Etude moléculaire de la dilatation des récepteurs P2X

Mahboubi Harkat

▶ **To cite this version:**

Mahboubi Harkat. Etude moléculaire de la dilatation des récepteurs P2X. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ023 . tel-02947900

HAL Id: tel-02947900
https://theses.hal.science/tel-02947900

Submitted on 24 Sep 2020

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCE DE LA VIE ET DE SANTE

UMR7199 - Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par :

Mahboubi HARKAT

Soutenue le : **28 avril 2017**

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

Discipline/ Spécialité : Neurobiologie moléculaire

Etude moléculaire de la dilatation des récepteurs P2X

THÈSE dirigée par :
Dr GRUTTER Thomas Directeur de recherche, CNRS

RAPPORTEURS :
Dr RASSENDREN François Directeur de recherche, CNRS
Dr SANDOZ Guillaume Chargé de recherche, CNRS

PRESIDENT DU JURY
Pr VUILLEUMIER Stéphane Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Dr Thomas GRUTTER. Tu m'as permis de m'épanouir dans un domaine que j'aime en m'accordant ta confiance durant cette thèse. J'ai appris énormément sous ta direction et je ne te remercierai jamais assez pour ta disponibilité, ta patience quand il a fallu comprendre mes interrogations (mon cerveau) et adapter tes réponses. C'est aussi à tes côtés que j'ai appris à tout remettre en cause en m'obligeant à pousser ma réflexion toujours plus loin. Et enfin à mettre en pratique le 'Serendipity'.

Je voudrais également remercier le Dr François Rassendren ainsi que le Dr Guillaume Sandoz et enfin le Dr Stéphane Vuilleumier d'avoir accepté de juger mon travail.
Je leur exprime ici toute ma gratitude pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ma thèse.

Ensuite, je tenais à dire que ces quatre années n'auraient pas été aussi belles sans l'ensemble des membres de mon laboratoire. L'ambiance d'exception dans laquelle j'ai évolué m'a permis de m'épanouir et de prendre plaisir dans mon travail.

Evidemment, je dois remercier le Dr Thierry Chataigneau, mon capitaine. Sache que ta manière de travailler m'a toujours impressionné et que j'ai vraiment apprécié ton encadrement et ton soutien durant ces années. Plus qu'un accompagnant, j'ai rencontré un homme passionné.

Aussi, merci au Dr Alexandre Specht, pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils tout au long de ma thèse. Ainsi que le Dr Frédéric Bolze pour sa bonne humeur communicative. Grâce à toi je progresse dans l'élevage (non culture) d'algues bioluminescentes. Mais surtout merci de m'avoir embarqué dans les couloirs du sous-sol pour le laboratoire « underground ».

Je tiens particulièrement à remercier l'ensemble de mes collègues, les anciens comme les nouveaux :
Damien merci de m'avoir inculqué le patch et poussé à tout démonter, réparer, sauver, mais aussi pour nos fous rire.
Adeline, celle qui a toujours su décrypter mon langage, merci pour ta gentillesse, ton engagement en biologie moléculaire, ton sens de l'organisation sur lequel je me suis toujours efforcé de prendre exemple.
Chloé, pour ta simplicité et ton travail acharné qui m'ont motivé pour mon propre travail. Sébastien, pour ta rage sportive, que je sois perdant ou gagnant ta compagnie m'a toujours poussée à me dépasser. Mais aussi pour tous nos débats autour de tellement de sujets. Bastien, pour m'avoir fait découvrir et voir les planètes, tu m'as fait rêver.

Laurie avec qui j'ai formé un super binôme, sans qui mon projet n'aurait pas pu aboutir. Mais aussi Juline, la vosgienne, son travail a contribué à l'aboutissement de notre projet. Kate Dunning pour Kate Dunning tout simplement. Merci au gar du ter ter Lucas ne change rien et ELIE, JF et david merci pour nos echanges
Mais aussi tous mes stagiaires pour avoir accepté mes exigences et ma folie et toutes les personnes que je n'ai pas pu citer…

Je tiens à remercier l'université de Strasbourg et la fondation Pierre et Jeanne Spiegel pour leur soutien financier.
Merci à mes amis
Marwan (CLUB 213), Romain (Taka) et Jean (Lil Jon) pour leur soutien et leur amitié. Vous êtes la famille.
Et au prince de Bel-Air d'avoir existé.

Merci à ma famille,

A ma mère qui m'a toujours soutenu par son amour, maman tu as su rendre mon enfance magique, c'est toi qui m'a appris à prendre la vie du bon côté. Mon père pour qui j'ai une pensée particulière…. Ma sœur Leila (et son équipe Ninis et Réda) qui m'a interdit de choisir la voie la plus facile et m'a poussé vers les sciences.
A ma femme, mon équipe, pour son soutien durant ma thèse et particulièrement ces derniers mois je n'ai pas été facile. Mais surtout, je dédie ce travail au plus beau des cadeaux mon fils Haroon (Pacha).

A vous tous merci,

L'ensemble de ces travaux a été réalisé au sein de l'équipe neurobiologie moléculaire et chimie (UMR7199) de l'Université de Strasbourg

Table des matières

Liste des Tables et Figures 4

Abréviations 7

Introduction 13

1 Généralité sur les récepteurs 13

1.1 Ligand-Gated Ion Channel 17

1.1.1 Les récepteurs pentamériques 17

1.1.2 Les récepteurs tétramériques 19

1.1.3 Les récepteurs trimériques 20

2 Les récepteurs P2X 21

2.1 Rôle physiologique des récepteurs P2X 21

2.1.1 L'ATP, une molécule pas comme les autres 21

2.1.2 Les récepteurs purinergiques 22

2.1.3 Distribution cellulaire et rôles physiologiques des récepteurs P2X 24

2.1.4 Aspect pharmacologique 29

2.2 Propriété moléculaire, fonctionnel et biophysique du pore 38

2.2.1 Structure des récepteurs P2X 38

2.2.2 Sélectivités ioniques 44

3 La dilatation du P2X, un état controversé 49

3.1 Bref historique 49

3.2 Le mécanisme de dilatation 51

3.2.1 Caractérisation de la dilatation deux techniques de choix 51

3.2.2 Aspect cellulaire de la dilatation 55
3.2.3 Modulation allostérique de la dilatation 59
3.2.4 La dilatation un mécanisme controversé 61
3.2.5 Approche de biologie moléculaire pour la compréhension de la dilatation 66
3.3 Le rôle physiologique de la dilatation 68
3.4 Le changement de sélectivité, une caractéristique partagée par d'autres canaux ioniques 71
3.4.1 Les récepteurs ASIC 72
3.4.2 Les récepteurs TRPV1 73
3.5 Bouleversement du paradigme du mécanisme de dilatation 75
4 Les molécules photoisomérisables dans la caractérisation des récepteurs P2X 77
4.1 Outils photochimiques pour le contrôle neuronal 77
4.1.1 L'Optogénétique 78
4.1.2 L'optopharmacologie 79
4.1.3 La pharmacologie optogénétique 79
4.2 Le contrôle des récepteurs P2X par la lumière 81
Objectif de la thèse 83
Résultats 84
5 Etudes la dilatation sur les différentes constructions du récepteurs zfp2x4 85
5.1 Contexte et stratégie 85
5.2 Matériels et méthodes 86
5.3 Résultats 87
5.4 Discussions 92
6 Utilisation des molécules photoisomérisables pour le contrôle des récepteurs P2X 93

6.1 Contexte et stratégie 93
6.2 Matériels et méthodes 95
6.3 Résultats 96
6.4 Discussions 100
7 Etude de la dilatation à la lumière du changement de paradigme 102
7.1 Contexte et stratégie 102
7.2 Matériels et méthodes 102
7.3 Résultats 104
7.3.1 Détermination des cinétiques d'activations en condition symétriques 104
7.3.2 Comparaison du mécanisme sous-jacent au passage du $NMDG^+$ et du Na^+ 108
7.3.3 Les mouvements induits par la lumière permettent l'incorporation du YO-PRO-1 dans des conditions physiologiques 111
7.3.4 Dynamique moléculaire de la perméabilité au $NMDG^+$ 113
7.3.5 Perméabilité des récepteurs homomériques P2X 114
7.4 Discussion 118
Discussion générale 135
Conclusion 138
8 Bibliographie 140

Liste des Tables et Figures

Figure 1 Les trois classes des récepteurs membranaires

Figure 2 Représentation schématique de la topologie membranaire et de l'assemblage des sous-unités des trois familles des LGIC

Tableau 1 : Localisation chromosomale des gènes P2X d'humain

Tableau 2 Heteromérisation des récepteur P2X déterminé dans les cellules HEK293

Tableau 3 Distribution et fonction des récepteurs P2X

Figure 3 L'implication des récepteurs P2X dans la nociception et dans la douleur neuropathique

Figure 4.Structure chimique des principaux agonistes, antagonistes et modulateur des récepteurs P2X

Tableau 4. Pharmacologie des récepteurs P2X: Les agonistes

Tableau 5 Pharmacologie des récepteurs P2X

Tableau 6 Pharmacologie des récepteurs P2X : Modulateurs allostériques

Figure 5 Architecture des récepteur P2X.

Figure 6 Site de fixation de l'ATP.

Figure 7 Désensibilisation des différents récepteurs P2X.

Figure 8 Les différentes configurations du Patch Clamp

Tableau 7 Perméabilité chlorique et calcique

Figure 9 Fluorescence : Diagramme simplifié de Jablonski illustrant les transitions des états énergétiques

Figure 10 Différentes techniques de caractérisation de la dilatation.

Tableau 8 Récapitulatif des espèces employées durant la caractérisation des recepteurs P2X

Figure 11 Influence du niveau d'expression sur la dilatation.

Figure 12 Diagramme schématique illustrant la dépendance du récepteur P2X7 au sodium.

Figure 13 Structure des pannexin un hémicanal

Figure 14 Illustration de la différence entre les deux modèles

Tableau 9 Récapitulatif des mutations ayant une influence sur la dilatation des différents sous unité P2X.

Figure 15 Implication des récepteurs P2X7 dans l'activation des NLRP3

Figure 16 structure cristallographique des récepteurs DeltaASIC1

Figure 17 Outils pour le photocontrôle des recepteurs

Figure 18 Principales molécules photoisomérisables

Figure 19 Contrôle des récepteurs P2X par la lumière

Figure 20 Illustration de différentes constructions du zfP2X4

Figure 21 Caractérisation du passage du $NMDG^{+}$ en électrophysiologie

Figure 22 Mesure de l'incorporation du YOPRO-1

Figure 23 Structure chimique des différents MAM utilisées

Figure 24 Investigation des mouvements horizontaux des hélices TM2

Figure 25 Investigation des mouvements horizontaux des hélices TM2

Figure 26 L'activation rapide de l'ATP des récepteurs P2X2-3T induit une perméation instantanée et stable de $NMDG^+$.

Figure 27 Conductance unitaire des courants $NMDG^+$ à partir de patchs externes exprimant le récepteur P2X2-3T.

Figure 28 La perméation $NMDG^+$ opère avec des mouvements moléculaires similaires à la perméation de Na^+.

Figure 29 Les changements structuraux des hélices TM2 induisent une absorption de colorant cellulaire dans des conditions physiologiques.

Figure 30 Test de stabilité des courants induit par la lumière sur les simples et doubles mutants cystéines.

Figure 31 Mécanisme de la perméation $NMDG^+$ révélée par des simulations MD.

Figure 32 Les récepteurs P2X sont perméables aux cations organiques.

Figure 33 Les mutants G342A et G342P sont perméant aux gros cations

Figure 34 Les récepteurs P2X sont perméables aux cations organiques naturels.

Abréviations

2-meSATP : 2-(méthylthio)adénosine 5'-triphosphate

5-HT3 : Récepteur de la sérotonine de type 3

ACh : Acétycholine

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFM : Atomic-Force Microscopy

AMPA : Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)

Ap3A : P1,P3-di(adénosine-5') trisphosphate

Ap4A : P1,P4-di(adénosine-5') tétraphosphate

Ap5A : P1,P5-di(adénosine-5') pentaphosphate

ASIC : Acid Sensing Ion Channels

ATD : Domaine extracellulaire aminoterminal

ATP : Adénosine 5'-triphosphate

ATPγS : Adénosine-5'-O-(3-thiotriphosphate)

BBG : Brilliant blue G

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor, Facteur neurotrophique du cerveau

BMA : Bis-maléimide azobenzène

Bz-ATP : 2',3'-O-(4-benzoyl-benzoyl)-adénosine-5'-triphosphate

C8B4 : lignée cellulaire microgliales

CIM : Domaine intracellulaires

CTP : Cytidine-5′-triphosphate

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ECD : domaine extracellulaire (éctodomaine)

E_{inv} ou E_{rev} : Potentiel d'inversion

ETBr : Bromure d'éthidium

GABA : Acide γ-aminobutyrique

$GABA_{A,}$: Récepteur GABA de type A

$GABA_C$: Récepteur GABA de type C

GDP : Guanosine diphosphate

GluCL : Canal chlore active par le glutamate

GLy : Récepteur de la glycine

HEK : Human embryonic kidney

IGluRs : Récepteur ionotropique du glutamate

Ip4I : diinosine tétraphosphate

Ip5I : diinosine pentaphosphate

IVM : Ivermectine

KCC2 : Co-transporteurs potassium chlore

KN-62 : 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-méthyl-L-tyrosyl]-4-phénylpipérazine

LGIC : Ligand gated ion channel

LiGluR : Light-gated ionotropic glutamate receptor

LinAChRs : Light-gated acetylcholine receptor

MAACh : Maléimide-azobenzène-acétylcholine

MAG : Maléimide-azobenzène-glutamate

MAM : Maléimide-azobenzène-maléimide

MAQ : maléimide-azobenzène-ammonium quaternaire

MDEG1 : Isoforme du ASIC2

MDEG2 : Isoforme du ASIC2

MEA-TMA : maléimide éthylène azobenzène triméthylammonium

MRS2159 : pyridoxal-5-phosphate-6-azophényl-4'-carboxylate

MRS2220 : acide cyclic pyridoxine-α4,5-monophosphate-6-azophényl-2',5'-disulfonique

MRS2257 : pyridoxal-5'-phosphonate 6-azophényl 3',5'-bisméthylènephosphonate

MTS : méthanethiosulfonate

MTS-rhodamine :

MTS-TPAE : : 2-(Tripentylammonium)ethyl-méthanethiosulfonate

MTSEA : hydrobromure de 2-aminoéthyl méthanethiosulfonate

MTSEA-biotine

MTSES : 2-sulfonatoéthyl méthanethiosulfonate

MTSET : bromure de 2-(triméthylammonium)éthyl méthanethiosulfonate

NES : Natural extracellular solution

NF023 : acide 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phénylène carbonylimino)bis-1,3,5-naphthalène trisulfonique

NF279 : acide 8,8'-(carbonylbis(imino-4, 1-phénylènecarbonylimino-4,1-phénylène carbonyl imino)) bis-1,3,5-naphthalènetrisulfonique

NF449 : acide 8,8'-(Carbonylbis(imino-5,1,3-benzènetriylbis(carbonylimino)))tétrakisbenzène -1,3-disulphonique

NF770 : acide 7,7’-(carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino-3,1-(4-methylphenylene) carbonylimino))bis-1-methoxy-naphthalene-3,6-disulfonique

NF778 : acide 6,6’-(carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino-3,1-(4-methylphenylene) carbonylimino))bis-1-methoxy-naphthalene-3,5-disulfonique

NF864 : 8,8’,8”,8’”-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriyl-bis(carbonylimino)))tetrakis-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid-dodecasodium

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique

NMDG : N-méthyl-D-glucamine

NTW8 : ligne cellulaire microgliale

P1 : récepteur purinergique de type 1

P2X : récepteur ionotropique purinergique de type 2

P2Y : récepteur métabotropique purinergique de type 2

Panx1 : Pannexine de type 1

PEG : Polyéthylène glycol

PI3K : phopshatidylinositol-kinase de type 3

PI4k phopshatidylinositol-kinase de type 4

PKC : Protein Kinase C

PPADS : acide pyridoxal-5-phosphate-6-azophényl-2',4'-disulphonique

PPNDS : acide pyridoxal-5'-phosphate-6-(2´-naphthylazo-6'-nitro-4´,8´-disulphonique)

PSB-1011 : disodium 1-amino-4-[3-(4,6-dichloro[1,3,5]triazine-2-ylamino)-4-sulfophenylamino]-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2-sulfonate

PSB-10211 : 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

RB-2 : Reactive blue 2

RCPG : Récepteur couplé à une proteine G

RO-0437626

RO-4 : 5-(5-iodo-2-isopropyl-4-méthoxyphénoxy)pyrimidine-2,4-diamine; RO-3, 5-[(4,5-diméthoxy-2-propan-2-ylphényl)méthyl]pyrimidine-2,4-diamine

RO-51 : 2-[[4-Amino-5-[5-iodo-4-méthoxy-2-(1-méthyléthyl)phénoxy]-2,4-pyrimidinyl]amino]-1,3-propanediol

RO-85 : 1-Méthyl-3-phényl-1H-thièno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid [(R)-2-(4-acétylpipérazin-1-yl)-1-méthyl-éthyl]-amide

SCAM : Substitued cysteine accessibility method

SNC : Système nerveux centrale

TM1 : Transmembrane domain 1

TM2 : Transmembrane domain 1

TNP-ATP : Tris : 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

TrkB des récepteurs à activité tyrosine kinase

TSA : Lignée cellulaire dérivée des HEK

VR : récepteurs ionotropiques des vanilloïdes

YO-PRO-1 : Diiodure de 4-[(3-méthyl-1,3-benzoxazol-2(3H)-ylidène)méthyl]-1-[3-(triméthyl ammonio)propyl]quinoléinium

zfP2X4: Récepteur P2X4 du poisson zèbre

αβ-meATP : α,β-méthylène-ATP

βγmeATP : β, γ-méthylène-ATP

Introduction

1 Généralité sur les récepteurs

La communication, du latin *communicare* (*« mettre en commun, faire part de, partage »*), dérive de *communis*, qui est l'action de communiquer, de transmettre des informations ou des connaissances à quelqu'un ou encore de les mettre en commun s'il y a échange. Cette action de communiquer permet depuis tout temps d'échanger ou de transmettre une information. Chez l'homme, la communication a permis l'émergence des sociétés par la mise en commun de biens, de points de vue, ou le besoin de se réunir à des fins sécuritaires. Mais surtout, la communication a permis d'ériger des ponts entre les êtres vivants autorisant la transmission des savoirs acquis, et d'améliorer la compréhension de l'autre et du monde environnant.

Au niveau cellulaire, les membranes constituent une barrière rendant les cellules imperméables à leurs environnements proches. Sans communication, les amas de cellules se développeraient de manière anarchique et ne pourraient former des tissus jouant un rôle d'une dimension macroscopique. Ainsi, aucun organisme pluricellulaire n'aurait pu se développer. C'est pourquoi la nature, l'évolution, a développé une stratégie permettant l'ancrage de protéines jouant le rôle de porte dans les membranes tout en élaborant des voies de communications (Alberts *et al*, 2002) facilitant les échanges entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire. La communication cellulaire dépend de deux molécules : le messager, qui est le support de l'information, et le récepteur de ce message.

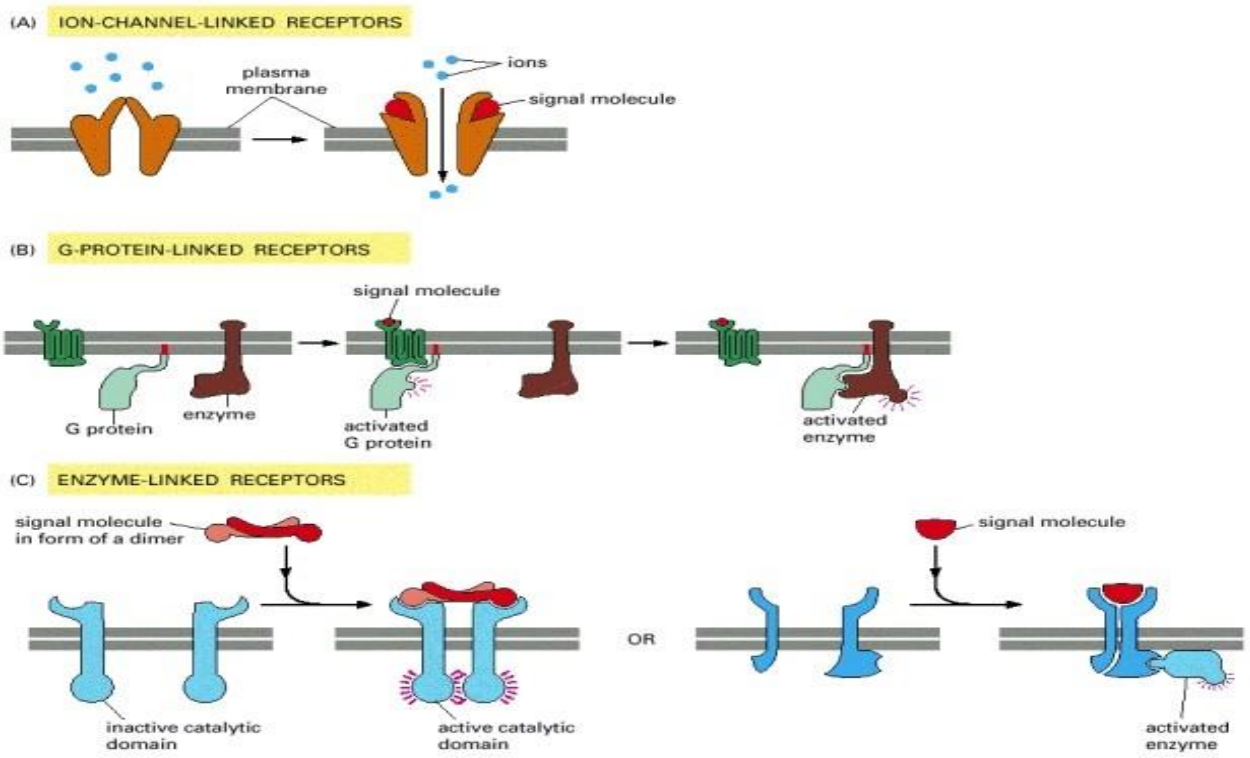

Figure 1 Les trois classes des récepteurs membranaires : A) les récepteurs canaux (ionotropiques) B) les récepteurs couplés au protéine G (métabotropiques C) les récepteurs lié aux enzymes, dont certains ont une activité enzymatique intrinsèque à gauche et d'autre s'associe à une enzyme à droite (Alberts et al*, 2002)*

Ce système est basé sur la distance entre l'émetteur et le récepteur. La distance contribue à caractériser le messager. Si la distance est faible (20 nm) le message est un neurotransmetteur lors d'une transmission synaptique. Cette transmission est portée et est régulée par des cellules nerveuses, les neurones. Ces derniers activés par une excitation exogène, un signal électrique se propage le long d'un axone. En fin de course axonal, cette impulsion provoque la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, activant les récepteurs des cellules nerveuses postsynaptiques.

Si la distance n'excède pas les 100 µm la transmission est paracrine et est supportée par une messager chimique local. Pour pouvoir fonctionner, les molécules secrétées ne doivent pas être capables de se diffuser trop loin, sous peines d'être absorbés par des cellules voisines ou détruites par des enzymes extracellulaires. Au-delà de cette distance, les transmissions sont endocrines. La signalisation endocrine dépend des cellules endocrines. Ces dernières sécrètent des hormones

dans la circulation sanguine qui sont ainsi distribuées largement dans tout le corps. La transmission peut alors s'effectuer par les cellules arborant le messager à leur surface et éventuellement se propager par le biais de gap jonction permettant la relation de cytoplasmes de deux cellules en contact direct.

Les messagers ciblent des protéines réceptrices ancrées à la surface des cellules. Ces récepteurs appartiennent à l'une des trois classes définies par leurs mécanismes de transduction (Figure 1)

Les récepteurs couplés à une protéine G (RCPG) forment un système protéique complexe permettant la transmission d'un signal à travers la membrane cellulaire (Figure 1b) (Kobilka, 2007). La traduction du message se déroule en trois parties :

- Premièrement, par l'activation du récepteur transmembranaire se déroulant dans la partie extracellulaire. Cette protéine est composée de sept segments transmembranaires contenant une partie pouvant lier la protéine G.
- Dans un second temps, le récepteur activé va pouvoir changer de conformation et permettre le transfert de l'information à la protéine G. La protéine G est un hétérodimère composé d'une sous unité α et d'une sous unité βγ qui lie la GTP. Quand il y a fixation de la molécule informative le changement de conformation spatiale se transmet à la sous-unité Gα. Celle-ci échange GDP contre GTP et simultanément elle se dissocie du dimère Gβγ.
- En dernier lieu, la dissociation de la sous-unité Gα va induire l'activation d'une protéine enzymatique effectrice ou alors d'un récepteur ionique.

Les récepteurs liés aux enzymes (Figure 1C) (Alberts *et al*, 2002) fonctionnent soit comme des enzymes ou soit ils sont directement associés à une enzyme lorsque lorsqu'ils sont activés. Leurs structures sont composées de simples protéines transmembranaires dont le site de liaison du ligand se situe dans la partie extracellulaire. Marqué par une hétérogénéité structurale, les récepteurs liés à l'enzyme sont toutefois en majorité des protéines kinases ou associés à des

protéines kinases. Suite à l'activation des récepteurs, les kinases provoquent la phosphorylation de l'ensemble des protéines dans les cellules cibles.

Les récepteurs directement liés au canal ioniques ou récepteurs ionotropiques (Figure 1A) (Purves *et al*, 2001; Lemoine *et al*, 2012) sont des protéines dont la partie transmembranaire est hydrophobe. L'activation par un ligand permet l'ouverture ou la fermeture d'un canal ionique modifiant transitoirement la perméabilité ionique de la membrane. Ces récepteurs canaux sont représentés majoritairement par la grande famille des LGICs (Ligand Gated Ion Channels). Ils existent trois membres de cette grande famille se différenciant par une stœchiométrie d'assemblage des sous unités. Ces trois membres sont les récepteurs pentamériques (communément appelés Cys-loop), tétramériques et enfin trimériques (Figure 2).

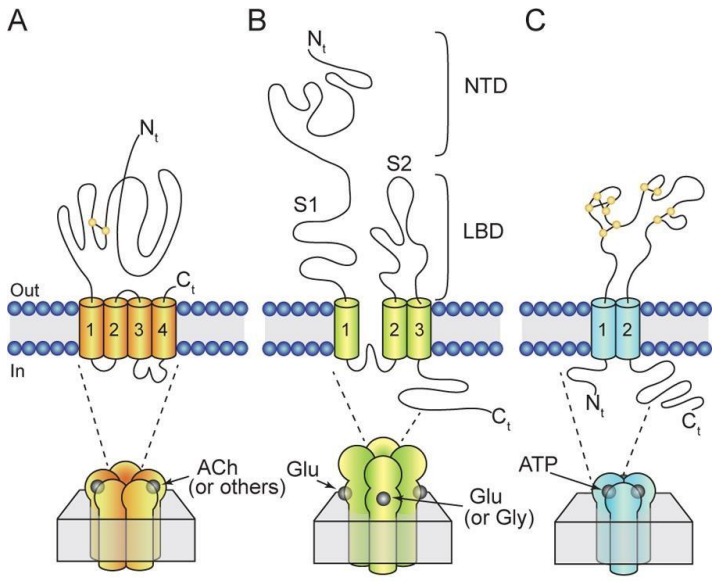

Figure 2 Représentation schématique de la topologie membranaire et de l'assemblage des sous-unités des trois familles des LGIC : (A) les récepteurs Cys-boucle, (B) iGluRs, et (C) les récepteurs P2X. Les résidus de cystéine conservés engagés dans des ponts de disulfure sont représentés par des cercles jaunes, et les extrémités N- et C-terminale et les liaisons transmembranaires sont également indiquées. Out et in, respectivement, à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule adapté de (Lemoine et al*, 2012)*

1.1 Ligand-Gated Ion Channel

1.1.1 Les récepteurs pentamériques

Les récepteurs Cys-Loop sont des protéines transmembranaires issues de l'oligomérisation de cinq sous unités adjacentes (Figure 2A). Ils sont activés par des neurotransmetteurs au niveau extracellulaire. Les membres de cette famille comprennent les récepteurs de la sérotonine (le récepteur 5-HT3), de l'acétylcholine (les récepteurs ACh nicotinique), de la glycine (les récepteurs GLy), de l'acide gamma-aminobutyrique (les récepteurs $GABA_{A,}$ $GABA_{C}$) et enfin les récepteurs activés par le zinc (les récepteurs ZAC). Tout cela définit l'ensemble des récepteurs pentamériques du règne des vertébrés. Chez les invertébrés, les récepteurs peuvent être activés par les mêmes neurotransmetteurs mais aussi par d'autres comme : les EXP-1, MOD-1, pHCl, HistCl, RDL, GluCL et SsCL (Gürel *et al*, 2012; Thompson *et al*, 2010; Althoff *et al*, 2014; Beg & Jorgensen, 2003). Des protéines semblables ont été identifiées chez les procaryotes, les récepteurs GLIC (Corringer *et al*, 2010, 2012).

Tous les récepteurs Cys-Loop partagent une structure pentamérique commune entourant le pore du canal ionique. Leurs activations sont médiées par un neurotransmetteur qui se fixe dans le domaine extracellulaire l'ectodomaine (ECD). Cette activation, pouvant être excitatrice ou inhibitrice selon la sélectivité, permet le passage des cations et anions. Deux autres domaines caractérisent chaque sous unités, dont le domaine transmembranaire TDM composés de quarte hélices (M1-M4) enchâssés dans la membrane permettant le passage des ions. Le troisième domaine, le domaine intracellulaire (CIM) constitue le portail d'entrée des ions dans les cellules. Ce dernier domaine est composé par la boucle intracellulaire des M3-M4 (Figure 2A).

La stœchiométrie d'assemblage et les neurotransmetteurs caractérisent les différents membres des récepteurs Cys-Loop. Ces membres sont représentés :

- Les récepteurs cationiques excitateurs 5-HT3 (Barnes *et al*, 2009) qui sont composés de cinq sous unités différentes (nommées A-E), pouvant former un récepteur homopentamérique ou

hétéropentamérique. La détermination de la distribution cellulaire des récepteurs 5-HT3 montrent que ces récepteurs sont exprimés dans le système nerveux central. Dans la partie du nucleus tradus solitarius (NTS), le récepteur 5-HT3 est impliqué dans l'initiation et la coordination de reflexe vomitif. Un polymorphisme des récepteurs montre une incidence des récepteurs 5-HT3 dans les désordres psychiatriques tels que la schizophrénie ou les troubles bipolaires

- Les récepteurs cationiques nicotiniques de l'acétylcholine musculaires (Albuquerque *et al*, 2009) se constituant de 5 sous unités (α1, β1, δ, γ et ε) pouvant formé deux sous types différents α1, β1, δ et γ ou α1, β1, δ et ε, chacune dans la stœchiométrie de 2 : 1 : 1 : 1. Par contre, les nACh neuronaux peuvent être des homopentamères ou des hétéropentamères composés de sept sous unités (α2, α3, α4, α5, α6, α7, α9 et α10). Ces récepteurs excitateurs nicotiniques ont une large implication dans des processus physiopathologiques de par leurs diversités et leurs localisations. Ils sont impliqués dans la neurotransmission synaptiques et peuvent être une cible pharmacologique pour combattre certaines maladies comme Alzheimer, Parkinson ou la schizophrénie(Schliebs, 2005; Smeal *et al*, 2008; Koukouli *et al*, 2017).

-Les récepteurs anioniques inhibiteurs $GABA_A$ s'organisent en 19 sous unités (α_{1-6}, β_{1-4}, γ_{1-3}, δ, ε, π, ρ_{1-3} et θ). Cependant, la plupart des récepteurs chez les mammifères se composent de deux alphas, deux bêta et un gamma ou delta. Ce situant majoritairement au niveau du cerveau, les récepteurs GABAAsont la cible thérapeutique de plusieurs molécules comme les Benzodiazépines traitant l'anxiété (Olsen & DeLorey, 1999; Olsen *et al*, 1991).

L'ensemble de ces caractéristiques font des récepteurs CYS-Loop des cibles thérapeutiques importantes dont découle la découverte de plusieurs médicaments. Ces trouvailles se sont accélérées depuis le début des années 90.

1.1.2 Les récepteurs tétramériques

Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont constitués de quatre larges sous unités qui forment le canal ionique. Les récepteurs tétramériques, possèdent une grande homologie de séquences, sont composés des récepteurs AMPA (acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique), kainate, NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique), et δ. Les récepteurs du glutamate partageant une structure similaire. Chaque unité est composée d'un domaine extracellulaire aminoterminal (ATD), d'un domaine de liaison du ligand extracellulaire (LBD), d'un domaine transmembranaire (TMD), et d'un domaine intracellulaire carboxy-terminal (CTD) (Figure 2B).

Partageant une structure commune, les récepteurs du glutamate se différencient par la spécificité des agonistes caractérisant chaque membre.

Les récepteurs cationiques kainates sont des récepteurs qui lient le glutamate, mais se caractérisent par la liaison d'une molécule exogène : le Kainate. Le canal ionique se forme au niveau des TMD (par les hélices M1, M3 et M4) issus de quatre sous unités adjacentes et sélectives aux ions sodium et potassium. Les récepteurs kainates sont formés d'une combinaison de 5 sous unités (GluK1-GluK5) pouvant former des récepteurs homo ou hétérotétrameriques. Ces récepteurs ont une action présynaptique et postsynaptique mineurs mais sont incontournables dans le fonctionnement de la plasticité synaptique.

Les récepteurs NMDA sont des canaux sélectifs au Na^+, K^+ et Ca^{2+}. Ils sont composés de sept sous unités différente (GluN1, GluN2A-GluN2D, GluN3A et GluN3B). Les récepteurs NMDA fonctionnels nécessitent l'assemblage de deux sous-unités GluN1 conjointement avec soit deux sous-unités GluN2, soit une combinaison de sous-unités GluN2 et GluN3. De plus, l'activation nécessite la fixation combinée du glutamate et de la glycine. L'activité des récepteurs NMDA est important au niveau du développement du cerveau (Ewald & Cline, 2009). Au niveau synaptique, les récepteurs jouent clairement un rôle dans la maturation des synapses glutaminergique. Ils sont également déterminants dans le dysfonctionnent des neurones épineux de tailles moyenne (MSN)et dans la mort dans la maladie Huntington (Fernandes & Raymond, 2009).

Les récepteurs AMPA possèdent quatre sous-unités différentes de GluAl à GluA4 et peuvent former à la fois des homo- et des hétéromères. Contrairement au récepteurs NMDA, ces récepteurs ne nécessitent pas un coagoniste. Comme les autres récepteurs du glutamate, les AMPA sont impliqués dans la plasticité synaptiques et la mémoire (Compans *et al*, 2016). Dans les synapses, le dysfonctionnement du trafic des récepteurs, de leurs nombres et de leurs variétés joue un rôle critique dans plusieurs maladies neurodégénératives (Henley & Wilkinson, 2013).

1.1.3 Les récepteurs trimériques

En fin, la dernière classe de récepteurs canaux dépendants de ligands sont caractérisés par une structure trimérique (Figure 2C). Chaque sous-unité a une grande boucle extracellulaire et deux segments transmembranaires. Les membres de cette famille comprennent les canaux ioniques les canaux P2X (North, 2002), contrôlés par l'ATP extracellulaire, que je vais caractériser dans la suite des chapitres

2 Les récepteurs P2X

2.1 Rôle physiologique des récepteurs P2X

2.1.1 L'ATP, une molécule pas comme les autres

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, la communication est nécessaire au bon fonctionnement de notre organisme. Partant du lien entre le messager et les récepteurs nous avons vu qu'il existait une grande diversité de canaux ioniques dépendant d'un ligand. Néanmoins, les messagers se caractérisent aussi par une grande diversité de molécules impliquées, et notamment les purines et les pyrimidines.

C'est en 1844 que la guanine fut isolée pour la première fois par Unger des matières fécales d'oiseaux marins du guano péruvien (Unger, 1846). À la fin du XIXe siècle, les principales purines et pyrimidines furent découvertes, notamment par Ludwig Karl Martin Leonhard Albrecht Kossel (Burnstock & Verkhratsky, 2012a). De la découverte de l'adénosine monophosphate en 1929, il ne fallut que deux ans pour la que l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) soit découverte en 1929, (Fiske & Subbarow, 1929; Lohmann, 1929). La découverte de l'ATP fut le théâtre de la bataille entre plusieurs équipes. Le point de discorde fut l'attribution de la primauté de la découverte (Maruyama, 1991).

La molécule d'ATP est composée d'une adénine liée par l'azote 9 au carbone 1' d'un ribose. Ce dernier est relié par le carbone 5' à un groupement triphosphate. Ce dérivé de purine est connu pour être la molécule énergétique des organismes vivants. En l'ATP occupe une place centrale dans le support de l'information génétique, le métabolisme, le transfert d'énergie, et ainsi que dans la plupart des réactions de biosynthèse intracellulaire. Or, l'ATP est capable d'activer des récepteurs purinergiques P2 parmi lesquels on distingue les récepteurs P2Y métatropiques qui

sont couplés aux systèmes des protéines G, et les récepteurs P2X ionotropiques, capables de former des canaux ioniques (Burnstock, 1972).

2.1.2 Les récepteurs purinergiques

La caractérisation des récepteurs transmembranaires dépend fortement de l'agoniste qui permet leur l'activation. En outre, les structures et les moyens de transduction du signal permettent une classification précise des récepteurs et notamment des récepteurs purinergiques. Les récepteurs purinergiques se divisent en deux classes différentes : les récepteurs P1 activés par l'adénosine et les récepteurs P2 activés par l'ATP. Les récepteurs purinergiques sont composés de récepteurs métatropiques et de récepteurs ionotropiques.

Les récepteurs métatropiques P1 et P2Y sont tous deux des RCPG ; Les récepteurs P1, liant l'adénosine, sont constitués de quatre membres (A_1, A_2, A_{2B}, A_3). Le premier sous type fut cloné en 1989 par hasard après le clonage de quatre autres RCPG issus de la thyroïde de chien (Libert *et al*, 1989). Les récepteurs P1 peuvent former des récepteurs homomériques ou hétérométriques. Associés à des protéines G_1 ou G_S, les récepteurs P1 influencent la concentration cAMP dans le cytosol. Les récepteurs P2Y sont eux composés de huit sous types (P2Y1,2,4,6,11-14) associés à plusieurs types de protéines G (Gs, Gi/o, Gq/11, et G12/13). Ces récepteurs sont notamment impliqués dans la régulation des récepteurs calciques voltages dépendant.

Les récepteurs ionotropiques P2X sont issus de l'oligomérisation de trois sous types identiques (homotrimériques) ou différents (héterotrimérique) encodés par sept gènes différents (P2X1-7) (North, 2002) (Tableau 1).

