M.E., Martinho Simões, J.A., Simoni, J.A., Teixeira, C., Diogo, H.P., Meng-Yan, Y., Pilcher, G., 1992. Enthalpies of formation of cis-azobenzene and trans-azobenzene. *J. Chem. Thermodyn.* 24, 439–447. [https://doi.org/10.1016/S0021-9614\(05\)80161-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9614(05)80161-2)
- Ding, S., Sachs, F., 1999. Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *J. Gen. Physiol.* 113, 695–720.
- Draper, M.H., Weidmann, S., 1951. Cardiac resting and action potentials recorded with an intracellular electrode. *J. Physiol.* 115, 74–94.
- Dubyak, G.R., el-Moatassim, C., 1993. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.* 265, C577–606. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.3.C577>
- Eckhard, A., Gleiser, C., Rask-Andersen, H., Arnold, H., Liu, W., Mack, A., Müller, M., Löwenheim, H., Hirt, B., 2012. Co-localisation of K(ir)4.1 and AQP4 in rat and human cochleae reveals a gap in water channel expression at the transduction sites of endocochlear K(+) recycling routes. *Cell Tissue Res.* 350, 27–43. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1456-y>
- Edvinsson, J.M., Shah, A.J., Palmer, L.G., 2011. Kir4.1 K⁺ channels are regulated by external cations. *Channels Austin Tex* 5, 269–279.
- Egan, T.M., Haines, W.R., Voigt, M.M., 1998. A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 2350–2359.

- El-Ajouz, S., Ray, D., Allsopp, R.C., Evans, R.J., 2012. Molecular basis of selective antagonism of the P2X₁ receptor for ATP by NF449 and suramin: contribution of basic amino acids in the cysteine-rich loop. *Br. J. Pharmacol.* 165, 390–400. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01534.x>
- Elliott, T.R., 1904. On the action of adrenalin. *J. Physiol.*
- Elliott, T.R., 1904. On the innervation of the ileo-colic sphincter. *J. Physiol.* 31, 157–168.
- Emerit, M.B., Baranowski, C., Diaz, J., Martinez, A., Areias, J., Alterio, J., Masson, J., Boué-Grabot, E., Darmon, M., 2016. A New Mechanism of Receptor Targeting by Interaction between Two Classes of Ligand-Gated Ion Channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 1456–1470. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2390-15.2016>
- Ennion, S., Hagan, S., Evans, R.J., 2000. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X₁ receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 29361–29367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003637200>
- Ennion, S.J., Evans, R.J., 2002. P2X₁ receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 611–616. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6488>
- Erhlich, P., 1913. Chemothérapeutiques : scientific principles, methods, and results. *The Lancet* 182, 445–451. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)38705-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)38705-6)
- Evans, R.J., Derkach, V., Surprenant, A., 1992. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357, 503–505. <https://doi.org/10.1038/357503a0>
- Evans, R.J., Lewis, C., Virginio, C., Lundstrom, K., Buell, G., Surprenant, A., North, R.A., 1996. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J. Physiol.* 497, 413–422.
- Fagerberg, S.K., Patel, P., Andersen, L.W., Lui, X., Donnino, M.W., Praetorius, H.A., 2018. Erythrocyte P2X₁ receptor expression is correlated with change in haematocrit in patients admitted to the ICU with blood pathogen-positive sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 22, 181. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2100-3>
- Faletra, F., Giroto, G., D'Adamo, A.P., Vozzi, D., Morgan, A., Gasparini, P., 2014. A novel P2RX2 mutation in an Italian family affected by autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Gene* 534, 236–239. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.052>
- Fischer, E., 1960. Temperature Dependence of Photoisomerization Equilibria. Part I. Azobenzene and the Azonaphthalenes. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 3249–3252. <https://doi.org/10.1021/ja01498a005>
- Fischer, W., Zadori, Z., Kullnick, Y., Gröger-Arndt, H., Franke, H., Wirkner, K., Illes, P., Mager, P.P., 2007. Conserved lysin and arginin residues in the extracellular loop of P2X₃ receptors are involved in agonist binding. *Eur. J. Pharmacol.* 576, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.068>
- Fliegl, H., Köhn, A., Hättig, C., Ahlrichs, R., 2003. Ab Initio Calculation of the Vibrational and Electronic Spectra of trans- and cis-Azobenzene. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 9821–9827. <https://doi.org/10.1021/ja034433o>
- Fortin, D.L., Dunn, T.W., Fedorchak, A., Allen, D., Montpetit, R., Banghart, M.R., Trauner, D., Adelman, J.P., Kramer, R.H., 2011. Optogenetic photochemical control of designer K⁺ channels in mammalian neurons. *J. Neurophysiol.* 106, 488–496. <https://doi.org/10.1152/jn.00251.2011>