Gène	Chromosome	Nombre des acides aminés
P2X1	17p13.3	399
P2X2	12q24.33	472
P2X3	11q12	393
P2X4	12q24.32	389
P2X5	17p13.3	455
P2X6	22q11.21	379
P2X7	12q24	595

Tableau 1 : Localisation chromosomale des gènes P2X d'humain tableau adapté (Burnstock & Verkhratsky, 2012b)

Issus de combinaisons foisonnantes, une grande variabilité de récepteurs en découle (Tableau 2). Or, il est important de noter que les sous unités P2X6 ne peuvent former que des récepteurs héterotrimérique. Une trop faible expression de surface est sans doute la cause de problèmes de détections cellulaires. Les récepteurs P2X ont des canaux archétypaux sélectivement perméants au cation Na^+, K^+, Ca^{2+}. Contrairement à d'autres récepteurs LGICs, leur découverte est assez récente et remonte principalement aux années 80-90, P2X1 (Valera *et al*, 1994), P2X2 (Brake *et al*, 1994), P2X3 (Chen *et al*, 1995), P2X4 (Bo *et al*, 1995), P2X5 et P2X6 (Collo *et al*, 1996), P2X7 (Surprenant *et al*, 1996). Ces récepteurs sont caractérisés par un simple ancrage membranaire ou chaque sous unité est composée par deux segments transmembranaires. Les branches phylogénétiques sont anciennes au même titre que les récepteurs glutaminergiques. L'origine phylogénétique des récepteurs est antérieure à celui de la divergence entre le règne végétal et animal. On les retrouve dans les premiers eucaryotes, en plus de leurs existences dans les plantes (North, 2002; Kaczmarek-Hájek *et al*, 2012). En revanche, ils sont absents chez les procaryotes

	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
P2X1	+	+	+	-	+	+	-
P2X2		+	+	-	+	+	-
P2X3			+	-	+	-	-
P2X4				+	+	+	-
P2X5					+	+	-
P2X6						-	-
P2X7							+

Tableau 2 Heteromérisation des récepteur P2X déterminé dans les cellules HEK293 adapté de (Torres et al*, 1999)*

2.1.3 Distribution cellulaire et rôles physiologiques des récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont abondamment exprimés dans beaucoup de tissus, soutenus par un nombre important de combinaisons d'oligomérisation.

Ainsi, ces récepteurs se retrouvent notamment dans les SNC (P2X2, P2X4, P2X6), dans les muscles lisses (P2X1, P2X2), dans les cellules de prolifération de la peau (P2X5), dans les cellules rétiniennes de Müller (P2X3), dans les cellules du système immunitaire (P2X7). Cette distribution cellulaire induit indéniablement une grande variété de rôles physiopathologies imputés aux P2X. Dans ce contexte, il est évident qu'une coordination de l'information est nécessaire et rend déterminant le rôle de la communication par les récepteurs. En tant que messager, l'ATP peut porter plusieurs informations différentes qui selon le sous type et la localisation peut induire différents résultats. L'équilibre des voies de signalisation étant primordiale pour la survie d'organismes pluricellulaires, la régulation de la traduction des récepteurs P2X dans les voies pathologiques du corps apparait comme une nécessité d'un fonctionnement optimal (Tableau 3).

Récepteur	Exemples de localisation	Principale fonction
P2X1	Muscles lisses, plaquettes, cervelet, neurones de la corne dorsale de la moelle épinière Neurone sympathique, adipocytes, Muscle cardiaque Oreilles interne	Contraction du muscle lisse, activation des plaquettes
P2X2	Muscles squelettiques, SNC, rétine, cellules chromafines, ganglions autonomes et sensoriels Neurone sympathique et parasympathique Neurone rétinienne et œil Cartilage, sperme	Transmission sensoriel, Modulation des fonction synaptique
P2X3	Neurones sensoriels, neurones du noyau du tractus solitaire, quelques neurones sympathiques et parasympathique Cellules rétiniennes de Müller Muscle cardiaque Cholangiocytes	Médiation de la transmission sensorielle Facilite la libération de glutamate dans le SNC
P2X4	SCN, testicules, colon, Les neurones entériques Microglie Organe olfactif, Cellules sécrétoires exocrines	Modulation de l'inflammation chronique Modulation de la douleur neuropathique
P2X5	Neurone sympathique et parasympathique Cellules en prolifération de la peau, de l'intestin, de la vessie, du thymus et de la moelle épinière, muscle cardiaque, Kératinocytes	Inhibition de la prolifération cellulaire Augmentation de la différentiation cellulaire
P2X6	SNC, Neurone sympathique SNC, motoneurones de la moelle épinière Muscles squelettique durant le développement muscle cardiaque cellules épithéliales	Fonctionne comme un récepteur hétérométrique en combinaison avec les sous unités P2X2 et P2X4
P2X7	Neurone sympathique Cellules apoptotiques du système immunitaire, du pancréas et de la peau, Microglie, Oligodendrocytes, Erythrocytes	Médiation de l'apoptose Prolifération cellulaire Libération de cytokines pro inflammatoires

Tableau 3 Distribution et fonction des récepteurs P2X adapté de (Burnstock & Verkhratsky, 2012b; Burnstock, 2008a)

Les récepteurs homomériques P2X1 contribuent à la vasoconstriction des muscles lisses vasculaires. Ce phénomène est consécutif à une activation par l'ATP, libéré par les nerfs sympathiques paravasculaires. Ces mêmes récepteurs montrent une importante influence dans l'autorégulation microvasculaire rénal suite à une augmentation de la pression néphrétique (Burnstock, 2008b). La présence du récepteur P2X2 dans SNC, et spécifiquement dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le bulbe olfactif montrent l'importance de ce récepteur associé ou non à d'autres sous types dans la modulation synaptique et la transmission sensorielle. Le récepteur P2X3 seul ou oligomérisé avec P2X2 est aussi associé à la transmission sensorielle et est notamment exprimer sur la langue, contribuant à la sensation du goût. Les P2X5 sont exprimés dans les neurones sensoriels impliqués dans la détection de l'ischémie musculaire, tandis que le récepteur P2X4 dans les cellules rénales va contribuer au transport du sodium épithélial et l'activité des ENaC (canal sodique épithélial), permettant de maintenir un équilibre du sodium dans le rein (Schwiebert & Kishore, 2001). La fonction du P2X6 est largement méconnu, mais il a été démontré qu'ils sont exprimés par association avec P2X2 et P2X4 dans les neurones moteurs de la moelle épinière et joue un rôle de relais d'information nociceptive le long de la voie de la douleur (Masin *et al*, 2006; Trang & Salter, 2012). Les récepteurs P2X7 sont connus pour leurs implications dans la mort cellulaire ou le système immunitaire par leur contribution dans la libération de molécules inflammatoires, les interleukines.

Outre leurs rôles physiologiques (Tableau 3), les récepteurs P2X sont impliqués dans certaines pathologies. Leur contribution dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson montrent l'importance de l'étude de ces récepteurs ionotropiques.

La contribution des récepteurs P2X est par exemple observé dans la nociception. La nociception correspond à l'ensemble du processus de transmission sensoriel aboutissant à la douleur (quel soit aigu ou chronique).

La libération de l'ATP, dans le milieu extracellulaire lors d'une lésion cellulaire par exemple, va activer les récepteurs P2X3 et P2X2/3 situé dans la terminaison nerveuse sensorielle (Wirkner *et al*, 2007). L'influx ionique va induire une dépolarisation de la membrane entrainant un potentiel d'action le long des neurones présynaptiques. Ce potentiel d'action va entrainer une

accumulation des ions calciques et permettre la libération de l'ATP et le glutamate dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs libérés entrainent à leurs tour une activation des récepteurs P2X (P2X2, P2X4, P2X6) et glutaminergiques, situé sur les neurones post synaptiques de la corne dorsale. Cette transmission permettra l'activation de la zone du cerveau induisant la douleur par une dépolarisation membranaire. L'ensemble de ce processus est entretenu et amplifié par l'intermédiaire des récepteurs P2X3 présynaptiques. L'inhibition ce cette transmission est médiée par libération du GABA par les interneurones. L'activation des récepteurs anioniques du GABA entrainera une hyperpolarisation de la membrane postsynaptique (Lemoine *et al*, 2012) (Figure 3).

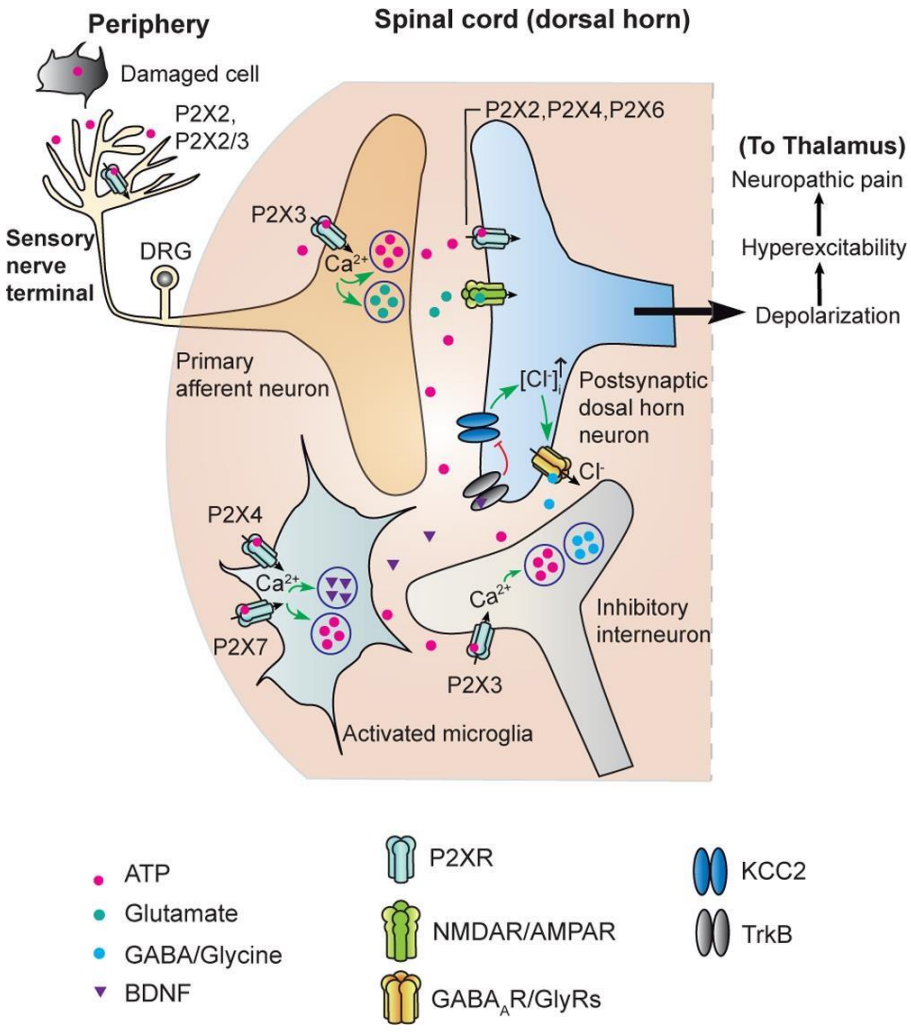

Figure 3 L'implication des récepteurs P2X dans la nociception et dans la douleur neuropathique : Mécanismes moléculaires et cellulaire sous-jacents de la douleur neuropathique impliquant des LGIC dans le système nerveux périphérique et la moelle épinière.(Lemoine et al*, 2012)*

Comme décrit précédemment, les récepteurs peuvent s'associer par une heteromérisation des sous unités, mais une autre association peut permettre une contribution conjointe dans certains rôles physiologiques par la présence homomériques simultanée de deux sous types dans certains tissus. La localisation conjointe des récepteurs P2X4 et P2X7 dans la microglie (Visentin *et al*, 1999) permet d'entrevoir un rôle combiné. L'augmentation de la concentration de l'ATP extracellulaire entraine tout d'abord l'activation non cytolytique des récepteurs P2X4, plus sensibles à l'ATP, avant qu'une plus grande concentration détectée par le P2X7 entraine la mort cellulaire. Cette contribution conjointe liée à une fonction physiopathologique importante des récepteurs P2X, la douleur neuropathique (Bernier *et al*, 2012) La douleur neuropathique n'est pas liée à des stimuli mais à des influx nerveux provenant des nerfs périphériques. Elles s'opposent en cela aux douleurs par excès de nociception, dont l'origine est une sensibilisation des nocicepteurs qu'entretient généralement un processus inflammatoire (douleur traumatique notamment postopératoire, douleur rhumatologique, douleur cancéreuse, douleur d'origine physique comme celle d'une brûlure, etc.) (Baron, 2006). En réponse à une lésion dans l'un des nerfs périphériques, la microglie de la corne dorsale est activée. Les récepteurs P2X4 et P2X7 qui sont impliqués dans l'activation de la microglie permettant la libération du BDNF (brain-derived neurotrofic factor). Une fois libéré, la BDNF va induire une dépolarisation de la membrane des neurones voisins grâce à l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase (TrkB) qui vont dans un second temps inhiber l'expression de co-transporteurs potassium chlore KCC2. Ce qui va inverser les courant anionique gabaergiques dans les neurones postsynaptiques, conduisant à désinhibition du système GABAergiques et glycinergiques et hyperexcitabilité neuronales (Lemoine *et al*, 2012; Tsuda *et al*, 2003; Inoue *et al*, 2004; Coull *et al*, 2005; Jarvis, 2010; Bernier *et al*, 2012) (Figure 3).

2.1.4 Aspect pharmacologique

La pharmacologie est une branche de la biologie, s'attachant à la compréhension de l'interaction entre des molécules et des organismes vivants. Cet outil a permis, par l'utilisation de diverses molécules, et par la compréhension de leurs actions sur les cibles étudiées, le développement de médicaments.

Les médicaments agissant sur les canaux ioniques sont parmi les thérapies les plus anciennes avec la quinine, la procaïne et le curare. En plus de visée thérapeutique, la pharmacologie a permis la compréhension de certaines voies de communication ainsi que la classification de l'ensemble des Ligand Gated Ion Channel.

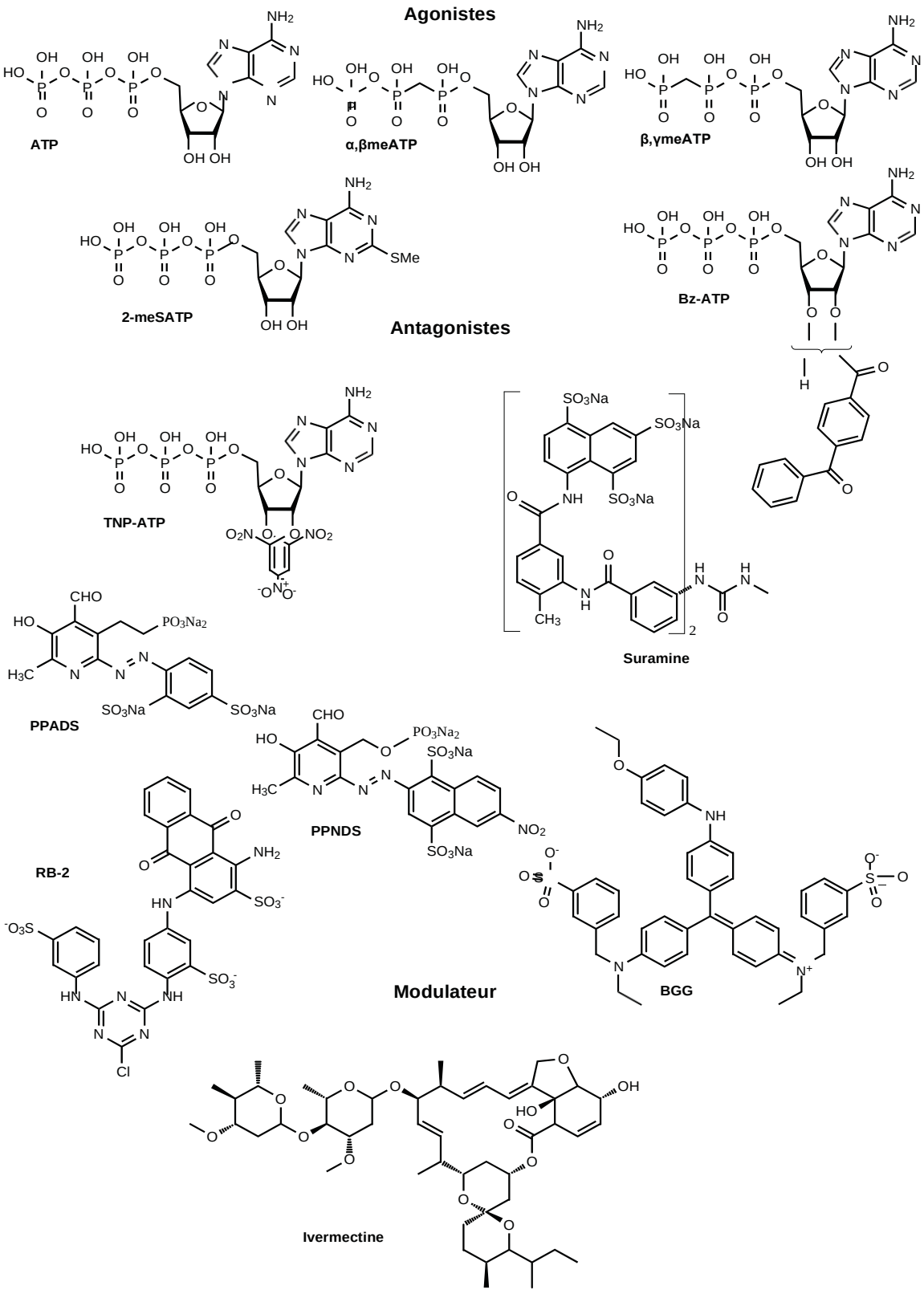

Figure 4.Structure chimique des principaux agonistes, antagonistes et modulateur des récepteurs P2X

Les récepteurs canaux P2X constituent une classe de récepteurs liants l'ATP, mais surtout contribuent à de nombreux rôles physiopathologiques (Figure 3). Le développement de stratégies thérapeutiques visant les récepteurs P2X accusent un retard par rapport aux autres LGICs. Ces derniers sont déjà la cible de médicaments largement prescrits comme les benzodiazépines ou des inhibiteurs calciques. Les études visant à la détermination d'agonistes et d'antagonistes sont en croissance constante, portées par les déterminations cristallographiques structurales et l'utilisation de méthodes de criblages haut débit.

En plus de l'intérêt thérapeutique, le développement de ligands permet de caractériser et différencier les différentes sous unités. C'est pourquoi il est important de différencier les divers ligands des récepteurs selon leurs sélectivités élargies à l'ensemble des récepteurs ou ciblant un seul sous-type.

L'agoniste principale des récepteurs P2X est l'ATP endogène dont l'affinité est proche du micromolaire pour les récepteurs P2X1 à P2X6. Ce sont des concentrations de l'ordre du millimolaire qui permettent l'activation du récepteur P2X7. Cette différence permet de discriminer le récepteurs P2X7 des autres récepteurs de la famille des P2X. Comme il est décrit dans les parties précédentes, l'ATP permet d'activer les récepteurs métabotropiques P2Y et spécifiquement les sous types P2Y2, P2Y4 et P2Y11 (Wildman *et al*, 2002). Cette faible sélectivité a encouragé les études et le développement de différents agonistes. Les principaux agonistes développés sont issus de modification chimique de l'ATP (Tableau 4).

Le 2-meSATP (2-methylthioATP), issue d'une modification au niveau de l'adénine, est au même titre que l'ATP un agoniste entier qui cible l'ensemble des récepteurs P2X. Contrairement au αβ-meATP (α,β-méthylène-ATP), issus de la modification au niveau des phosphates, qui cible seulement les sous types homomériques P2X1, P2X3, P2X5 et les sous types hétérométriques P2X2/3. De plus, le βγmeATP (β, γ-méthylène-ATP), cible préférentiellement les sous type P2X1 et P2X5. Le Bz-ATP (2'(3') -O-4-benzoylbenzoyl-ATP) obtenu par une modification au niveau du ribose, est un agoniste ciblant les récepteurs P2X, mais offrant une affinité plus importante que l'ATP pour le récepteur P2X7. L'αβ-meATP et le βγmeATP semblent ne pas interagir avec les P2Y

contrairement au Bz-ATP qui cible P2Y11 et P2Y13 (Lewis *et al*, 1995; Wildman *et al*, 2002; Lynch *et al*, 1999; Donnelly-Roberts *et al*, 2009; He *et al*, 2003).

	Sous-unité des récepteurs P2X					
	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X7
Composés	CE_{50} (µM)					
ATP	0.1-0.7	2-8	1	1-10	0.5-4	2.4mM
2MeSATP	0.1-1	1	0.3	10.100	0.5	200
αβmeATP	0.1-1	>100	1-2	>300	10	>300
β,γ-meATP	2	>300	>300	>300	10	>300
ATPγS	1	10	10	-	0.5	-
Ap3A					5	-
Ap4A	0.04	15	1	2-10	0.3	-
Ap5A	1-3		1		0.7	-
Ap6A	1		1.5		5	-
BzATP	0,7-24	6-30	-	3	-	10
CTP	-	-	-	200	-	-

Tableau 4. Pharmacologie des récepteurs P2X: Les agonistes adapté de (Coddou et al*, 2011)*

A l'heure actuelle, aucun agoniste ne cible préférentiellement un sous type, ce qui ne permet pas de discriminer les différents sous types au sein de l'organisme.

Des antagonistes des récepteurs P2X (Tableau 5) ont été conçus sur la base de modifications sur l'ATP. Le TNP-ATP (trinitrophényl ATP) et les dérivés di et mono phosphate ont une action inhibitrice sur les récepteurs P2X1, P2X3, et P2X2/3 avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Virginio *et al*, 1998b). D'autre part, l'ATP oxydé agit comme un bloqueur spécifique du récepteur P2X7 de souris (Michel *et al*, 2000). L'utilisation de l'IP5 (inositol pentakisphosphate) permet une inhibition des courants P2X1 et P2X3 (King *et al*, 1999). L'IP4 (inositol tetrakisphophate) inhibe préférentiellement le récepteur P2X3 (King *et al*, 1999).

La suramine, une molécule polysulfonée, est l'une des antagonistes compétitifs des récepteurs les plus utilisés. Mais contrairement aux deux derniers exemples, la suramine ne cible pas spécifiquement les récepteurs P2X mais permet aussi l'inhibition de la protéine G, de protéases, et de la tyrosine phosphatase. En plus de son action d'inhibiteur, la suramine permet la stimulation des récepteurs de la ryanodine. Son mode d'action sur les récepteurs P2X dépend des sous type visés. Ainsi selon les modifications apportées aux différents sous types, on observe une sensibilité variable. Ce qui indique que les régions d'action varient selon différents sous types (Evans *et al*, 1995; Wildman *et al*, 2002; Lewis *et al*, 1995; Brake *et al*, 1994).

Des dérives de la suramine (le NF023, NF449, NF864) présentent une activité antagoniste des récepteurs P2X. Le NF023 par exemple, inhibe plusieurs P2XR homomériques et hétéromériques exprimés dans des ovocytes de *Xenopus laevis* , mais il est plus puissant sur P2X1R (Soto *et al*, 1999). NF279 n'affecte pas l'activation des récepteurs de l'adénosine et présente une faible activité inhibitrice sur les P2YR et les ectonucléotidases, et mais il produit un effet antagoniste les P2XR (Damer *et al*, 1998) montrant un plus grand effet à P2X1R et P2X7R (Klapperstück *et al*, 2000; Donnelly-Roberts *et al*, 2009)

Le PPADS (Pyridoxal 5-phosphate L'acide 6-azophényl-2 ', 4'-disulfonique) bloque les P2X1Rs, P2X2Rs, P2X3R et P2X5Rs homomériques, ainsi que les récepteurs P2X2/3, P2X1/5 et P2Y1 hétérométriques, alors qu'il est faible ou inefficace en tant qu'antagoniste chez les récepteurs P2X4 de rat, de P2X6, de P2X7 et plusieurs récepteurs P2Y. Des études réalisées afin de déterminer le site d'action a permis d'exposer la région 81 à 183 de récepteurs P2X4 (Garcia-Guzman *et al*, 1996), et spécifiquement l'A126 (Michel *et al*, 2008), comme contributrice à

l'insensibilité au PPADS. Le PPNDS (l'acide pyridoxalphosphate-6-azophényl-2 ', 5'-disulfonique) dont la structure est proche du PPADS, permet une inhibition plus importante des réponses des récepteurs P2X. Son action sur les P2Y est 50 fois moins importante. D'autres dérivés du pyrridoxol phosphate semble avoir une activité inhibitrice prometteuse (MRS2220, MRS2159 et MRS2257).

La classe des composés anthraquinoniques est également utilisée pour inhiber P2X. Des différences existent selon l'isomère utilisé. Ainsi les effets antagonistes de la RB-2 ont été observés dans diverses réponses physiologiques médiées par l'ATP, telles que la contraction du muscle lisse de la vessie urinaire chez le rat (Hashimoto & Kokubun, 1995), les potentiels de jonction inhibitrice du caecum du rat (Manzini *et al*, 1986) et l'influx ioniques dans les cellules actiniques parotides de rat (Soltoff *et al*, 1990)

		Sous-unité des récepteur P2X					
		P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X7
Classe des composés	Composés	CI_{50} (µM)					
Dérivée ATP et nucléotides	TNP-ATP	0.0006	2	0.0009	15	0.6-0.7	>30
	oATP	-	-	-	-	-	100-300
	Ip4I	0.6	Inactif	1	1.7	-	-
	Ip5I	0.003	Inactif	3	0.002	-	-
Suramine et analogues	Suramine	1-2	10	3	>300	2-3	>300
	NF023	0.2	-	8.5	>100	-	-
	NF279	0.02	1	2	-	-	3-20

	NF449	0.005	-	3	-	-	-
	NF770	-	0.019	-	-	-	-
	NF776	-	0.097	-	-	-	-
	NF778	-	0.140	-	-	-	-
	PPADS	1	1-3	1.5	>300	0.2-0.6	10-45
Pyrridoxol phosphate et analogues	PPNDS	0.015	-		-		1-10
	MRS2220	10	-		-		-
	MRS2159	0.009	-	0.150	-		5
	MRS2257	-	-	30	-		-
	RB-2	-	05	45	-	-	-
Dérivés d'anthraquinones	PSB-1011 ou RB4	0.4	0.079	0.5	>10	-	10
	PSB-10211	-	0.086	-	-	-	-
Analogues du tréméthoprime	RO-4	>100	-	0.013	-	-	-
	RO-51	>10	-	0.01	-	-	-
	RO-85	>10	0.032	0.03	>10	>10	>10
Divers composés organiques	RO-0437626	3	-	-	-	-	-
	KN-62	-	-	-	-	-	10
	A-317491	-	-	-	-	-	-

	Paroxétine	-	-	-	2	-	-
	BBG	>5	1.4	>10	3-100	0.5	0.002-0.7

Tableau 5 Pharmacologie des recepteurs P2X: Antagoniste adapté de (Coddou et al*, 2011; Burnstock & Verkhratsky, 2012a)*

Contrairement aux agonistes, le développement d'antagonistes a permis l'émergence de molécules sélectifs pour un seul sous types. Cependant, les agonistes et les antagonistes ne représentent pas les seules molécules permettant la régulation et la différenciation des récepteurs P2X. En effet, l'effet de modulateurs allostériques (Tableau 6) permet de contribuer à caractériser les récepteur P2X.

Une des premières descriptions de la modulation allostérique fut celle de l'implication de composés exogènes dans la régulation de l'activité enzymatique (Monod *et al*, 1965). L'activité enzymatique dépend non seulement de la disponibilité du substrat mais aussi de l'activité certaine se fixant sur des sites indépendants. Plus tard, cette définition fut étendue à l'action de coopération positive dans la liaison de deux molécules l'acétylcholine sur les récepteurs nicotiniques (Changeux *et al*, 1968, 1969). Dans le cas des récepteurs ionotropiques P2X, il existe plusieurs types de modulateurs allostériques.

Une des caractéristiques des récepteurs P2X est leurs modulations par des ions métalliques. Mais surtout les effets obtenus sont différents selon le métal employé et les différentes sous unités (Tableau 6). Plusieurs acides aminés jouent un rôle important dans la modulation allostérique des ions métalliques. L'ion zinc a des effets différents selon le sous type. Sur les récepteurs P2X1 et P2X7 le Zn^{2+} va inhiber les courants, contrairement aux autres sous types où il aura tendance à les potentialiser (Wildman *et al*, 1999, 2002). Les ions cuivriques n'ont pas d'action sur les récepteurs P2X1, P2X3, P2X5 mais contribuent à la modulation des autre sous types (Lorca *et al*, 2005; Acuña-Castillo *et al*, 2000). D'autres ions métalliques contribuent à la modulation allostérique des récepteurs, notamment les ions mercuriques et l'ion cadmium (Coddou *et al*, 2005, 2009).

L'IVM (ivermectine) est un modulateur allostérique spécifique des récepteurs homomériques et hétérométriques P2X4 de mammifère. L'IVM est un membre de la famille des avermectines ; Il est largement utilisé comme agent antiparasitaire en médecine humaine et vétérinaire. L'utilisation de l'IVM permet de potentialiser la réponse des récepteurs P2X4. Son site de fixation, initialement situé dans les parties extracellulaires, se situerait plutôt dans la partie transmembranaire (Ikeda, 2003; Priel & Silberberg, 2004; Khakh *et al*, 1999b).

Les protons extracellulaires permettent une régulation de l'ensemble des récepteurs P2X. Cette absence de sélectivité n'empêche pas des effets différents selon les sous-types. Le pH acide induit par les protons va potentialiser le courant sur le récepteur P2X2 alors qu'il va l'inhiber sur les autres sous types. La fixation des protons est souvent localisée sur des résidus contenant des acides carboxyliques et des histidines (Clarke *et al*, 2000; Clyne *et al*, 2002; Gerevich *et al*, 2007; Yan *et al*, 2005).

D'autres modulateurs allostériques existent, comme le H2O2, le monoxyde de carbone, les phosphoinositides, ou des protéines kinases. Ils contribuent tous à la régulation des récepteurs P2X. L'ensemble de toutes ces molécules permet de caractériser l'ensemble des récepteurs P2X. De plus, faute de trouver le candidat idéal dans les agonistes ou les antagonistes, les modulateurs allostériques peuvent être employés dans des voies thérapeutiques visant spécifiquement les récepteurs P2X.

	Sous-unité des récepteur P2X					
	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X7
Composés				CE_{50}		
Zinc(µM)	1*	30[p]	10 [p]	5 [p]	10 [p]	80*
Cuivre (µM)	-	3 [p]	-	10*	-	2 [p]
Cadmium (µM)	*	3 [p]	*	20		100*
Mercury* (µM)		3 [p]		10*		10*
Protons (pH)	6.3*	7.3 [p]	6*	6.8*	-*	6.1*
H2O2 (mM)	-	0.3 [p]	-	1*	-	-
CO		*		*		-
IVM (µM)		Pas d'effet	Pas d'effet	3*	-	Pas d'effet
Ethanol		*				

Tableau 6 Pharmacologie des récepteurs P2X : Modulateurs allostériques : Inhibiteur (*), potentiateur ([p])

2.2 Propriété moléculaire, fonctionnel et biophysique du pore

2.2.1 Structure des récepteurs P2X

La première structure cristallographique fut seulement publiée en 2009 (Kawate *et al*, 2009). Dans un premier temps dans un état fermé, puis en 2012 (Hattori & Gouaux, 2012) co-

cristallisé avec l'ATP dans son site de fixation dans un état ouvert confirmant ainsi les résultats précédemment obtenus au sein de notre laboratoire (Jiang *et al*, 2011). Pour obtenir ces cristaux, la séquence fut néanmoins tronquée au niveau du C-ter et du N-ter, laissant une incertitude structurale pour cette partie importante du récepteur. Or depuis 2016, une nouvelle structure cristallographique a permis de retirer une partie du voile concernant les segments intracellulaires (Mansoor *et al*, 2016). Une autre structure publiée en 2016 a permis de révéler la topographie tridimensionnelle du récepteur P2X7 (Karasawa & Kawate, 2016) venant compléter les premières structures cristallisant les récepteurs P2X4 (Figure 5A/C). (Kawate *et al*, 2009; Hattori & Gouaux, 2012) et P2X3 (Mansoor *et al*, 2016) (Figure 5B/D).

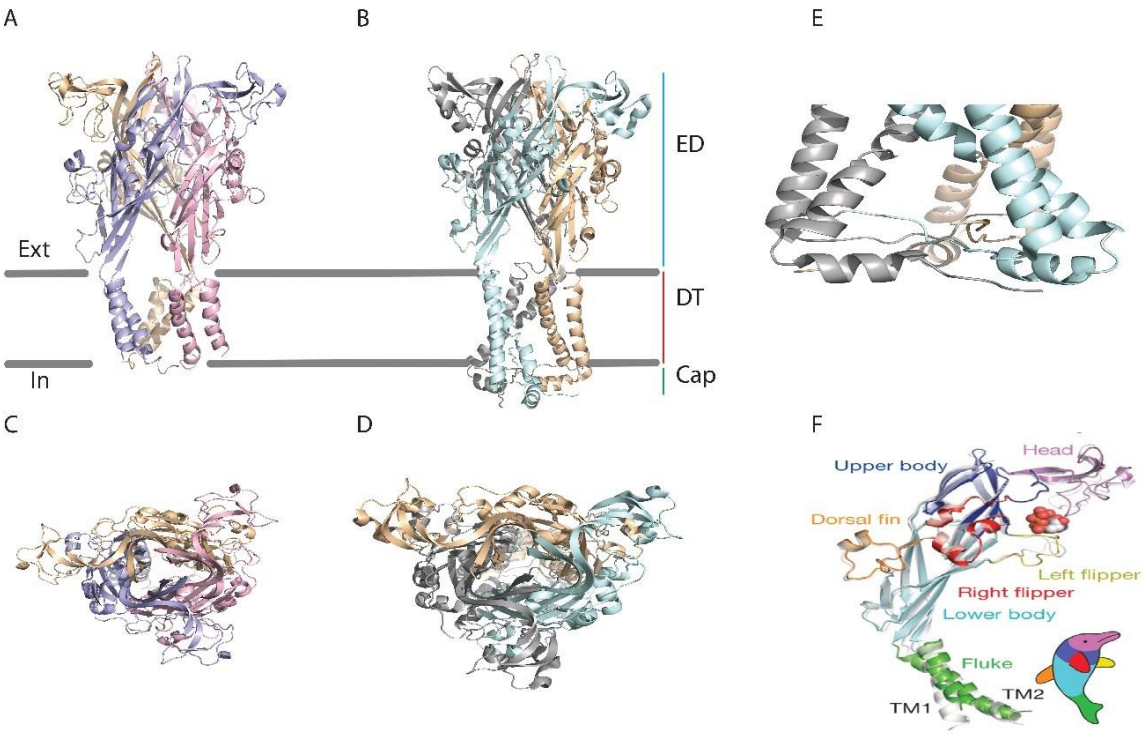

Figure 5 Architecture des récepteur P2X. Structure cristallographique du A) P2X4 du poisson zèbre (ΔN27/ΔC24) C) P2X3 d'humain (ΔN5ΔC33). Vue du haut C) P2X4 et D) P2X3. E) Zoom sur la partie du bouchon cytoplasmique (CAP) F) sous unité homologie avec un dauphin(Hattori & Gouaux, 2012)

Chaque sous-unité est donc composée de trois parties : l'ectodomaine, la partie transmembranaire porté par deux segments TM1 et TM2 et la partie intracellulaire. La forme générale de chaque sous-unité est comparable à celle d'un dauphin composé d'un corps, d'une tête, d'une queue, d'une nageoire dorsale et deux nageoires (Figure 5F).

2.2.1.1 La partie extracellulaire l'Ectodomaine

La large boucle extracellulaire compose la plus grande partie de la protéine (280-300 acides aminés). Elle est longue de 70 Å et est composée de résidus hautement conservés, organisés en une structure rigide en feuillet β et stabilisés par cinq liaisons disulfures. L'ectodomaine contient le site de fixation des différents agonistes et antagonistes mais surtout le site orthostérique qui se situe à l'interface deux sous unités adjacentes. Au nombre de trois, les sites de fixation de l'agoniste naturel sont contenus dans une poche. Cette poche est formée par des résidus fortement conservés dont chaque acide aminé joue un rôle dans la stabilisation de l'ATP. Les résidus lysines 70, 72, 316 et les résidus asparagine 296 et arginine 298 participent à la stabilisation des trois phosphates contenus dans l'ATP. Les résidus lysine 70, thréonine 189 forment des liaisons hydrogènes avec la base de l'adénine. Et enfin les résidus leucine 191 et isoleucine 232 coordonnent l'adénine (Figure 6d) (Jiang *et al*, 2011; Hattori & Gouaux, 2012; Chataigneau *et al*, 2013; Habermacher *et al*, 2016a). En plus du site de fixation de l'ATP, l'ectodomaine comporte les portes d'entrées des ions extracellulaires. Deux voies potentielles à travers lesquelles les ions peuvent accéder au pore ont été identifiées : une voie centrale, par laquelle les ions entrent dans le canal verticalement par l'intermédiaire de trois vestibules connectés et positionnés le long de l'axe central du récepteur, ou alternativement, une voie latérale située au-dessus de la zone Gate. Cependant, les études d'accessibilités MTS et les calculs d'énergie électrostatique libre (Kawate *et al*, 2011; Samways *et al*, 2011) suggèrent fortement que les ions extracellulaires utilisent la voie latérale, entrant dans le canal préférentiellement par des ouvertures appelées fenestrations, avant de s'écouler par le pore ionique lui-même.

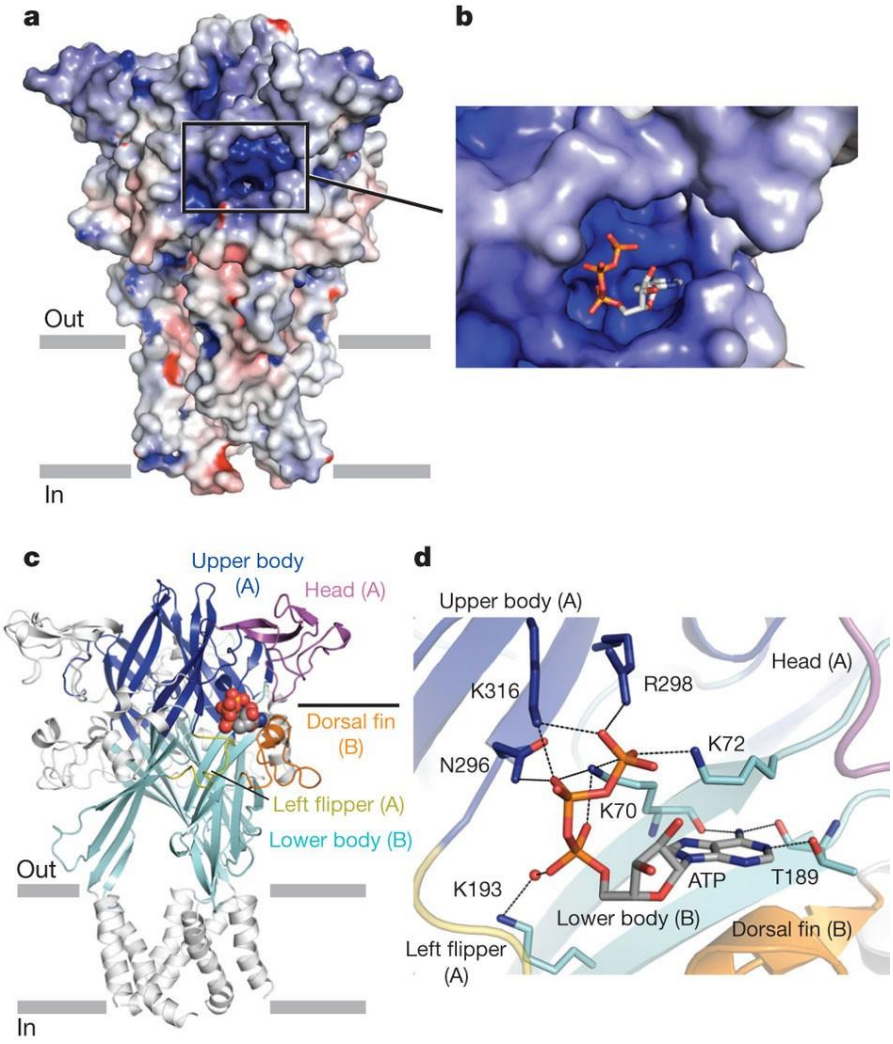

Figure 6 Site de fixation de l'ATP. a) et b) Représentation en potentiel électrostatique. c) Les régions formant la poche de fixation de l'ATP. d) Vue rapproché du site de fixation (Hattori & Gouaux, 2012)

Les fenestrations sont fondamentales dans la voie de perméabilité cationique. Elles sont situées au niveau de la membrane et au niveau latéral des récepteurs P2X. La partie haute de la protéine (le corps du dauphin), constituant l'ectodomaine est prolongée par les deux segments transmembranaires.