- Fountain, S.J., North, R.A., 2006. A C-terminal lysine that controls human P2X₄ receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 281, 15044–15049. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600442200>
- Franklin, C., Braam, U., Eisele, T., Schmalzing, G., Hausmann, R., 2007. Lack of evidence for direct phosphorylation of recombinantly expressed P2X₂ and P2X₃ receptors by protein kinase C. *Purinergic Signal.* 3, 377–388. <https://doi.org/10.1007/s11302-007-9067-x>
- Fujiwara, Y., Keceli, B., Nakajo, K., Kubo, Y., 2009. Voltage- and [ATP]-dependent gating of the P2X₂ ATP receptor channel. *J. Gen. Physiol.* 133, 93–109. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810002>
- Fujiwara, Y., Kubo, Y., 2006. Regulation of the desensitization and ion selectivity of ATP-gated P2X₂ channels by phosphoinositides. *J. Physiol.* 576, 135–149. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115246>
- Fujiwara, Y., Kubo, Y., 2004. Density-dependent changes of the pore properties of the P2X₂ receptor channel. *J. Physiol.* 558, 31–43. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.064568>
- Gao, C., Yu, Q., Xu, H., Zhang, L., Liu, J., Jie, Y., Ma, W., Samways, D.S.K., Li, Z., 2015. Roles of the lateral fenestration residues of the P2X₄ receptor that contribute to the channel function and the deactivation effect of ivermectin. *Purinergic Signal.* 11, 229–238. <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9448-5>
- Garcia-Guzman, M., Soto, F., Laube, B., Stühmer, W., 1996. Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS Lett.* 388, 123–127.
- Garcia-Guzman, M., Stühmer, W., Soto, F., 1997. Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X₃ purinoceptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 47, 59–66.
- Gendreau, S., Schirmer, J., Schmalzing, G., 2003. Identification of a tubulin binding motif on the P2X₂ receptor. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 786, 311–318.
- Gever, J.R., Cockayne, D.A., Dillon, M.P., Burnstock, G., Ford, A.P.D.W., 2006. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 452, 513–537. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0070-9>
- Glass, R., Loesch, A., Bodin, P., Burnstock, G., 2002. P2X₄ and P2X₆ receptors associate with VE-cadherin in human endothelial cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 870–881.
- Guo, C., Masin, M., Qureshi, O.S., Murrell-Lagnado, R.D., 2007. Evidence for functional P2X₄/P2X₇ heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol.* 72, 1447–1456. <https://doi.org/10.1124/mol.107.035980>
- Habermacher, C., Martz, A., Calimet, N., Lemoine, D., Peverini, L., Specht, A., Cecchini, M., Grutter, T., 2016. Photo-switchable tweezers illuminate pore-opening motions of an ATP-gated P2X ion channel. *eLife* 5, e11050. <https://doi.org/10.7554/eLife.11050>
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85–100.
- Hansen, R.R., Nielsen, C.K., Nasser, A., Thomsen, S.I.M., Eghorn, L.F., Pham, Y., Schulenburg, C., Syberg, S., Ding, M., Stojilkovic, S.S., Jorgensen, N.R., Heegaard, A.-M., 2011. P2X₇ receptor-deficient mice are susceptible to bone cancer pain. *Pain* 152, 1766–1776. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.03.024>

- Harhun, M.I., Povstyan, O.V., Gordienko, D.V., 2010. Purinoreceptor-mediated current in myocytes from renal resistance arteries. *Br. J. Pharmacol.* 160, 987–997. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00714.x>
- Harkat, M., Peverini, L., Cerdan, A.H., Dunning, K., Beudez, J., Martz, A., Calimet, N., Specht, A., Cecchini, M., Chataigneau, T., Grutter, T., 2017. On the permeation of large organic cations through the pore of ATP-gated P2X receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E3786–E3795. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701379114>
- Hartley, G.S., 1937. The *Cis*-form of Azobenzene. *Nature* 140, 281. <https://doi.org/10.1038/140281a0>
- Hattori, M., Gouaux, E., 2012. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485, 207–212. <https://doi.org/10.1038/nature11010>
- Hausmann, R., Bahrenberg, G., Kuhlmann, D., Schumacher, M., Braam, U., Bieler, D., Schlusche, I., Schmalzing, G., 2014. A hydrophobic residue in position 15 of the rP2X3 receptor slows desensitization and reveals properties beneficial for pharmacological analysis and high-throughput screening. *Neuropharmacology* 79, 603–615. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.01.010>
- Hausmann, R., Bodnar, M., Woltersdorf, R., Wang, H., Fuchs, M., Messemer, N., Qin, Y., Günther, J., Riedel, T., Grohmann, M., Nieber, K., Schmalzing, G., Rubini, P., Illes, P., 2012. ATP binding site mutagenesis reveals different subunit stoichiometry of functional P2X2/3 and P2X2/6 receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 13930–13943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.345207>
- Heymann, G., Dai, J., Li, M., Silberberg, S.D., Zhou, H.-X., Swartz, K.J., 2013. Inter- and intrasubunit interactions between transmembrane helices in the open state of P2X receptor channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E4045–4054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311071110>
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500–544.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1939. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature* 144, 710–711. <https://doi.org/10.1038/144710a0>
- Holton, T., Hudspeth, A.J., 1986. The transduction channel of hair cells from the bullfrog characterized by noise analysis. *J. Physiol.* 375, 195–227.
- Horn, R., Roux, B., Åqvist, J., 2014. Permeation Redux: Thermodynamics and Kinetics of Ion Movement through Potassium Channels. *Biophys. J.* 106, 1859–1863. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.03.039>
- Horner, S., Menke, K., Hildebrandt, C., Kassack, M.U., Nickel, P., Ullmann, H., Mahaut-Smith, M.P., Lambrecht, G., 2005. The novel suramin analogue NF864 selectively blocks P2X1 receptors in human platelets with potency in the low nanomolar range. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 372, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00210-005-1085-z>
- Housley, G.D., Jagger, D.J., Greenwood, D., Raybould, N.P., Salih, S.G., Järleback, L.E., Vlajkovic, S.M., Kanjhan, R., Nikolic, P., Muñoz, D.J.M., Thorne, P.R., 2002. Purinergic regulation of sound transduction and auditory neurotransmission. *Audiol. Neurotol.* 7, 55–61. <https://doi.org/10.1159/000046865>
- Housley, G.D., Kanjhan, R., Raybould, N.P., Greenwood, D., Salih, S.G., Järleback, L., Burton, L.D., Setz, V.C.M., Cannell, M.B., Soeller, C., Christie, D.L., Usami, S., Matsubara, A., Yoshie, H., Ryan, A.F., Thorne, P.R., 1999. Expression of the P2X2 Receptor Subunit of the ATP-Gated Ion Channel in the Cochlea:

- Implications for Sound Transduction and Auditory Neurotransmission. *J. Neurosci.* 19, 8377–8388. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-19-08377.1999>
- Hu, H., Yang, B., Li, Y., Zhang, S., Li, Z., 2016. Blocking of the P2X7 receptor inhibits the activation of the MMP-13 and NF- κ B pathways in the cartilage tissue of rats with osteoarthritis. *Int. J. Mol. Med.* 38, 1922–1932. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2770>
- Hudspeth, A.J., 1985. The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. *Science* 230, 745–752.
- Järleback, L.E., Housley, G.D., Thorne, P.R., 2000. Immunohistochemical localization of adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel P2X(2) receptor subunits in adult and developing rat cochlea. *J. Comp. Neurol.* 421, 289–301.
- Jarvis, M.F., Burgard, E.C., McGaraughty, S., Honore, P., Lynch, K., Brennan, T.J., Subieta, A., Van Biesen, T., Cartmell, J., Bianchi, B., Niforatos, W., Kage, K., Yu, H., Mikusa, J., Wismer, C.T., Zhu, C.Z., Chu, K., Lee, C.-H., Stewart, A.O., Polakowski, J., Cox, B.F., Kowaluk, E., Williams, M., Sullivan, J., Faltynek, C., 2002. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 17179–17184. <https://doi.org/10.1073/pnas.252537299>
- Jarvis, M.F., Khakh, B.S., 2009. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.067>
- Jelínková, I., Vávra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Zemkova, H.W., Zemkova, H., Stojilkovic, S.S., 2008. Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Arch.* 456, 939–950. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0450-4>
- Jelínková, I., Yan, Z., Liang, Z., Moonat, S., Teisinger, J., Stojilkovic, S.S., Zemková, H., 2006. Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.084>
- Jiang, L.-H., Kim, M., Spelta, V., Bo, X., Surprenant, A., North, R.A., 2003. Subunit arrangement in P2X receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 8903–8910.
- Jiang, L.H., Rassendren, F., Spelta, V., Surprenant, A., North, R.A., 2001. Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 14902–14908. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011327200>
- Jiang, L.H., Rassendren, F., Surprenant, A., North, R.A., 2000a. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 34190–34196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005481200>
- Jiang, L.H., Rassendren, F., Surprenant, A., North, R.A., 2000b. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 34190–34196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005481200>
- Jiang, R., Lemoine, D., Martz, A., Taly, A., Gonin, S., Carvalho, L.P. de, Specht, A., Grutter, T., 2011. Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 9066–9071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102170108>
- Karasawa, A., Kawate, T., 2016. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.22153>

- Karlin, A., Akabas, M.H., 1998. Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol.* 293, 123–145.
- Kassack, M.U., Braun, K., Ganso, M., Ullmann, H., Nickel, P., Böing, B., Müller, G., Lambrecht, G., 2004. Structure-activity relationships of analogues of NF449 confirm NF449 as the most potent and selective known P2X1 receptor antagonist. *Eur. J. Med. Chem.* 39, 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.01.007>
- Kasuya, G., Fujiwara, Y., Takemoto, M., Dohmae, N., Nakada-Nakura, Y., Ishitani, R., Hattori, M., Nureki, O., 2016. Structural Insights into Divalent Cation Modulations of ATP-Gated P2X Receptor Channels. *Cell Rep.* 14, 932–944. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.087>
- Kasuya, G., Yamaura, T., Ma, X.-B., Nakamura, R., Takemoto, M., Nagumo, H., Tanaka, E., Dohmae, N., Nakane, T., Yu, Y., Ishitani, R., Matsuzaki, O., Hattori, M., Nureki, O., 2017. Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel. *Nat. Commun.* 8, 876. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00887-9>
- Kawate, T., 2017. P2X Receptor Activation, in: Atassi, M.Z. (Ed.), *Protein Reviews: Volume 19, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Singapore, Singapore, pp. 55–69. https://doi.org/10.1007/5584_2017_55
- Kawate, T., Michel, J.C., Birdsong, W.T., Gouaux, E., 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature* 460, 592–598. <https://doi.org/10.1038/nature08198>
- Kawate, T., Robertson, J.L., Li, M., Silberberg, S.D., Swartz, K.J., 2011. Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. *J. Gen. Physiol.* 137, 579–590. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010593>
- Ke, H.Z., Qi, H., Weidema, A.F., Zhang, Q., Panupinthu, N., Crawford, D.T., Grasser, W.A., Paralkar, V.M., Li, M., Audoly, L.P., Gabel, C.A., Jee, W.S.S., Dixon, S.J., Sims, S.M., Thompson, D.D., 2003. Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 17, 1356–1367. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0021>
- Kennedy, C., Tasker, P.N., Gallacher, G., Westfall, T.D., 2007. Identification of atropine- and P2X1 receptor antagonist-resistant, neurogenic contractions of the urinary bladder. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 845–851. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3115-06.2007>
- Khakh, B.S., Bao, X.R., Labarca, C., Lester, H.A., 1999a. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat. Neurosci.* 2, 322–330. <https://doi.org/10.1038/7233>
- Khakh, B.S., Humphrey, P.P., Surprenant, A., 1995. Electrophysiological properties of P2X-purinoreceptors in rat superior cervical, nodose and guinea-pig coeliac neurones. *J. Physiol.* 484 (Pt 2), 385–395.
- Khakh, B.S., North, R.A., 2012. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 76, 51–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.024>
- Khakh, B.S., Proctor, W.R., Dunwiddie, T.V., Labarca, C., Lester, H.A., 1999b. Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 7289–7299.
- Kim, D.O., 1986. Active and nonlinear cochlear biomechanics and the role of outer-hair-cell subsystem in the mammalian auditory system. *Hear. Res.* 22, 105–114.