2.2.1.2 Le domaine transmembranaire, zone du Gate

Les domaines transmembranaires mesurent en moyenne 28 Å et traversent la membrane sous un angle d'environ 45° par rapport au plan de la membrane. La partie transmembranaire, dans l'ensemble hydrophobe, est constituée de deux domaines transmembranaires organisés en hélice alpha. La taille de ce domaine est suffisamment long pour traverser la membrane de part en part. La région du domaine transmembranaire rappelle la forme d'un sablier formé par les 6 hélices alpha de l'ensemble des 3 sous unités. Dans chaque sous unité, TM1 est positionné à la périphérie de TM2 dont l'association avec les autres hélices forment le pore ionique. Le pore du récepteur est délimité par la région hydrophobe entre la leucine 340 et l'alanine 347. Le pore est centré sur le résidu alanine 344 ou le diamètre à ce niveau est le plus court. Le domaine transmembranaire se prolonge dans la partie intracellulaire pour terminer par le domaine terminal. Des études de SCAM (scanning cysteine accessibility method) ont été produites afin de permettre la compréhension de la contribution du domaine transmembranaire et spécifiquement le TM2 (Samways *et al*, 2014). La découverte de nombreux hit le long de TM2 en découle. Les cystéines introduites à chaque chaine latérale unique entre la thréonine 336 et la phénylalanine 346 sont accessibles à la modification par des composés réactifs aux thiols. De plus, des études avec trois agents thiol réactif, MTSEA +, MTSET + et MTSES- ont permis d'exposer le rôle important des résidus Isoleucine 328, asparagine 333 et thréonine 336 thréonine 339, Serine 340, Glycine 342, et l'acide aspartique 349 sur les récepteurs P2X2. (Rassendren *et al*, 1997a) (Samways *et al*, 2014)

2.2.1.3 La partie cytoplasmique

La partie cytoplasmique ou capuchon cytoplasmique (Figure 5E) (Mansoor *et al*, 2016) inclut des éléments de structure secondaire provenant des deux extrémités, comprenant deux brins ß séquentiels de l'extrémité N et un brin ß de l'extrémité C. Chacun des trois feuillets β incorpore un brin ß de chacune des trois sous-unités, illustrant comment les sous-unités du

récepteur se chevauchent et créent un maillages complexe sur le côté cytoplasmique de la membrane. Depuis la publication de la structure cristallographique du récepteur P2X3 possédant la partie transmembranaire entière et une grande partie de la partie intracellulaire, nous connaissons l'importance de ce bouchon cytoplasmique. Toute cette partie va donc jouer un rôle dans la stabilisation de l'état ouvert mais aussi dans le passage des ions dans la partie cytoplasmique. Complétant les données des anciennes structures, cette nouvelle structure montre que la sortie des ions du pore dans le cytoplasme s'effectue par des fenestrations latérales de forme triangulaire formé par les hélices TM2 et le bouchon cytoplasmique et des phospholipides de la membrane.

2.2.1.4 Le processus d'ouverture du canal : Le Gating

Le processus d'ouverture du canal est un mouvement complexe de l'ensemble de la protéine. L'ATP extracellulaire va se loger à l'interface de deux sous unités adjacentes, dans une poche communément appeler mâchoire. Suite à la fixation de l'ATP, la mâchoire va se refermer suite au rapprochement de la tête et de la nageoire dorsale. Ceci va initier tout un mouvement dans la partie du domaine transmembranaire et cytoplasmique. Le mouvement combiné de la nageoire dorsale et de la nageoire gauche va induire un fléchissement de la partie basse du corps. Cela se traduit par :

- Une rotation dans le sens inverse des aiguilles d'une montre de TM2 pour ouvrir le port dans un mouvement analogue à l'iris.
- Un changement de pas hélicoïdal pour un virage de TM2 d'une hélice alpha à une hélice 3 10.
- La formation du bouchon cytoplasmique, qui ancre les surfaces cytoplasmiques des domaines transmembranaires et fournit des fenestrations cytoplasmiques à travers lesquelles les ions sortent du pore.

2.2.2 Sélectivités ioniques

Afin de caractériser et différencier les récepteurs P2X, l'utilisation des différents ligands et de modulateurs permet en partie d'apporter une partie de la solution. Cependant, un autre paramètre communément utilisé pour distinguer les sous unités P2X consiste à mesurer la désactivation et désensibilisation des canaux (Figure 7). Les récepteurs P2X1 et P2X3 subissent une désensibilisation très rapide de l'ordre de centaines de millisecondes, avec un temps de récupération extrêmement lente. Les récepteurs P2X2, P2X4 et le P2X2/3 présentent une désensibilisation plus lente, tandis que le récepteur P2X7 ne présente aucune désensibilisation (North, 2002).

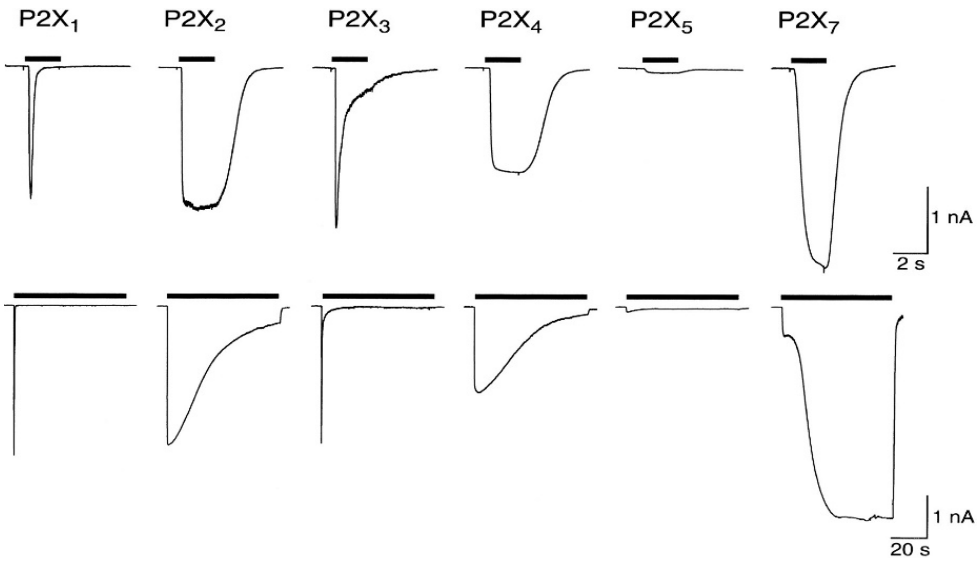

Figure 7 Désensibilisation des différents récepteurs P2X. Application courte (haut) et longue (bas) (North, 2002)

La caractérisation des courants ioniques est obtenue par une technique d'électrophysiologie, le Patch Clamp. Rappelons que le courant ionique est induit par un mouvement des ions à travers les membranes selon un gradient électrochimique. Ce gradient électrochimique ioniques favorise, dans le cas des canaux cations sélectifs, l'afflux de cations provoquant une dépolarisation et une

élévation de la concentration du $Ca^{2+.}$ Cette dépolarisation est suffisante pour déclencher une propagation du potentiel d'action.

La technique de Patch Clamp fut utilisée la 1ère fois par Neher et Sakmann en 1976 (Neher & Sakmann, 1976) afin de résoudre les courants transitant à travers les canaux, activés par l'acétylcholine dans des patch de la membrane du muscle squelettique de grenouilles. La technique consiste à mettre en continuité électrique une micro pipette et les membranes cellulaires. La technique repose sur l'utilisation de la loi d'Ohm avec U=R.I. Il existe plusieurs configurations du Patch Clamp (Figure 8). Le whole cell ou cellule entière permet de mesurer l'ensemble des courants portés par les canaux à la surface d'une cellule. Cette configuration permet d'avoir un contrôle sur le milieu extracellulaire et intracellulaire. Le cell attached ou cellule attachée permet de mesurer les courants de l'ensemble des recepteurs prient sous la pipette pouvant aller au canal unique. Dans ce cas, aucun contrôle du milieu intracellulaire n'est possible car, contrairement au whole cell, la membrane reste intacte. L'avantage est que cela ne perturbe pas le cytosquelette. Les configurations Outside-out et Inside-out permettent la mesure du courant d'un seul canal. Ils sont le résultat de l'arrachement d'un fragment de la membrane. La différence notable de ces deux techniques est la face en contact avec la pipette. L'Outside-out permet la mesure de l'action de ligand ou modulateur sur des récepteurs dans la partie extracellulaire. Dans le cas Inside-out, quand le patch est obtenu, l'étude se porte sur la partie cytoplasmique. Cette technique permet de quantifier les courants ioniques des récepteurs P2X.

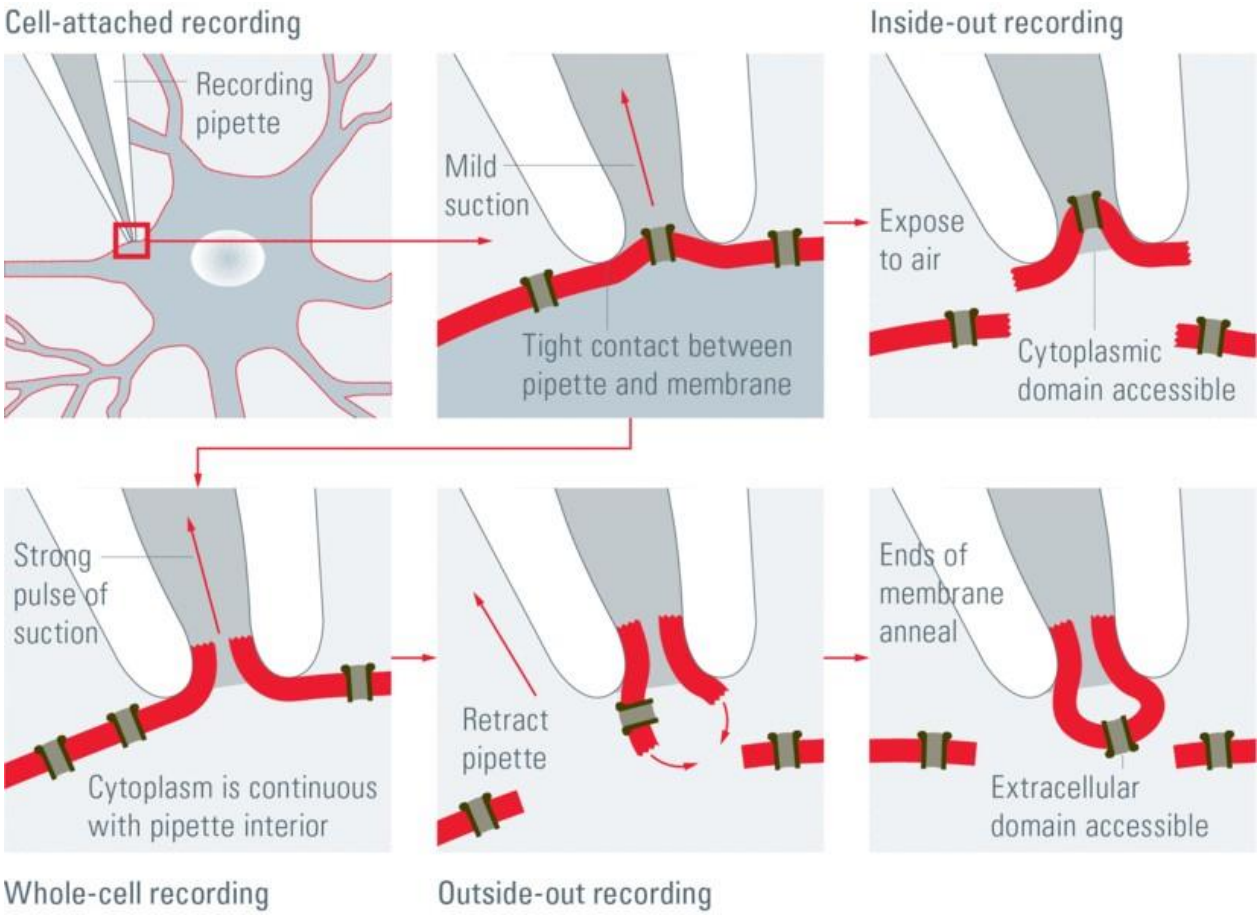

Figure 8 Les différentes configurations du Patch Clamp (Veitinger, 2011)

La technique de Patch permet donc de mesurer l'ensemble du flux ionique transitant à travers la membrane plasmique et notamment dans les canaux des récepteurs P2X. Ces derniers sont généralement décrits comme des canaux cationiques non sélectifs. Dans des conditions physiologiques, les récepteurs P2X sont tous exclusivement perméant au Na^+, K^+ et Ca^{2+}. Certains récepteurs P2X5 recombinants ne sont plus cations sélectifs car en plus des cations ils présentent une perméabilité anionique telle qu'au Cl^-. Différentes études en canal unique ont permis de caractériser les sélectivités des récepteurs P2X. Les premières études s'intéressant à la perméabilité qui permit de mettre en évidence une séquence de perméabilité pour les recepteurs P2X (Ding & Sachs, 1999). Ainsi, les P2X sont perméants au $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$. À cela se rajoute des tests en présence de cations organiques de tailles variables, qui montrent que les récepteurs P2X2 sont imperméables aux $NMDG^+$, au $Tris^+$, au TMA^+ et au TEA^+. Les cations

divalents, selon leurs concentrations, bloquent le canal et notamment le $Mn^{2+,}$ $Mg^{2+,}$ Ca^{2+}, Ba^{2+}. La manière exacte dont les P2XR à sélectivité cationique prédominent entre les cations et les anions n'a pas encore été déterminée de manière adéquate.

Récepteur	La perméabilité calcique
P2X1	3.6–3.9
P2X2	2.2–2.9
P2X3	1.2
P2X4	4.2–4.6
P2X5	n.d.
P2X7	35

Tableau 7 Perméabilité calcique

Les récepteurs P2X ont une sélectivité similaire aux cations monovalents, mais arborent des différences dans la sélectivité aux cations divalents. Les récepteurs P2X1 et P2X4 présentent une perméabilité calcique supérieure aux autres récepteurs P2X (Tableau 7). Certains acides aminés ont un rôle important dans cette perméabilité calcique. Plus précisément, il a été prouvé que la substitution des résidus polaires Thréonine 336, Thréonine 339 et Sérine 340 avec des résidus hydrophobes d'une taille similaire supprimait presque entièrement la sélectivité entre Ca^{2+} et Na^{+} (Migita *et al*, 2001).

Plutôt qu'un locus structural spécifique existant pour la sélectivité ionique, les données suggèrent qu'un certain nombre de sites existent : à l'intérieur de la voie de perméation à canal ouvert, certains à l'intérieur des portails latéraux et d'autres profondément dans le pore transmembranaire étroit. Ils contribuent à cette propriété essentielle du canal ionique. En effet, la sélectivité et la conductance des ions semblent être des propriétés dynamiques des récepteurs P2X (Khakh & Lester, 1999; Samways *et al*, 2012).

Les récepteurs P2X sont donc prédisposés à s'organiser en plusieurs états allostériques. L'état de repos fermé imperméant aux cations se modifie suite à l'activation des récepteurs par l'ATP. Le canal s'ouvre et passe dans un état I1 perméant aux petits cations. Selon le sous type et la durée d'application de l'agoniste, certains canaux se désensibilisent passant d'un récepteur dans un état I1 a un état désensibilisé. Ces trois états allostériques du récepteur sont communs à l'ensemble des récepteurs P2X, à l'exception du sous type P2X7 qui ne présente aucune désensibilisation.

Par ailleurs, des études ont montré que certains sous types présentent une perméabilité aux gros cations à partir d'un certain temps d'application de l'ATP. Cet état particulier de conductance, autrement appelé état I2, sera largement détaillé dans la partie suivante.

3 La dilatation du P2X, un état controversé

3.1 Bref historique

Afin de bien comprendre la notion de dilatation, il est nécessaire de comprendre d'où vient ce terme et quelles ont été les différentes étapes sous-jacentes à la découverte de cet état de conductance particulier. Cette découverte fut obtenue en plusieurs étapes. La 1ère première étape fut l'observation par Cockcroft et Comperts en 1979 de la perméabilisation membranaire des mastocytes (Cockcroft & Gomperts, 1979). Il a en effet été démontré que la perméabilisation est induite par la mise en présence d'ATP, permettant l'évacuation de produits phosphorylés issus du métabolisme intermédiaire. Associé à l'activation des récepteurs P2, la perméabilisation membranaire fut par la suite étudiée par des mesures d'incorporation et de fluorescence par le biais de colorants de tailles moléculaires importantes de plusieurs centaines de dalton. L'ATP a consécutivement causé l'incorporation :

- D'un colorant cationique (bromure d'éthidium) par les mastocytes (Gomperts, 1983).
- De colorants anioniques tels que le jaune Lucifer et le 6-carboxyfluoreceine par les mastocytes (Bennett *et al*, 1981) et les macrophages (Steinberg *et al*, 1987).

Très rapidement cette perméabilisation fut liée au récepteur P2Z, terme employé pour la première fois en 1990 (Soltoff *et al*, 1990). Le récepteur P2Z a permis de mettre en relation la forte sensibilité à l'ATP, la perméabilisation membranaire et la mort cellulaire observée durant les différentes expériences. Afin de décrire spécifiquement le passage des grosses molécules, le terme de Z Pore fut employé.

Durant de nombreuses années le récepteur P2Z fut considéré distinctement des récepteurs P2X et P2Y, sensibles à l'ATP. Ces caractéristiques de perméabilisation ont en outre focalisé l'attention

sur le récepteur P2Z, et c'est seulement en 1996 que le récepteur P2Z (identifié comme P2X7) (Surprenant *et al*, 1996) a été cloné. En effet le récepteur P2X7 montrait des caractéristiques similaires au récepteur P2Z et notamment le changement de perméabilité en fonction du temps. Après une longue application d'ATP, les récepteurs P2X7 deviennent perméant a un c. Ce fut la 1ère preuve que le canal de l'un des récepteurs P2X devenait perméant à un colorant cationique (le YO-PRO-1), par un changement de sélectivité.

Cependant la 1ère occurrence du mot dilatation pour décrire ce phénomène survient en 1999, avec la publication de deux articles majeurs (Virginio *et al*, 1999b; Khakh *et al*, 1999a). Ainsi la dilatation décrit le phénomène du passage de cations organiques de grosses tailles dans le pore des récepteurs P2X2 et P2X4. Ces cations de grosses tailles, et le $NMDG^+$ particulièrement, possèdent tous une taille supérieure au diamètre du pore suite à leurs activation par l'ATP. La dilatation exprimait la notion d'expansion du pore par mécanisme progressif sous l'application prolongé d'ATP. Mais surtout un changement de sélectivité du canal, passant d'une perméation sélective au petit cation (état du canal nommé I1) à un canal non sélectif aux molécules pouvant mesurer plusieurs centaines de dalton (état du canal nommé I2). Par la suite, de nombreux articles furent publiés, confirmant l'existence de cet état de conductance particulier du canal. La multiplication des conditions expérimentales ainsi que la variété des espèces et systèmes d'expression a permis d'ancrer la dilatation des pores P2X dans les thèmes de recherches des 20 dernières années. De plus, l'augmentation du nombre de publications a permis par la même occasion l'émergence d'un débat sur le mécanisme de dilatation. Et notamment sur deux mécanismes distincts ; le premier appelé le « gating model » correspond à une expansion intrinsèque du pore permettant le passage des gros cations par le récepteur et le second, nommé « pannexin model », qui coïncide avec le recrutement d'un autre canal que les molécules de grandes tailles traversent.

3.2 Le mécanisme de dilatation

Comme nous l'avons vu la découverte de la dilatation des pores des récepteurs P2X, coïncide avec la découverte des différentes sous-unités. Dans ce chapitre je vais discuter du phénomène de dilation dans son ensemble. Je commencerais par décrire les techniques employées pour la caractérisation de la dilatation, afin de nous familiariser avec certaines notions techniques. Puis nous allons voir les aspects cellulaires, et pharmacologiques de la dilatation en montrant la diversité des résultats pour introduire le débat sur mécanisme sous-jacent. Je finirai par décrire les aspects moléculaires.

3.2.1 Caractérisation de la dilatation deux techniques de choix

La découverte et la compréhension de la dilatation fait intervenir plusieurs techniques. La caractérisation du passage des grosses molécules fut tout d'abord caractérisée par fluorescence.

La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par une étape d'excitation pouvant être effectuée de diverses manières. Une des manières est d'utiliser une source lumineuse. Les photons qui en sont issus apportent l'énergie permettant aux molécules fluorescentes de se trouver dans un état électroniquement excité (après absorption de l'énergie d'un photon). Cet état se trouve souvent être un état singulet qu'on note S0*. Le retour à un état fondamental s'effectue par émission d'un photon qui peut être enregistré à certaines longueurs d'ondes (émission) (Lakowicz, 2013).

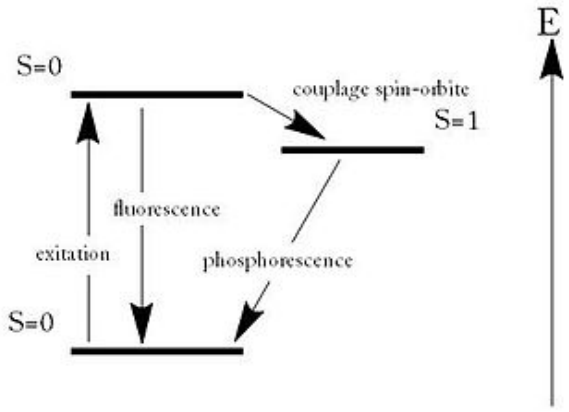

Figure 9 Fluorescence : Diagramme simplifié de Jablonski illustrant les transitions des états énergétiques

Les molécules fluorescentes utilisées, sont souvent des intercalants d'ADN qui émettent à des longueurs d'ondes spécifiques (Figure 10C). Dans le cas du YOPRO-1 (Figure 10D), la molécule est utilisée à la base comme marqueurs d'apoptose cellulaire. Cependant, dans le cas de la caractérisation de la dilatation, le YOPRO-1 est utilisé comme marqueurs de perméabilité membranaires de grosses molécules. Les cellules exprimant les récepteurs étudiés ne permettent pas le passage du YOPRO à travers la membrane sans activation. Suite à l'activation des récepteurs P2X par l'ATP extracellulaire, le récepteur se dilate et le YOPRO-1 passe le pore du canal en s'intercalant entre deux bases azotées empilées au cœur de la double hélice d'ADN. Suite à une excitation à 491nm, la fluorescence du YOPRO-1 est mesure à 509nm. Les avantages de cette technique sont les conditions non invasives de la mesure (la structure des cellules n'est pas modifiée) et l'utilisation de conditions se rapprochant des conditions physiologiques. Par contre, un des désavantages de cette technique est l'observation indirecte de la dilatation. En effet, la molécule a besoin de s'intercaler dans l'ADN pour qu'on puisse observer la fluorescence. D'autre molécules ont été utilisées en dehors du YOPRO-1 comme le jaune Lucifer, le bromure d'éthidium, le 6-carboxyfluorecein (6-FAM) ou l'iodure de propidium.

Une autre méthode est utilisée pour caractériser la dilatation et la mesure de la variation de perméabilité grâce à l'utilisation de l'électrophysiologie Patch Clamp (Figure 8).

Avant de pourvoir caractériser le changement de sélectivité, le potentiel d'inversion mesuré nous renseigne sur la perméabilité relative d'un ion par rapport un autre (figure 10A). Le potentiel d'inversion noté E_{inv} ou E_{rev} est la valeur du potentiel de membrane auquel il n'y a

pas de flux net (global) d'un ion particulier d'un compartiment cellulaire vers à l'autre. Concrètement, à la valeur du potentiel d'inversion d'un courant porté par un ion, le gradient électrochimique de l'ion est nul. Dans le cas d'une solution bi ionique, les changements observés du E_{rev} doivent refléter soit un changement dans la sélectivité ionique des canaux du récepteur, soit un changement des concentrations d'ions sur les deux côtés de la membrane. Cette nouvelle valeur du potentiel correspond à la somme des tous les flux d'ions perméants. La valeur du potentiel d'inversion dépend donc des ions perméants de part et d'autre de la membrane, mais aussi du facteur correspondant à leur capacité relative à franchir le canal. Ce facteur, dans le cas de deux ions perméants X et Y contenu dans deux milieux compartimentés, correspond à un rapport de perméabilité P_x/P_y. La valeur de ce facteur indique directement la perméabilité de l'ion X par rapport à l'ion Y.

Ce facteur est :

- Égal à 1 quand les deux ions perméants passent le canal de la même manière ou quand les deux ions sont identiques de part et d'autre de la membrane.
- Inférieur à 1 pour tout ion X moins perméant que Y.
- Égal à 0 quand l'ion X est complètement imperméant.
- Supérieur à 1 pour tout ion X est plus perméant que Y.

Ayant déterminé expérimentalement la valeur du potentiel d'inversion, il est possible de déterminé le rapport de perméabilité deux ions grâce à l'équation de GOLDMAN HODGKIN KATZ, formule dans le cas deux ions. (Joffre, 2001)

$$Erev = \frac{RT}{zF} Ln \frac{(P_B[B^+]e + P_A[A^+]i)}{P_B[B^+]i + P_A[A^+]e}$$

$$Erev = \frac{RT}{zF} Ln \frac{(P_B[B^+]e + P_A[A^+]i)}{P_B[B^+]i + P_A[A^+]e}$$

Équation 1 GOLMAN HODGKIN KATZ

Dans le cas des récepteurs P2X, le potentiel d'inversion est mesuré en présence $NMDG^+$ (Figure 10B) extracellulaire. Initialement le $NMDG^+$ est utilisé pour des tests de perméabilité car il était connu comme imperméant au canal sodique. Mais en substituant le Na+ extracellulaire par du $NMDG^+$ sur des cellules surexprimant certains récepteurs P2X, il fut mis en évidence que le potentiel d'inversion se déplace (shift) vers des valeurs plus positives. Or, comme nous l'avons vu, le E_{rev} est directement relié à la perméabilité relative des ions considérés. Dans le cas du récepteur P2X7 ce changement de E_{rev} correspondait à une augmentation de perméabilité des $NMDG^+$ dans le canal ionique.

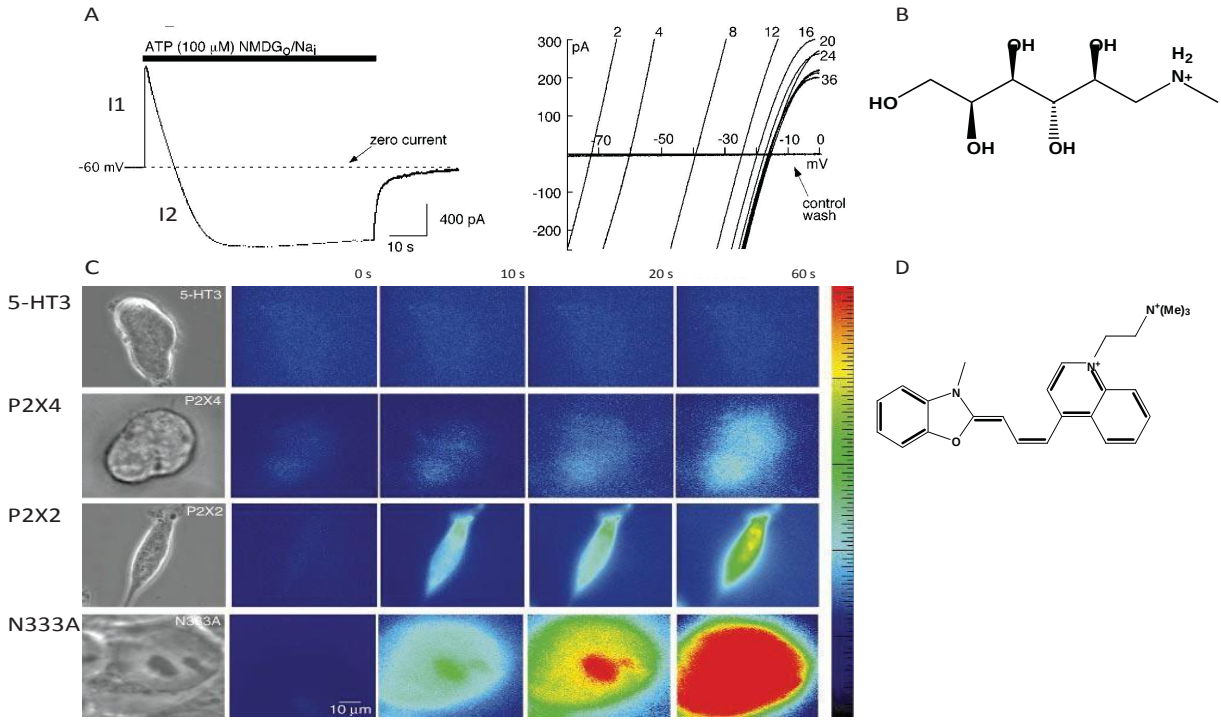

Figure 10 Différentes techniques de caractérisation de la dilatation. A) Enregistrement en Patch clamp ; Suite à l'application prolongé de l'ATP, le potentiel d'inversion change vers des valeurs plus positives indiquant une augmentation de la perméabilité au $NMDG^+$ des récepteurs P2X2 B) Structure du NMDG. C) Mesure d'incorporation du YO-PRO-1. D) Structure du YO-PRO-1

3.2.2 Aspect cellulaire de la dilatation

Le phénomène de dilatation est un mécanisme dont la variabilité d'observation apporte quelques incertitudes dans le traitement et l'interprétation des données recueillies. La dilatation n'a pas été observée à chaque fois qu'elle a été étudiée. Beaucoup de variables rentrent en compte. Les sous unités, les systèmes d'expression et les espèces étudiés montrent que la dilatation n'est pas un mécanisme universel. Le changement de sélectivité des pores ioniques est observé chez les récepteur homotrimériques P2X2, P2X4, P2X5, P2X7 (Virginio *et al*, 1999b; Khakh *et al*, 1999a; Rassendren *et al*, 1997b; Bo *et al*, 2003); et chez les récepteurs héterotrimérique P2X2/3 et P2X2/5 (Khakh *et al*, 1999a; Virginio *et al*, 1998a; Compan *et al*, 2012). Les récepteurs P2X1 et P2X3 ont également été étudiés (Fisher *et al*, 2004; Khakh *et al*, 1999a; Virginio *et al*, 1998a), néanmoins la désensibilisation observée chez ces récepteurs ne permet pas d'étudier la variation de la perméabilité au $NMDG^+$ au cours du temps. Cependant, des courants portés par le $NMDG^+$ sont enregistrés chez le récepteur P2X1, sans pouvoir quantifier le mécanisme dynamique de dilatation.(Evans *et al*, 1996). Une différence de la dilatation dans les différentes sous unités est l'observation d'un courant biphasique lors des enregistrements en électrophysiologie Patch Clamp. Seules les sous unités P2X7, P2X4, et P2X2/5 présentent ce courant biphasique (Virginio *et al*, 1999a; Toulme *et al*, 2010; Browne *et al*, 2013; Compan *et al*, 2012)

De manière très claire, en plus d'une distinction entre les différentes sous-unités, la dilatation est marquée par des différences entre plusieurs espèces d'un même sous- type. En effet, chez le récepteur P2X7, les trois espèces étudiées (rat, humain et souris) ne présentent pas la même dilatation (Hibell *et al*, 2000). Ainsi un classement sur l'importance de la dilatation montre que l'orthologue P2X7 du rat présente une dilation plus conséquente que celui de l'humain, qui lui-même se dilate plus que celui de la souris. Bien sûr, le système d'expression employé a pu au départ induire en erreur l'observateur. Les différents orthologues ayant été étudiés à chaque fois dans différents systèmes d'expression. Cependant, une étude conduite sur la dilatation sur les différentes espèces montre que dans les mêmes conditions expérimentales, les différences observées entre les différents orthologues est confirmé (rat › humain › souris). Une piste pour

expliquer cette différence, est la présence d'une mutation (le proline 451 leucine chez la souris) (voir partie 3.3).

Le récepteur P2X2, majoritairement étudié sur l'orthologue de rat, est marqué par la présence d'une différence majeure entre le rat et la souris. En effet, étudié dans les mêmes conditions, sur l'orthologue de souris le recepteurs ne présente aucune dilatation contrairement au récepteur P2X2 de rat. Des tests effectués en biologie moléculaire a montré que l'absence de dilatation chez la souris n'est pas influencée pas les conditions expérimentales mais correspondait à des différences au niveau de la structure moléculaire (Eickhorst *et al*, 2002).

Le récepteur P2X4 présente une dilatation dans tous les orthologues étudiés. Cependant le récepteur P2X4 exprimé dans les cellules C8B4 de microglie (Toulme *et al*, 2010) présente aucune incorporation de YOPRO-1-1.

Le récepteur P2X5 présente une dilatation chez l'humain (Bo *et al*, 2003) et chez le crapaud . Cependant la cinétique d'établissement de la dilatation est instantanée chez l'humain contrairement à l'orthologue du crapaud. Sur le P2X7, P2X2, P2X4 et P2X5 de crapaud, l'établissement de l'état perméant au $NMDG^+$ est dépendant du temps. La différence entre les deux espèces du P2X5 peut être due au système d'expression utilisé. L'orthologue humain HP2X5 est exprimé dans les cellules HEK293 tandis que celui du crapaud fP2X5 l'est dans des ovocytes de grenouilles (Tableau 8)

La diversité des systèmes d'expression utilisés pour l'étude de la dilatation ne montre aucune différence notable. La dilatation est observée par exemple, dans le cas du récepteur P2X7, à la fois dans un système Natif comme J774 (lignée cellulaire de souris) ou de macrophage et des systèmes tels que HEK293. Ces observations montrent que la dilatation ici n'est pas tributaire d'un système expression précis (Tableau 8).

Récepteurs	Système d'expression	Références
P2X2	HEK 293 (rat, souris), ovocyte(rat), neurone(rat)	(Eickhorst *et al*, 2002; Virginio *et al*, 1999b; Khakh *et al*, 1999a)
P2X4	HEK 293 (rat, souris), ovocyte (rat) C8B4 (rat), neurone (rat) microglie (souris)	(Toulme *et al*, 2010; Khakh *et al*, 1999a; Zemkova *et al*, 2015; Shinozaki *et al*, 2009; Bernier *et al*, 2012)
P2X5	HEK 293 (humain), ovocyte (crapaud)	(Bo *et al*, 2003; Jensik *et al*, 2001)
P2X7	HEK 293(rat, humain, souris), cellules microgliales NTW8 (sourit), THP-1(humain), neurone de l'hippocampe (rat), GTI (rat), macrophages (souris), J774 (souris), RAW264.7 (souris), ovocytes (rat, souris), ovaire d'Hamster chinois	(Chessell *et al*, 1998; Gu *et al*, 2009; Virginio *et al*, 1997; Hibell *et al*, 2000; Yan *et al*, 2008, 2010; Khadra *et al*, 2013; Browne *et al*, 2013; Petrou *et al*, 1997; Coutinho-Silva & Persechini, 1997; Faria *et al*, 2005; Alves *et al*, 2014; Pelegrin & Surprenant, 2006; Cankurtaran-Sayar *et al*, 2009)

Tableau 8 Récapitulatif des espèces employées durant la caractérisation des récepteurs P2X

En plus des divers aspects cellulaires pouvant contrôler la dilatation, la densité des récepteurs exprimés à la surface des cellules peuvent aussi jouer un rôle important (Fujiwara & Kubo, 2004; Li *et al*, 2015; Sun *et al*, 2013). Ainsi, un fort niveau d'expression élève le potentiel d'inversion de manière plus importante qu'avec un système de niveau faible (Figure 11). Le niveau d'expression joue aussi un rôle sur la dépendance de la dilatation au temps. En effet, les canaux des récepteurs P2X2 montrent habituellement une faible perméabilité à $NMDG^+$ immédiatement après l'application de l'ATP, même lorsque le niveau d'expression est élevé. La perméabilité au $NMDG^+$ a ainsi été nettement augmentée dans le temps lorsque le niveau d'expression était élevé.

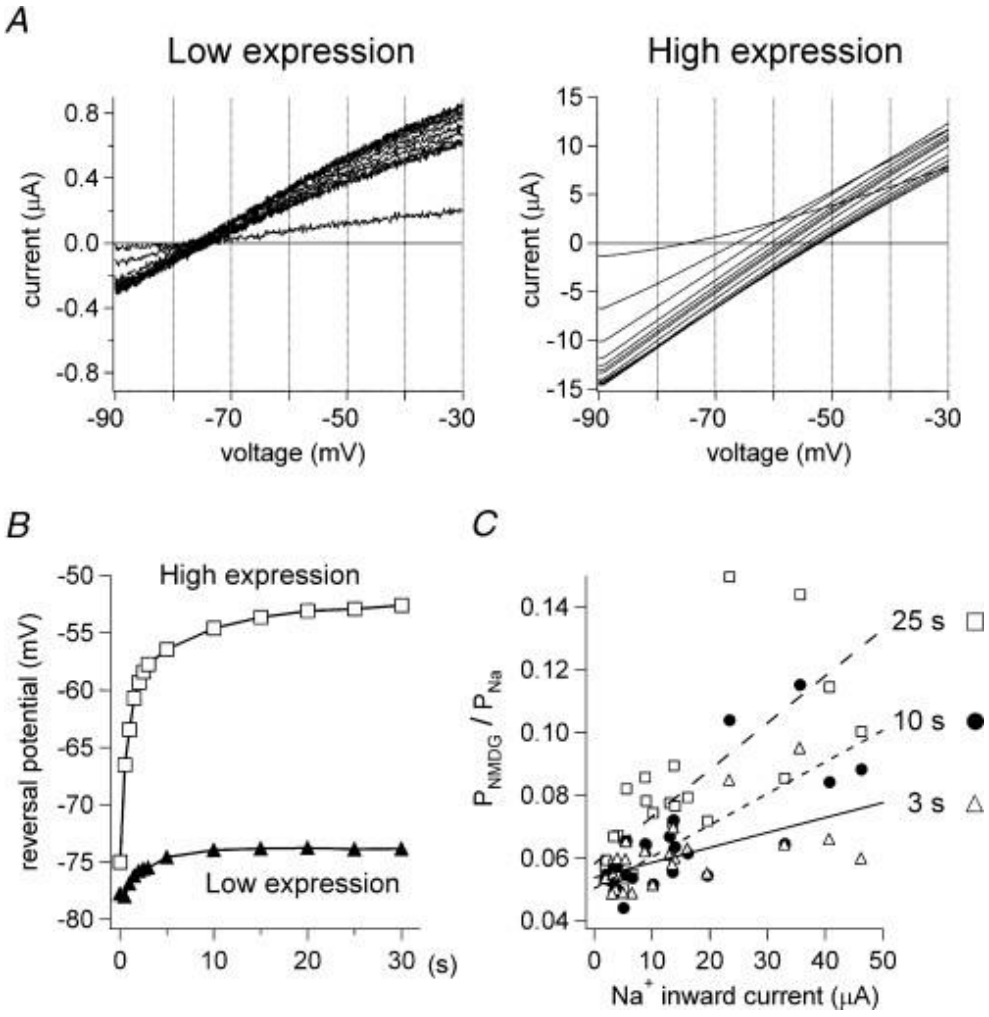

Figure 11 Influence du niveau d'expression sur la dilatation. Mesure des potentiels d'inversion a) Faible expression aucune dilatation B) Forte expression, augmentation de perméabilité C) Comparaison des potentiels d'inversions selon le niveau d'expression

D'autres études portant sur le P2X7 établissent un lien direct entre certaines mutations provoquant une sous expression du récepteur P2X7 et l'incorporation de YOPRO-1 et d'autres colorants (Sun *et al*, 2013). Notamment, les mutations Y336T et Y343L induisant une diminution de l'expression de surface par rapport au P2X7 de type sauvage. Des expériences portant sur ces mêmes mutations soumises à des tests d'incorporation de colorant montrent une diminution de l'incorporation aux colorants.

Des études portant sur l'utilisation de LPS (proinflammatory bacterial lipopolysaccharides)(Bernier *et al*, 2012) confirment que la densité des canaux exprimés joue une

rôle sur la dilatation. En effet, le LPS est connu pour augmenter l'expression de surface des récepteurs P2X4. Des cellules traitées avec le LPS présentent une plus grande incorporation de YOPRO-1 et de ce faite une plus grande dilatation des pores.

3.2.3 Modulation allostérique de la dilatation

Comme nous l'avons vu, la dilatation est modulée par plusieurs facteurs. Des expériences sur l'influence des cations divalents sur la dilatation, ont montré, au même titre que le phénomène de gating, une inhibition des courants portés par le $NMDG^+$ et l'incorporation de YOPRO-1. Les ions Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} et protons inhibent l'incorporation de YOPRO-1 de manières concentration dépendante dans le cas du récepteur P2X7 (Virginio *et al*, 1997). Ces résultats se confirment sur le récepteur P2X4 ou le Ca^{2+} et le Mg^{2+} inhibent très fortement l'incorporation de YOPRO-1 et de fluorescence rouge (Shinozaki *et al*, 2009; Bernier *et al*, 2012). C'est pourquoi les expériences en présence de NMDG+ sont souvent effectués en présence de concentration faible voir nul de cations divalents. Cette inhibition pouvant prévenir d'un effet bloquant du canal ou du changement d'affinité de l'ATP. Selon la concentration des cations divalents, l'ATP change de forme et n'a plus la même affinité avec les récepteurs étudiés. L'affinité de l'ATP joue un rôle très important, car selon le nombre de sites occupés par l'ATP, la dilatation ne présente plus les mêmes caractéristiques. L'ATP joue donc un rôle sur la modulation de la dilatation. En effet la dilatation n'a besoin que 2 ou 3 sites soient occupés pour présenter une dilatation.

Le Na^+ extracellulaire joue aussi un rôle très prépondérant dans le phénomène de dilatation. Sur les récepteurs P2X7, la présence de sodium en grande quantité peut inhiber la dilatation. Plusieurs suppositions pour expliquer ce rôle ont été mises en avant. La présence d'un site orthostérique du sodium sur le récepteur, changeant les caractéristiques du récepteur pendant la fixation du BzATP (Jiang *et al*, 2005), en est une. Afin d'obtenir une dilatation, le Na^+ doit alors se détacher de son site pour permettre au récepteur d'évoluer d'un état cation sélectif vers un

état perméant au gros cation. Des conditions hyposodiques sont donc nécessaires pour ce processus (Figure 12).

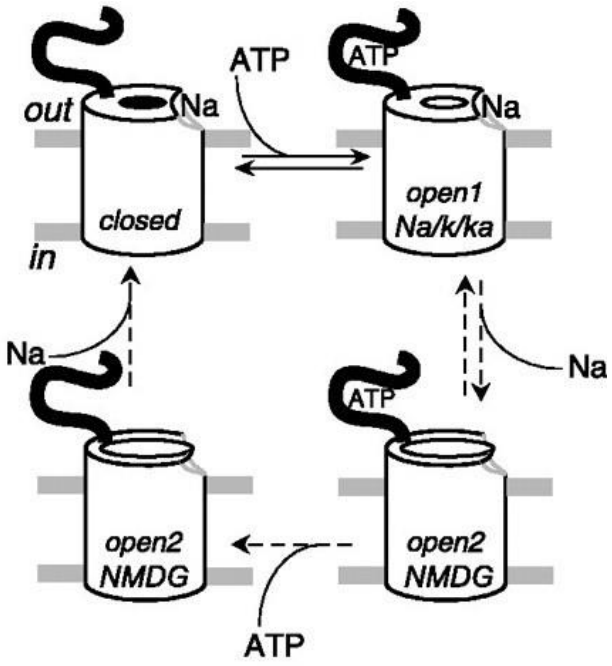

Figure 12 Diagramme schématique illustrant la dépendance du récepteur P2X7 au sodium. Haut, solution de sodium extracellulaire. Gauche, état de repos, canal fermé ; Pas de liaison ATP liée au sodium. Droit, canal ouvert, perméable aux petits cations ; Lié à l'ATP, lié au sodium. Bas, extracellulaire $NMDG^+$. Droite, canal ouvert, perméable au $NMDG^+$; ATP lié, sans liaisons sodium. Gauche, canal ouvert, perméable au $NMDG^+$; Aucun ATP lié, aucun sodium lié.(Jiang et al, 2005)

Outre l'influence des cations extracellulaires, des molécules inhibitrices peuvent sélectivement inhiber l'état dilaté. La calmidazolium représente bien cette caractéristique, car cette molécule inhibe l'incorporation sans avoir d'effet sur la perméation cationique. La colchicine a aussi une influence sur la dilatation en inhibant l'incorporation des colorants sur les recepteurs P2X2 et P2X7 (Marques-da-Silva *et al*, 2011)

Comme nous l'avons vu sur le récepteur P2X4 de rat, l'ivermectine potentialise la réponse. Des études montrent que l'ivermectine par la même occasion augmente l'incorporation du YOPRO-1 (Zemkova *et al*, 2015 ; Bernier *et al*, 2012).

Les molécules telles que des PIPs (phosphoinositides) peuvent avoir une influence positive sur la dilatation. En effet, l'utilisation du Wortmannin, un inhibiteur ciblant des enzymes contrôlant la

synthèse de PIPs peut diminuer voire inhiber complètement la dilatation. Les enzymes PI3K et PI4k (phosphoinositide 3-kinase et phosphoinositide 4-kinase) permettent la synthèse de PIPs. Cette inhibition montre le lien entre la dilatation sur les récepteurs P2X4 et les PIPs. Une influence négative sur l'incorporation de YOPRO-1 est aussi visible en présence de BX430, un inhibiteur connu des récepteurs P2X4 dont le mécanisme exact est encore à l'étude. Pendant une utilisation avec de l'ivermectine l'effet est d'autant plus important (Ase *et al*, 2015). D'autres molécules comme PEG (Polyéthylène glycol)(à partir d'une certaines tailles) peuvent inhiber la dilatation , notamment en bloquant le passage de gros cations ou l'incorporation de YOPRO-1(Virginio *et al*, 1999a).

3.2.4 La dilatation un mécanisme controversé

La variabilité des résultats (cinétique, sous unité, espèce) observé pendant les études de la dilatation récepteurs P2X a soulevé des interrogations. Et spécifiquement sur la voie de passage des grosses molécules (dont des colorants) Le passage de ces molécules est-t-il vraiment dû à la dilatation intrinsèque du pore ? Ou est-t-il, le fait, d'une protéine en lien directe avec l'activation des récepteurs P2X ?

La première hypothèse suggérée fut que l'état moins sélectif du canal du récepteur P2Z/P2X7 (Virginio *et al*, 1997), était dû à une augmentation de l'oligomérisation des canaux existants, de sorte que le diamètre du pore augmenterait à mesure que l'oligomérisation se poursuivait. A cette époque aucune structure cristallographique n'était publiée. Suite à l'article de Lewis en 1995(Lewis *et al*, 1995) , il a été défini que le récepteur pouvait être formé par plusieurs sous-unités et que ce nombre pouvait varier. Cette hypothèse, fut très rapidement rejetée car la cinétique du changement de sélectivité sur le récepteur P2X7 est trop rapide pour correspondre à une augmentation des sous-unités composant le récepteur.

Suite aux différentes observations sur la dilatation des récepteurs P2X7, l'hypothèse portant sur le recrutement d'une autre protéine permettant la dilatation émergea. Et de ce fait, les petits cations et celui des grosses molécules (colorants) emprunteraient respectivement deux voies différentes. Plusieurs arguments permettent de confirmer cela. Notamment l'utilisation de calmidazolium qui permet l'inhibition du canal ionique du récepteurs P2X7 a plus de 95% sans pour autant avoir d'influence sur l'incorporation de YOPRO-1 (Virginio *et al*, 1997). De même, le passage de colorant anioniques tels que le jaune Lucifer (voir 3.1), n'ont pour l'instant aucune explication. De plus, des tests utilisant des mutations ou des délétions dans le domaine C-terminal a permis l'inhibition de la dilatation des pores P2X7 mesuré par les courants portés par le passage du $NMDG^+$. Cependant, ces mêmes mutations n'induisent aucune inhibition de l'incorporation du YOPRO-1. Au contraire, une augmentation de l'incorporation fut observée par rapport au récepteur P2X7 sauvage (Jiang *et al*, 2005). Ces observations dissocient la variation de perméabilité du $NMDG^+$ et l'incorporation de colorant tel que le YOPRO-1. De plus, l'absorption de colorant (et l'augmentation de la perméabilité du NMDG+) n'est pas universellement observée dans les cellules où l'activation des récepteurs P2X7 provoquent un courant de cations interne typique (Petrou *et al*, 1997) et peut être dépendante de la densité d'expression (Fujiwara & Kubo, 2004) (Pelegrin & Surprenant, 2006; Locovei *et al*, 2007). De surcroît, il existe des divergences entre les résultats caractérisés par l'incorporation de YO-PRO-1 et la dilatation caractérisés par les courants portés par $NMDG^+$ quand ils sont comparés directement (Jiang *et al*, 2005). Enfin la mesure de la perméabilité relative par substitution complète des ions extracellulaires (par exemple, avec du $NMDG^+$) est couramment utilisée pour la caractérisation biophysiques des canaux. Mais cela peut entraîner des complications lorsque l'élimination des petits cations habituels (sodium, calcium, magnésium) a des effets sur les récepteurs. Le rôle critique du sodium extracellulaire est clairement observé lorsque le récepteur P2X7 est activé par agoniste dans une solution sans sodium: le canal ne se ferme pas lorsque l'agoniste est enlevé, jusqu'à ce que le sodium extracellulaire (ou cations divalents) soit également restauré (Jiang *et al*, 2005; Compan *et al*, 2012). Contrairement à de telles études, les mesures de l'absorption du colorant sont typiquement réalisées avec des concentrations micromolaires ajoutées à une solution extracellulaire physiologique.

Les récepteurs P2X7 sont connus pour se coupler à plusieurs autres molécules effectrices intracellulaires (North, 2002), dont certaines ont été impliquées dans l'absorption du YOPRO-1 (Donnelly-Roberts *et al*, 2004). Des candidats potentiels à la voie d'absorption des colorants ont été proposés (Schilling *et al*, 1999). Il s'agit notamment de la protéine membranaire pannexin-1, avec laquelle le récepteur P2X7 est souvent associé (Pelegrin & Surprenant, 2006; Locovei *et al*, 2007).

Les pannexines ont été initialement identifiées en 2003/2004 par une faible homologie de séquence avec les canaux de gap jonction d'invertébrés, les innexines (Baranova *et al*, 2004). Comme les innexines et les connexines, des canaux gap jonctions de mammifères et les trois membres de la famille pannexin (panx1,2,3) partagent une topologie membranaire similaire constituée de quatre domaines transmembranaires, de courts segments extracellulaires et des terminaisons C et N intracellulaires (Figure 13). Ayant aucune homologie de séquence avec les connexines, les pannexines font parties cependant de la même famille moléculaire que les innexines et les connexines (Yen & Saier, 2007). Les pannexines sont exprimées dans les cellules immunitaires, endothéliales, épithéliales et de l'épiderme (Yen & Saier, 2007; Bruzzone *et al*, 2003).

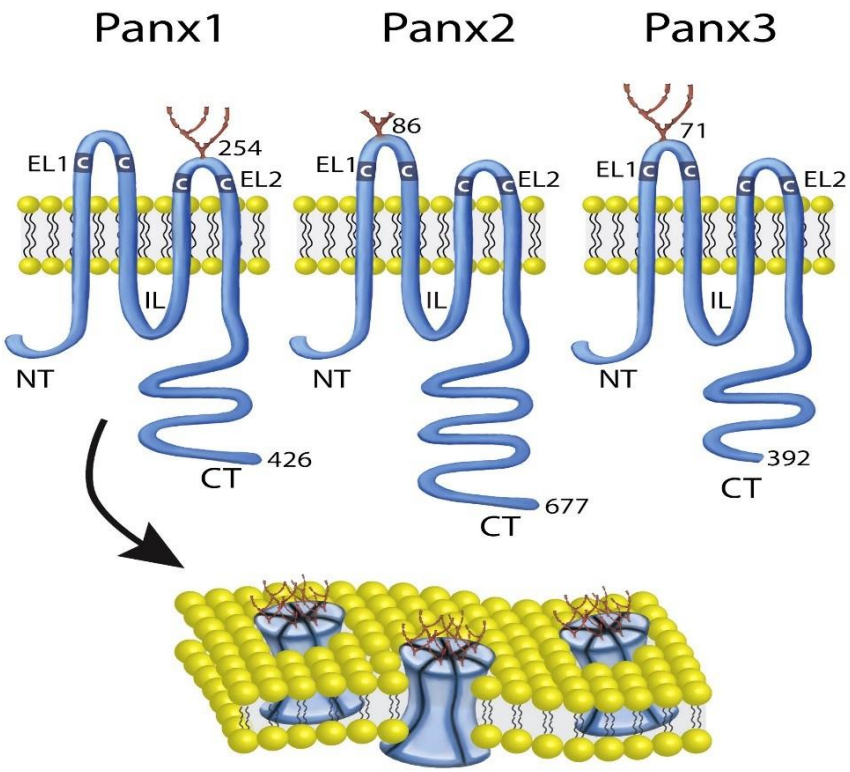

Figure 13 Structure des pannexin un hémicanal (Penuela et al, 2013)

L'utilisation d'un ARN interférant faible (ANSI) dirigé contre panx1, d'un peptide inhibiteur mimétique panx1 (peptide 10panx1) ou de CBX inhibent tous l'absorption de colorant médiée par P2X7 mais pas les courants membranaires ou le flux de calcium dans les cellules HEK 293 dans les macrophages humains surexprimant la Panx1 et le récepteur P2X7.

Cependant de récentes études remettent en cause, l'importance de la PANX-1 pour la voie de passages du YOPRO-1 dans les macrophages murins. Des analyses de transcriptases inverses (RT-PCR) ont montré que la pannexine n'est pas exprimé dans les macrophages. Une incorporation de YOPRO-1 est pourtant observée. Montrant ainsi que l'influence de la pannexine n'est pas une condition *Sine qua non* à l'incorporation de colorant pour les récepteur P2X7 (Alberto *et al*, 2013). Des études utilisant des ovocytes n'exprimant pas nativement la pannexine comme système d'expression des P2X7 montrent aussi une dilatation, sans aucune perturbation de l'incorporation des colorants (Khakh *et al*, 1999a; Smart *et al*, 2003; Paukert *et al*, 2002). De plus, l'utilisation de CBX n'induit pas complétement une inhibition de l'incorporation du YOPRO-1, mais un délai dans

l'observation de la fluorescence. Ceci traduit, dans certains cas, que le mécanisme de dilatation n'est pas nécessairement dû au recrutement d'une autre protéine. Donc dans le cas de l'étude de la dilatation sur les récepteurs P2X7, les deux hypothèses sont simplement complémentaires. Ainsi le pore du récepteur P2X7 peut se dilater et laisser les grosses molécules passer mais il peut aussi recruter une protéine dans la quelles les grosses molécules traverseraient la membrane.

L'étude du phénomène de dilatation sur les sous type 2 et 4 marque une différence importante avec le récepteur P2X7, car aucune contribution d'une autre protéine et spécifiquement la pannexine n'a été prouvée (Chaumont & Khakh, 2008; Bernier *et al*, 2012). Dans le cas d'une utilisation d'inhibiteur de pannexin aucun effet sur l'incorporation de YOPRO-1 et les courants ioniques n'a été observé. De plus de nombreuses études tendent à prouver que la dilatation du pore est un mécanisme d'expansion du pore. Des techniques optiques montrent des mouvements des hélices simultanément au passage de grosses molécules.

Par exemple, deux phases de changements conformationnels sont observées en AFM (Atomic-Force Microscopy) sur le P2X4, l'une correspondant au passage de petits cations et l'autre à la dilatation, sans aucune contribution de la pannexin (Shinozaki *et al*, 2009). Mais surtout cette technique permet une visualisation directe de l'expansion du pore directement lié à l'incorporation du ETBr. De plus, des observations en FRET utilisant le tag CXXXC fixé sur le N et C terminal montrent que des changements confromationels des terminaisons N et C sont nécessaires pour que les canaux P2X2 puissent entrer dans un état I2 (Chaumont & Khakh, 2008). L'analyse de courants très faibles portés par le $NMDG^{+}$, enregistrés en configuration canal unique sur le P2X2 et P2X7 (Ding & Sachs, 1999; Riedel *et al*, 2007), ont démontré le rôle inhérent des pores des récepteurs P2X. Cependant, les caractéristiques dynamiques de la dilatation n'ont pas été observées sur ces tests

En plus de ces observations directes, d'autres arguments abondent dans le sens d'une dilatation intrinsèque. Les mesures du passage de MTSEA-biotine ou de MTS-rhodamine dans le récepteur P2X7 dans le lequel des acides aminés préalablement choisi ont été substitués par des cystéines ont provoqué un blocage de courant induit par l'ATP. Ces molécules de tailles voisines au YOPRO-1 se lient covalemment avec des cystéines. Ils ont été montré que les passait à travers le pore

(Browne *et al*, 2013). Ces résultats viennent confirmer des résultats semblables obtenus sur le récepteur P2X2 avec le MTSET, MTS-TPAE et le Texas Red-MTSEA (Li *et al*, 2010). Aux vues de ces différents arguments, l'hypothèse expliquant le mécanisme de perméation de grosses molécules dépendrait des conditions et des sous types étudiés. Concernant le récepteur P2X7, les deux hypothèses semblent complémentaires (Pelegrin & Surprenant, 2006; Browne *et al*, 2013). Pour ce qui est des sous types P2X2 et P2X4, l'expansion du pore est l'explication la plus probable(Chaumont & Khakh, 2008; Shinozaki *et al*, 2009).

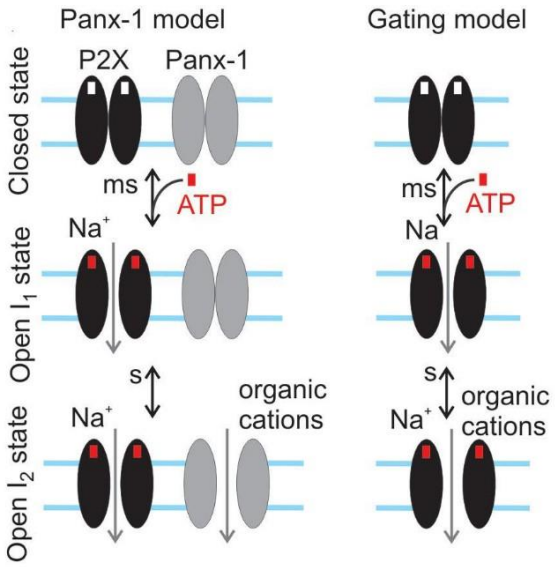

Figure 14 Illustration de la différence entre les deux modèles (Chaumont & Khakh, 2008)

3.2.5 Approche de biologie moléculaire pour la compréhension de la dilatation

L'approche moléculaire de la dilatation a permis de cerner toute une cohorte de positions impliquées dans la régulation de la formation des pores dilatés. Des mutations dans la structure du récepteur perturbent directement l'établissement de l'état I2 (Tableau 9). Ceci confirme de fait l'implication direct du pore dans le passage des grosses molécules. Ces mutations peuvent soit potentialiser la dilatation ou soit complétement l'inhiber. Par exemple, la mutation G342A inhibe l'incorporation de YOPRO-1 dans le récepteur P2X2(Khakh & Egan, 2005) ainsi que dans le récepteur P2X4 muté de manière équivalente par une tyrosine(Khakh *et al*, 1999a). À l'inverse,

le mutant N333A potentialise lui la dilatation sur le P2X2. Plusieurs parties de la structure des récepteurs P2X étudiés montrent clairement l'implication de segments transmembranaires. Des constructions chimériques basé sur le P2X2 du rat et sur celui de la souris permet au sous type de souris d'exposer une augmentation de l'incorporation de YOPRO-1. Mettant en lumière le rôle important des segments transmembranaires TM1 et TM2. Le rôle spécifique du segment TM2 est directement prouvé lors de la substitution de certains acides aminés formant le pore. Les mutations ciblant les acides aminés dans la lumière du canal sont prédominantes dans la modulation de la dilatation. Cette modulation est soit dû un mécanisme favorisant certain mouvement des hélices soit à l'encombrement stériques des résidus employé (Yan *et al*, 2008).

Récepteurs	Espèces	Influence sur la dilatation	Mutation	Informations complémentaires	Référence
P2X2	Souris	Potentialisation	R374K, L406P, A413T, P426S, S429P, S432I, D444G	Ces mutants permettent au P2X2 de souris de dilaté et montre la contribution du C ters dans dilatation	(Eickhorst *et al*, 2002)
	Rat	Potentialisation	N333 (A, G, N, D, E, K, S, Q); T336 (A, G, N, D, E, K, S, Q); L338 (A, G, N, D, E, K, S, Q) ; G342 (A, N, D, E, K, S, Q)	Incorporation du YOPRO augmenté et montre un large shift avec l'alanine	(Virginio *et al*, 1999b)
		Inhibition	I432S, G444D M430R	Mutation dans la partie TM1 Inhibe la dilatation	(Eckhart *et al*, 2002)
		Inhibition	T18A/P2X2-PH/P2X2-PH + UTP	Pas de dilatation (T18A) dû à une désensibilisation importante DILATATION /P2X2-PH + UTP	(Fisher *et al*, 2004)
		Aucune	H33C et S345C et C48C	Le pond compose de ces trois mutants ne change rien à la dilatation du pore	(Heymann *et al*, 2013)
		Inhibition	K369Q et K365Q	Ces mutant augmentent la désensibilisation et diminuent la dilatation	(Fujiwara & Kubo, 2006)
		Inhibition	I328A/C et R371stop	Les mutations sur I328 influencent la dilatation en diminuant l'expression de surface Troncature après r371 ne change rien	(Fujiwara & Kubo, 2004)

		Inhibition	TM1(F31A, R34A, Q37A, Y43A.F44A, K53A) TM2(I328A, I332A, S340A, G342A, W350A, L353A)	Mutation qui inhibe ou réduise la dilatation	(Khakh & Egan, 2005)
P2X4		Potentialisation	Y42A, E51A, I337A	Ces mutant en combinaison avec de IVM montrent une dilatation	(Zemkova *et al*, 2015)
		Inhibition	G347Y et G347K	G347Y inhibe la dilatation quand el G347K potentialise	(Khakh *et al*, 1999a)
P2X7	Rat	Inhibition	P2X7 DELTA C ter	Le Cter manquant réduit l'incorporation de YO-PRO-1 et aucune dilatation observée en patch	(Surprenant *et al*, 1996)
		Inhibition	Délétion de de la région riche en cystéine dans la c terminal	Inhibe la dilatation	(Pelegrin & Surprenant, 2009)
		Potentialisation	D352N et D352K	Facilitation du passage de colorant anionique	(Browne *et al*, 2013)
		Inhibition	G345Y		(Monif *et al*, 2009)
		Inhibition	T15(A, V, S, T, W, E, K)	Plus l'acide aminé est grand plus il aura une influence sur le courant biphasique	(Yan *et al*, 2008)
	Souris	Inhibition	Q332P, Y336T, S342F, Y343L	Diminue l'incorporation de colorant, lien avec l'expression de surface	(Sun *et al*, 2013)
		Inhibition	P451L	Diminue l'incorporation su YO-PRO-1	(Adriouch *et al*, 2002)
	Humain		Comparaison avec d'autres espèces	Importante du CTER	(Rassendren et al, 1997b)

Tableau 9 Récapitulatif des mutations ayant une influence sur la dilatation des différents sous unité P2X. L'utilisation terme potentialisation peux exprimer l'apparition ou une augmentation. Le terme inhibition peux exprimer la disparition totale ou diminution

3.3 Le rôle physiologique de la dilatation

La découverte de la dilatation fut une étape majeure dans la compréhension du récepteur P2X, apportant un nouveau point de vue sur le mécanisme d'ouverture et de perméabilité. Il reste cependant une étape importante dans la validation du mécanisme de dilatation. La détermination

de son rôle physiologique reste une étape nécessaire à la compréhension entière des caractéristiques des récepteurs P2X. Les nombreuses études portant sur le sujet furent très longtemps limitées en suppositions. La dilatation des pores P2X7 est un processus inhérent à la fonction immunitaire. Des récentes publications suggèrent que la dilatation des pores P2X7 est impliquée dans le passage des lipopolysaccharides extracellulaires et active les NLRP3 les cellules inflammatoires. L'activation des NLRP3, localisés sur les Inflammasomes dans les cellules immunitaires, conduit à la sécrétion d'interleukin-1β, un important médiateur de l'inflammation qui recrute d'autres cellules immunitaires (Figure 15) (Schroder & Tschopp, 2010).

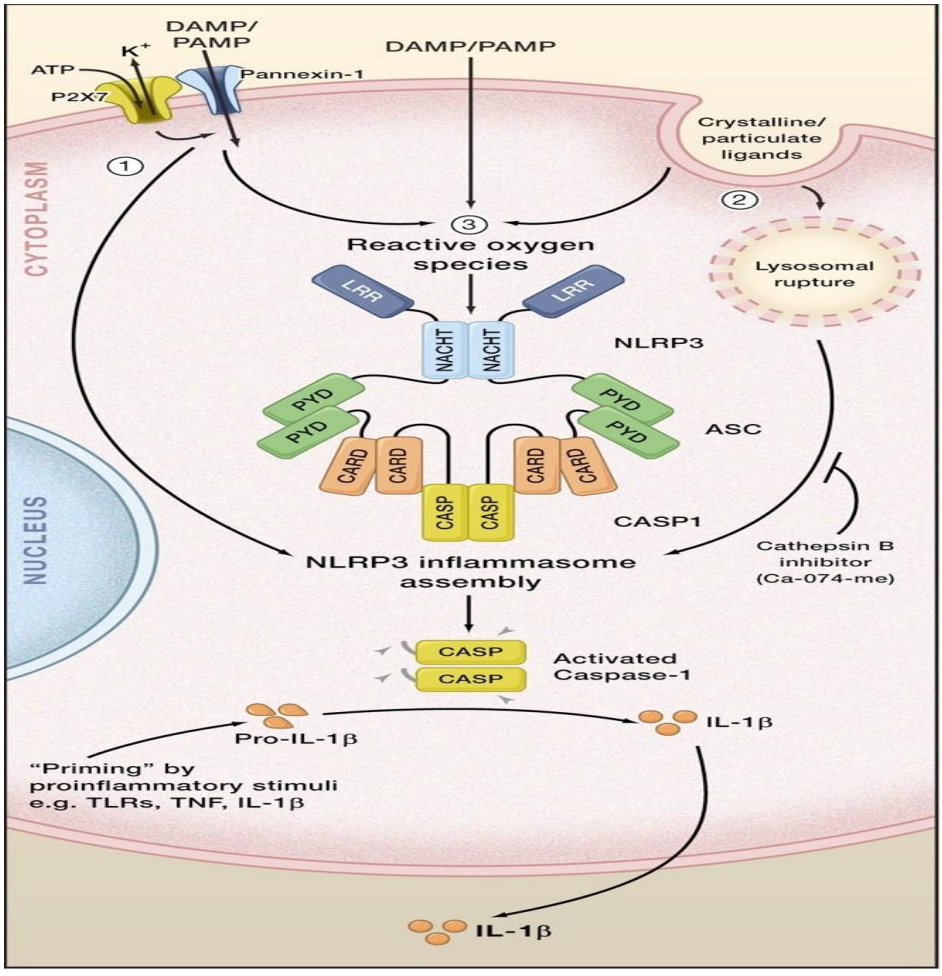

Figure 15 Implication des récepteurs P2X7 dans l'activation des NLRP3 : Libération des interleukines par l'actvatiion des NLRP3 (Schroder & Tschopp, 2010)

D’autres rôles sont attribués à l'ouverture à l'état I2 mais restent peu clairs, la dilatation est souvent connue pour être un déclencheur d’une variété de processus physiopathologiques, comprenant notamment, le phénomène de blebbing sur le récepteur P2X7 (Virginio *et al*, 1999a; Pfeiffer *et al*, 2004; Roger *et al*, 2008), l’excrétion microvésicule (Chaumont & Khakh, 2008), la libération de molécules de signalisation des interleukines, et la mort cellulaire.

Cependant, l’une des preuves directes d’une implication de la dilatation dans un rôle physiopathologique est l’implication des récepteurs P2X7 dans la médiation des effets des dommages nerveux dans les douleurs chroniques (Sorge *et al*, 2012).

La douleur chronique est une maladie du système nerveux central. Elle est définie comme « douleur sans valeur biologique apparente qui a persisté au-delà du temps normal de guérison des tissus ». Durant depuis au moins 6 mois, ce type de douleur peut être nociceptif ou neuropathique, c'est-à-dire manipulé par un nerf dysfonctionnel ou un groupe de signaux nerveux. Les personnes souffrantes de douleurs chroniques signalent souvent une hyperalgésie (augmentation de la sensibilité à la douleur), une allodynie (augmentation de la réponse de la douleur à des stimuli généralement non douloureux) ou une dysesthésie (sensations anormales désagréables). La douleur chronique peut également provenir d'autres types de douleur et est souvent neuropathique

La douleur chronique est très variable entre les individus, tout comme la réponse aux analgésiques. Bien qu'une grande partie de la variabilité de la douleur chronique et de la réponse analgésique soit héréditaire, la compréhension des déterminants génétiques sous-jacents à cette variabilité est rudimentaire. Cependant, une étude portant sur la variabilité au sein de la séquence codante du gène codant pour le récepteur P2X7 a permis d’établir un lien direct entre le phénomène de dilatation des pores et la douleur chronique chez l’homme et la souris.

Chez l’homme, suite à une mastectomie (chirurgie mammaire suite à une tumeur maligne), de nombreuses femmes présentent des douleurs chroniques post mastectomie. La variabilité de la sensation de la douleur est directement liée au polymorphisme génétique du récepteur P2X7. Les allèles tyrosine 155, connues pour être hyperfonctionnelle (Bradley *et al*, 2011), induisent une augmentation des douleurs chez la femme, par rapport aux allèles histidine 155. Réciproquement,

les allèles histidines 270, connues pour être hypofonctionnelle, montre une diminution des douleurs par rapport aux femmes porteuses de l'allèle arginine 270. Le lien entre la dilatation et la variabilité génétique a été confirmée dans la même étude, spécifiquement chez les patientes souffrantes d'arthrose, une maladie inflammatoire chronique montrant une variabilité dans la charge douloureuse. Chez l'humain, les porteurs de l'allèle HIS 270 présentent une diminution de la dilatation.

Chez la souris, les porteuses de la mutation P451L (connue pour avoir une modulation négative sur la formation des pores dilatés) ont montré une diminution de l'allodynie inflammatoire.

Ces résultats confirment que l'hypersensibilité à la douleur est directement liée à la capacité des récepteurs P2X7 de permettre la dilatation.

Ces études soulignent l'importance de développer une voie thérapeutique ciblant les récepteurs P2X et plus largement la dilatation. De plus, à la vue du déterminisme génétique dans le cas de la douleur chronique (Sorge *et al*, 2012), il serait intéressant par la même occasion de développer une méthode de prévention de sensibilité à la douleur.

3.4 Le changement de sélectivité, une caractéristique partagée par d'autres canaux ioniques

De nombreuses expériences ont été effectuées afin de savoir si tous les récepteurs canaux observaient un changement de sélectivité de leurs pores. Ainsi les récepteurs de la sérotonine 5HT3 et recombinant nicotiniques α4β2 ne montrent aucun changement de leurs sélectivités durant leurs activations. En présence de NMDG+ extracellulaires, aucune évidences expérimentales n'a permis de déceler un changement de sélectivité de leurs canaux ioniques (Virginio *et al*, 1999b; Khakh *et al*, 1999a). Cependant des résultats similaires ont été rapidement observés sur d'autres canaux ioniques (Khakh & Lester, 1999). Notamment sur les récepteurs ASIC (Lingueglia *et al*, 1997) où l'on observe un changement de sélectivité des récepteurs hétérométriques MDEG1/MDEG2. D'autres récepteurs possèdent aussi la capacité de dilatation

de leurs pores transmembranaires, et particulièrement les récepteurs TRP (Transient Receptor Potential).

3.4.1 Les récepteurs ASIC

Les récepteurs ASIC (Acid Sensing Ion Channels) sont des canaux sodiques. Leur activation est médiée par le pH extracellulaire et forme, avec les récepteurs VR (récepteurs ionotropiques des vanilloïdes), les deux types de récepteurs sensibles aux protons. La structure des récepteurs ASIC est composé d'une oligomérisation de trois sous unités. Chaque sous unité est composée de deux domaines transmembranaires encadrant une large boucle extracellulaire. A ce jour on récence 5 gènes paralogues chez les vertébrés. Les sous unités peuvent s'assembler en homo ou hétéromères, ce qui leurs permet d'avoir une plus grande diversité structurale et fonctionnelle (Figure 16). Les récepteurs ASICs sont exprimées dans les systèmes nerveux périphériques et centrales. Ils sont impliqués dans divers rôles neuronales comme la plasticité synaptique, la mécanosensation, la chimiosensation et la nociception. Les courants ioniques des ASIC présentent des différences. Ainsi le courant induit par les ASIC1 présente un courant rapide et transitoire (pH 5 6,2), tandis que le récepteur ASIC3 produit un courant biphasique, un courant entrant transitoire (pH 6) suivit d'un courant stable plus lent (pH 4,5)(Abdelhamid & Sluka, 2015; Hanukoglu, 2016; Baconguis *et al*, 2014; Jasti *et al*, 2007).

Associé au ASIC2B, le courant ASIC3 est modifiée, la deuxième phase devient plus sensible au pH. De plus, le courant du récepteur homotrimèrique ASIC3 est sodique, sa variante héterotrimèrique est cationique non sélective. Ainsi sans parler de dilatation, les récepteurs ASICs sous la forme d'un hétérotrimère ASIC3/ASIC2b, présente un changement de sélectivité ionique, passant d'un récepteur sodium sélectif à un canal non sélectif (Lingueglia *et al*, 1997). Le rôle de ce changement de sélectivité reste encore non résolu. De plus, le mécanisme de la douleur acide est inexpliqué,

et le commutateur dans la sélectivité ionique peut servir de médiateur à ce type de douleur. Des expériences définitives sont attendues, mais si cela est vrai, les canaux ASIC3/ASIC2b agissent comme des détecteurs d'activité afférents primaires.(Abdelhamid & Sluka, 2015; Hanukoglu, 2016)

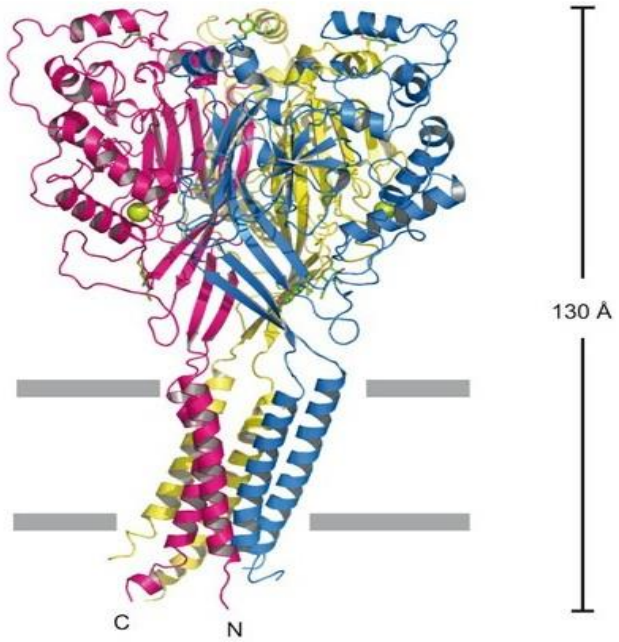

Figure 16 structure cristallographique des récepteurs DeltaASIC1:(Jasti et al, 2007)

3.4.2 Les récepteurs TRPV1

Les récepteurs TRPV1 (Transient receptor potential channels vanilloid 1) sont des canaux cations sélectifs, appartenant à la famille des TRPV constituée de six membres (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, TRPV6). Les récepteurs TRPV sont tous activés par la chaleur et peuvent être activé par des molécules vanilloides comme les capsaicine et le resiniferatoxine pour le récepteur TRPV1 notamment. La structures du TRPV1 est un tétramère dont chaque monomère est composé six domaines transmembranaires (TM). La région du pore est localisée entre le TM5 et le TM6. Toutes les sous unités présentent plusieurs sites de phosphorylation pour la PKA (Protein Kinase A), la PKC (Protein Kinase C) et la CaMkII (Ca2+/calmodulin-dependent kinase II), ainsi que de

nombreux sites de glycosylation. Les TRPV1 sont impliqués dans les douleurs neuropathiques, l'inflammation neuronique, et la médiation du nociception (Levine & Alessandri-Haber, 2007; Danigo *et al*, 2013; Cao *et al*, 2013).