- Kim, H., Kajikawa, T., Walsh, M.C., Takegahara, N., Jeong, Y.H., Hajishengallis, G., Choi, Y., 2018. The purinergic receptor P2X5 contributes to bone loss in experimental periodontitis. *BMB Rep.*
- King, B.F., Townsend-Nicholson, A., Wildman, S.S., Thomas, T., Spyer, K.M., Burnstock, G., 2000. Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 4871–4877.
- King, B.F., Wildman, S.S., Ziganshina, L.E., Pintor, J., Burnstock, G., 1997. Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X2 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 121, 1445–1453. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701286>
- Klapperstück, M., Büttner, C., Nickel, P., Schmalzing, G., Lambrecht, G., Markwardt, F., 2000. Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X(1) and P2X(7) receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 387, 245–252.
- Koshimizu, T., Koshimizu, M., Stojilkovic, S.S., 1999. Contributions of the C-terminal domain to the control of P2X receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 274, 37651–37657.
- Koshimizu, T., Tomić, M., Koshimizu, M., Stojilkovic, S.S., 1998. Identification of amino acid residues contributing to desensitization of the P2X2 receptor channel. *J. Biol. Chem.* 273, 12853–12857.
- Kracun, S., Chaptal, V., Abramson, J., Khakh, B.S., 2010. Gated access to the pore of a P2X receptor: structural implications for closed-open transitions. *J. Biol. Chem.* 285, 10110–10121. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.089185>
- Krishtal, O.A., Marchenko, S.M., Obukhov, A.G., 1988. Cationic channels activated by extracellular atp in rat sensory neurons. *Neuroscience* 27, 995–1000. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90203-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90203-5)
- Labrakakis, C., Tong, C.-K., Weissman, T., Torsney, C., MacDermott, A.B., 2003. Localization and function of ATP and GABAA receptors expressed by nociceptors and other postnatal sensory neurons in rat. *J. Physiol.* 549, 131–142. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.031963>
- Lalo, U., Pankratov, Y., Wichert, S.P., Rossner, M.J., North, R.A., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A., 2008. P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5473–5480. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1149-08.2008>
- Langley, J.N., 1906. On nerve endings and on special excitable substances in cells. *Proc R Soc Lond B* 78, 170–194. <https://doi.org/10.1098/rspb.1906.0056>
- Latapiat, V., Rodríguez, F.E., Godoy, F., Montenegro, F.A., Barrera, N.P., Huidobro-Toro, J.P., 2017. P2X4 Receptor in Silico and Electrophysiological Approaches Reveal Insights of Ivermectin and Zinc Allosteric Modulation. *Front. Pharmacol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00918>
- Lazarowski, E.R., 2012. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal.* 8, 359–373. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9304-9>
- Lê, K.T., Babiniski, K., Séguéla, P., 1998. Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 7152–7159.
- Lê, K.T., Boué-Grabot, E., Archambault, V., Séguéla, P., 1999. Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *J. Biol. Chem.* 274, 15415–15419.
- Lemoine, D., Habermacher, C., Martz, A., Méry, P.-F., Bouquier, N., Diverchy, F., Taly, A., Rassendren, F., Specht, A., Grutter, T., 2013. Optical control of an ion channel gate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20813–20818. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318715110>

- Lemoine, D., Jiang, R., Taly, A., Chataigneau, T., Specht, A., Grutter, T., 2012. Ligand-gated ion channels: new insights into neurological disorders and ligand recognition. *Chem. Rev.* 112, 6285–6318. <https://doi.org/10.1021/cr3000829>
- Lerch, M., Szymanski, W., Feringa, B.L., 2018. The (photo)chemistry of Stenhouse photoswitches: guiding principles and system design. *Chem Soc Rev* 47(6):1910–1937.
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R.A., Buell, G., Surprenant, A., 1995. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377, 432–435. <https://doi.org/10.1038/377432a0>
- Li, M., Chang, T.-H., Silberberg, S.D., Swartz, K.J., 2008. Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* 11, 883–887. <https://doi.org/10.1038/nn.2151>
- Li, M., Silberberg, S.D., Swartz, K.J., 2013. Subtype-specific control of P2X receptor channel signaling by ATP and Mg²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3455–3463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308088110>
- Li, M., Toombes, G.E.S., Silberberg, S.D., Swartz, K.J., 2015a. Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* 18, 1577–1583. <https://doi.org/10.1038/nn.4120>
- Li, M., Toombes, G.E.S., Silberberg, S.D., Swartz, K.J., 2015b. Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* 18, 1577–1583. <https://doi.org/10.1038/nn.4120>
- Li, Z., Migita, K., Samways, D.S.K., Voigt, M.M., Egan, T.M., 2004. Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 7378–7386. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1423-04.2004>
- Lin, W.-C., Davenport, C.M., Mouro, A., Vytla, D., Smith, C.M., Medeiros, K.A., Chambers, J.J., Kramer, R.H., 2014. Engineering a light-regulated GABAA receptor for optical control of neural inhibition. *ACS Chem. Biol.* 9, 1414–1419. <https://doi.org/10.1021/cb500167u>
- Lippiat, J.D., 2008. Whole-cell recording using the perforated patch clamp technique. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 491, 141–149. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-526-8_11
- Liu, G.J., Brockhausen, J., Bennett, M.R., 2003. P2X1 receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 108, 12–16. [https://doi.org/10.1016/S1566-0702\(03\)00154-1](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(03)00154-1)
- Lopatin, A.N., Makhina, E.N., Nichols, C.G., 1995. The mechanism of inward rectification of potassium channels: “long-pore plugging” by cytoplasmic polyamines. *J. Gen. Physiol.* 106, 923–955.
- Lorca, R.A., Coddou, C., Gazitúa, M.C., Bull, P., Arredondo, C., Huidobro-Toro, J.P., 2005. Extracellular histidine residues identify common structural determinants in the copper/zinc P2X2 receptor modulation. *J. Neurochem.* 95, 499–512. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03387.x>
- Lörinczi, É., Bhargava, Y., Marino, S.F., Taly, A., Kaczmarek-Hájek, K., Barrantes-Freer, A., Dutertre, S., Grutter, T., Rettinger, J., Nicke, A., 2012. Involvement of the cysteine-rich head domain in activation and desensitization of the P2X1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 11396–11401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118759109>
- Ma, W., Korngreen, A., Weil, S., Cohen, E.B.-T., Priel, A., Kuzin, L., Silberberg, S.D., 2006. Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor

- channel in airway ciliated cells. *J. Physiol.* 571, 503–517. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.103408>
- Malkin, S., Fischer, E., 1962. TEMPERATURE DEPENDENCE OF PHOTOISOMERIZATION. PART II.1 QUANTUM YIELDS OF *cis* $\rightleftharpoons$ *trans* ISOMERIZATIONS IN AZO-COMPOUNDS. *J. Phys. Chem.* 66, 2482–2486. <https://doi.org/10.1021/j100818a038>
- Mansoor, S.E., Lü, W., Oosterheert, W., Shekhar, M., Tajkhorshid, E., Gouaux, E., 2016. X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action. *Nature* 538, 66–71. <https://doi.org/10.1038/nature19367>
- Marcus, D.C., Wu, T., Wangemann, P., Kofuji, P., 2002. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C403–407. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00312.2001>
- Marquez-Klaka, B., Rettinger, J., Nicke, A., 2009. Inter-subunit disulfide cross-linking in homomeric and heteromeric P2X receptors. *Eur. Biophys. J. EBJ* 38, 329–338. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0325-9>
- Masin, M., Kerschensteiner, D., Dümke, K., Rubio, M.E., Soto, F., 2006. Fe65 interacts with P2X2 subunits at excitatory synapses and modulates receptor function. *J. Biol. Chem.* 281, 4100–4108. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507735200>
- Mayer, M.L., 2005. Glutamate receptor ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.05.004>
- Mo, G., Bernier, L.-P., Zhao, Q., Chabot-Doré, A.-J., Ase, A.R., Logothetis, D., Cao, C.-Q., Séguéla, P., 2009. Subtype-specific regulation of P2X3 and P2X2/3 receptors by phosphoinositides in peripheral nociceptors. *Mol. Pain* 5, 47. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-47>
- Moehring, F., Cowie, A.M., Menzel, A.D., Weyer, A.D., Grzybowski, M., Arzua, T., Geurts, A.M., Palygin, O., Stucky, C.L., 2018. Keratinocytes mediate innocuous and noxious touch via ATP-P2X4 signaling. *eLife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.31684>
- Montana, V., Malarkey, E.B., Verderio, C., Matteoli, M., Parpura, V., 2006. Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia* 54, 700–715. <https://doi.org/10.1002/glia.20367>
- Morgenstern, C., Amano, H., Orsulakova, A., 1982. Ion transport in the endolymphatic space. *Am. J. Otolaryngol.* 3, 323–327.
- Mourot, A., Kienzler, M.A., Banghart, M.R., Fehrentz, T., Huber, F.M.E., Stein, M., Kramer, R.H., Trauner, D., 2011. Tuning photochromic ion channel blockers. *ACS Chem. Neurosci.* 2, 536–543. <https://doi.org/10.1021/cn200037p>
- Mulryan, K., Gitterman, D.P., Lewis, C.J., Vial, C., Leckie, B.J., Cobb, A.L., Brown, J.E., Conley, E.C., Buell, G., Pritchard, C.A., Evans, R.J., 2000. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* 403, 86–89. <https://doi.org/10.1038/47495>
- Muñoz, D.J., Kendrick, I.S., Rassam, M., Thorne, P.R., 2001. Vesicular storage of adenosine triphosphate in the guinea-pig cochlear lateral wall and concentrations of ATP in the endolymph during sound exposure and hypoxia. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 121, 10–15.
- Nakai, K., Nakae, A., Oba, S., Mashimo, T., Ueda, K., 2010. P2X4 receptor expression in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuroreport* 21, 559–563. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32833980b2>
- Neher, E., Sakmann, B., 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799–802.

- Nichols, C.G., Lopatin, A.N., 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 171–191. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.171>
- Nicke, A., 2008. Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 803–808. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.042>
- Nicke, A., Kerschensteiner, D., Soto, F., 2005. Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *J. Neurochem.* 92, 925–933. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02939.x>
- North, R.A., 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013–1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>
- Nurden, A.T., 2007. Does ATP act through P2X(1) receptors to regulate platelet activation and thrombus formation? *J. Thromb. Haemost. JTH* 5, 907–909. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02456.x>
- Nys, M., Kesters, D., Ulens, C., 2013. Structural insights into Cys-loop receptor function and ligand recognition. *Biochem. Pharmacol.* 86, 1042–1053. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.001>
- Otoshi, K., Kikuchi, S., Konno, S., Sekiguchi, M., 2010. The reactions of glial cells and endoneurial macrophages in the dorsal root ganglion and their contribution to pain-related behavior after application of nucleus pulposus onto the nerve root in rats. *Spine* 35, 264–271. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181b8b04f>
- Oury, C., Lecut, C., Hego, A., Wéra, O., Delierneux, C., 2015. Purinergic control of inflammation and thrombosis: Role of P2X1 receptors. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13, 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.11.008>
- Paas, Y., 1998. The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Trends Neurosci.* 21, 117–125.
- Paoletti, P., Neyton, J., 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011>
- Pelegri, P., Surprenant, A., 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25, 5071–5082. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>
- Pellegatti, P., Falzoni, S., Pinton, P., Rizzuto, R., Di Virgilio, F., 2005. A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol. Biol. Cell* 16, 3659–3665. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-03-0222>
- Plested, A.J.R., 2016. Structural mechanisms of activation and desensitization in neurotransmitter-gated ion channels. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 494–502. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3214>
- Popova, M., Trudell, J., Li, K., Alkana, R., Davies, D., Asatryan, L., 2013. Tryptophan 46 is a site for ethanol and ivermectin action in P2X4 receptors. *Purinergic Signal.* 9, 621–632. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9373-4>
- Praetorius, H.A., Leipziger, J., 2009. ATP release from non-excitable cells. *Purinergic Signal.* 5, 433–446. <https://doi.org/10.1007/s11302-009-9146-2>
- Priel, A., Silberberg, S.D., 2004. Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *J. Gen. Physiol.* 123, 281–293. <https://doi.org/10.1085/jgp.200308986>
- Rassendren, F., Buell, G., Newbolt, A., North, R.A., Surprenant, A., 1997. Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J.* 16, 3446–3454. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.12.3446>
- Rau, H., 1973. Spectroscopic Properties of Organic Azo Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 12, 224–235. <https://doi.org/10.1002/anie.197302241>