Comme la plupart des canaux TRP, TRPV1 est un canal cationique non sélectif. Aucune différence de perméabilité n'existe entre Na+ et K+. Cependant les ions calcium présentent une perméabilité 10 fois plus importante que les autres cations. Une des caractéristiques notables de TRPV1 est la variation de sélectivité de son canal. Lors d'une activation prolongée avec des vanilloïdes, la perméabilité aux grands cations, tels que la N-méthyl-D-glucamine ($NMDG^+$) ou le colorant de propidium YO-PRO1, augmente malgré le fait que le canal continue d'exclure les anions. Ces perméabilités dynamiques sont dépendantes de la concentration de l'agoniste et de l'identité de cet agoniste. Effectivement, des concentrations élevées de capsaicine évoquent facilement une grande augmentation de la perméabilité, contrairement à des faibles concentrations qui n'en provoquent pas. Cette affirmation peut cependant changer quand, à de faibles concentrations d'agonistes, le récepteur est phosphorylé par le PKC. C'est uniquement à cette condition que le récepteur devient perméant aux gros cations. L'utilisation d'autres agonistes (comme la chaleur ou le camphre) n'évoquent cependant pas de changement de sélectivités. Par la suite, d'autre récepteurs de la famille des TRP ont montrés un changement de sélectivité, notamment les récepteurs TRPV3 et TRPA1. Afin de bien comprendre le mécanisme sous-jacent à ce changement de sélectivité, de nombreuses études sur les TRPV1 ont montré l'importance de plusieurs sites notables, grâce à des mutants entrainant des gains de fonction. Par ce biais, il a été mis en évidence que la tourelle du pore (N628P et S629A), l'hélice du pore (F638A) et le filtre de sélectivité (M644A) ont des rôles déterminants dans ce mécanisme. Bien que la contribution des chaines latérales joue un rôle dans la compréhension de cet état de conductance, aucun mécanisme ne permet à l'heure actuelle d'expliquer ce phénomène (Banke *et al*, 2010 ; Chung *et al*, 2008 ; Cao *et al*, 2013).

Ces exemples de canaux ioniques présentant un changement de sélectivité de leurs pores, est important. Que ce soit pour un changement favorisant le passage de cations divalents ou celui de molécules de grosses tailles, le changement de sélectivité, et/ou de dilatation pour certains récepteurs canaux, existe et montre l'importance de leurs compréhensions.

3.5 Bouleversement du paradigme du mécanisme de dilatation

« Le terme de paradigme, mis en avant par Thomas Samuel Kuhn (Kuhn, 1996), en 1962 dans La structure des révolutions scientifiques, est maintenant couramment employé pour désigner une manière de voir ou une méthode à suivre. Pour Kuhn, il s'agit de l'ensemble des principes et méthodes partagés par une communauté scientifique. C'est un modèle à suivre qui, pour un temps, fait autorité, puis sera remplacé par un autre. »

La dilatation des récepteurs P2X est caractérisé par le passage de grosses molécules sensé ne pas pouvoir passer quand le récepteur est dans son état I1 sélectif au petit cation. De plus, on observe une variabilité importante de l'observation de ce mécanisme, provenant des conditions, des sous unités, des espèces, des systèmes d'expressions employés et de la compréhension même du mécanisme sous-jacent. Mais surtout l'emploi du terme dilatation exprime un processus temporel. Dans le cas des récepteurs P2X, ceci se traduit par une augmentation de la perméabilité dépendante du temps.

Or dans le cas du mécanisme de dilatation, le changement de paradigme intervient en 2015 avec la publication de l'article de c (Li *et al*, 2015). Dans cet article, les auteurs renversent le modèle de sélectivité ionique dépendant du temps. Longtemps, les deux techniques employées pour caractériser la dilatation ont exposé un sélectivité ionique dynamique. L'étude de l'incorporation du YOPRO-1 se déroule sur la base d'une cinétique lente. Cette cinétique est due tout d'abord à la technique elle-même. En effet, le YOPRO-1 comme vue précédemment (3.1.1), a besoin de s'intercaler dans l'ADN pour pouvoir émettre de la fluorescence. Dans le cas de la technique d'électrophysiologie Patch Clamp, la mesure de la perméabilité au $NMDG^+$ montre une dépendance au temps d'application de l'ATP.

Les conditions ioniques asymétriques du $NMDG^+$ extracellulaire et du Na^+, dans le milieu intracellulaire, induisent un artéfact de mesure. Suite aux premiers articles et les divers tests, le

shift du Erev vers des valeurs moins négatives correspondait à une augmentation de la perméabilité du canal au $NMDG^+$ dans les solutions bi-ioniques.

Or, dans des conditions symétriques de $NMDG^+$ ($NMDG^+_{INT}$/ $NMDG^+_{EXT}$) et suite à une activation des récepteurs P2X2, les cinétiques d'activation sont semblables aux cinétiques d'activation en condition symétrique sodique. Ces résultats indiquent que la conductance du canal pour les gros cations s'active presque aussi rapidement que pour les petits cations. De plus, des tests ont permis de montrer que le changement du potentiel d'inversion est dû à un changement des concentrations d'ions sur les deux côtés de la membrane. Ceci s'explique par un phénomène de déplétion sodique (une sortie massive de Na^+). De plus, l'expression de surface module considérablement cette déplétion essentiellement sodique. C'est ce qui explique les diverses observations et le rôle de l'expression dans les précédentes publications sur la dilatation.

Cette nouvelle vision du processus de dilatation, permet d'entrevoir tous les résultats sous un nouvel angle. Les conditions employées ont surement induit certains observateurs en erreur. Les tests sur les différents sous types effectués sous le prisme dynamique de la dilatation sont à renouveler en conditions symétriques, permettant ainsi de confirmer ou d'infirmer les précédents résultats. Les résultats obtenus en Single Channel sont par la même occasion à revoir sous un nouveau jour.

Cette découverte a permis de relancer les débats et la compréhension de ce mécanisme controversé, apportant de nouvelles informations sur la cinétique de dilatation. Serait-t-il possible que l'implication d'autres rôles physiologiques soit observable ? La détermination des molécules physiologiques capables de passer le pore du canal pourrait donner un début de réponse. En tous les cas, il est intéressant d'observer que certaines certitudes peuvent être revues voir récusées après de nombreuses années.

4 Les molécules photoisomérisables dans la caractérisation des récepteurs P2X

La caractérisation des divers récepteurs sensibles aux neurotransmetteurs est confrontée à un manque de sélectivité lors de l'utilisation de molécules conventionnelles. En règles générales, les molécules employées permettent de cibler un ensemble fini des récepteurs d'une même famille mais ne permet pas de discriminer un seul membre de cette même famille. Dans le cas des récepteurs purinergiques, l'utilisation de l'ATP active l'ensemble des récepteurs ionotropiques P2X et certains métabotropiques sans discrimination. Certes, il existe à l'heure actuelle des molécules capables de cibler préférentiellement un type de récepteurs, mais les molécules employées ne sont pas capables de cibler un seul récepteur dans une zone bien délimitée. Cette non-sélectivité engendre des effets secondaires lors de l'utilisation de molécules à visée thérapeutique. L'emploi d'une stratégie appelée pharmacologie optogénétique, permettant le contrôle des protéines par la lumière, permet de contourner ce problème. Dans cette partie, je vais exposer brièvement la notion de pharmacologie optogénétique dans un cadre plus large, afin d'introduire l'utilisation des molécules photoisomérisables pour le contrôle spatio-temporel des récepteurs P2X.

4.1 Outils photochimiques pour le contrôle neuronal

La pharmacologie optogénétique est une stratégie faisant intervenir un ensemble d'outils photochimiques permettant le contrôle par la lumière de protéines transmembranaires. L'utilisation de ces outils se retrouve dans trois types approches : l'optogénétique, l'optopharmacologie (subdivisé en deux : les ligands cagés et les ligands photochromiques) et la pharmacologie optogénétique (Figure 17).

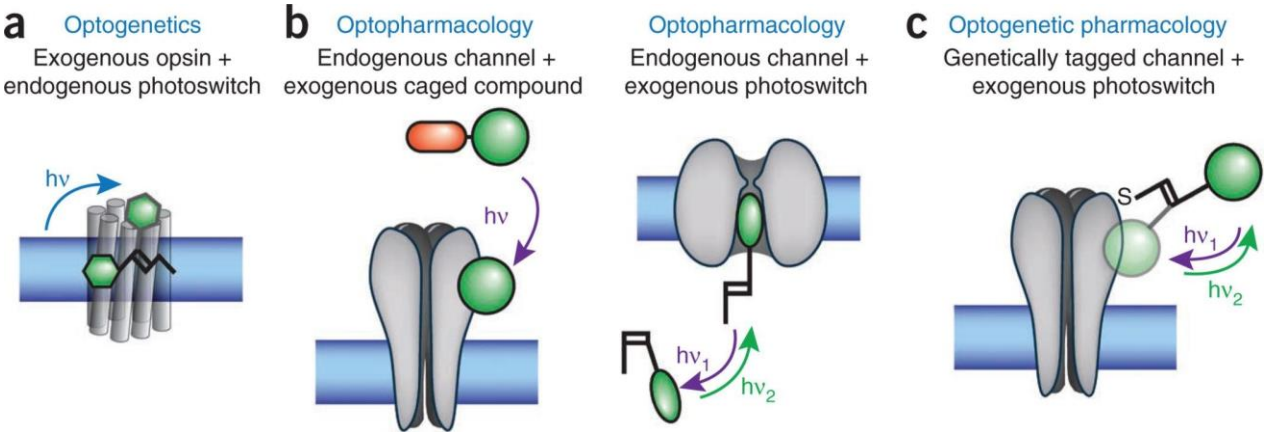

Figure 17 Outils pour le photocontrôle des recepteurs a) Optogénétique. b) Optopharmacologie c) Pharmacologie optogénétique (Kramer et al*, 2013)*

4.1.1 L'Optogénétique

-L'Optogénétique est définie comme la combinaison de méthodes génétiques et optiques pour obtenir un gain ou une perte de fonction d'événements bien définis dans des cellules spécifiques de tissu vivant.(Deisseroth, 2011) Cette stratégie s'appuie sur l'utilisation de l'expression d'une opsine microbienne dans les neurones(Terakita, 2005). Les opsines incluant les channelrhodopsines-2 et les halorhodopsines constituent une famille de protéines à sept hélices transmembranaires. Les gènes d'opsine se divisent en deux familles distinctes : les opsines de types 1 (microbienne) et les opsines de type 2 (animales). Les membres de cette famille de protéines ont besoin, pour devenir sensible à la lumière, de l'association d'un cofacteur : le rétinal. Le rétinal, une des trois formes de la vitamine A, se lie covalemment en créant une base de Schiff avec une lysine localisée dans l'hélice sept. La lumière captée par le rétinal va induire un réarrangement structural et entrainer soit le passage d'ions, soit l'activation de messagers secondaires. L'utilisation d'optogénétique peut être utile pour l'excitation neuronale ou à l'inverse, l'inhibition neuronale (Boyden *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2006; Tye *et al*, 2011; Witten *et al*, 2010). Par ailleurs, la résolution moléculaire du fonctionnement des récepteurs n'est pas permise par ce biais.

4.1.2 L'optopharmacologie

-L'optopharmacologie est une stratégie employant des molécules photosensibles agissant sur des récepteurs dans un système neuronal. Dans ce cas, l'utilisation de la lumière va permettre de résoudre le problème de sélectivité régional par la possibilité de cibler une zone précise. La stratégie optopharmacologie la plus utilisée est celles des ligands cagés. La molécule employée est composée d'une cage sensible à la lumière emprisonnant des ligands. L'activation de ces cages permet la libération rapide de ligand avec une précision spatiale et temporel. Cette stratégie est employée pour la libération de glutamate, de gaba entre autres (Lutz *et al*, 2008) L'utilisation de ligands photochromiques (PCL) représente la seconde stratégie de l'optopharmacologie. Ce sont des composés sur lesquels, le ligand pouvant être un agoniste, un antagoniste ou un bloqueur du canal, est attaché un groupe photoisomérisable qui contrôle la présentation de ce ligand sur son site. Un exemple d'utilisation de cette stratégie est le blocage des canaux potassiques, sodiques et calciques(Mourot *et al*, 2013). Une différence marquante entre les ligands photochromiques et les cages est la réversibilité du processus. En effet, l'utilisation de molécules photoisomérisables permet, selon l'isomère (qui dépend de la longueur d'onde), de présenter ou pas le ligand face au site.

4.1.3 La pharmacologie optogénétique

-La pharmacologie optogénétique est une combinaison de lumière, de chimie et de génétique en résolvant simultanément les problèmes de spécificité des sous-types et du ciblage cellulaire. Pour ce faire, la stratégie utilisant des PTL (photoswitchable tethered ligand) consiste à lier covalemment une molécule photosensible contenant un ligand a une protéine. La protéine cible est astucieusement génétiquement modifiée afin d'exposer un site d'ancrage (une cystéine) de cette molécule à proximité du site de fixation du ligand. Ce principe fut employé la 1ère fois sur les récepteurs potassiques voltages dépendants (les Shakers) (Banghart *et al*, 2004), cette protéine modifiée fut appelé SPARK. La molécule photoisomérisable (MAQ) contenait un ligand (un

groupement ammonium quaternaire) qui selon la longueur d'onde bloquait l'activité du canal. Cette stratégie fut étendue aux récepteurs ionotropiques du glutamate(LiGluR). Contrairement aux récepteurs potassiques, les molécules (MAG pour maléimide azobenzène glutamate) utilisées sont désignées pour induire une ouverture allostérique du canal (Volgraf *et al*, 2006). D'autres récepteurs ionotropiques peuvent êtres régulés par la lumière, notamment les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (le LinAChRs avec le MAACh) et du GABAa (Tochitsky *et al*, 2012; Kramer *et al*, 2013). En plus de récepteurs à canaux ioniques, la pharmacologie optogénétique fut développée sur les récepteurs métabotropiques du glutamate (Levitz *et al*, 2013).

Très récemment cette stratégie fut employée sur des récepteurs P2X pour photoréguler l'ouverture et a permis d'apporter des informations fonctionnelles.

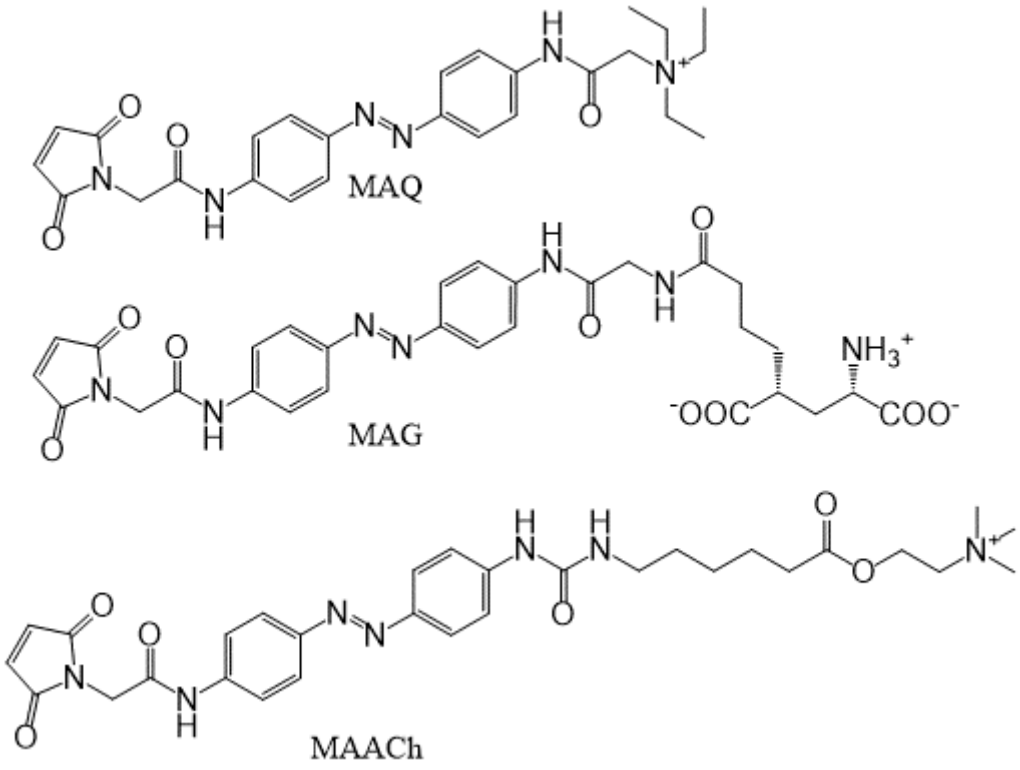

Figure 18 Principales molécules photoisomérisables

4.2 Le contrôle des récepteurs P2X par la lumière

La combinaison de la spécificité de la génétique et la précision de la lumière contribue à la puissance de la stratégie employant les PTL. La structure des molécules utilisées dans le contrôle des récepteurs P2X reste identique à celle utilisée pour les autres récepteurs. Les molécules sont constituées de trois fonctions :

Une fonction maléimide qui permet la fixation du PTL sur la protéine. Le maléimide est très réactif vis à vie des thiols contenu dans les cystéines. La partie génétique de la stratégie de la pharmacologie optogénétique est effective par la modification de certains acides aminés, situés dans une zone proche du site d'intérêt des ligands, en cystéines. La liaison covalente entre le maléimide et la cystéine s'effectue par une réaction d'addition de Michael.

Une fonction azobenzène autorisant une isomérisation du PTL par l'action de la lumière. L'azobenzène comprend deux anneaux phényles liés par un double pont N=N. Sous l'action d'une irradiation à 380nm, l'isomère *cis est* favorisé. L'irradiation à 500 nm favorise l'isomère *trans.* Une transition cis trans est aussi obtenue par une détente thermique car l'isomère *trans* est plus stable thermodynamiquement. L'utilisation de l'ultraviolet peut entrainer des dommages cellulaires. C'est pourquoi le cas échéant, des substitutions des groupements azobenzène permettent de déplacer les longueurs d'onde d'irradiation vers le rouge et remédier à tout problème de cytotoxicité. Les substitutions peuvent être des espaceurs permettant ainsi de moduler la taille des PTL. L'utilisation de l'azobenzène est commune au PTL et PCL et permet donc d'avoir un contrôle temporel et spatial des récepteurs (Figure 19B).

Le ligand est la partie du PTL qui va interagir avec la protéine cible. Le ligand peut prendre la forme d'un agoniste, d'un antagoniste, ou d'un bloquant du canal.

Dans l'objectif de contrôler les récepteurs P2X, un dérivé de la stratégie des PTL fut développé en 2013 par notre laboratoire (Lemoine *et al*, 2013). La molécule utilisée, le MEA-TMA (maléimide éthylène azobenzène triméthyl ammonium), est semblable au MAQ employé

dans la stratégie du blocage des récepteurs potassiques (Figure 19A). La zone ciblée par cette stratégie est la partie du pore et non la partie du site de fixation de l'ATP comme sur les autres récepteurs transmembranaires vu précédemment. Se démarquant par cette spécificité, le MEA-TMA permet la photorégulation du pore par isomérisation de son cœur azobenzène. C'est un ensemble de positions mutées en cystéines qui permet le pontage et la régulation du récepteur P2X2 de rat. Cette stratégie innovante permet le contrôle de l'ouverture du récepteur en s'affranchissant de l'emploi d'ATP. Une autre approche utilisant des BMA (bis-maléimide azobenzène) fut employée pour photoréguler les récepteurs (Browne *et al*, 2014). La particularité de cet outil est la réalisation d'un double pontage grâce à la présence de deux fonctions maléimides entourant le cœur azobenzène. Ciblant toujours la zone de l'ouverture cette nouvelle stratégie permet par la même occasion d'importer des informations sur les mouvements des hélices transmembranaires (Figure 19A).

En 2016, une autre publication issue de notre laboratoire utilise le MAM (maléimide azobenzène maléimide), semblable au BMA, mais dont la partie entre l'azobenzène et les maléimides est complétée par une unité glycine permettant d'avoir une molécule plus grande. L'emploi du MAM a permis d'apporter des informations importantes sur les mouvements des hélices TM2 lors de l'ouverture des récepteurs (Habermacher *et al*, 2016b) (Figure 19A). Cela notamment par la détermination de deux mouvements des hélices (un vertical et un horizontal), et par l'apport d'information de distance améliorant les données des structures cristallographiques (Figure 19C).

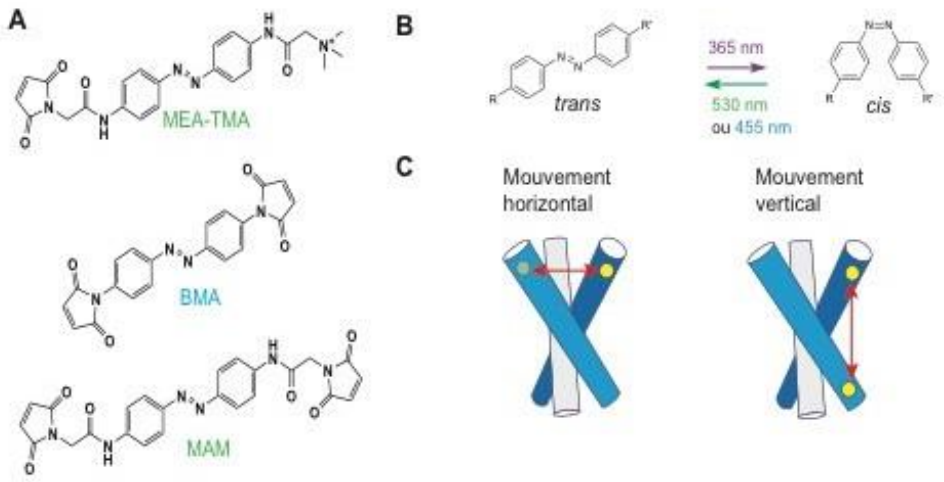

*Figure 19 Contrôle des récepteurs P2X par la lumière **A** Structure chimique des molécules développée pour les P2X **B** Isomérisation cis-trans, différence de longueurs d'onde pour l'isomérisation cis trans entre le BMA et les deux autres molécules. **C** Représentation schématique des différents mouvements permettant l'ouvert du pore découvert grâce au MAM*

L'utilisation de la lumière pour le contrôle des récepteurs constitue une stratégie de choix pour permettre le contrôle spatio-temporel en s'affranchissant de l'utilisation de l'agoniste naturel. De plus, cette approche apporte des informations structurales sur les divers récepteurs.

Objectif de la thèse

Les récepteurs P2X font l'objet d'une attention particulière depuis leurs découvertes. De nombreuses études portant sur leurs structures, leur fonctionnement et leurs rôles nous a permis de caractériser un certain nombre d'aspect des récepteurs P2X. Le processus de dilatation des récepteurs P2X ne fait pas l'unanimité dans le monde scientifique malgré de nombreuses expérimentations depuis une vingtaine d'années. Comme nous l'avons vu dans la partie 3, la caractérisation de cet état de conductance particulier est portée par un grand nombre de résultats variés mais qui entrainent indubitablement un certain nombre de questions. La dilatation n'est pas une caractéristique uniformément observée selon les sous-types, les espèces, l'expression de surface, ou même les conditions expérimentales. La compréhension du mécanisme de dilatation reste donc controversée et incertain. Ces incertitudes nous amènent à se poser la question de savoir si la dilatation est un phénomène réel ou le résultat de différentes conditions expérimentales. Durant l'ensemble de ma thèse, mon objectif a consisté à comprendre les différents mécanismes de la dilatation des récepteurs P2X.

La première partie de ma thèse s'est concentrée à déterminer des conditions permettant de piéger l'état dilaté. Pour cela, j'ai d'abord étudié la dilatation sur les récepteurs zfP2X4 et particulièrement sur les constructions qui ont permis l'obtention de structures cristallographiques. Par la suite, toujours dans une volonté de piéger un état dilaté, j'ai utilisé des molécules photoisomérisables développés au sein de mon laboratoire afin d'avoir un contrôle spatiale et temporel de l'ouverture des récepteurs P2X. Et enfin, suite au changement de paradigme survenu en 2015 (Li *et al*, 2015), il était important de caractériser le mécanisme dilatation à la lumière de ces nouvelles conditions.

Résultats

5 Etudes la dilatation sur les différentes constructions du récepteurs zfp2x4

5.1 Contexte et stratégie

Au début de ma thèse, il existait une structure cristallographique de l'état fermé résolu en absence d'ATP, et une structure co-cristallisée avec de l'ATP dans un état ouvert. Les informations issues de ces structures nous permettent de comprendre l'organisation générale des récepteurs P2X et nous apportent une partie de compréhension des transitions de l'état fermé à l'état ouvert (I1). Les deux structures cristallographiques ont nécessité deux constructions ayant des domaines cytoplasmiques tronqués. Les constructions zfP2X4-A (NterΔ27aa, CterΔ8aa) pour l'état fermé et le zfP2X4-C (NterΔ27aa, terΔ24aa) pour l'état ouvert (Figure 20). Il est intéressant de noter qu'en parallèle de la résolution de la structure a l'état ouvert des tests en perméabilité sur zfP2X4-C ont permis de démontrer que cette construction ne présentait pas de dilatation (Hattori & Gouaux, 2012).

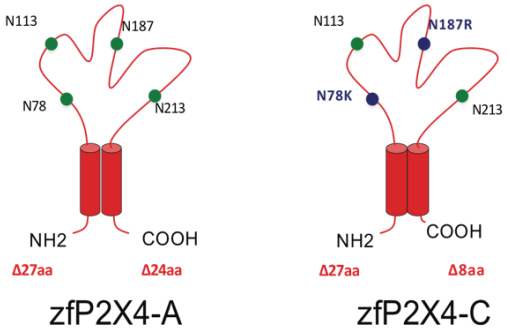

*Figure 20 Illustration de différentes constructions du zfP2X4 : Construction zfP2X$_4$-A tronqué en (Nter**Δ27aa**, Cter**Δ8aa**). C Construction zfP2X$_4$-C tronquée en (Nter**Δ27aa**, Cter**Δ24aa**) et mutée en N78K et N197R. Le point vert correspond aux sites glycosylations et les points bleu les mutations.*

Notre objectif premier est de trouver un moyen de piéger l'état dilaté et de confirmer son existence. Pour cela nous avons décidé d'étudier la dilatation sur les différentes constructions du récepteurs zfP2X4 et notamment la construction A par électrophysiologie et par mesure de fluorescence pour in fine pouvoir cristalliser l'état dilaté, s'il existe.

5.2 Matériels et méthodes

Enregistrements électrophysiologiques. Dans nos expérimentations, les pipettes de patch-clamp (résistance de pipette : 3-5 MΩ) contiennent une solution dite intrapipette qui, une fois la membrane cellulaire rompue, dialyse la cellule. Trois types de milieux ont été utilisés selon les besoins. Milieu extracellulaire NMDG : 160mM, 10mM de HEPES, et 10 mM de glucose. Milieu extracellulaire NES :140 mM de NaCl, 2.8mM de KCl, 2mM de MgCl2, 2mM de CaCl2, 10mM de HEPES, et 10 mM de glucose. Milieu intrapipette 140mM de CsCl, 10mM de MgCl2, 5mM de d'EGTA.

Fluorescence La fluorescence est mesurée à l'aide d'un microscope Leica DM IRBE2 équipé d'un objectif à immersion (40x 1.25 HCX PL APO) ; la capture d'images se fait par utilisation de la caméra Leica DC 350 FX. La source lumineuse est du Xénon bulb XBO 100 Watts. La fluorescence du YO-PRO-1 (Fig.6) (un intercalant de l'ADN, analogue du propidium (4-[(3-methyl-2(3H)-benzoxazolylidene)methyl]-1-[3-(triethylammonio)propyl]diiodid)) est mesurée pour une seule cellule dans le champ optique ; le marqueur est caractérisé par des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 491 nm et 509 nm, respectivement.

5.3 Résultats

Avant d'étudier les différentes constructions nous avons voulu étudier le processus de dilatation sur le récepteurs P2X2 de rat afin de pourvoir mettre au point les conditions d'études (Virginio et al., 1999). Nous avons effectué l'enregistrement des courants ioniques sur des cellules HEK293 exprimant le récepteur rP2X2 après transfection. Les courants ioniques ont été mesurés en configuration cellule entière. Dans le milieu extracellulaire, tous les ions Na^+ ont été substitués par des ions $NMDG^+$ (Matériels et Méthodes) afin d'étudier la dilatation des pores. De plus, afin de s'affranchir des courants ioniques attribuables à des courants transitant par des canaux potassiques de type voltage-dépendants (Yu & Kerchner, 1998), le milieu intrapipette est un milieu riche en CsCl (après substitution équimolaire du KCl par le CsCl) ; en effet, les Cs^+ bloquent les canaux potassiques permettant donc de s'affranchir des courants transitant par les canaux Kv.

L'application de 100 μM d'ATP (40 s) sur une cellule, dont le potentiel de membrane est imposé initialement a -60 mV, induit l'apparition d'un courant sortant transitoire suivi d'une composante entrante de courant *(Figure 21A,* résultat de gauche*).* Durant l'application d'ATP, des variations de potentiel de membrane sont imposées à la cellule sous la forme de rampes (-100 à +50 mV pendant 200 ms, 4 rampes aux temps 1s, 10s, 20s, 30s depuis le début de l'application d'ATP). La mesure des courants ioniques enregistrés consécutivement à ces rampes et le report de l'intensité de courant en fonction du potentiel de membrane permet d'obtenir les courbes courant-potentiel (courbes I/V, Figure 21A, résultat de droite). Nous constatons lors de l'application de l'ATP un changement du potentiel d'inversion. L'examen des courbes I/V montre un changement du E_{rev} au cours du temps (de -63.9 ± 2.03mV, initialement, à -20.925 ± 1.5mV, pour la dernière rampe, n=4). Cette variation du potentiel d'inversion est le signe du processus de dilatation des récepteurs P2X2. Le processus de dilatation est confirmé par l'évolution de la perméabilité du pore au $NMDG^+$ (de $P_{NMDG+/Cs+}$=0,064±0.017 à $P_{NMDG+/Cs+}$=0,353±0.010 en fin d'acquisition).

Nous avons ensuite étudié la dilatation en mesurant les courants sur des cellules TSA transfectées par le plasmide zfP2X4-C, selon le même principe que précédemment (solution extracellulaire riche en $NMDG^+$, milieu intrapipette riche en CsCl ; rampes de -100 à +50 mV pendant 200 ms, 4 rampes aux temps 1, 6, 11, et 16 secondes depuis le début de l'application d'ATP) Dans ces conditions, l'application d'ATP (100 μM) n'induit pas de courant (Figure 21B,résultat de gauche). Il n'est donc pas possible de déterminer des valeurs de potentiel d'inversion sur les courbes I/V correspondantes. Pour vérifier la bonne expression et le fonctionnement des récepteurs zfP2X4-C, des tests ont été effectués avec un milieu riche en NaCl (NES ; intensité moyenne de courant en réponse à l'ATP (100 μM) : – 33.25 ± 3.32 pA, n =4) (Figure 21B résultat de droite)). Ces résultats montrent que le récepteur a une activité très faible mais que le processus de dilatation n'est pas observé. J'ai fini par caractériser la dilatation sur les récepteurs zfP2X4-A, les courants ont été mesurés sur des cellules TSA transfectées par le plasmide zfP2X4-A, avec un protocole similaire à celui utilisé pour les récepteurs zfP2X4-C. Dans ces conditions, l'application d'ATP (100 μM) entraîne l'apparition d'un courant entrant (Figure 21C, résultat de gauche). Les courbes courant-potentiel sont caractérisées par des valeurs de potentiel d'inversion très proches les unes des autres (de -17.6.± 3.37mV, initialement, à -10,4 ± 2.76mV, pour la dernière rampe, n =8). Nous ne constatons aucune une évolution de la perméabilité du pore au $NMDG^+$ (de $P_{NMDG+/Na+}$=0.40±0.01 à $P_{NMDG+/Na+}$=0,53±0.01 en fin d'acquisition) et une absence de déplacement de ces valeurs sur l'axe des abscisses. Les résultats suggèrent une dilatation instantanée du pore avec d'emblée, une forte perméabilité pour le $NMDG^+$.

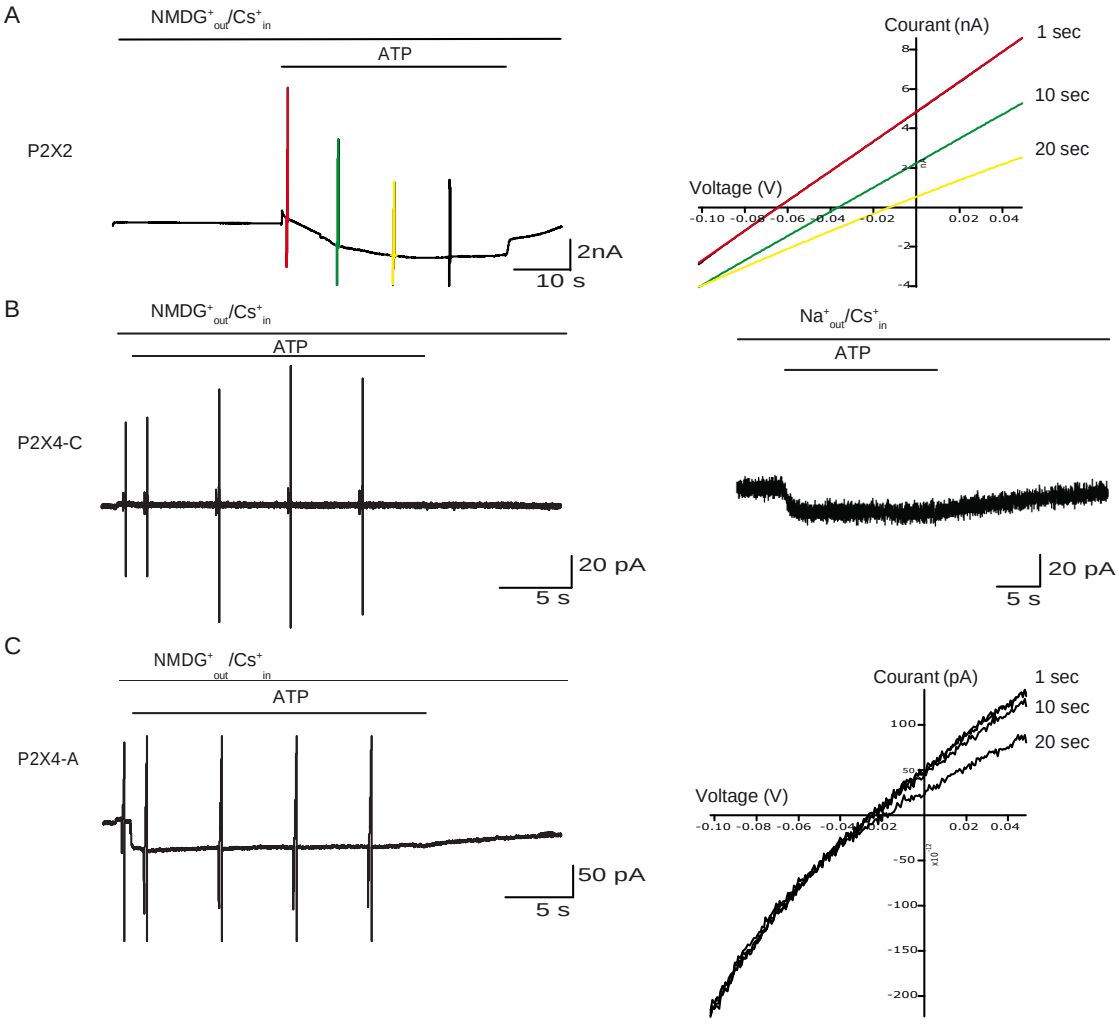

*Figure 21 Caractérisation du passage du $NMDG^+$ en électrophysiologie : **A** Les courants sont mesurés pendant 30 seconde en $NMDG^+$ puis pendant 40 secondes d'application en présence d'ATP sur des cellules HEK293 exprimant le récepteur P2X2. (Résultat de gauche) L'ATP induit un courant sortant puis rapidement rentrant. (Résultat de droite) Courbe I/V sur la même cellule obtenue à partir de rampes de 500ms. 1ère application de la rampe 1 s après l'ATP puis tous les 10 sec. **B** (Résultat de gauche) Les courants sont mesurés sur des cellules TSA exprimant le récepteur zfP2X4-C pendant 1 seconde en NES puis pendant 1 seconde en $NMDG^+$ puis 20 secondes d'application en $NMDG^+$ en présence d'ATP. L'ATP induit peu de courant sortant. (Résultat de droite) Test du bon fonctionnement du récepteur. Courant rentrant après application de l'ATP du récepteur (milieu riche en Na^+). Mesure prise sur la même cellule. **C** (Résultat de gauche) Les courants sont mesures sur cellules TSA exprimant le récepteur zfP2X4-A pendant 1 seconde en NES puis pendant 1 seconde en $NMDG^+$ puis 20 secondes d'application d'ATP. L'ATP produit un courant entrant. (Résultat de droite) Courbe I/V sur la même cellule obtenue à partir de rampes de 500ms. 1ère application de la rampe 500 ms en $NMDG^+$, 1 s après l'ATP puis tous les 5 s.*

Afin de confirmer l'ensemble de ces résultats nous avons décidé de mesurer l'incorporation de YO-PRO-1. Dans ce protocole, les cellules sont exposées à un milieu extracellulaire riche en

$NMDG^+$ de même composition que la solution utilisée en patch et contenant du YO-PRO1 (100 μM) pendant 5 minutes ; elles sont ensuite exposées à une solution riche en $NMDG^+$ et contenant de l'ATP (100 μM, 10 minutes) en plus du YO-PRO1. L'acquisition des images est faite à une fréquence de 0,03 Hz dans la première phase (en $NMDG^+$ seul) puis à 0,2 Hz (en $NMDG^+$ + ATP). Les résultats montrent une augmentation importante de la fluorescence émise par les cellules après application d'ATP (Figure 22A) pour les cellules exprimant le récepteurs P2X2

Sur le récepteur P2X2, l'analyse des variations de fluorescence montre une augmentation de la fluorescence, environ 2 minutes 30 secondes après l'application de l'ATP suivie d'une phase de stabilisation du signal indiquant l'incorporation du YO-PRO-1 dans le noyau cellulaire (Figure 22A). Ces résultats sont représentatifs de 5 observations. Sur le récepteur P2X4-C, l'application d'ATP (100 μM) n'induit l'apparition de fluorescence que très tardivement (après 8 minutes) et l'intensité du signal reste faible, avec la solution riche en $NMDG^+$ (Figure 22B). Ces résultats confirment ceux obtenus en électrophysiologie, aucune dilatation n'est observée. Sur le récepteur zfP2X4-A, les résultats montrent une augmentation importante de la fluorescence émise par les cellules après application d'ATP, ce qui est semblable aux résultats obtenus avec le récepteur rP2X2. L'analyse de la fluorescence montre une augmentation du signal, environ 2 minutes 30 secondes après l'application de l'ATP suivie d'une phase de stabilisation du signal indiquant l'incorporation du YO-PRO-1 dans le noyau cellulaire (Figure 22C) Ces résultats sont représentatifs de 4 observations.

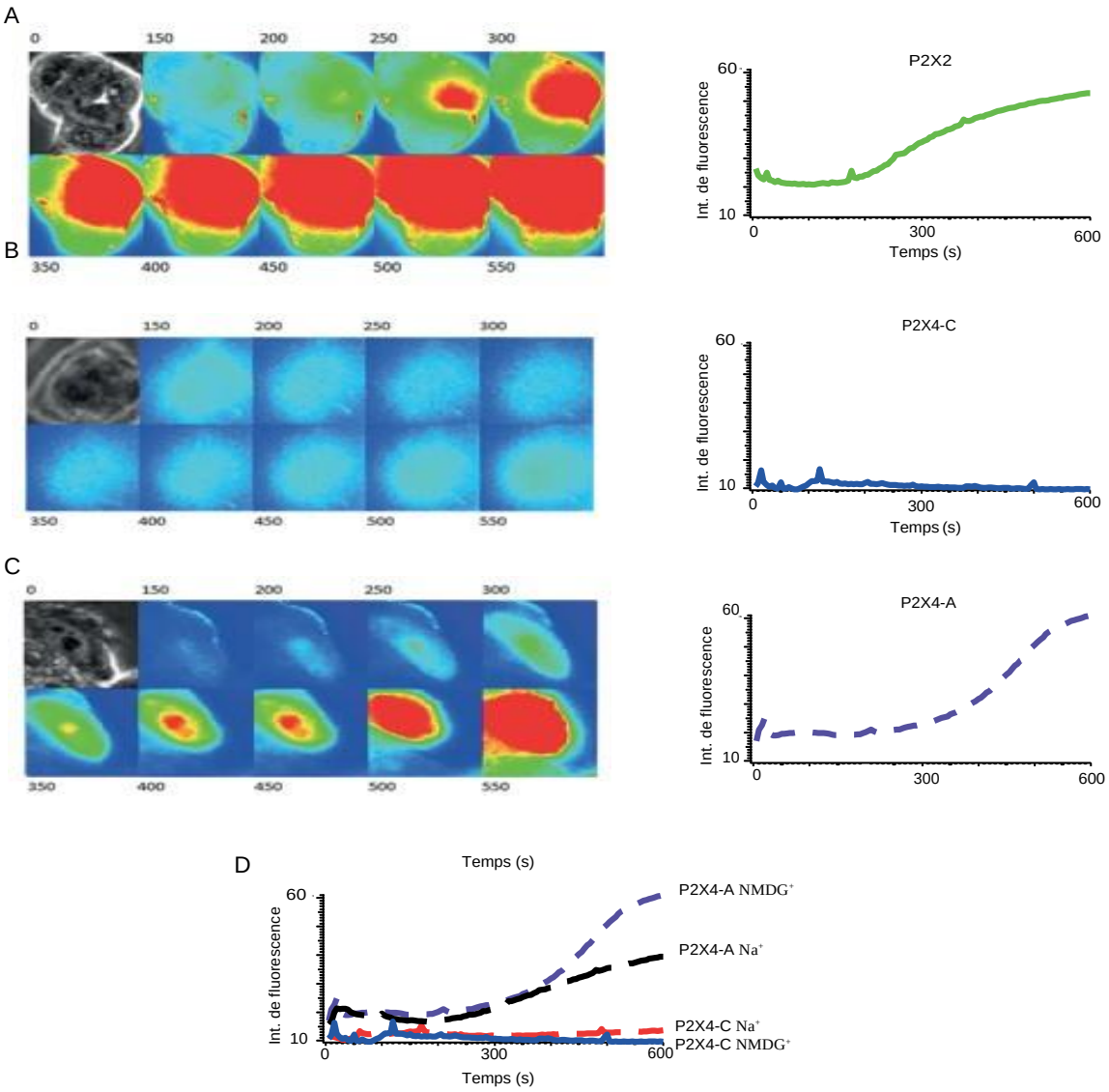

Figure 22 Mesure de l'incorporation du YOPRO-1 : A- (Résultat de gauche) Les cellules exprimant le récepteur rP2X2 sont incubées dans une solution riche en NMDG+ contenant du YO-PRO-1 (2 µM) pendant 10 minutes ; elles sont ensuite soumises à une application d'ATP (100 µM) pendant 10 minutes. La première image correspond à la lumière transmise ; les images en fluorescence ont été obtenues pendant l'application de l'ATP aux temps indiqués en secondes. Le YO-PRO-1 est présent dans toutes les conditions. L'ATP est appliquée au temps 0 s. Les images ont été obtenues en microscopie à épi-fluorescence avec un objectif à grossissement 40X. Augmentation de l'intensité du YO-PRO-1 (Résultat de droite) La courbe correspondante représente l'intensité relative de fluorescence exprimée en fonction du temps. B Les cellules exprimant le récepteur zfP2X$_4$-C ne montrent aucune incorporation. C Les cellules exprimant le récepteur zfP2X$_4$-A montre une incorporation semblable au récepteur rP2X2. D comparaisons des conditions extracellulaires Les cellules exprimant le récepteur zfP2X4-A (zébré noire) et zfP2X4-C (rouge) sont incubées dans une solution riche en Na^+ selon le même protocole. Meilleur incorporation en $NMDG^+$ extracellulaire

Afin de tester l'influence du Na^+ sur le phénomène de dilatation. J'ai reproduit ces tests avec un milieu riche en Na^+ (solution NES) sur le zfP2X4-A. L'ATP (100 µM) induit une augmentation du signal de fluorescence émis par les cellules transfectées avec le récepteur zfP2X4-A. L'étude des

données montre qu'en milieu riche en $NMDG^+$, la cinétique est accélérée par rapport aux données recueillies en NES pour le récepteur zfP2X4-A (Figure 22D).

5.4 Discussions

Nos résultats nous ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'existence d'un phénomène de dilatation pour les récepteurs zfP2X4-A. Nous avions choisi d'étudier le récepteur P2X2 en premier car il nous était important de mettre en places les meilleures conditions possibles pour l'observation de la dilatation. C'était de surcroit un moyen qui nous permettait de nous familiariser et d'appréhender au mieux le mécanisme de dilatation. Dans cette partie nous avons pu déterminer la perméabilité au $NMDG^+$ du récepteur au cours du temps et le caractère dynamique de la dilatation ($P_{NMDG+/Cs+}$=0,064±0.017 à $P_{NMDG+/Cs+}$=0,353±0.010). Cette variation au cours du temps peut s'interpréter comme le résultat de l'ouverture progressive du pore au fur et à mesure de l'exposition de la dilatation. Contrairement au P2X2, nos résultats sur le zfP2X4-A montrent que le E_{rev} ne subit qu'une faible variation au cours du temps et une perméabilité immédiatement importante au $NMDG^+$. Ceci peut être interprété par le fait que le récepteur est d'emblée perméant au $NMDG^+$ et donc dans un état dilaté. Ceci rapprocherait le récepteur zfP2X4-A du récepteur humain hP2X5 caractérisé, lui aussi, par un état dilaté instantané (Bo *et al.,* 2003).

Par la même occasion nous confirmons que le récepteur zfP2X4-C ne présente pas de dilatation (Hattori and Gouaux, 2012). De plus l'analyse des résultats obtenus en fluorescence permet de confirmer les différents résultats obtenus en électrophysiologie. La cohérence des résultats obtenus par deux techniques différentes est évidement un avantage certain dans l'interprétation qu'on en fait. Les résultats obtenus avec des solutions extracellulaires riches en Na^+ montrent un décalage dans le temps de l'incorporation de YO-PRO-1 par les cellules en comparaison aux résultats obtenus avec un milieu riche en $NMDG^+$. Il peut donc être suggéré que les ions Na^+ ralentissent probablement ce processus et par conséquent le phénomène de dilatation. Cette hypothèse est conforme à d'autres études, où il a été observé que les ions Na^+ sont responsables

d'une inhibition conséquente de la perméabilité au $NMDG^+$ pour les récepteurs P2X2/5 et P2X7 et d'une moins grande efficacité d'incorporation de YO-PRO-1 par les récepteur P2X2/5 et P2X2 (Compan *et al*, 2012).

Ces données soulèvent un certain nombre de questions et notamment les résultats obtenus sur le zfP2X4-C. Outre les différences structurales entre les constructions A et C, nous avons constaté une diminution des courants observés en présence d'ATP plus importante pour la construction C. Ces faibles courants nous ont posés énormément de problème pour la caractérisation de la dilatation. Pour pallier à ce problème de courant nous avions commencé à utiliser de l'IVM pour potentialiser les courants. Nous avions remarqué des différences entre les constructions du récepteurs P2X4 et la version sauvage (résultats non illustrés ici). Nous avions multiplié des conditions afin d'améliorer les conditions d'observation cependant nous avons pris la décision de stopper ce projet car l'optimisation devenait couteuse en temps. Surtout que l'ablation de certaine partie du récepteur pouvait introduire des artefacts de résultats nous induisant en erreur.

6 Utilisation des molécules photoisomérisables pour le contrôle des récepteurs P2X

6.1 Contexte et stratégie

Notre laboratoire se situe à l'interface de la chimie et de la biologie. Cette spécificité a permis la publication de deux articles portant sur le développement d'outils optogénétiques permettant le contrôle des récepteurs P2X2 (Lemoine *et al*, 2013; Habermacher *et al*, 2016b). La stratégie des « photo-tweezer » développée par la doctorante Chloé Habermarcher a permis notamment de comprendre l'implication des hélices TM2 et la découverte des mouvements impliqués dans l'ouverture du pore P2X. En utilisant cette stratégie, le pore peut être ouvert ou

fermé en réponse à la lumière, à condition qu'un MAM (dénommé ici MAM3) soit lié de manière covalente entre une paire de résidus modifiés par une cystéine située à une distance appropriée. Un mouvement horizontal des hélices TM2 est consécutif à un double pontage horizontal entre deux sous-unités de mutants cystéines, induit par le MAM. L'ouverture du pore est le résultat du passage du MAM d'un isomère *cis* (version courte) à l'isomère *trans* (version longue), qui induit un écartement des hélices TM2 l'une par rapport à l'autre. Le mouvement vertical, consécutif à un double pontage vertical du MAM, est le résultat du passage du MAM d'un isomère *trans* à un isomère *cis.* Ceci a pour conséquence un rapprochement des hélices TM2 grâce à un mouvement de torsion.

Nous avons décidé d'utiliser cette stratégie et des dérivés du MAM pour piéger l'état I2. Pour cette partie du projet j'ai utilisé 5 molécules (nommé MAM1 à 5), synthétisées par la doctorante Laurie Peverini, ayant des tailles différentes afin d'incrémenter la distance entre les deux maléimides (Figure 23). En jouant sur la taille nous espérions discriminer le passage des petits cations et des gros cations du type $NMDG^+$. Car en plus de pouvoir contrôler l'ouverture et la fermeture du récepteur P2X2 en s'affranchissant de l'utilisation de l'ATP, nous avions l'opportunité d'avoir une règle moléculaire en jouant sur la taille des espaceurs. La stratégie employée s'est articulée autour des mouvements horizontaux et verticaux des hélices TM2 permettant l'ouverture du récepteur. L'idée est simple : afin d'étudier la dilatation nous allons utiliser des molécules photoisomérisables de grandes tailles pour investiguer le mouvement horizontal et permettre un écartement plus important des hélices TM2. D'une manière analogue l'utilisation des molécules photoisomérisables plus courtes se justifie afin d'investiguer les mouvements verticaux dans le but de rapprocher les hélices TM2.

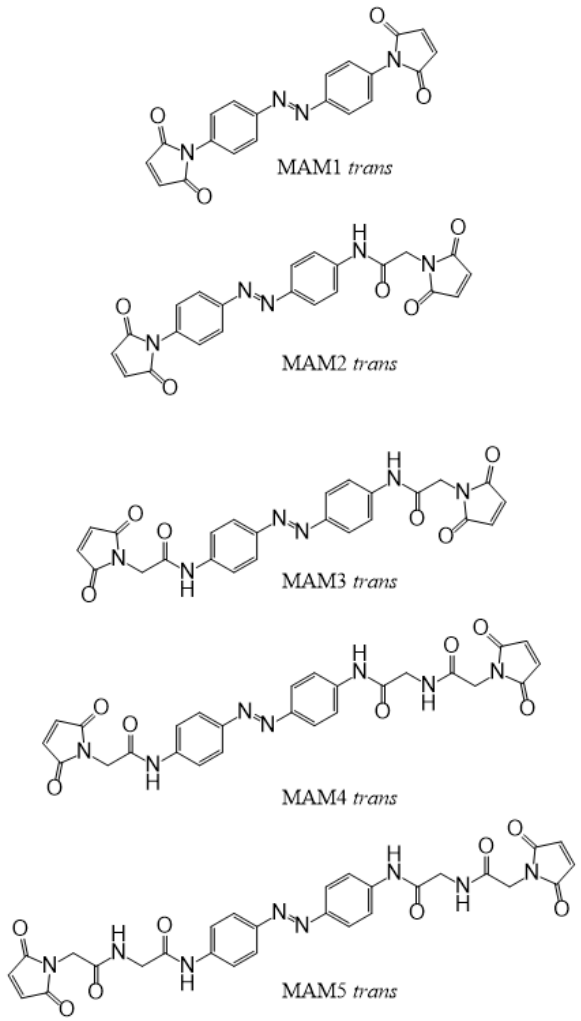

Figure 23 Structure chimique des différents MAM utilisées

6.2 Matériels et méthodes

Enregistrements électrophysiologiques : Deux types de milieux ont été utilisés. Milieu extracellulaire $NMDG^+$: 160mM, 10mM de HEPES, et 13 mM de glucose. Milieu extracellulaire NES :140 mM de NaCl, 2.8mM de KCl, 2mM de MgCl2, 2mM de CaCl2, 10mM de HEPES, et 10 mM de glucose. Milieu intrapipette 140mM de CsCl, 10mM de MgCl2, 5mM de d'EGTA. Les conditions d'incubations pour les molécules photoisomérisables sont respectivement MAM1 10 µM pendant 10 min, 1% de DMSO final dans NES, MAM2 10 µM pendant 10 min, 1% DMSO dans NES et MAM3 3 pendant 20 min, DMSO à 1% dans NES, MAM4 50µM pendant 20 min, 1% DMSO dans NES, MAM5 50µM pendant 20 min, 1% DMSO dans NES et ATP 3 µM. Les effets de la lumière sur

l'activité du récepteur ont ensuite été mesurés en utilisant des enregistrements de Patch clamp en configuration cellules entières à 365 nm (2 s, 17,7 mW / mm2), 530 nm (4 s, 13,3 mW / mm2) ou 455 -nm (2 s, 39,5 mW / mm2) pour obtenir des photorégulations.

6.3 Résultats

Au sein du laboratoire, nous avons une banque assez importante de plasmides codant pour des récepteurs P2X2 possédant une ou plusieurs mutations cystéines. L'ensemble des mutants a été généré sur le récepteur P2X2-3T dont trois cystéines endogènes furent remplacées par des thréonines. Afin d'augmenter le nombre de position qui permettent la photorégulation, j'ai lancé un criblage sur un ensemble de mutants au niveau du pore et particulièrement autour des résidus I328 et S345. Pour ce faire j'ai utilisé les 5 MAM (Figure 24) en notre possession. Les mutants utilisés sont composés d'une combinaison de simple et double mutant sur TM1 et TM2. Sur un ensemble de 40 combinaisons j'ai obtenu 24 photorégulations. L'ensemble des résultats obtenus confirment les mouvements moléculaires précédemment publiés (Habermacher *et al*, 2016b) c'est-à-dire une ouverture gouvernée soit par un pontage horizontal soit par un pontage vertical. Afin de piéger l'état dilaté j'ai dissocié les deux types de pontages en les étudiant séparément. J'ai utilisé deux groupes de mutants : un premier groupe de simples mutants où un seul résidu est muté en cystéine permettant l'accroche d'une seule molécule photoisomérisable et un deuxième groupe de doubles mutants où trois molécules photoisomérisables peuvent potentiellement se fixer. J'ai donc testé le premier groupe de mutant afin de pouvoir me concentrer sur le mouvement horizontal des hélices (Figure 24D). J'ai incubé les différents mutants avec les MAM (voir matériels et méthodes pour les conditions d'incubation) puis j'ai appliqué de la lumière en commençant par irradiation UV puis visible. Sur un ensemble de 18 simples mutants introduits sur TM1 ou TM2 (Y47C, S326C, I328C, P329C, I332C, T336C, Y43C, D57C, S58C, T330C, I331C, N333C, L334C, A335C, L338C, T339C, S345C, L347C) seul 6 mutants présentent une photorégulation (Y47C, S326C, I328C, P329C, I332C, T336C) (Figure 24C). Sur l'ensemble des mutants, il s'est avéré que le mutant I328C présentait les plus forts courants de photorégulation

(Figure 24A). C'est pourquoi j'ai décidé de tester la dilatation en substituant le Na^+ extracellulaire par du $NMDG^+$. Suite à l'activation de nos récepteurs par la lumière, aucun courant rentrant porté par le $NMDG^+$ n'est enregistré lors de la première activation, (Figure 24B). Au contraire nous observons un courant sortant porté par le Na^+, mais suite à plusieurs applications de ce protocole lumineux j'ai constaté une diminution progressive de ce courant sortant jusqu'à la disparition totale du courant, de plus dans certain cas j'ai pu observer de très faible courant rentrant. Cette dernière observation se produisant suite l'application, d'un grand nombre, du protocole lumineux. Il s'est donc avéré que ce mouvement correspondant à un écartement des hélices horizontal ne permettait pas d'observer un courant net et important de $NMDG^+$

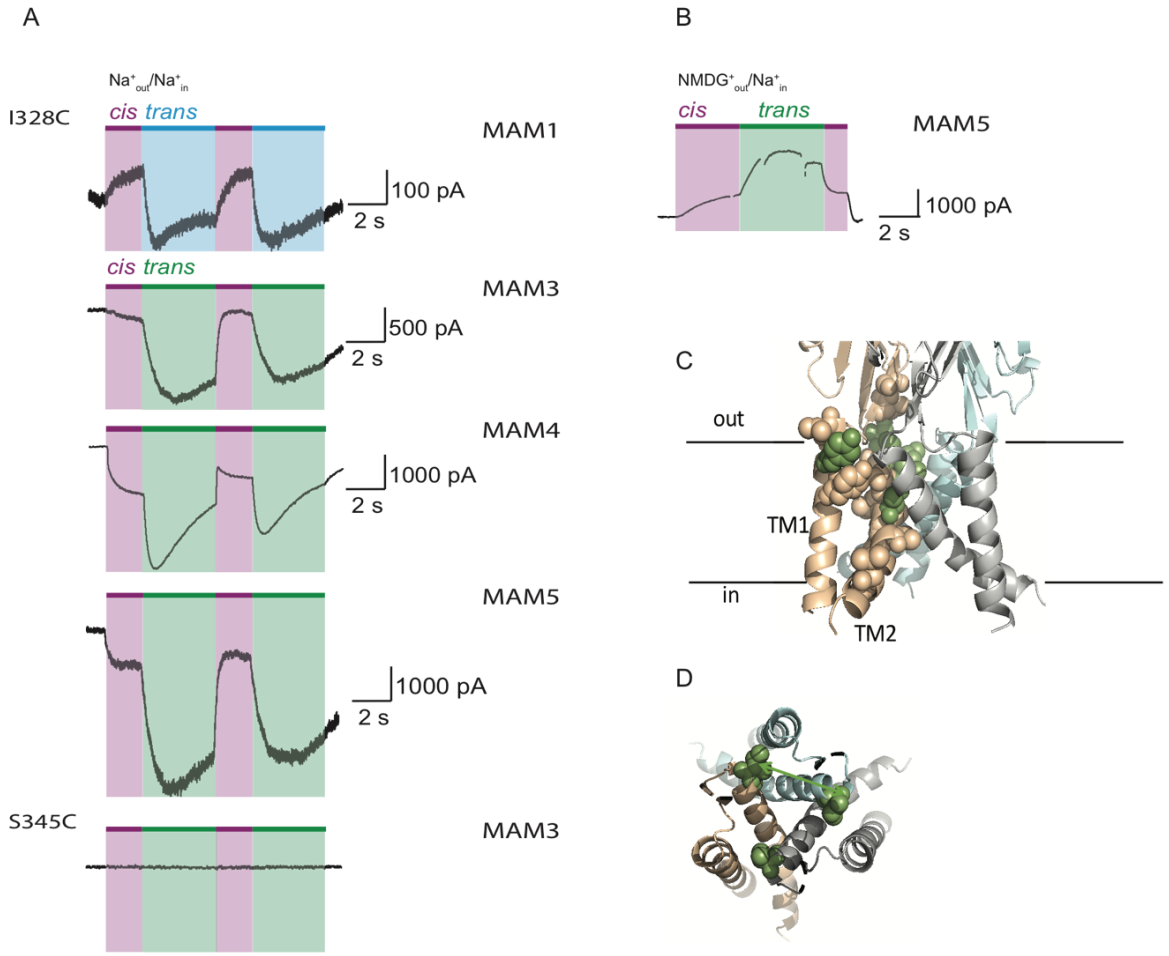

*Figure 24 Investigation des mouvements horizontaux des hélices TM2 : **A** Traces électrophysiologiques enregistrées lors d'irradiation 525, 365nm en absence d'ATP sur des cellules exprimant le mutant I328C avec des différents MAM et S345C avec le MAM3. **B** Trace électrophysiologiques représentatif des courants induit par la lumière en présence du $NMDG^+$ sur le mutant I328C. C Vue latérale du domaine transmembranaire de la structure de rayons X liée à ATP zfP2X4 codées par couleur par sous-unité. Les*

résidus sélectionnés et représentés par des sphères indiquent les substitutions en cystéine. La couleur verte indique les positions qui photorégulent et l'autre couleur indique les positions qui ne photorégulent pas. D Vue du haut du mutant I328C

J'ai par la suite ciblé le mouvement vertical par l'intermédiaire de mutations de deux acides aminés positionnés afin que les molécules photoisomérisables puissent ponter. J'ai testé un ensemble de 17 mutants (I332C/V51C, I332C/Y47C, A335C/V51C, I332C/S345C, I328C/S345C, I328C/F346C, S326C/S58C, S326C/N333C, I332C/Q52C, I332C/D57C, I332C/S58C) dont seuls 6 mutants présentaient une photoregulation (I332C/V51C, I332C/Y47C, A335C/V51C, I332C/S345C, I328C/S345C, I328C/F346C) (Figure 25D). Je me suis focalisé sur la paire I328C/S345C (Figure 25A) pour la détection de la dilatation car soit les courants de photorégulation (I328C/F346C) étaient trop faibles soit les mutants se trouvaient sur deux segments transmembranaires différents impliquant une analyse plus complexe des mouvements sous-jacents (A335C/V51C). Il est important de noter que seules les MAM2 et MAM3 ont permis de ponter, sur le mutant I328C/S345C, les deux cystéines.

J'ai à nouveau substitué le Na^+ par $NMDG^+$ afin de détecter la dilatation du pore.

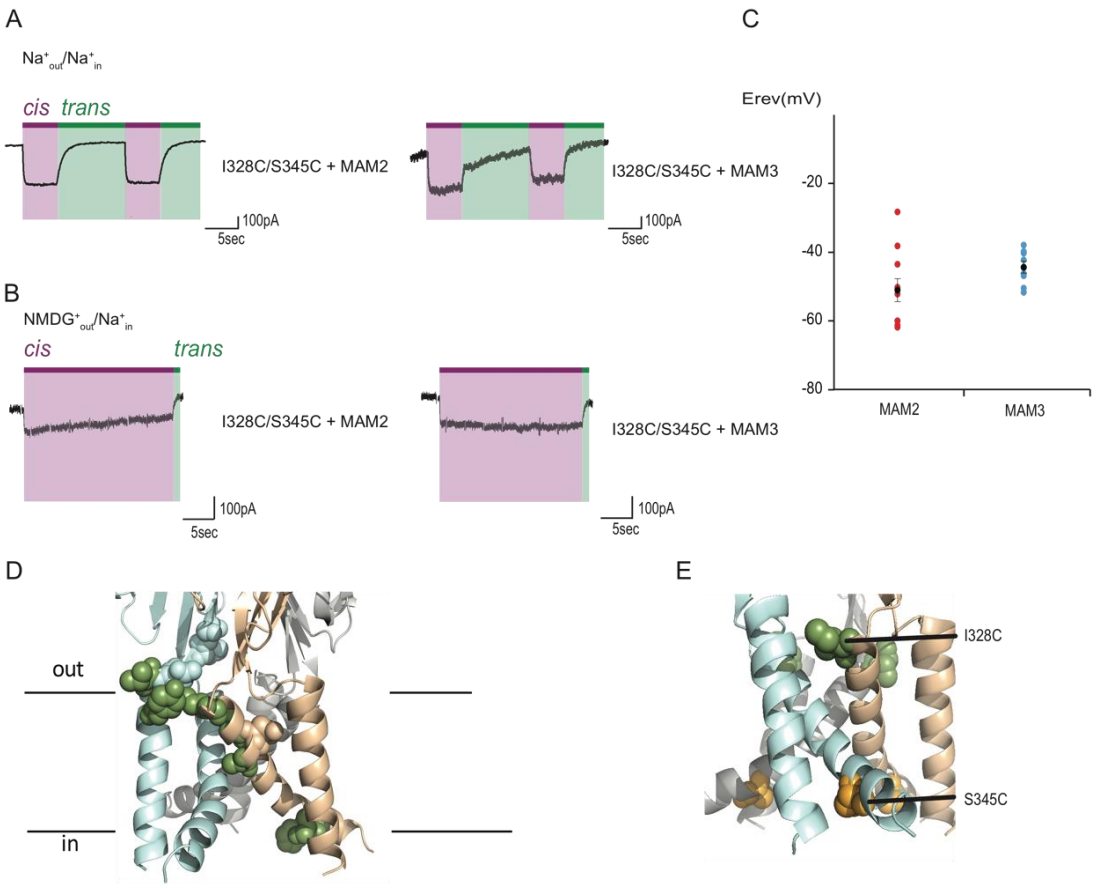

Figure 25 Investigation des mouvements horizontaux des hélices TM2 : A traces électrophysiologiques enregistrées lors d'irradiation 525, 365nm en absence d'ATP sur des cellules exprimant le mutant I328C/S345C avec les MAM2 et MAM3 (Na^+ externe). B trace électrophysiologiques représentatif des courants induit par la lumière en présence du $NMDG^+$ sur le mutant I328C/S345C avec le MAM2 et MAM3.C Données regroupées, présentées en tant que valeurs individuelles du E_{rev} et en moyenne ± sem, obtenues avec le MAM2 (couleur rouge n = 11 patches) et le MAM3 (couleur bleu, n = 9) D Vue latérale du domaine transmembranaire de la structure de rayons X liée à ATP zfP2X4 codées par couleur et par sous-unité. Les résidus sélectionnés et représentés par des sphères indiquent les substitutions en cystéine. La couleur verte indique les positions qui photorégulent et l'autre couleur indique les positions qui ne photorégulent pas. E Vue latérale des mutants I328C et S345C

En utilisant le MAM2 et le MAM3 nous observons une entrée de $NMDG^+$ consécutif à une irradiation dans l'UV. Pour quantifier la dilatation et comparer l'effet des deux MAM j'ai mesuré le potentiel d'inversion avec le MAM2. Lors de l'analyse des résultats, J'ai comparé mes résultats obtenus avec les résultats de la doctorante Chloé Habermarcher (Habermacher *et al*, 2016b), j'ai constaté aucune réelle différence (MAM2 $E_{revmoyen}$=53.6mV, $P_{NMDG+/Cs+}$=0,1233, N=12 ; MAM3 $E_{revmoyen}$=-49,6mV, $P_{NMDG+/Cs+}$=0,1474, N=9). Nous avions postulé que l'utilisation du MAM2 étant plus petit que le MAM3, augmenterait la dilation, il s'est donc avéré aucune différence notable (Figure 25C).

6.4 Discussions

Comme il l'est déjà décrit dans des précédentes publications, l'utilisation de molécules photoisomérisables constitue un outil puissant pour le contrôle des récepteur P2X. Son utilisation pour piéger la dilation s'est avérée intéressante. Dans un premier temps nous avons confirmé qu'il existait deux mouvements des hélices permettant l'ouverture du pore. C'est deux mouvements ont permis de piéger deux états d'ouvertures différentes. Un état ouvert consécutif à un mouvement horizontal permettant l'observation de courant porté des petits cations. Mais également un état ouvert qui fait suite au mouvement vertical des hélices perméant aux cations de grosses tailles de types $NMDG^+$. Nous avons certes déterminé un mécanisme piégeant l'état dilaté, cependant il reste un certain nombre de questions auxquelles il est important de répondre afin de clarifier certaines zones d'ombre. Nous pensions qu'augmenter la taille des MAM lors du pontage horizontal et notamment sur le mutant I328C permettrait d'écarter suffisamment les hélices afin de piéger l'état I2. Or aucune combinaison n'a pas permis d'observer un courant $NMDG^+$. Des analyses en dynamique moléculaire ont révélé que le MAM4 et le MAM5 présentaient une trop grande flexibilité. Cette analyse montre que les tailles des molécules (MAM4, MAM5) n'ont peut-être pas autant d'influence sur l'écartement des hélices dans le pontage horizontal. Ceci peut fausser notre interprétation et notamment sur la différenciation des deux mouvements.

La comparaison du MAM2 et MAM3 pour l'investigation du pontage verticale lors de l'analyse de la perméabilité est confronté à un problème de différence de marquage. En effet, il n'est pas exclu que la différence structurale des molécules influence le taux marquage de nos molécules. Les résultats obtenus avec les deux molécules sont donc certainement à améliorer. Durant cette partie de ma thèse j'ai investigué des mouvements induit par le pontage de cystéine se trouvant sur TM1 et TM2, j'ai observé des courants activés par la lumière. Les mutants I332C/V51C, I332C/Y47C, A335C/V51C représentent cette configuration. Nous avons décidé de ne pas continuer sur cette voie car nous avons voulu nous focaliser sur le mouvement des hélices TM2. Ce choix est fondé par la composition du pore formé par les segments TM2 de chaque sous-unité.

De plus, le mouvement induit par le pontage de cystéines situés sur les deux segments TM1 et TM2 crées un certain nombre de combinaison. Les MAM peuvent se fixer sur des cystéines situées sur la même sous unités ou sur des sous unités différentes. La discrimination de ces deux pontages nécessitait des manipulations complémentaires. De plus il est important de compléter ces résultats en mesurant la fluorescence afin de confirmer ou infirmer ces hypothèses. J'avais entamé les premières expériences en fluorescence, cependant à la publication de l'article (Li *et al*, 2015), nous avons décidé d'étudier la dilatation grâce à ces nouvelles conditions.

7 Etude de la dilatation à la lumière du changement de paradigme

7.1 Contexte et stratégie

La publication de (Li *et al*, 2015) a considérablement remis en cause notre perception du mécanisme de dilatation. En effet, la dilatation fut longtemps décrite comme le résultat d'une augmentation progressive du pore. Pour rappel, les auteurs de cet article ont prouvé que le changement du potentiel d'inversion en fonction du temps est dû aux conditions expérimentales. Or depuis le début, la dilatation fut étudiée en condition asymétrique, c'est-à-dire $NMDG^{+}_{EXT}/Na^{+}_{INT}$. Le changement d'$E_{rev}$ n'est pas une augmentation de perméabilité au $NMDG^{+}$ mais une sortie massive de Na^{+}_{INT} vers le milieu extracellulaire suite à l'activation des récepteurs P2X. En utilisant des conditions $NMDG^{+}$ symétriques ($NMDG^{+}_{EXT}/NMDG^{+}_{INT}$), deux évidences apparaissent ; la première est que le récepteur montre aucune variation de la perméabilité au $NMDG^{+}$ et le deuxième est que l'analyse des courants en configuration cellule entière montre que le pore est directement perméant au $NMDG^{+}$.

C'est pourquoi, en collaboration avec la doctorante Laurie Peverini, nous avons décidé d'étudier la dilatation à la lumière de cette nouvelle condition. En utilisant la configuration 'Outside out' nous avons voulu tester les cinétiques d'activation du récepteur P2X2 et déterminer la conductance des courants unitaires. L'utilisation des molécules photoisomérisables nous a par ailleurs permis d'étudier les mouvements moléculaires conduisant au passage du $NMDG^{+}$.

7.2 Matériels et méthodes

Enregistrement électrophysiologique. Configuration 'Outside out'. La solution extracellulaire contenait 132,6 mM de NaCl ou NMDG 0,3 mM de CaCl2, 0,25 mM de MgCl2, 10 mM de HEPES,

pH 7,3. La solution intrapipette contenait soit 132,6 mM NMDG, 9,46 mM HEPES et 10 mM EDTA, ajustée à pH 7,3. Ou NaF 132,6 mM, HEPES 9,46 mM et EDTA 10 mM, ajusté à pH 7,3 avec NaOH.

Configuration cellule entière. La solution externe normale (NES) contient 140 mM de NaCl, 2,8 mM de KCl, 2 mM de CaCl2, 2 mM de MgCl2, 10 mM de glucose, 10 mM de HEPES, ajustée à pH 7,3 avec du NaOH. La solution interne normale (NIS) contenait KCl 140 mM, MgCl2 5 mM, EGTA 5 mM, HEPES 10 mM, ajustée à pH 7,3 avec du NaOH. Pour les expériences de photorégulation les conditions sont : Milieux intrapipette 140 mM NMDG, 10 mM HEPES et 10 mM EDTA, pH ajusté avec HCl à 7,3 ; milieux extracellulaire 140 mM NMDG et 10 mM HEPES, pH 7,3 ou 140 mM de NaCl et 10 mM de HEPES, pH 7,3. Pour les expériences de perméation de la Spermidine, les conditions sont : milieu intrapipette 33 mM de spermidine, 10 mM d'HEPES et 10 mM d'EDTA, pH ajusté à 7,3 ; milieu extracellulaire contient 33 mM de spermidine et 10 mM de HEPES, pH 7,3.

Les conditions d'incubations pour le molécules photoisomérisable sont respectivement MAM1 10 μM pendant 5 min, 1% de DMSO (final dans NES), MAM2 10 μM pendant 10 min, 1% DMSO dans NES et MAM3 3 pendant 20 min, DMSO à 1% dans NES et ATP 3 μM. La densité de courant a été obtenue en divisant le courant par la capacité de la membrane cellulaire.

Fluorescence. Pour le double mutant I328C / S345C, les cellules ont d'abord été incubées avec 10 MaM-2 en présence de 3 M d'ATP pendant 10 minutes et lavées avec du tampon NES. Ensuite, les cellules ont été incubées avec YO-PRO-1 (10 μM dans le NES), et après 10 minutes d'incubation, les cellules ont été irradiées à 365 nm pendant 5 s. Pour les mutants simples I328C et S345C, le même protocole a été réalisé, sauf que l'activation a été réalisée par irradiation à 530 nm et que les cellules ont été brièvement pré-irradiées à 365 nm avant l'incubation de YO-PRO-1 afin de réinitialiser l'azobenzène dans l'état *cis*. Dans des expériences de contrôle avec le P2X3-3T, l'incorporation de YO-PRO-1 10 uM a été mesurée en réponse à ATP 30 μM.

L'analyse des données. Toutes les expériences ont été réalisées au moins quatre fois à partir d'au moins deux transfections, et les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± s.e.m. Pour la modélisation, les valeurs de répartition des configurations cis et trans sont présentées sous forme de moyenne ± s.e.m Le nombre de cellules ou patches utilisés pour les expériences est fourni dans le texte ou la légende de la figure correspondante.

7.3 Résultats

7.3.1 Détermination des cinétiques d'activations en condition symétriques

Afin de tester ces nouvelles conditions nous avons décidé d'utiliser la configuration 'outside out', nous permettant d'étudier les courants ioniques à l'échelle de canal unique. Nous avons tout d'abord déterminé les constantes d'activation des récepteurs afin de comparer les vitesses d'établissement du courant suite à l'activation des récepteurs en présence $NMDG^+$ ou Na^+.

Nous avons transfecté des cellules HEK-293 avec des plasmides codant pour le P2X2-3T de rat, qui présente une conductance unitaire plus importante que le récepteur P2X2 sauvage. En condition symétrique, nous avons éprouvé énormément de difficultés pour stabiliser le patche en configuration 'outside out'. Nous avons utilisé du F^- dans le milieu intrapipette en tant que contre-ions du $NMDG^+$ qui a permis d'augmenter la résistance du seal. Sur des patches contenant de nombreux canaux, une application de 3 µM d'ATP induit le développement rapide d'un courant rentrant $NMDG^+$, pour un potentiel de membrane a -120 mV (constante d'activation τ_{NMDG+}= 203 ± 47 ms, n = 9 patches, Figure 26A, gauche, et Figure 26C et 26D). Les courants $NMDG^+$ sont restés constants pendant la durée d'application de 6 s. L'augmentation de la concentration d'ATP a 10 µM induit une diminution de la constante d'activation (τ_{NMDG+} = 36 ± 4 ms, n = 10 patches à 10 µM, Figure 26D).

Afin de comparer les courants $NDMG^+$ et les courants Na^+ avec les mêmes conditions (3 µM d'ATP, -120 mV), nous substituons le $NMDG^+_{EXT}$ par du Na^+_{EXT} (Na^+_{EXT}/$NMDG^+_{INT}$) sur les mêmes patches. L'application de l'ATP induit un courant rentrant Na^+ plus important que le courant $NMDG^+$ (I_{NMDG+}/I_{Na+} = 9.7 ± 1.7%, n = 9 patches, Figure 26A). Cette différence est attendue car la force motrice électrochimique est en faveur de l'influx de Na^+ dans une solution asymétrique Na^+_{EXT} / $NMDG^+_{INT}$. La constante d'activation du récepteur en présence de Na^+ est similaire au $NMDG^+$ (τ_{Na+} = 235 ± 74 ms à 3 µM d'ATP, n = 9, Figure 26A). Pour confirmer ces résultats nous avons augmenté les concentrations d'ATP. Cette augmentation de la concentration induit une

diminution de la constante d'activation (τ_{Na+} = 27± 4 ms à 10 µM, n = 10 patches, Figure 26D). Par la même occasion nous constatons que la concentration n'a aucun effet sur le ratio I_{Na+}/ I_{NMDG+} (11.4 ± 0.6%, n = 9). Ces résultats indiquent que le canal du pore P2X2 est simultanément perméable au Na^+ et au $NMDG^+$ lors de son activation.

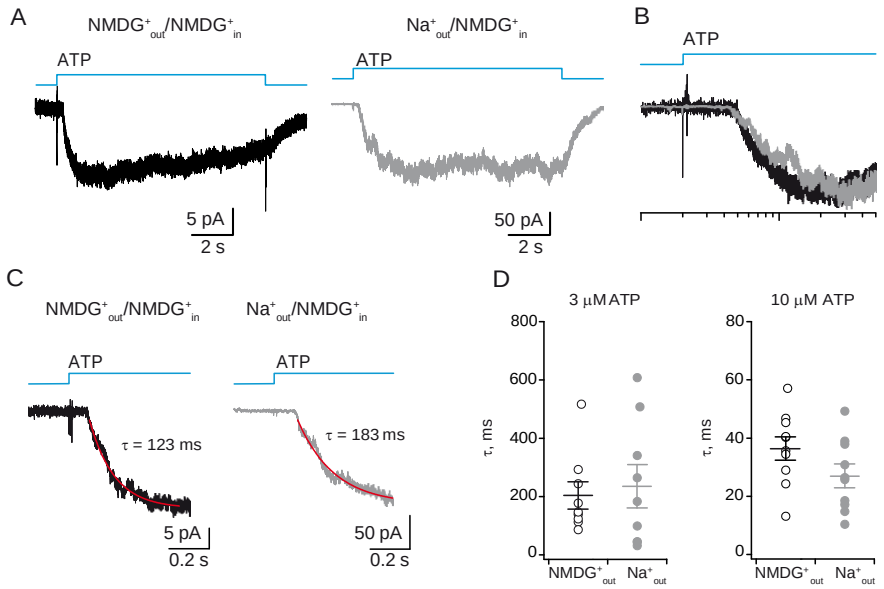

Figure 26 L'activation rapide de l'ATP des récepteurs P2X2-3T induit une perméation instantanée et stable de $NMDG^+$.A L'application rapide d'ATP (3 M, traces bleues) sur un patche à récepteur multiple de cellules HEK-293 exprimant le récepteur P2X2-3T évoque des courants $NMDG^+$ (gauche) et Na^+ (droite) rapides enregistrés à -120 mV. Le patch a d'abord été baigné dans une solution extracellulaire de $NMDG^+$ ($NMDG^+_{out}$ / $NMDG^+_{in}$, à gauche), puis rapidement échangé avec une solution extracellulaire de Na^+ (Na^+_{out}/ $NMDG^+_{in}$, à droite). Notez la différence dans l'échelle. B Superposition des courants normalisés $NMDG^+$ (trace noire) et Na^+ (tracé gris) représentés en (A) dans une échelle de temps logarithmique C Détermination de la constante d'activation τ en ajustant les courants $NMDG^+$ (gauche, trace noire) ou Na^+ (droite, trace grise), induite par ATP 3 mM (traces bleues). Les courants ont été enregistrés à partir du même patch à -120 mV en utilisant le même protocole que celui décrit dans la Figure 26A. Les courbes rouges indiquent les traces ajustées. D Données groupées, présentées en tant que valeurs de τ individuelles et en moyenne ± sem, obtenues à 3 mM (n = 9 patchs) et 10 mM ATP (n = 10) dans $NMDG^+_{out}$/ $NMDG^+_{in}$ (lignes noires et points) Et dans Na^+_{out}/ $NMDG^+_{in}$ (lignes grises et points).