- Ren, J., Bian, X., DeVries, M., Schnegelsberg, B., Cockayne, D.A., Ford, A.P.D.W., Galligan, J.J., 2003. P2X2 subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. *J. Physiol.* 552, 809–821. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.047944>
- Resende, R.R., Britto, L.R.G., Ulrich, H., 2008. Pharmacological properties of purinergic receptors and their effects on proliferation and induction of neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 26, 763–777. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2008.07.008>
- Rettinger, J., Braun, K., Hochmann, H., Kassack, M.U., Ullmann, H., Nickel, P., Schmalzing, G., Lambrecht, G., 2005. Profiling at recombinant homomeric and heteromeric rat P2X receptors identifies the suramin analogue NF449 as a highly potent P2X1 receptor antagonist. *Neuropharmacology* 48, 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.11.003>
- Roberts, J.A., Digby, H.R., Kara, M., El Ajouz, S., Sutcliffe, M.J., Evans, R.J., 2008. Cysteine substitution mutagenesis and the effects of methanethiosulfonate reagents at P2X2 and P2X4 receptors support a core common mode of ATP action at P2X receptors. *J. Biol. Chem.* 283, 20126–20136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800294200>
- Roberts, J.A., Vial, C., Digby, H.R., Agboh, K.C., Wen, H., Atterbury-Thomas, A., Evans, R.J., 2006. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452, 486–500. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0073-6>
- Rokic, M.B., Stojilkovic, S.S., Vavra, V., Kuzyk, P., Tvrdonova, V., Zemkova, H., 2013. Multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the function of the rat P2X4 receptor. *PloS One* 8, e59411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059411>
- Rokic, M.B., Stojilkovic, S.S., Zemkova, H., 2014. Structural and functional properties of the rat P2X4 purinoreceptor extracellular vestibule during gating. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 3. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00003>
- Rorsman, P., Braun, M., 2013. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 155–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>
- Rothwell, S.W., Stansfeld, P.J., Bragg, L., Verkhatsky, A., North, R.A., 2014. Direct gating of ATP-activated ion channels (P2X2 receptors) by lipophilic attachment at the outer end of the second transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* 289, 618–626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529099>
- Royle, S.J., Qureshi, O.S., Bobanović, L.K., Evans, P.R., Owen, D.J., Murrell-Lagnado, R.D., 2005. Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *J. Cell Sci.* 118, 3073–3080. <https://doi.org/10.1242/jcs.02451>
- Rozengurt, N., Lopez, I., Chiu, C.-S., Kofuji, P., Lester, H.A., Neusch, C., 2003. Time course of inner ear degeneration and deafness in mice lacking the Kir4.1 potassium channel subunit. *Hear. Res.* 177, 71–80. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(02\)00799-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(02)00799-2)
- Rubio, M.E., Soto, F., 2001. Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 641–653.
- Ryten, M., Dunn, P.M., Neary, J.T., Burnstock, G., 2002. ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X5 receptor on satellite cells. *J. Cell Biol.* 158, 345–355. <https://doi.org/10.1083/jcb.200202025>

- Samways, D.S.K., Khakh, B.S., Dutertre, S., Egan, T.M., 2011. Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13800–13805. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017550108>
- Samways, D.S.K., Li, Z., Egan, T.M., 2014. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 6. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00006>
- Saul, A., Hausmann, R., Kless, A., Nicke, A., 2013. Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front. Cell. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00250>
- Schierling, B., Noël, A.-J., Wende, W., Hien, L.T., Volkov, E., Kubareva, E., Oretskaya, T., Kokkinidis, M., Römpf, A., Spengler, B., Pingoud, A., 2010. Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1361–1366. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909444107>
- Schneider, M., Prudic, K., Pippel, A., Klapperstück, M., Braam, U., Müller, C.E., Schmalzing, G., Markwardt, F., 2017. Interaction of Purinergic P2X4 and P2X7 Receptor Subunits. *Front. Pharmacol.* 8, 860. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00860>
- Schwindt, T.T., Trujillo, C.A., Negraes, P.D., Lameu, C., Ulrich, H., 2011. Directed differentiation of neural progenitors into neurons is accompanied by altered expression of P2X purinergic receptors. *J. Mol. Neurosci.* MN 44, 141–146. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9417-y>
- Séguéla, P., Haghighi, A., Soghomonian, J.J., Cooper, E., 1996. A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 448–455.
- Shinozaki, Y., Sumitomo, K., Tsuda, M., Koizumi, S., Inoue, K., Torimitsu, K., 2009. Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X(4) receptors. *PLoS Biol.* 7, e1000103. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000103>
- Shrivastava, A.N., Triller, A., Sieghart, W., Sarto-Jackson, I., 2011. Regulation of GABA(A) receptor dynamics by interaction with purinergic P2X(2) receptors. *J. Biol. Chem.* 286, 14455–14468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.165282>
- Silberberg, S.D., Chang, T.-H., Swartz, K.J., 2005. Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels. *J. Gen. Physiol.* 125, 347–359. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409221>
- Silberberg, S.D., Li, M., Swartz, K.J., 2007. Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels. *Neuron* 54, 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.03.020>
- Sim, J.A., Broomhead, H.E., North, R.A., 2008. Ectodomain lysines and suramin block of P2X1 receptors. *J. Biol. Chem.* 283, 29841–29846. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802523200>
- Sine, S.M., Engel, A.G., 2006. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* 440, 448–455. <https://doi.org/10.1038/nature04708>
- Skals, M., Jorgensen, N.R., Leipziger, J., Praetorius, H.A., 2009. Alpha-hemolysin from *Escherichia coli* uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4030–4035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807044106>
- Smart, T.G., Paoletti, P., 2012. Synaptic neurotransmitter-gated receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009662>
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths, R.J., Gabel, C.A., 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7)

- receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 125–132.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M006781200>
- Soto, F., Garcia-Guzman, M., Karschin, C., Stühmer, W., 1996. Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 456–460. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0915>
- Soto, F., Garcia-Guzman, M., Stühmer, W., 1997. Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J. Membr. Biol.* 160, 91–100.
- Soto, F., Lambrecht, G., Nickel, P., Stühmer, W., Busch, A.E., 1999. Antagonistic properties of the suramin analogue NF023 at heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology* 38, 141–149.
- Souslova, V., Cesare, P., Ding, Y., Akopian, A.N., Stanfa, L., Suzuki, R., Carpenter, K., Dickenson, A., Boyce, S., Hill, R., Nebenuis-Oosthuizen, D., Smith, A.J., Kidd, E.J., Wood, J.N., 2000. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors. *Nature* 407, 1015–1017.
<https://doi.org/10.1038/35039526>
- Spelta, V., Jiang, L.-H., Bailey, R.J., Surprenant, A., North, R.A., 2003. Interaction between cysteines introduced into each transmembrane domain of the rat P2X2 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 138, 131–136.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705018>
- Splinter, T.A., Romijn, J.C., 1986. Phase I study of alpha-difluoromethylornithine and methyl-GAG. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 22, 61–67.
- Stein, M., Middendorp, S.J., Carta, V., Pejo, E., Raines, D.E., Forman, S.A., Sigel, E., Trauner, D., 2012. Azo-propofols: photochromic potentiators of GABA(A) receptors. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 51, 10500–10504.
<https://doi.org/10.1002/anie.201205475>
- Stojilkovic, S.S., Tomic, M., He, M.-L., Yan, Z., Koshimizu, T.-A., Zemkova, H., 2005. Molecular dissection of purinergic P2X receptor channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1048, 116–130. <https://doi.org/10.1196/annals.1342.011>
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., Buell, G., 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735–738.
- Surprenant, A., Schneider, D.A., Wilson, H.L., Galligan, J.J., North, R.A., 2000. Functional properties of heteromeric P2X(1/5) receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 249–263.
- Szücs, A., Szappanos, H., Tóth, A., Farkas, Z., Panyi, G., Csernoch, L., Sziklai, I., 2004. Differential expression of purinergic receptor subtypes in the outer hair cells of the guinea pig. *Hear. Res.*, 40th Inner Ear Biology (IEB) Workshop 196, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.04.008>
- Takimoto, Y., Ishida, Y., Kondo, M., Imai, T., Hanada, Y., Ozono, Y., Kamakura, T., Inohara, H., Shimada, S., 2018. P2X2 Receptor Deficiency in Mouse Vestibular End Organs Attenuates Vestibular Function. *Neuroscience* 386, 41–50.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.026>
- Thorne, P.R., Muñoz, D.J.B., Housley, G.D., 2004. Purinergic Modulation of Cochlear Partition Resistance and Its Effect on the Endocochlear Potential in the Guinea Pig. *JARO J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 5, 58–65.
<https://doi.org/10.1007/s10162-003-4003-4>
- Tiberio, G., Muccioli, L., Berardi, R., Zannoni, C., 2010. How does the trans-cis photoisomerization of azobenzene take place in organic solvents?

- Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem. 11, 1018–1028. <https://doi.org/10.1002/cphc.200900652>
- Tochitsky, I., Banghart, M.R., Mouroto, A., Yao, J.Z., Gaub, B., Kramer, R.H., Trauner, D., 2012. Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Chem.* 4, 105–111. <https://doi.org/10.1038/nchem.1234>
- Torres, G.E., Egan, T.M., Voigt, M.M., 1999. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* 274, 6653–6659.
- Torres, G.E., Egan, T.M., Voigt, M.M., 1998a. N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry (Mosc.)* 37, 14845–14851. <https://doi.org/10.1021/bi981209g>
- Torres, G.E., Haines, W.R., Egan, T.M., Voigt, M.M., 1998b. Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol. Pharmacol.* 54, 989–993.
- Toulmé, E., Soto, F., Garret, M., Boué-Grabot, E., 2006. Functional properties of internalization-deficient P2X4 receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin. *Mol. Pharmacol.* 69, 576–587. <https://doi.org/10.1124/mol.105.018812>
- Toyoshima, C., Kanai, R., Cornelius, F., 2011. First crystal structures of Na⁺,K⁺-ATPase: new light on the oldest ion pump. *Struct. Lond. Engl.* 19, 1732–1738. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.10.016>
- Ulmann, L., Hatcher, J.P., Hughes, J.P., Chaumont, S., Green, P.J., Conquet, F., Buell, G.N., Reeve, A.J., Chessell, I.P., Rassendren, F., 2008. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 11263–11268. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2308-08.2008>
- Ulmann, L., Hirbec, H., Rassendren, F., 2010. P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J.* 29, 2290–2300. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.126>
- Valera, S., Hussy, N., Evans, R.J., Adami, N., North, R.A., Surprenant, A., Buell, G., 1994. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516–519. <https://doi.org/10.1038/371516a0>
- Vial, C., Evans, R.J., 2002. P2X(1) receptor-deficient mice establish the native P2X receptor and a P2Y6-like receptor in arteries. *Mol. Pharmacol.* 62, 1438–1445.
- Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F.A., North, R.A., Surprenant, A., 1999a. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* 2, 315–321. <https://doi.org/10.1038/7225>
- Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F.A., North, R.A., Surprenant, A., 1999b. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* 2, 315–321. <https://doi.org/10.1038/7225>
- Virginio, C., Robertson, G., Surprenant, A., North, R.A., 1998. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Mol. Pharmacol.* 53, 969–973.
- Volgraf, M., Gorostiza, P., Numano, R., Kramer, R.H., Isacoff, E.Y., Trauner, D., 2006. Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat. Chem. Biol.* 2, 47–52. <https://doi.org/10.1038/nchembio756>
- Volgraf, M., Gorostiza, P., Szobota, S., Helix, M.R., Isacoff, E.Y., Trauner, D., 2007. Reversibly caged glutamate: a photochromic agonist of ionotropic glutamate receptors. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 260–261. <https://doi.org/10.1021/ja067269o>

- Wagner-Wysiecka, E., Łukasik, N., Biernat, J.F., Luboch, E., 2018. Azo group(s) in selected macrocyclic compounds. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 90, 189–257. <https://doi.org/10.1007/s10847-017-0779-4>
- Wang, C.Z., Namba, N., Gono, T., Inagaki, N., Seino, S., 1996. Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 196–202. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0380>
- Wang, J., Sun, L.-F., Cui, W.-W., Zhao, W.-S., Ma, X.-F., Li, B., Liu, Y., Yang, Y., Hu, Y.-M., Huang, L.-D., Cheng, X.-Y., Li, L., Lu, X.-Y., Tian, Y., Yu, Y., 2017. Intersubunit physical couplings fostered by the left flipper domain facilitate channel opening of P2X4 receptors. *J. Biol. Chem.* 292, 7619–7635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.771121>
- Wang, X., Levic, S., Gratton, M.A., Doyle, K.J., Yamoah, E.N., Pegg, A.E., 2009. Spermine synthase deficiency leads to deafness and a profound sensitivity to alpha-difluoromethylornithine. *J. Biol. Chem.* 284, 930–937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807758200>
- Werner, P., Seward, E.P., Buell, G.N., North, R.A., 1996. Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15485–15490.
- Wiedbrauk, S., Dube, H., 2015. Hemithioindigo—an emerging photoswitch. *Tetrahedron Lett.* 56, 4266–4274. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.05.022>
- Wilkinson, W.J., Jiang, L.-H., Surprenant, A., North, R.A., 2006a. Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Mol. Pharmacol.* 70, 1159–1163. <https://doi.org/10.1124/mol.106.026658>
- Wilkinson, W.J., Jiang, L.-H., Surprenant, A., North, R.A., 2006b. Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Mol. Pharmacol.* 70, 1159–1163. <https://doi.org/10.1124/mol.106.026658>
- Wolf, C., Rosefort, C., Fallah, G., Kassack, M.U., Hamacher, A., Bodnar, M., Wang, H., Illes, P., Kless, A., Bahrenberg, G., Schmalzing, G., Hausmann, R., 2011. Molecular determinants of potent P2X2 antagonism identified by functional analysis, mutagenesis, and homology docking. *Mol. Pharmacol.* 79, 649–661. <https://doi.org/10.1124/mol.110.068700>
- Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Kobayashi, M., Kawamura, K., Masuda, H., Kamiya, A., Ando, J., 2006. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat. Med.* 12, 133–137. <https://doi.org/10.1038/nm1338>
- Yan, D., Zhu, Y., Walsh, T., Xie, D., Yuan, H., Sirmaci, A., Fujikawa, T., Wong, A.C.Y., Loh, T.L., Du, L., Grati, M., Vlajkovic, S.M., Blanton, S., Ryan, A.F., Chen, Z.-Y., Thorne, P.R., Kachar, B., Tekin, M., Zhao, H.-B., Housley, G.D., King, M.-C., Liu, X.Z., 2013. Mutation of the ATP-gated P2X(2) receptor leads to progressive hearing loss and increased susceptibility to noise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2228–2233. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222285110>
- Yan, Z., Li, S., Liang, Z., Tomić, M., Stojilkovic, S.S., 2008. The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J. Gen. Physiol.* 132, 563–573. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810059>
- Yan, Z., Liang, Z., Obsil, T., Stojilkovic, S.S., 2006. Participation of the Lys313-Ile333 sequence of the purinergic P2X4 receptor in agonist binding and transduction of signals to the channel gate. *J. Biol. Chem.* 281, 32649–32659. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512791200>