Pour continuer la caractérisation du passage du $NMDG^+$, nous avons déterminé les conductances unitaires en présence de $NMDG^+$ et de Na^+, et pour cela nous avons utilisé des patches contenant très peu de canaux afin de pouvoir discerner l'ouverture d'un seul canal. Lors de l'application de 1 µM d'ATP, nous avons détecté aucune ouverte ou fermeture en condition symétrique ($NMDG^+_{EXT}$/$NMDG^+_{INT}$). Or, quand nous sommes passés en condition asymétrique (Na^+_{EXT}/$NMDG^+_{INT}$), des courants monocanaux furent mesurés (conductance moyenne de 65± 9 pS, n=6 patches, 1 µM d'ATP données filtrées à 1 kHz). Sur ces mêmes patches nous avons filtré

les enregistrements avec une bande passante plus faible (100 Hz) car nous voulions savoir si l'absence d'ouverture, en présence de $NMDG^{+,}$ n'était pas dû à des courants trop faibles noyés dans le bruit de l'enregistrement. Suite à ce changement de filtre nous avons observé des courants unitaires discernables résolus dans une solution symétrique ($NMDG^{+}_{EXT}/NMDG^{+}_{INT}$) (Figure 27A). La mesure des courants unitaires représente une valeur moyenne de 0,43 ± 0,03 pA (3,6 ± 0,2 pS, n = 6 patches). Cette valeur représente environ 5.5% de la conductance unitaire des courants Na^{+}, ce qui est très proche de la valeur obtenue à partir des courants multicanaux. Nous observons à nouveau que l'augmentation des concentrations d'ATP à 10 ou 30 µM n'influencent pas le ratio I_{Na+}/ I_{NMDG+}, suggérant que des concentrations proches de la valeur saturante n'augmente pas la conductance $NMDG^{+}$ (Figure 27).

Nous avons donc déterminé la conductance unitaire des courants $NMDG^{+}$, cependant la conductance unitaire du Na^{+} fut déterminé en condition asymétrique ($Na^{+}_{EXT}/NMDG^{+}_{INT}$). Pour pouvoir comparer les deux conductances et déterminer leurs passages à travers le pore, il est important de se trouver dans les mêmes conditions afin d'avoir un élément de comparaison, c'est pourquoi nous avons déterminé la conductance sodique en condition symétrique ($Na^{+}_{EXT}/Na^{+}_{INT}$) (44 ± 6 pS, n = 4 patches à 1 µM ATP). La conductance unitaire du courant $NMDG^{+}$ ($NMDG^{+}_{EXT}/NMDG^{+}_{INT}$) est environ 12 fois plus faible que la conductance unitaire du courant Na^{+} en condition symétrique ($Na^{+}_{EXT}/Na^{+}_{INT}$). A partir de ces valeurs, nous avons conclu que les ions $NMDG^{+}$ traversent le pore du canal ouvert à des taux extrêmement faibles (~ $2,7 \times 10^{6}$ ions $NMDG^{+}$ par seconde par canal à -120 mV avec 132,6 mM $NMDG^{+}$) comparé au Na^{+} (~33×10^{6} ions Na^{+} par seconde par canal à -120 mV avec 132,6 mM de Na^{+}). Nous observons donc que le $NMDG^{+}$ peut traverser un pore ouvert suffisamment large pour permettre son passage a de plus faibles concentrations que celui du Na^{+}, mais que le pore est immédiatement perméant au $NMDG^{+}$, au même titre que le Na^{+}.

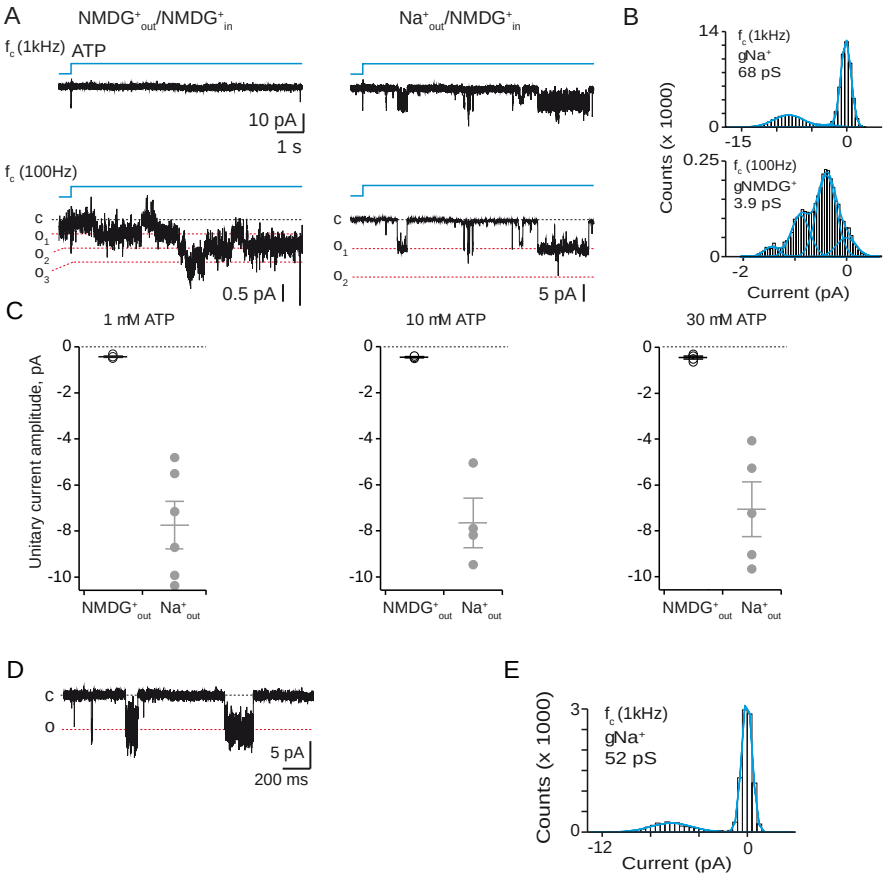

Figure 27 Conductance unitaire des courants $NMDG^+$ à partir de patchs externes exprimant le récepteur P2X2-3T. ***A*** *Les enregistrements canal unique d'un patch en configuration outside out enregistré à -120 mV activé par 1 µM ATP, d'abord dans du $NMDG^+_{out}$ /$NMDG^+_{in}$ (à gauche), puis dans Na^+_{out} /$NMDG^+_{in}$ (droite). Les données ont été filtrées à une fréquence finale (fc) de 1 kHz (traces du haut) ou 100 Hz (traces du bas). Les ouvertures des canaux (o) sont indiquées par les lignes en tirets rouges. Les courants de référence, qui correspondent aux canaux fermés (c), sont indiqués par les lignes en pointillés noirs.* ***B*** *Histogrammes d'amplitude en tous points des courants Na^+ (canal supérieur, fc = 1 kHz) et $NMDG^+$ (bas, fc = 100 Hz) obtenus à partir du panneau A. Les gaussiennes centrées à 0 pA représentent des canaux fermés. Dans ce patch, la conductance unitaire moyenne des courants Na^+ dans Na^+_{out} / $NMDG^+_{in}$ est de 68 pS, alors que celle des courants $NMDG^+$ dans $NMDG^+_{out}$/$NMDG^+_{in}$ est de 3,9 pS.* ***C*** *On a déterminé l'amplitude de courant unitaire à partir des enregistrements canal unique aux concentrations d'ATP indiquées dans $NMDG^+_{out}$/$NMDG^+_{in}$ (noire) et Na^+_{out}/$NMDG^+_{in}$ en (gris) enregistrées à -120 mV. Données, présentées sous forme de valeurs individuelles et sous forme de moyenne ± s.e.m. (N = 6, 4 et 5 patchs pour 1, 10 et 30 µM d'ATP, respectivement).* ***D*** *Enregistrement canal unique du courant de P2X2-3T induit par 1 µM d'ATP enregistré en Na^+_{out} /Na^+_{in} à -120 mV. Les données ont été filtrées à une fc finale de 1 kHz. Les ouvertures des canaux (o) sont indiquées par la ligne pointillée rouge. Le courant de base, qui correspond aux canaux fermés (c), est indiqué par une ligne noire en pointillés. (E) Histogrammes d'amplitude en tous points des courants Na^+ canal unique. Pour ce patch, la conductance unitaire moyenne du courant de Na^+ est de 52 pS.*

7.3.2 Comparaison du mécanisme sous-jacent au passage du $NMDG^+$ et du Na^+

Nous avons ensuite utilisé les molécules photoisomérisables afin de déterminer les mouvements moléculaires conduisant à la perméation du $NMDG^+$ ($NMDG^+_{EXT}/NMDG^+_{INT}$). Sur l'ensemble des MAM en notre possession nous avons sélectionné le MAM1, MAM2 et MAM3 afin de pouvoir incrémenter le diamètre du pore car contrairement aux molécules plus grandes, les simulations en dynamique moléculaire montrent que ces trois molécules sont plus rigides et permettent de discriminer les isomères *cis* et *trans*. Comme lors de mes précédents travaux, nous nous sommes focalisés sur la partie du pore autour des résidus I328 et S345 qui peuvent ponter horizontalement et verticalement par rapport au plan de membrane. Nous avons testé 13 simples et doubles mutants sur le récepteur P2X2-3T exprimé dans les cellules HEK-293. Chaque mutant fut traité avec chaque molécule photoisomérisable entrainant 42 combinaisons différentes incluant le contrôle P2X2-3T. Afin de pouvoir comparer les différents résultats obtenus avec les MAM nous avons normalisé les courants $NMDG^+$ avec les courant portés par le Na^+ (I_{NMDG+}/I_{Na+}). Cette normalisation nous permet de nous affranchir des différences éventuelles de marquage.

Nous avons testé l'ensemble des mutants en réponse à l'ATP, afin de confirmer leurs fonctionnements et nous permettre l'obtention des ratios I_{NMDG+}/I_{Na+}. L'analyse des ratios montre qu'ils sont semblables à ceux mesurés en configuration 'Outside out' (valeur comprise entre 4% et 15%). De plus, afin d'avoir un contrôle négatif nous avons testé les MAM sur le P2X2-3T et nous avons constaté aucune photorégulation.

Sur un ensemble des 39 combinaisons testées, nous observons une photorégulation sur 27 combinaisons différentes. Cependant, les expériences de contrôle ont révélé que de nombreux courants de photorégulations générés à partir de doubles mutants (12/19) avaient des profils d'activation qui étaient similaires au mutant simple homologue (case marquée par un astérisque dans la Figure 28E). Cela signifie que les courants de photorégulations résultants correspondaient un simple pontage entre deux cystéines identiques marquant ainsi le nombre limite de doubles pontages. Parmi les mutants simples et doubles restants, la moitié (7/15) a présenté des courants $NMDG^+$ induits par la lumière, avec un ratio I_{NMDG+}/I_{Na+} supérieur à 5% (moyenne 9 ± 3%) proche

de celui des contrôles avec l'ATP (Figure 28E). Nous avons décidé d'exclure le ratio des deux combinaisons I332C/F346C incubés avec le MAM2 et MAM3. Bien que les deux combinaisons montrent un ratio I_{NMDG+} / I_{Na+} supérieur à la moyenne, l'utilisation des MAM semble affecter les courants portés par le Na^+ et pourrait induire une incertitude dans la mesure des ratios (Figure 28D).

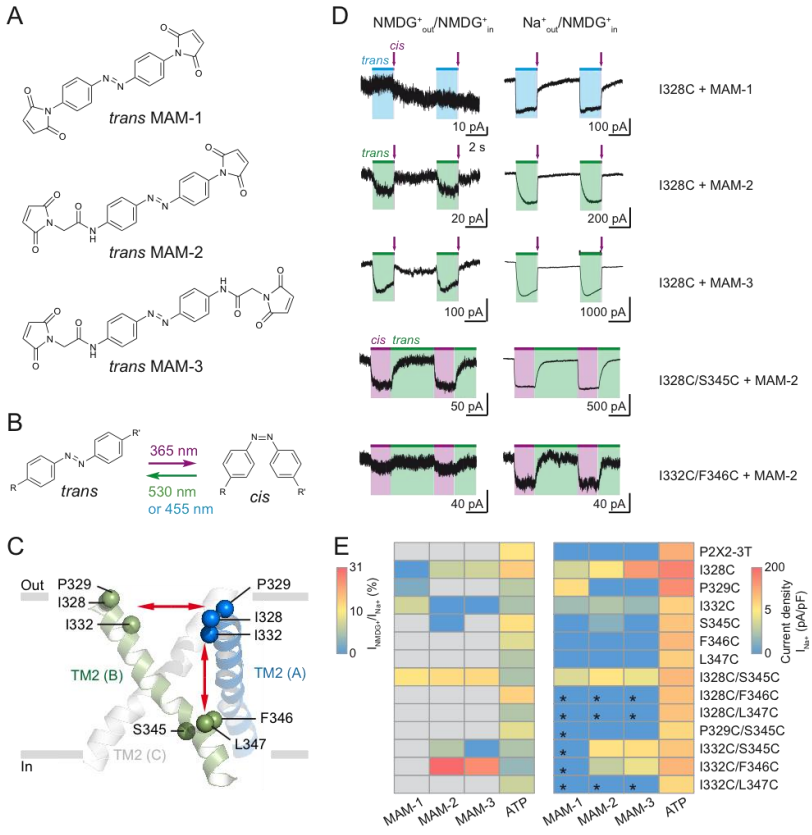

*Figure 28 La perméation $NMDG^+$ opère avec des mouvements moléculaires similaires à la perméation de Na^+. **A** Structures chimiques des MAM à l'état trans. **B** isomérisation cis-trans de l'azobenzène induite par les longueurs d'onde indiquées de lumière. L'isomérisation cis-trans est induite par irradiation à 455 nm pour MAM-1 ou 530 nm pour MAM-2 et MAM-3. **C** Vue latérale des trois hélices TM2 transmembranaires de la structure de rayons X liée à l'ATP hP2X3 codées par couleur par sous-unité. Les résidus sélectionnés pour la substitution de la cystéine sont indiqués par des sphères sur les monomères A et B et, pour plus de clarté, ils ont été convertis en une numérotation rP2X2 équivalente. Des flèches rouges doubles indiquent des pontages horizontaux et verticaux possibles, par rapport au plan membranaire, entre les cystéines utilisées. D Courants lumineux macroscopiques enregistrés à -60 mV à partir de cellules HEK-293 exprimant les mutants indiqués traités avec les MAM indiqués. Les cellules ont d'abord été baignées dans une solution extracellulaire de $NMDG^+$ (à droite), qui a ensuite été rapidement échangée contre une solution extracellulaire de Na^+ (à droite). L'illumination a été effectuée, comme indiqué, à 365 nm (barres violettes) et à 455 nm (barres bleues) ou 530 nm (barres vertes) pour induire les états cis et trans de l'azobenzène, respectivement. Les flèches violettes indiquent un éclairage court (80 ms). Pour les mutants simples traités par les MAM, les cellules ont été brièvement pré-irradiées à*

*365 nm (80 ms) avant les enregistrements. **E** Carte de chaleur des courants $NMDG^+$ normalisés avec courants Na^+ (à gauche) et avec la densité des courants Na^+ (à droite) enregistrés dans les conditions indiquées. Toutes les photorégulations enregistrées pour les mutants simples ont été induits par la configuration trans, alors que tous les photorégulations détectés pour les doubles mutants ont été induits par la configuration cis, à l'exception de ceux indiqués par des astérisques qui répondaient à la configuration trans, de manière similaire à leur mutant unique Homologues I328C, P329C ou I332C. Les cases grises indiquent que I_{NMDG+} / I_{Na+} ne peut pas être déterminé. Dans les témoins, 30 µM d'ATP, appliquée sur des cellules non traitées, a suscité des réponses qui se situent entre 32 à 92% de la réponse maximale (pour chaque case, n = 4-7 cellules).*

Nous avons constaté par la même occasion que les deux mouvements moléculaires, que nous avons vu précédemment et permettant l'ouverture du récepteur, admettent une perméation au $NMDG^+$. Ainsi nous observons que le mouvement horizontal issue du pontage horizontal de simple mutant (I328C traité avec MAM-2 ou MAM-3 et I332C traité avec MAM-1) ont induit une perméation au $NMDG^+$ au même titre que le mouvement vertical issu d'un double pontage réticulé (I328C / S345C traités avec n'importe quel MAM et I332C / S345C traités avec MAM-2). On note une corrélation claire entre les courants de $NMDG^+$ et de Na^+, où les courants sodiques ont toujours été observés lorsque des courants $NMDG^+$ sont enregistrés. Inversement, aucun courant de $NMDG^+$ n'a été enregistré lorsqu'aucun courant de Na^+ n'a été enregistré. Ceci indique que la perméabilité du $NMDG^+$ et l'ouverture du canal permettant le passage des petits cations fonctionnent avec des mécanismes similaires. Contrairement à mes précédents résultats et à ceux issus de la publication du doctorant Chloé Habermarcher, nous observons une perméabilité au $NMDG^+$ lors du mouvement horizontal. La raison de cette différence est inconnue, mais étant donné que la perméabilité $NMDG^+$ a été obtenue en mesurant E_{rev} à partir d'expériences en condition asymétrique, il reste possible que sa perméabilité soit sous-estimée, soulignant en outre la nécessité d'utiliser des solutions symétriques pour mesurer les événements de perméation directe.

La corrélation entre les courants $NMDG^+$ et Na^+ induits par la lumière n'est pas systématiquement vérifiée. Dans le cas de 3 combinaisons sur 11, nous observons un courant sodique (dont la densité est supérieure à 3 pA/pF) avec parallèlement une absence ou quasi-absence de courant $NMDG^+$. Nous observons ces résultats à la fois dans le pontage verticale (I332C / S345C traité avec MAM-3) et horizontale (I328C et P329C traité avec MAM1). Nous remarquons aussi que la longueur des molécules photoisomérisables ont une influence sur le ratio. Une augmentation de la taille du MAM (MAM1 à MAM2 à MAM3) augmente le ratio I_{NMDG+}/I_{Na+} de 0 à 7% pour le mouvement horizontal autour du simple mutant I328C. Une diminution de la taille de MAM

(MAM3 à MAM2)) augmente le ratio I_{NMDG+}/I_{Na+} de ~ 0.2 à ~ 6% pour le mouvement vertical autour du double mutant I332C/S345C. Ces données révèlent donc l'existence d'états partiellement ouverts perméants au Na^+ et non au $NMDG^+$, ce qui indique en outre que la perméabilité des grosses molécules est influencée par de petites variations de la distance séparant les hélices TM2 délimitant le pore.

7.3.3 Les mouvements induits par la lumière permettent l'incorporation du YO-PRO-1 dans des conditions physiologiques

Afin de pouvoir confirmer les données obtenues par électrophysiologie patch-clamp, nous avons mesuré l'absorption de colorant YO-PRO-1 dans des conditions physiologiques, où Na^+ a remplacé $NMDG^+$. Par cette occasion nous voulions des conditions ne perturbant pas l'intégrité membranaire des cellules. L'utilisation du $NMDG^+$ se justifie afin de pouvoir se rapprocher de conditions physiologiques.

Nous nous sommes concentrés sur la paire I328C et S345C incubée avec le MAM2, dont le ratio I_{NMDG+}/I_{Na+} est le plus important et dont la densité de courant sodique est la plus forte. Suite à une irradiation de 365nm sur le double mutant I328C/S345C, nous observons une augmentation de l'incorporation du YOPRO-1. Cette incorporation est similaire à celle induit par 30 µM sur le P2X2-3T (Figure 29C) constituant notre contrôle positif.

En revanche, aucune incorporation de YO-PRO-1 n'a été observée dans les cellules exprimant les simples mutants I328C ou S345C incubés avec MAM-2 qui ont été éclairées à 530 nm, après une courte pré-irradiation à 365 nm avant l'application du YO-PRO-1 afin de réinitialiser l'azobenzène dans l'état cis (Figure 29D, E). Bien que ces données de fluorescence soient en accord avec les données de patch-clamp, l'absence d'apport de YO-PRO-1 pour I328C semblait détonner avec la perméabilité au $NMDG^+$ enregistrée.

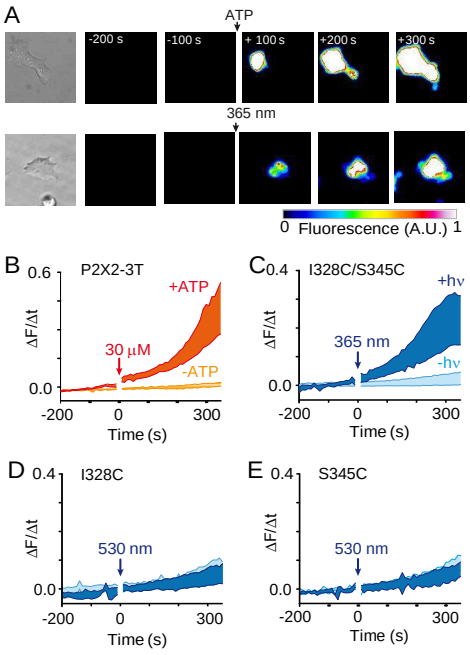

Figure 29 Les changements structuraux des hélices TM2 induisent une absorption de colorant cellulaire dans des conditions physiologiques. ***A*** *Série chronologique d'incorporation du YO-PRO-1 dans des cellules HEK-293 exprimant le récepteur P2X2-3T (rangée supérieure) et le double mutant I328C / S345C traité avec MAM-2 (rangée inférieure). La fluorescence (en unités arbitraires) a été acquise avant et pendant l'activation de l'ATP (30 µM) ou légère (365 nm pour 5 s) qui a débuté à 0 s comme indiqué. Sur la gauche sont représentées les microphotographies correspondantes sous lumière transmise.* ***B*** *Vitesse correspondante d'incorporation du YO-PRO-1 dans des cellules (n = 15 cellules) exprimant le récepteur P2X2-3T en l'absence (orange) ou en présence (rouge) d'ATP. La flèche indique l'heure à laquelle l'ATP a été appliqué.* ***C*** *Vitesse d'incorporation du YO-PRO-1 dans des cellules exprimant le double mutant I328C / S345C traité avec MAM-2 en l'absence (bleu clair) ou présence (bleu foncé) d'irradiation à 365 nm (n = 18 cellules). La flèche indique le moment auquel les cellules ont été brièvement irradiées.* ***D*** *Même protocole que dans (C) pour des cellules exprimant le mutant simple I328C traité avec MAM-2, sauf que l'irradiation s'est produite à 530 nm (n = 12 cellules). (E) Même protocole que dans (D) pour des cellules exprimant le mutant simple S345C traité avec MAM2 (n = 18-21 cellules). Pour les panneaux (D) et (E), les cellules ont été brièvement pré-irradiées à 365 nm pendant 2 s juste avant l'application de YO-PRO-1. Les zones ombrées indiquent la moyenne ± s.e.m.*

Cependant, une analyse minutieuse a montré, pendant et après irradiation des cellules exprimant le mutant I328C traité avec MAM-2, une inactivation rapide des courants induits par la lumière (courant résiduel mesuré 18 s après la fin de l'irradiation : 3 ± 3%, n = 5) (Figure 30A). Tandis que des courants stables ont été enregistrés pour le double mutant I238C / S345C incubé avec le même MAM (69 ± 7%, n = 4). (Figure 30B). L'activation temporaire du simple mutant empêche une accumulation importante de YO-PRO-1 dans les cellules, une hypothèse qui explique facilement l'absence apparente d'incorporation du YO-PRO-1. L'ensemble, des résultats fournissent la preuve le que le passage de grosses molécules induite par la configuration *cis* du MAM2 se produit dans des conditions physiologiques.

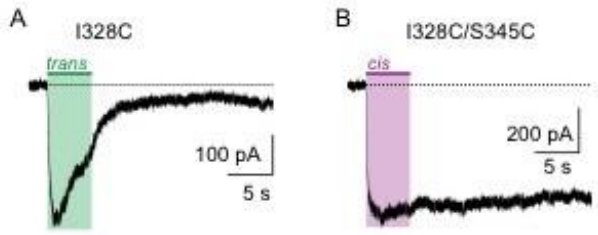

Figure 30 Test de stabilité des courants induit par la lumière sur les simples et doubles mutants cystéines. A Courants photo-induit macroscopiques enregistrés à -60 mV à partir de cellules HEK-293 exprimant le mutant simple I328C B Courants photo-induit à partir de cellules HEK-293 exprimant le double mutant I328C / S345C. Avant les enregistrements, les cellules ont été pré-irradiées à 365 nm (pour I328C) ou 525 nm (pour I328C / S345C).

7.3.4 Dynamique moléculaire de la perméabilité au $NMDG^+$

Grace à une collaboration avec le laboratoire de Marco Cecchini (ISIS, Strasbourg), nous avons lancé des études en dynamique moléculaire (MD) afin d'obtenir des informations sur le mécanisme de perméation de $NMDG^+$ dans les récepteurs P2X. Les études ont été effectuées à partir du modèle du récepteur zfP2X4 dans un état ouvert ponté verticalement avec trois MAM2 sur la combinaison I336C/N353C (équivalent I328C/S345C). Sur une durée de 50 ns, les évènements de perméation du $NMDG^+$ ont été enregistrés en présence d'un grand potentiel de membrane (jusqu'à -2 V). Lors de l'analyse des résultats, nous observons que le récepteur zfP2X4 est perméant au $NMDG^+$ avec un taux de perméabilité de $7x10^7$ s^{-1}. La mesure du ratio du passage des ions $NMDG^+/Na^+$ est semblable au résultat obtenu en configuration Outside out, bien que la valeur absolue soit supérieure. Ceci est probablement dû à des valeurs extrêmes de la force motrice électrochimique qui ont été utilisées en MD (Figure 31).

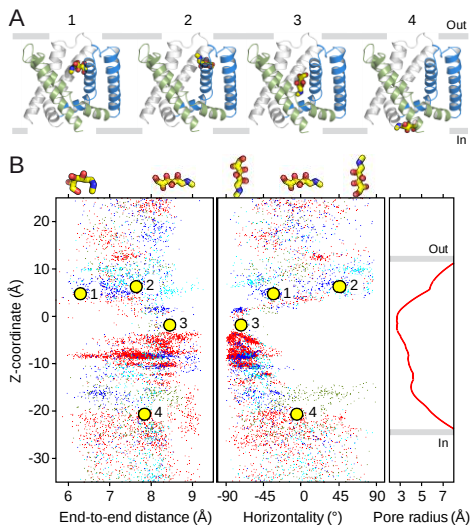

*Figure 31 Mécanisme de la perméation $NMDG^+$ révélée par des simulations MD.**A** Instantanés à différents moments de simulation. B La distance de bout en bout de $NMDG^+$ (colonne de gauche) et l'angle formé par l'axe longitudinal de $NMDG^+$ avec l'axe parallèle au plan de membrane (milieu) sont affichés par trame de la simulation pour toutes les molécules de perméant.*

Il est important de noter que ces simulations montrent que la différence de perméabilité observée pour le Na^+ par rapport à $NMDG^+$ est due à un mécanisme de perméation plus complexe pour le $NMDG^+$ qui nécessite une sélection basée à la fois sur sa conformation moléculaire et sur son orientation en traversant le pore. Pour que le $NMDG^+$ puisse traverser le pore, le cation organique doit ainsi adopter une conformation complètement étendue (d > 7,5 Å) et présenter l'azote chargé vers le bas, le long du gradient électrochimique (θ <-50 °) (Figure 31). De plus, les simulations ont indiqué qu'avant de remplir la conformation perméable, le $NMDG^+$ a échantillonné plusieurs conformations et orientations. Ceci diminue considérablement sa perméabilité en accord avec la faible conductance unitaire des courants portés par le $NMDG^+$ en configuration 'Outside out'.

7.3.5 Perméabilité des récepteurs homomériques P2X

Comme nous l'avons vu précédemment grâce à la configuration 'outside out', la perméabilité aux grands cations se développe en quelques millisecondes lors de l'application de l'ATP, et cela en parallèle avec la perméabilité aux petits cations. Nous nous sommes demandés si ce processus

est également vrai pour les autres membres P2X, en particulier pour les récepteurs P2X1 et P2X3 présentant une désensibilisation rapide, qui étaient présumés être des pores « non dilatants ». Nous avons enregistré les courants des cellules HEK293 transfectées avec les récepteurs P2X1, P2X3, P2X4, P2X5 et P2X7 de rat, en condition $NMDG^+$ symétrique ($NMDG^+_{EXT}/NMDG^+_{INT}$). Nous avons observé, pour l'ensemble des récepteurs étudiés, un courant $NMDG^+$ sauf pour le récepteur P2X1 qui, pour une raison inconnue, n'est pas fonctionnelle en condition $NMDG^+$ (Figure 32A). Nous voulûmes savoir par la même occasion si ce processus pouvait s'étendre sur d'autres P2X issus d'autre espèces, car nous savions que certains isoformes présentaient des différences. C'est pourquoi nous avons aussi testé ces conditions sur les récepteurs P2X2 et P2X3 d'humain. Or, comme chez les orthologues rat, les deux récepteurs humains présentent des courants $NMDG^+$ (Figure 32B). Il faut retenir que le récepteur P2X3 de rat et d'humain est perméant au $NMDG^+$, signifiant que le récepteur désensibilisé a la capacité de laisser passer de gros cations à travers le pore et que le changement d'espèce dans ce cas ne perturbe pas nos résultats.

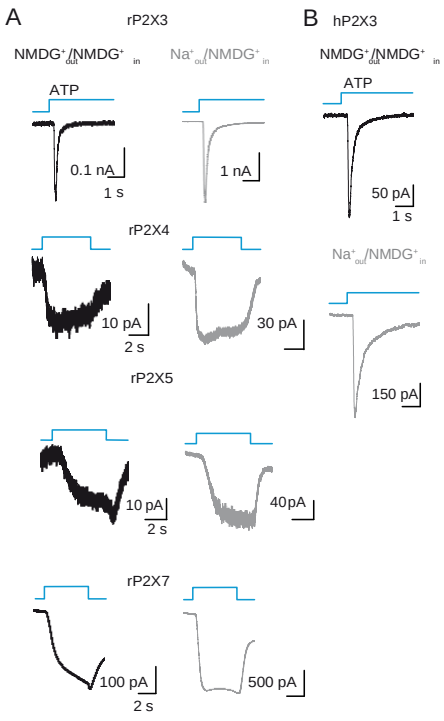

Figure 32 Les récepteurs P2X sont perméables aux cations organiques. A Courants macroscopiques enregistrés à -60 mV à partir de cellules HEK-293 exprimant les récepteurs P2X de rat indiqué. Les enregistrements ont d'abord été réalisés en $NMDG^+_{out}$ /

$NMDG^+_{in}$ symétrique en solution (traces noires), puis en solution Na^+_{out} / $NMDG^+_{in}$ (traces grises). La concentration en ATP était de 30 µM pour rP2X3, rP2X4 et rP2X5, et 300 µM pour les récepteurs rP2X7. Pour les récepteurs rP2X3, les applications d'ATP étaient espacées d'au moins 3 minutes. B Les courants macroscopiques enregistrés à -60 mV à partir de cellules HEK-293 exprimant les récepteurs P2X3 humains

Nous avons vu dans la partie sur la dilatation (3.2.5) que des mutants pouvaient inhiber le passage du $NMDG^+$. Afin de tester cette caractéristique nous avons transfecté le récepteur P2X2 portant la mutation G342A. Ce mutant a été spécifiquement choisi suite à des inhibitions observées sur le sous type P2X2 portant la mutation G342A. La mutation de cette position sur d'autre sous type et spécifiquement le G347Y sur le récepteur P2X4 présente également une inhibition de la perméabilité du $NMDG^+$, montrant ainsi l'importance de cette position largement conservé chez les récepteurs P2X (Khakh *et al*, 1999a). Nous avons observé un courant $NMDG^+$ en condition symétrique sur le mutant G342A mais présentant une forte désensibilisation (Figure 33A). Afin de pouvoir pousser nos investigations plus loin, nous avons testé ces mêmes conditions sur le récepteur P2X2 portant la mutation G342P. Ce mutant est connu pour augmenter l'affinité de l'ATP(Habermacher *et al*, 2016b). Suite à l'application de l'ATP nous avons observé un courant $NMDG^+$ moins désensibilisant que le mutant G342A (Figure 33B). Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus sur ces deux mutants nous avons déterminé les ratio I_{NMDG+} / I_{Na+}. Aucune différence notable n'est observée quand on compare le G342A (16.3 ± 5.1 %, n = 5 patches) et G342P (12.2 ± 4.1 %, n = 5 patches) connu pour augmenter l'affinité apparente de l'ATP. Ces résultats montrent clairement que la mutation G342A n'a pas d'influence sur la perméabilité du $NMDG^+$.

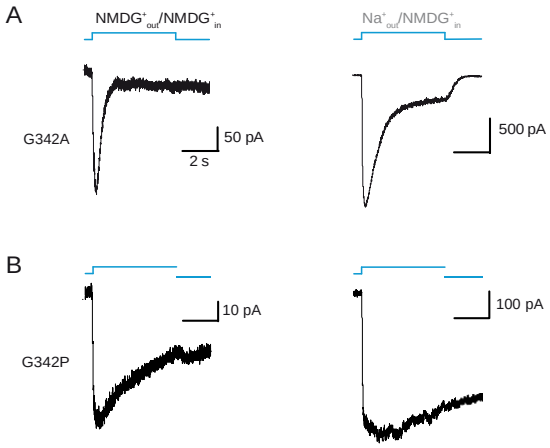

Figure 33 Les mutants G342A et G342P sont perméant aux gros cations Des courants macroscopiques ATP-gated enregistrés à -60 mV à partir de cellules HEK-293 exprimant les mutant indiqués. Les enregistrements ont d'abord été réalisés en $NMDG^{+}_{out}$ /$NMDG^{+}_{in}$ (traces de gauches), puis en solution Na^{+}_{out} /$NMDG^{+}_{in}$ (traces de droites). La concentration en ATP était de 30 µM pour pour les deux mutants. A Enregistrement des courant du mutant G342A Pour le mutant G342A, les applications d'ATP étaient espacées d'au moins 3 minutes. B Enregistrement des courant du mutant G342P

Nous avons certes déterminé et caractérisé le passage du $NMDG^{+}$, mais il est important de caractériser la capacité des composés naturels à traverser le pore. Nous avons sélectionné la Spermidine, une polyamine connue pour sa capacité à moduler de nombreux pores, car il présentait des charges positives et partageait une taille similaire à celle du $NMDG^{+}$. Afin d'étudier son passage à travers les pores, nous avons produit des solutions de Spermidine afin de se trouver en condition spermidine symétrique ($Sper_{EXT}$/$Sper_{INT}$). Nous avons observé des courants rentrant de spermidine suite à une application rapide d'ATP dans des cellules exprimant les récepteurs P2X2 et P2X3 d'humains tandis que le potentiel de membrane était maintenu à -60 mV (Figure 34). De plus, des études en MD ont permis de montrer que le zfP2X4 dans l'état ouvert est aussi perméant à la Spermidine. Les simulations indiquent que le taux de perméation (5×10^{8} s-1) est 7 fois plus rapide que celui de $NMDG^{+}$. La structure symétrique de la spermidine, en plus de la présence de charges positives aux extrémités, fait vraisemblablement disparaître les barrières pour la perméation dû à la conformation et l'orientation, augmentant ainsi drastiquement sa perméabilité par rapport au $NMDG^{+}$ malgré une taille similaire. Ces données révèlent donc une nouvelle signalisation impliquant le passage de gros cations à travers les récepteurs P2X.

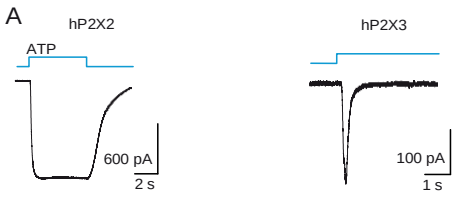

Figure 34 Les récepteurs P2X sont perméables aux cations organiques naturels. ***A*** *Courants macroscopiques enregistrés dans une solution symétrique de spermidine à -60 mV à partir de cellules HEK-293 exprimant les récepteurs P2X humains indiqués. La concentration en ATP était de 30 µM. La densité du courant de spermidine était la suivante : hP2X2 : 43 ± 4 pA / pF (n = 5 cellules) ; HP2X3 : 6 ± 2 pA / pF (n = 7 cellules). Pour toutes les traces, l'application d'ATP a duré 5 s.*

7.4 Discussion

Nos résultats présentés ici fournissent une preuve que la liaison d'ATP sur les récepteurs P2X entraine une ouverture rapide (échelle de la milliseconde) des pores perméants aux gros cations. Cette constatation importante remet en question la précédente opinion prédominante qui suggère que l'état ouvert I1 est seulement sélectif pour les petits cations, tels que Na^+, K^+ et Ca^{2+}. En MD, nous fournissons des preuves évidentes que le $NMDG^+$ et la spermidine cationique peuvent traverser le pore du récepteur à l'état ouvert. Le flux du $NMDG^+$ est significativement plus bas que celui de Na^+, car le premier a besoin d'adopter une conformation et une orientation spécifique pour traverser le pore du canal. Notamment une conformation entièrement linéaire et une orientation où le groupement d'azoté chargé positivement doit pointer vers le bas le long du gradient électrochimique. Un mécanisme complexe de perméation semble donc avoir lieu pour $NMDG^+$, où la nécessité d'une conformation linéaire et la sélection d'une orientation spécifique dans la partie la plus étroite du pore introduisent des barrières significatives qui entravent sa perméabilité. En conséquence, ces exigences moléculaires ralentissent le débit global du flux $NMDG^+$. Ces résultats semblent concorder avec la faiblesse des courants unitaires du $NMDG^+$ que nous avons présenté comme d'autres l'ont déjà fait (Ding & Sachs, 1999; Riedel *et al*, 2007) Une information importante de notre étude est que le passage du $NMDG^+$ et du Na^+ opère avec des mouvements similaires. Pour ce faire, nous avons utilisé trois MAM de différentes tailles appliquées sur un ensemble de 13 mutants. Nous constatons que sur un ensemble de 39

combinaisons, seulement sept sont perméants au $NMDG^+$. La spécificité des molécules photoisomérisables employées et les résultats montrant une influence de la taille des espaceurs démontrent que l'emploi de ces molécules n'induit pas de désordre dans la protéine, et peuvent être utilisées comme un outil pour apporter des informations sur les mouvements moléculaires. Nous avons identifié deux mouvements moléculaires qui conduisent au passage du $NMDG^+$ des pores : un mouvement horizontal correspondant à un écartement des hélices TM2 et un mouvement vertical correspondant à un rétrécissement de la distance séparant les extrémités de l'hélice TM2. Nous avons constaté qu'un mouvement horizontal insuffisant ou des mouvements verticaux inappropriés de deux hélices TM2 adjacentes ne permettent pas l'établissement d'un courant $NMDG^+$ mais sont sans influence sur le courant Na^+, ce qui suggère que le pore est partiellement ouvert. Une autre variation, par seulement quelques Å, des hélices adjacentes permet au pore de devenir perméable au $NMDG^+$, laissant supposer que la taille du pore détermine la conductance $NMDG^{+.}$ La pertinence physiologique de ces états partiellement ouverts non dilatés demeure incertaine. Nous avons étendu nos expériences sur l'ensemble des récepteurs homomériques et déterminé que même le récepteur désensibilisant P2X3 était perméant au $NMDG^+$. De plus, la mutation G342A connue dans la littérature pour inhiber la dilatation montre aucune influence sur la perméation au NMDG. Indiquant que les mutations ayant une influence sur la perméabilité du NMDG en condition asymétriques $NMDG^+_{out}/Na^+_{in}$ doivent être étudier à a lumière des nouvelles conditions.