- Yokoyama, Y., Gushiken, T., Ubukata, T., 2011. Fulgides and Related Compounds, in: Molecular Switches. Wiley-Blackwell, pp. 81–95. <https://doi.org/10.1002/9783527634408.ch3>
- Yu, N., Zhao, H.-B., 2008. ATP activates P2x receptors and requires extracellular Ca⁺⁺ participation to modify outer hair cell nonlinear capacitance. *Pflugers Arch.* 457, 453–461. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0522-5>
- Yue, L., Pawlowski, M., Dellal, S.S., Xie, A., Feng, F., Otis, T.S., Bruzik, K.S., Qian, H., Pepperberg, D.R., 2012. Robust photoregulation of GABA(A) receptors by allosteric modulation with a propofol analogue. *Nat. Commun.* 3, 1095. <https://doi.org/10.1038/ncomms2094>
- Zaza, A., 2010. Control of the cardiac action potential: The role of repolarization dynamics. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.07.027>
- Zemkova, H., Yan, Z., Liang, Z., Jelinkova, I., Tomic, M., Stojilkovic, S.S., 2007. Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions. *J. Neurochem.* 102, 1139–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04616.x>
- Zhang, F., Zarrine-Afsar, A., Al-Abdul-Wahid, M.S., Prosser, R.S., Davidson, A.R., Woolley, G.A., 2009. Structure-based approach to the photocontrol of protein folding. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 2283–2289. <https://doi.org/10.1021/ja807938v>
- Zhao, W.-S., Sun, M.-Y., Sun, L.-F., Liu, Y., Yang, Y., Huang, L.-D., Fan, Y.-Z., Cheng, X.-Y., Cao, P., Hu, Y.-M., Li, L., Tian, Y., Wang, R., Yu, Y., 2016. A Highly Conserved Salt Bridge Stabilizes the Kinked Conformation of β 2,3-Sheet Essential for Channel Function of P2X4 Receptors. *J. Biol. Chem.* 291, 7990–8003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.711127>
- Zheng, J., Shen, W., He, D.Z., Long, K.B., Madison, L.D., Dallos, P., 2000. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405, 149–155. <https://doi.org/10.1038/35012009>
- Zhou, X., Galligan, J.J., 1998. Non-additive interaction between nicotinic cholinergic and P2X purine receptors in guinea-pig enteric neurons in culture. *J. Physiol.* 513 (Pt 3), 685–697.
- Zhu, Y., Zhao, H.-B., 2012. ATP activates P2X receptors to mediate gap junctional coupling in the cochlea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426, 528–532. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.119>

Etude mécanistique des récepteurs P2X par l'utilisation de molécules photoisomérisables

Résumé

Les récepteurs P2X, activés par l'ATP extracellulaire et cations non-sélectifs, sont impliqués dans de nombreux rôles physiopathologiques. Le manque de sélectivité de molécules pharmacologiques est un inconvénient majeur pour leur étude. La résolution de leurs structures cristallographiques a permis de les comprendre à l'échelle moléculaire, cependant les mécanismes impliqués dans les transitions allostériques restent mal compris. Au laboratoire, deux outils, dérivés d'azobenzène, permettant l'activation des récepteurs P2X en absence d'ATP et par la lumière ont été développés.

L'utilisation de ces outils ont permis l'étude de la transition allostérique de l'état ouvert à l'état désensibilisé, mettant en avant une zone de régulation efficace dans les espaces transmembranaires. De plus, leur utilisation a permis l'investigation biophysique d'une mutation présente sur P2X2 humain, responsable d'une surdité non-syndromatique. Cette mutation entraîne un rétrécissement du pore, impactant le passage de gros cations impliqués dans le processus d'audition. Enfin, la relation entre le diamètre du pore ionique et le passage de gros cations a été établi.

Mots clés : P2XR, azobenzène, désensibilisation, audition

Abstract

P2X receptors, activated by extracellular ATP and non-selective cations, are involved in many physiopathological roles. The lack of selectivity of pharmacological molecules is a major drawback for their study. The resolution of their crystallographic structures provided a molecular framework, but the mechanisms involved in allosteric transitions remain misunderstood. In the laboratory, two tools, derived from azobenzene, allowing the activation of P2X receptors in the absence of ATP and by light have been developed.

The use of these tools allowed the study of the allosteric transition from the open to the desensitized state, highlighting an effective regulatory zone in transmembrane spaces. In addition, their use provided the biophysical investigation of a mutation present on hP2X2, responsible for non-syndromatic hearing loss. This mutation leads to a narrowing of the pore, impacting the large cations flow involved in hearing process. Finally, the relationship between the diameter of the ionic pore and the passage of large cations has been established.

Keywords P2XR, azobenzene, desensitization, hearing