Enfin, nous avons découvert que la spermidine est capable de pénétrer dans l'état ouvert. Les polyamines sont bien connues pour moduler l'activité de nombreux canaux ioniques, y compris les canaux ioniques synaptiques. Il est important de noter que même des récepteurs désensibilisants, tels que le hP2X3, qui ont été considérés jusqu'ici comme des pores "non dilatants", sont capables d'activer brièvement leurs pores à l'état ouvert, permettant un écoulement transitoire de spermidine. Cette constatation a une signification physiologique considérable car elle révèle un rôle insoupçonné des polyamines dans la signalisation P2X. Plus généralement, elle augmente la possibilité que l'activation des récepteurs P2X puisse permettre l'échange entre les cellules d'autres cations physiologiques, tels que les acides aminés. Nous suggérons donc que, à côté du rôle critique de la perméation des cations inorganiques, le passage

de métabolites de petites tailles, comme la spermidine, à travers le pore P2X ouvert peut contribuer à d'autres réponses physiopathologiques. Nos résultats ouvrent ainsi de nouveaux horizons dans la signalisation P2X.

Ces résultats font l'objet d'une révision à PNAS

Pore dilation revisited: evidence for stable permeation of large organic cations through the pore of ATP-gated P2X Receptors

Mahboubi Harkat[1], Laurie Peverini[2], Adrien Cerdan[3], Kate Dunning[1], Juline Beudez[1], Adeline Martz[1], Nicolas Calimet[4], Alexandre Specht[1], Marco Cecchini[4], Thierry Chataigneau[1], Thomas Grutter[1]

[1]UMR 7199 CNRS - Université de Strasbourg, [2]UMR 7199 CNRS - UdS, [3]UMR 7006 CNRS - Université de Strasbourg, [4]ISIS, UMR 7006 CNRS, Université de Strasbourg

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

Pore dilation is thought to be a hallmark of purinergic P2X receptors. The most commonly held view of this unusual process posits that under prolonged ATP exposure the ion pore expands in a striking manner from an initial small-cation conductive state to a dilated state which allows the passage of larger synthetic cations, such as *N*-methyl-D-glucamine ($NMDG^+$). However, this mechanism is controversial and the identity of the natural large permeating cations remains elusive. Here we provide evidence that, contrary to the time-dependent pore dilation model, ATP binding opens an $NMDG^+$ permeable channel within milliseconds, with a conductance that remains stable over time. We show that the time course of $NMDG^+$ permeability superimposes that of Na^+ and demonstrate that the molecular motions leading to the permeation of $NMDG^+$ are very similar to those that drive Na^+ flow. We found, however, that $NMDG^+$ 'percolates' ten-times slower than Na^+ in the open state, likely due to a conformational and orientational selection of permeating molecules. We further uncover that several P2X receptors, including those able to desensitize, are not only permeable to $NMDG^+$, but also to spermidine, a natural cation involved in ion channel modulation, revealing a previously unrecognized P2X-mediated signaling. Altogether, our data do not support a time-dependent dilation of the pore on its own, but reveal that the open pore of P2X receptors is wide enough to allow the permeation of large organic cations, including natural ones. This permeation mechanism has considerable physiological significance.

Pore dilation | Purinergic receptor | Photoswitches | YO-PRO uptake | Spermidine

P2X receptors are non-selective cation channels activated by adenosine 5′-triphosphate (ATP). They are integral membrane proteins and form a family of trimeric receptors composed of seven subunits (P2X1-P2X7) that are involved in a wide range of physiological and pathological processes, including pain sensation, hearing protection, taste, modulation of neurotransmitter release, hypertension, inflammation and neuropathic pain (1-5). P2X receptors have, therefore, attracted attention as promising therapeutic targets (5, 6). Supported by recent X-ray structures (7-11), a functional receptor is composed of three subunits that assemble in the cell membrane as a homo- or heterotrimer to form a central transmembrane pore (12, 13). Each subunit comprises two transmembrane helices, named TM1 and TM2, which are linked by an extracellular domain, where the ATP-binding sites are nestled. In response to a short application of ATP, the pore rapidly opens on the millisecond timescale—a process known as gating—to a state that is selective to small inorganic cations, such as Na^+, K^+ and Ca^{2+} ions. The flow of these cations is estimated to occur at relatively high conduction rates between 6 to 20 × 10^6 ions per second at a given driving force amplitude (14-16). This rapidly affects the ion balance of the cell, and consequently initiates signal transduction. This open state is sometimes referred to as I_1 state (2).

A remarkable feature of P2X receptors is that longer ATP application causes a striking time-dependent pore dilation of the channel. This process, named pore dilation, is observed only for selected subtypes, notably homomeric P2X2, P2X4 and P2X7 and heteromeric receptors P2X2/3 and P2X2/5 (17-21). Different possible mechanisms have been proposed to explain pore dilation (22, 23), but the most prevailing one posits that the open pore of the initial I_1 state progressively dilates for several seconds to form an enlarged pore, denoted I_2 state, that is permeable to large organic cations such as *N*-methyl-D-glucamine ($NMDG^+$), or fluorescent dyes such as ethidium bromide and YO-PRO-1 (2). As these cations are larger than small inorganic ions, they are believed to be impermeable to the I_1 state. This belief has been supported by many biophysical studies, including atomic force microscopy (AFM), patch-clamp electrophysiology, fluorescent dye uptakes and real time conformational change measurements (17, 18, 24-31). However, the molecular mechanism of pore expansion is still unclear.

Very recently, a study has challenged the pore dilation paradigm (32). The study suggests that the slow transition towards the I_2 state is not caused by a progressive change in the permeability ratio of $NMDG^+$ relative to Na^+, which is usually determined by measuring the hallmark shift in equilibrium potentials

Submission PDF

Significance

Unlike many ion channels whose pore conductances remain relatively stable over time, it is thought that prolonged ATP application to P2X receptors causes a striking increase over time in the permeability of large molecules, a process dubbed pore dilation. However, this mechanism remains poorly understood and highly controversial. Here we employ different methods spanning photochemistry, molecular biology and biophysics to show that contrary to current belief, rapid activation by ATP allows the stable passage of large molecules through the P2X pore. We further discover that spermidine, a large cationic species known to modulate other ion channels, is able to transit through many P2X receptors, including those thought to be non-dilating. Our data thus reveal a novel P2X mediated signaling.

Reserved for Publication Footnotes

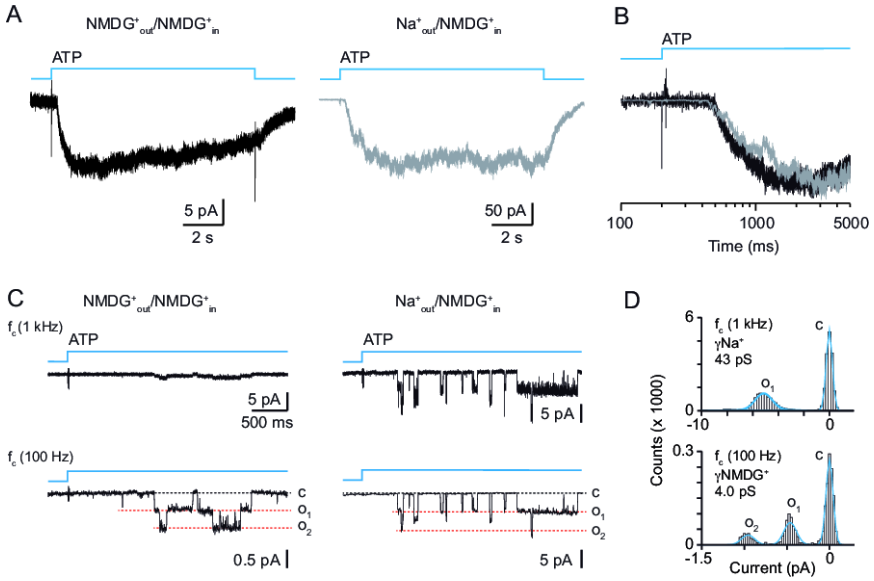

Fig. 1. . Rapid ATP activation of P2X2-3T receptors induces instantaneous and stable permeation of $NMDG^+$. (A) Fast application of ATP (3 μM, blue traces) to a multiple-channel-containing outside-out patch from HEK-293 cells expressing the P2X2-3T receptor evokes rapid $NMDG^+$ (left) and Na^+ (right) currents recorded at -120 mV. The patch was first bathed in extracellular $NMDG^+$ solution ($NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$, left), and then rapidly exchanged to extracellular Na^+ solution ($Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$, right). Note the difference in current scale. (B) Superposition of normalized $NMDG^+$ (black trace) and Na^+ (grey trace) currents shown in (A) in logarithmic time scale. (C) Single-channel recordings from an outside-out patch recorded at -120 mV of currents elicited by 1 μM ATP, first in $NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solution (left), and then in $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solution (right). Data were sampled at 10 kHz and filtered at a final corner frequency (f_c) of 1 kHz (top traces) or 100 Hz (bottom traces). Channel openings (o) are downward deflections indicated by the red dashed lines. Baseline currents, which correspond to closed channels (c), are indicated by the black dashed lines. (D) All-points amplitude histograms of single-channel Na^+ (top, f_c = 1 kHz) and $NMDG^+$ currents (bottom, f_c = 100 Hz) obtained from the patch shown in panel C. Distributions were fit by a sum of four Gaussians for Na^+ currents and three Gaussians for $NMDG^+$ currents (blue lines). Gaussians centered at 0 pA represent closed channels. For this patch, the mean unitary conductance of Na^+ currents in $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$ is 43 pS, whilst that of $NMDG^+$ currents in $NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$ is 4.0 pS.

Submitted to PNAS

by patch-clamp electrophysiology under bi-ionic conditions, but rather by a dramatic, unappreciated change of the concentrations of these ions inside the cell. In addition, pore dilation has never been observed at the single-channel level (16, 33), and no crystal structure of a dilated state has been reported to date, making the study of this peculiar state particularly difficult. Finally, the physiological relevance of P2X pore dilation remains unclear, especially due to the unknown identity of the natural molecules that permeate through the dilated state. A recent work has, however, shown that genetically determined P2X7 dilated pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity (34). The study revealed that in women having undergone a mastectomy there is a genetic association between lower pain intensity and the hypofunctional His270 (rs7958311) allele of *P2RX7* gene, suggesting that selectively targeting P2X pore formation may be a new strategy for individualizing the treatment of chronic pain. The concept of pore dilation of P2X receptors has remained a matter of controversy for almost 20 years, and as such, understanding of this molecular mechanism with new approaches represents a challenging and pertinent issue.

In this paper, we discover the molecular mechanism of permeation of large organic cations in P2X receptors. Contrary to the prevailing assumptions, we provide evidence by single-channel recordings that the pore does not undergo a time-dependent dilation upon opening, but rather enters rapidly, in response to ATP binding, a state that allows the stable passage of large organic cations. In addition, we designed and used photoswitchable cross-linkers of different lengths to probe conformational changes of engineered cysteine-substituted P2X2 receptors that are associated with $NMDG^+$ and YO-PRO-1 permeability. We demonstrate that the molecular motions leading to the permeation of these large organic cations are very similar to those that drive Na^+ flow. We further reveal by Molecular Dynamics (MD) simulations a complex mechanism for $NMDG^+$ permeation, which involves both a conformational and orientational selection of the permeating molecules. Finally, we uncover that desensitizing P2X receptors have the capacity to transiently conduct $NMDG^+$ ions in response to ATP binding, and identify spermidine as a natural large molecule able to permeate selected human P2X pores. Our results underscore an unappreciated novel P2X signaling.

Results

ATP gates a pore that is immediately permeable to $NMDG^+$

In a recent study carried out in P2X2 receptors, it has been shown that ATP gates macroscopic currents in symmetric $NMDG^+$ solutions (32). To determine whether this occurs at the level of the single channel, we employed the outside-out configuration of the patch-clamp technique that enables fast solution exchange at the cell membrane on the millisecond time-scale. We used symmetric $NMDG^+$ solutions, in which $NMDG^+$ is present in both the external (outside) and internal (inside the pipette) solutions ($NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$), and thus represents the only carrier of cationic currents. To increase seal resistance and patch stability, fluoride ions (F^-) were used as internal counter ions to $NMDG^+$ cations (see Methods). We transiently transfected human embryonic kidney (HEK-293) cells with plasmids encoding the rat P2X2-3T, which is a cysteine-less mutated receptor that retains wild-type P2X2 functionality (35), but displays increased single-channel conductance (36). In a first series of experiments, we used excised outside-out patches that contained multiple channels and observed robust inward $NMDG^+$ currents that developed rapidly following fast perfusion of 3 μM ATP, while holding the voltage to -120 mV (activation time constant τ_{NMDG+} = 203 ± 47 ms, n = 9 patches, **Fig. 1A,** left, and **Fig. S1A and B**). $NMDG^+$ currents remained constant during the 6-s time

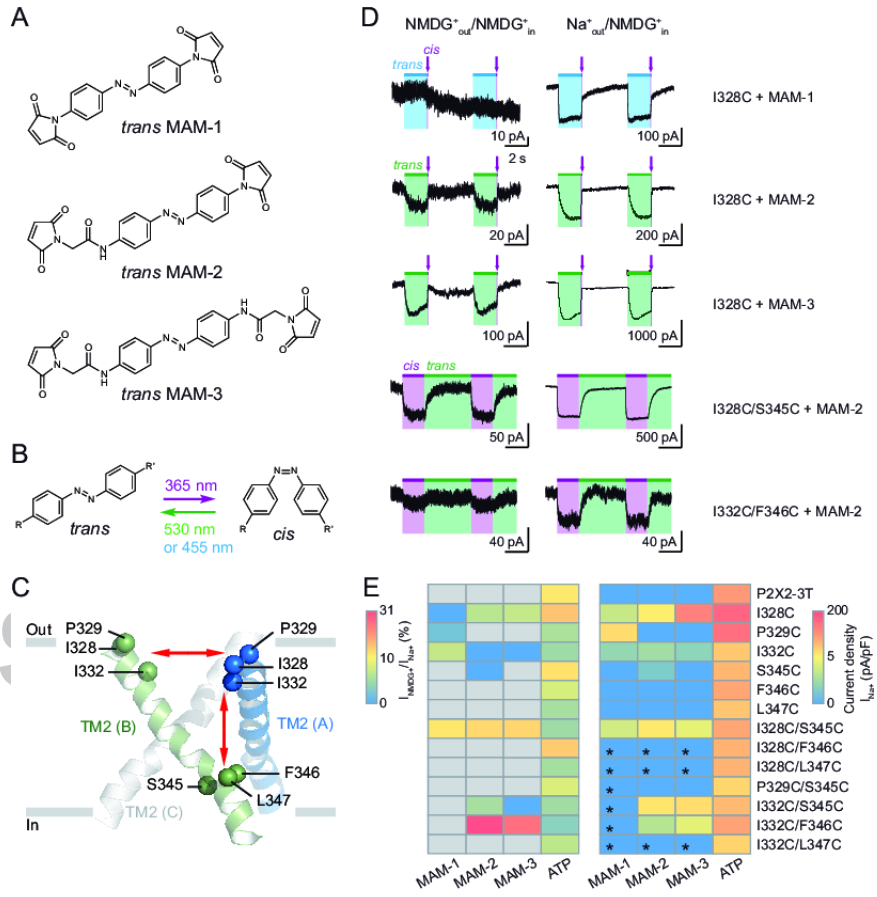

Fig. 2. . $NMDG^+$ permeation operates with similar molecular motions to Na^+ permeation. (A) Chemical structures of MAMs in the *trans* state. (B) *Cis-trans* isomerization of the azobenzene induced by the indicated wavelengths of light. The backward *cis-trans* isomerization is induced by irradiation at 455 nm for MAM-1 or 530 nm for MAM-2 and MAM-3. (C) Side view of the three transmembrane TM2 helices of the hP2X3 ATP-bound X-ray structure (PDB ID: 5SVK) (10) shown in ribbons and color-coded by subunit. Residues selected for cysteine substitution are indicated by spheres on monomers A and B, and for clarity, they were converted to equivalent rP2X2 numbering. Double red arrows indicate possible horizontal and vertical MAMs cross-linking, relative to the membrane plane, between engineered cysteines. (D) Macroscopic light-gated currents recorded at -60 mV from HEK-293 cells expressing the indicated mutants treated with the indicated MAMs. Cells were first bathed in extracellular $NMDG^+$ solution ($NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$, left), which was then rapidly exchanged for extracellular Na^+ solution ($Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$, right). Illumination was carried out, as indicated, at 365-nm (violet bars) and 455-nm (blue bars) or 530-nm (green bars) to elicit the *cis* and *trans* states of the azobenzene, respectively. Short illuminations (80 ms) are indicated by violet arrows. For MAMs-treated single mutants, cells were briefly pre-irradiated at 365 nm (80 ms) before recordings. (E) Heat map of $NMDG^+$ currents normalized to Na^+ currents (left) and of Na^+ currents density (right) recorded in indicated conditions. All light-gated currents recorded for single mutants were induced by the *trans* configuration, whereas all light-gated currents recorded for double mutants were elicited by the *cis* configuration, except those indicated by asterisks which responded to the *trans* configuration, similarly to their single mutant counterparts I328C, P329C, or I332C. Grey boxes indicate that I_{NMDG+}/I_{Na+} cannot be determined. In controls, 30 μM ATP, applied on untreated cells, elicited responses that range between 32 to 92% of the maximal response (**see Table S2**) (for each box, n = 4-7 cells).

application. Increasing ATP concentration consistently decreased activation time constants (τ_{NMDG+} = 36 ± 4 ms, n = 10 patches at 10 μM, **Fig. S1B**). These data show that ATP rapidly gates an $NMDG^+$ conductance which remains stable over time.

We next compared these $NMDG^+$ currents to those carried by Na^+ at the same potential, by rapidly exchanging (less than 1 second) external $NMDG^+$ for Na^+ (i.e. $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$), and then challenging again the same patch with 3 μM ATP. Robust inward Na^+ currents were recorded that were larger than $NMDG^+$ currents (I_{NMDG+}/I_{Na+} = 9.7 ± 1.7%, n = 9 patches, **Fig. 1A,** right). This enhancement is expected since the electrochemical driving force is in favor of Na^+ influx in $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solution. Comparison of normalized ATP-gated Na^+ currents to ATP-gated $NMDG^+$ currents revealed similar onsets of inward currents (**Fig. 1B**), quantified by similar activation rates (τ_{Na+} = 235 ± 74 ms at 3 μM ATP, n = 9, **Fig. S1A and B**). Increasing ATP concentration also consistently decreased activation time constants (τ_{Na+} = 27 ± 4 ms at 10 μM, n = 10 patches, **Fig. S1B**), with no substantial change of the ratio I_{NMDG+}/I_{Na+} (11.4 ± 0.6%, n = 9). These results indicate that the ATP-gated P2X2 open pore is simultaneously permeable to both Na^+ and $NMDG^+$. The similarity of the activation rates determined in both solutions at a given ATP concentration suggests similar gating kinetics and that the difference in current ratio must be due to different rates of permeation of these ions.

To determine $NMDG^+$ permeation rates, we measured unitary conductance of $NMDG^+$ current from outside-out patches that contained single channels, using the same protocols as described for patches that contained multiple channels. In $NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$, barely visible single openings and closings were detected following 1 μM ATP application, while robust single-channel currents were recorded in $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$ (**Fig. 1C,** top traces) with a mean conductance of 44 ± 8 pS (n = 7 patches, data filtered at 1 kHz). However, when the same recordings were further filtered at a much lower bandwidth (100 Hz, see Methods), discernable unitary currents were then

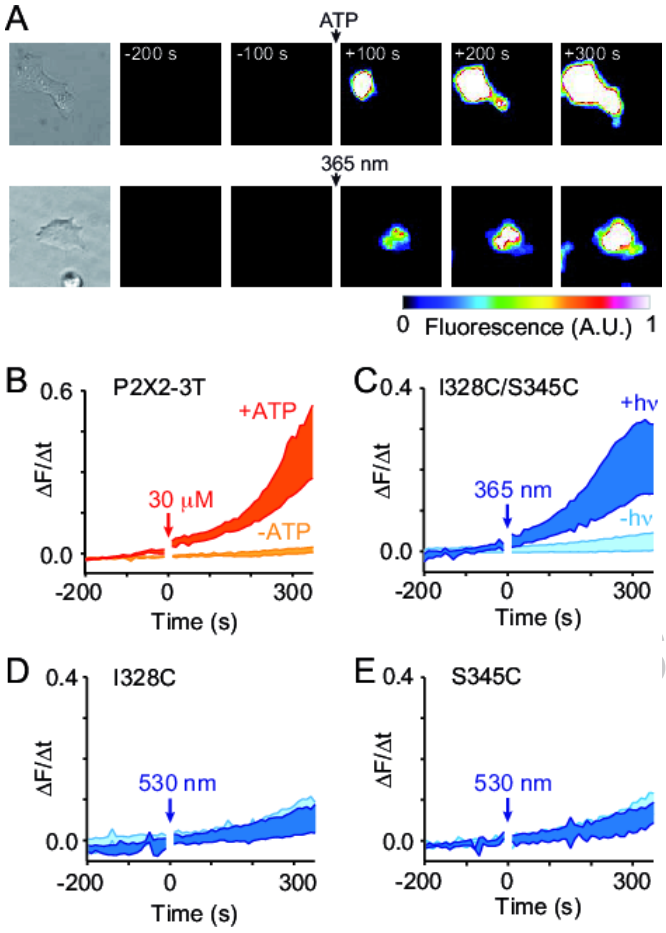

Fig. 3. . Structural changes of TM2 helices induce cellular dye uptake in physiological conditions. (A) Selected time series of YO-PRO-1 dye uptake in HEK-293 cells expressing the P2X2-3T receptor (upper row) and double mutant I328C/S345C treated with MAM-2 (bottom row). Fluorescence (in arbitrary units) was acquired before and during ATP (30 µM) or light (365 nm for 5 s) activation that started at 0 s as indicated. On the left are shown the corresponding microphotographs under transmitted light. (B) Corresponding rate of YO-PRO-1 dye uptake in cells (n = 15 cells) expressing the P2X2-3T receptor in the absence (orange) or presence (red) of ATP. The arrow indicates the time at which ATP was applied. (C) Corresponding rate of dye uptake in cells expressing the double mutant I328C/S345C treated with MAM-2 in the absence (light blue) or presence (dark blue) of irradiation at 365 nm (n = 18 cells). The arrow indicates the time at which cells were briefly irradiated. (D) Same protocol as in (C) for cells expressing the single mutant I328C treated with MAM-2, except that irradiation occurred at 530 nm (n = 12 cells). (E) Same protocol as in (D) for cells expressing the single mutant S345C treated with MAM-2 (n = 18-21 cells). For panels (D) and (E), cells were briefly pre-irradiated at 365 nm for 2 s just before YO-PRO-1 application. Shaded areas denote mean ± s.e.m.

resolved in symmetric $NMDG^+$ solution (**Fig. 1C,** bottom traces). These small unitary currents were always recorded in patches that responded to ATP in Na^+_{out} (16 out of 24 examined patches; the remaining 8 patches were unresponsive to ATP and no unitary $NMDG^+$ currents were detected), and they were not observed in the absence of ATP (**Fig. S1D**). All-points histogram analysis revealed that the mean conductance of these unitary currents was 3.3 ± 0.6 pS (mean amplitude of 0.40 ± 0.04 pA, n = 6 patches) that represented 7.5% of the unitary Na^+ currents, a value that was close to that of the ratio I_{NMDG+}/I_{Na+} determined from multi-channel currents (**Fig. 1D** and **Fig. S1C**). Increasing ATP concentration to 10 or 30 µM did not change the ratio of the mean conductance of $NMDG^+$ relative to Na^+, suggesting that a near saturating concentration of ATP does not increase $NMDG^+$

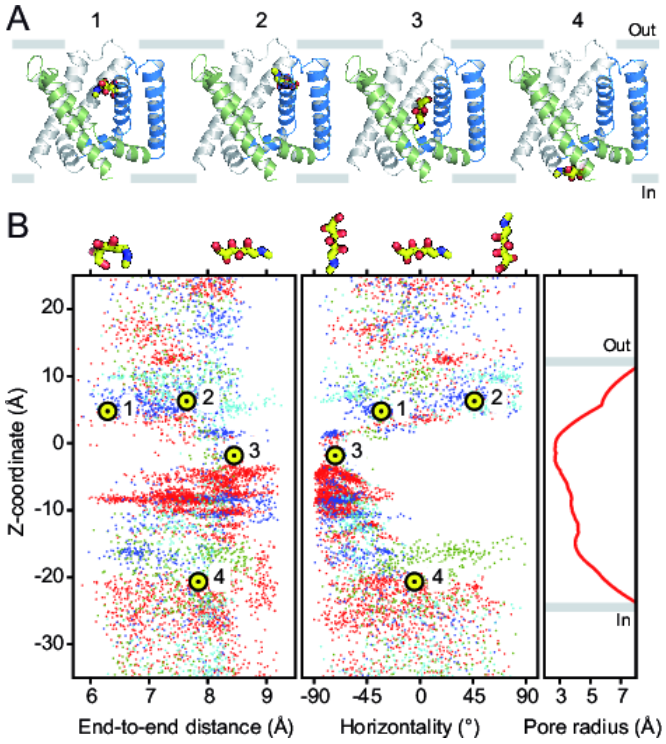

Fig. 4. . Mechanism of $NMDG^+$ permeation revealed by MD simulations. (A) Snapshots at different simulation times. (B) End-to-end distance of $NMDG^+$ (left column) and angle formed by the longitudinal axis of $NMDG^+$ cation with the axis parallel to the membrane plane (middle) are displayed per frame of the simulation for all permeant molecules. Data were collected from four different $NMDG^+$ concentration and membrane potential simulation setups: 1 M at -1 V (red dots), 0.15 M at -1 V (green), 0.15 M at -1.5 V (blue), and 0.15 M at -2 V (cyan). Molecular snapshots of $NMDG^+$ conformations and orientations corresponding to extreme values for these two observables are shown on top. Indicated numbered dots in yellow are snapshots from panel A. HOLE profile of the zfP2X4 open-state model after 50 ns of equilibration (right column). The simulation results indicate that the ion pore of the ATP-bound state is sufficiently wide to allow for the passage of large organic cations.

conductance (**Fig. S1C**). Compared to recordings carried out in symmetric Na^+ solution (43 ± 6 pS, n = 4 patches at 1 µM ATP, **Fig. S1E**), the unitary conductance of $NMDG^+$ currents was about 13-times lower than that of Na^+ currents. From these values, we conclude that $NMDG^+$ ions flow through the ATP-gated open pore at extremely low rates (~2.5×10^6 $NMDG^+$ ions per second per channel at -120 mV with 132.6 mM $NMDG^+$) compared to Na^+ (~32×10^6 Na^+ ions per second per channel at -120 mV with 132.6 mM Na^+). Given the fact that $NMDG^+$ can rapidly transit through the ATP-gated receptor channel, our data demonstrate that the open pore is wide enough to allow its passage on the millisecond time scale.

Molecular motions underlying $NMDG^+$ permeation are similar to those underlying Na^+ permeation

We next sought to determine the molecular motions that drive permeation of $NMDG^+$. We used our recent "opto-tweezers" strategy that enabled us to probe the gating mechanism of P2X2 receptors by using light to open and close the pore (36). This strategy entails the use of a synthetic semi-rigid azobenzene cross-linker, 4,4′-bis(maleimido-glycine) azobenzene, called MAM (named hereafter MAM-3), which is covalently tethered between a pair of engineered cysteine-substituted residues located at an appropriate distance apart. Light stimulation at specific wavelengths can then be used to force parts of the protein to come closer together or move farther apart due to isomerization

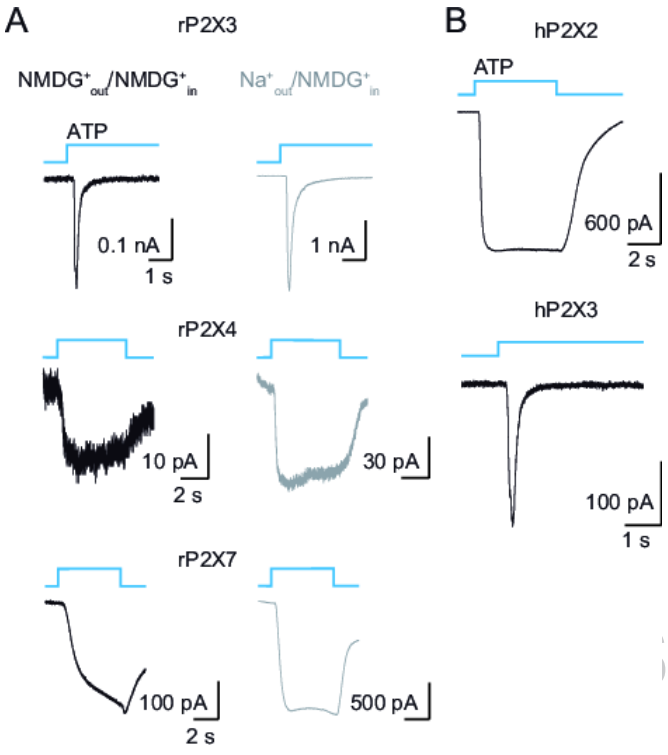

Fig. 5. . P2X receptors are permeable to natural organic cations. (A) Macroscopic ATP-gated currents recorded at -60 mV from HEK-293 cells expressing the indicated rat P2X receptors. Recordings were first made in symmetric $NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solution (black traces), and then in $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$ (grey traces) solution. ATP concentration was 30 μM for rP2X3 and rP2X4, and 300 μM for rP2X7 receptors. For rP2X3 receptors, ATP applications were spaced at least by 3 minutes. (B) Macroscopic ATP-gated currents recorded in symmetric spermidine solution at -60 mV from HEK-293 cells expressing the indicated human P2X receptors. ATP concentration was 30 μM. Spermidine current density was as follows: hP2X2: 43 ± 4 pA/pF (n = 5 cells); hP2X3: 6 ± 2 pA/pF (n = 7 cells). For all traces, ATP application lasted 5 s.

of the azobenzene between defined *trans* and *cis* configurations (**Fig. 2 A and B**). These light-driven motions provide a faithful readout of the molecular movements induced by ATP (36, 37).

We focused on the region of the pore that is particularly effective for manipulating molecular motions by light, i.e. around residues I328 and S345 that can be cross-linked horizontally or vertically relative to the membrane plane by MAM-3 (36) (**Fig. 2C**). To increase the chance of trapping any incremental increase of the pore diameter, we synthesized two shorter, more rigid photo-switchable cross-linkers, named MAM-1 (also known as BMA (37)) and MAM-2, in which the cysteine-reactive maleimides are either directly attached to both extremities of the azobenzene core (MAM-1) or indirectly at one of the two extremities by a glycine unit (MAM-2) (**Fig. 2A** and **Fig. S2-S4**). As a result, the two end-to-end maleimides are incrementally separated by 2 Å between any two consecutive MAMs in their *trans* configuration (**Fig. S5**). The end-to-end distance distributions in the *cis* configuration were significantly broader and more difficult to interpret. We produced thirteen single and double cysteine mutants in the P2X2-3T background that were expressed in HEK-293 cells, and individually treated with each photo-switchable cross-linker, giving rise to forty-two different combinations, including controls on the P2X2-3T (**Fig. 2E**). Effects of light on receptor activity were then assayed using whole-cell patch-clamp recordings on 365-nm (80 ms or 2 s, 17.7 mW/mm^2), 530-nm (2 or 4 s, 13.3 mW/mm^2) or 455-nm (2 s, 39.5 mW/mm^2) illumination cycles to elicit photocurrents in symmetric $NMDG^+$ solutions. These currents were normalized to those carried by Na^+ (I_{NMDG+}/I_{Na+}), following the rapid exchange of cells to a $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solution.

The screening revealed four important findings. First, all mutants responded to ATP and were permeable to $NMDG^+$ when ATP was used as agonist, with I_{NMDG+}/I_{Na+} ratios that were similar to those recorded in outside-out patches (between 4 and 15%, **Fig. 2E** and **Fig. S6A** and **Table S1**). In control experiments, no light-gated currents were observed with P2X2-3T incubated with any MAM (**Fig. 2E** and **Fig. S6B**). Second, only a few of the cysteine mutants (7 combinations out of 39) showed reliable light-induced $NMDG^+$ currents, with a I_{NMDG+}/I_{Na+} ratio > 5 (mean 9 ± 3%) that was close to that of ATP controls (**Fig. 2E**). Indeed, most of the cysteine mutants responded to light following incubation with MAMs (27/39), but control experiments revealed that many of the light-gated currents originating from double mutants (12/19) had activation profiles that were similar to those of one of their single-mutant counterparts (asterisk-labelled boxes in **Fig. 2E**). In addition, two other combinations—I332C/F346C incubated with MAM-2 or MAM-3— which displayed the highest I_{NMDG+}/I_{Na+} ratios were discarded because MAM treatment appeared to dramatically reduce light-gated Na^+ currents which, in turn, may introduce uncertainty regarding ratio measurements (**Fig. 2 D and E**).

Third, two phenotypes were observed in light-induced $NMDG^+$ currents: horizontally cross-linked single mutants (I328C treated with MAM-2 or MAM-3, and I332C treated with MAM-1) were activated in the *trans* configuration of the azobenzene leading to an $NMDG^+$ permeability, while vertically cross-linked double mutants (I328C/S345C treated with any MAMs, and I332C/S345C treated with MAM-2) were activated in the *cis* configuration (**Fig. 2 D and E**). Conversely, backward isomerization of the azobenzene from *trans* to *cis*, in the case of horizontally cross-linked mutants, or *cis* to *trans* configuration, for vertically cross-linked mutants, closed the pore, and an additional illumination cycle revealed full reversibility of the light-gated $NMDG^+$ currents. Supported by inter-subunit cross-linking (**Fig. S6C**), these data demonstrate that the opening of the $NMDG^+$-permeable pore involves two molecular motions: i) a specific vertical shortening of the distance between extracellular and intracellular ends of adjacent TM2 helices, and ii) an outward separation of the extracellular ends from two adjacent TM2 helices.

Fourth, a clear correlation between light-gated $NMDG^+$ and Na^+ currents was observed, whereby Na^+ currents were always observed in the case of $NMDG^+$ currents and, inversely, no light-gated $NMDG^+$ currents were recorded when no light-gated Na^+ currents were recorded, indicating that the molecular mechanism underlying $NMDG^+$ permeation is very similar to that underlying Na^+ permeation.

Unlike our previous work (36), we found substantial $NMDG^+$ permeability in mutant I328C cross-linked horizontally with MAM-3. The reason for this discrepancy is unknown, but given that $NMDG^+$ permeability had been obtained by measuring E_{rev} from bi-ionic experiments (36), it remains possible that its permeability was underestimated, further stressing the need to use symmetric solutions to measure direct permeation events.

Occurrence of partially open states

The correlation between light-gated $NMDG^+$ and Na^+ currents was, however, not perfect. The results revealed that in three out of eleven combinations that displayed sizeable light-gated Na^+ currents (current density > 3 pA/pF), no or very small light-gated $NMDG^+$ currents were recorded (I_{NMDG+}/I_{Na+} were equal or close to zero, **Fig. 2E**). These data were observed in both vertical (I332C/S345C treated with MAM-3) and horizontal (I328C and P329C treated with MAM-1) cross-linking. Of note, increasing the length of the 'tweezers' in the horizontal I328C

cross-linking from MAM-1 to MAM-2 to MAM-3, increased the ratio I_{NMDG+}/I_{Na+} from 0 to ~7% (**Fig. 2D**). Likewise, decreasing the length of the 'tweezers' in the vertical I332C/S345C cross-linking from MAM-3 to MAM-2, also increased the ratio I_{NMDG+}/I_{Na+} from ~0.2 to ~6%. Although we cannot rule out the hypothesis that the presence of MAM is specifically interfering with the bulkier $NMDG^+$, these data suggest the existence of partially, Na^+-selective open states that are not permeable to $NMDG^+$.

Light-induced motions gate dye uptake in physiological conditions

To further confirm data obtained by patch-clamp electrophysiology, we measured YO-PRO-1 dye uptake in physiological conditions, where Na^+ replaced $NMDG^+$. We focused on the pair I328C and S345C treated with MAM-2, which gave both the highest I_{NMDG+}/I_{Na+} ratio and the most robust light-gated Na^+ current density. Robust dye uptake following a pulse of 5 s of light at 365-nm was observed for the double mutant I328C/S345C (**Fig. 3 A and C**). These uptakes were light-dependent and were similar to those induced by 30 μM ATP on the P2X2-3T background (**Fig. 3 A and B**). In contrast, no dye uptake was observed in cells expressing the single mutant I328C or S345C incubated with MAM-2 that were illuminated at 530 nm, following a brief pre-irradiation at 365 nm before YO-PRO-1 application in order to reset the azobenzene in the *cis* state (**Fig. 3 D and E**). While these fluorescence data were in agreement with patch-clamp data, the lack of YO-PRO-1 intake for I328C seemed to be in contrast to the recorded $NMDG^+$ permeability. However, a careful analysis showed a rapid inactivation of light-gated currents during and after irradiation of cells expressing the I328C mutant treated with MAM-2, whereas stable light-gated currents were recorded for the double mutant I328C/S345C incubated with the same photo-cross-linker (**Fig. S7B**). The transient light-gated activation of the single mutant likely prevents substantial accumulation of YO-PRO-1 into cells, a hypothesis that readily explains the apparent lack of dye uptake. All together, these results provide evidence that YO-PRO-1 uptake induced by the *cis* configuration of MAM-2 tethered to the I328C/S345C double mutant occurs in physiological conditions.

Molecular dynamics simulations of $NMDG^+$ permeation

To obtain insights into the permeation mechanism of large organic cations in P2X receptors, $NMDG^+$ conductance was explored by all-atom Molecular Dynamics (MD). For this purpose, an atomistic model of the open state of zfP2X4 equilibrated with three MAM-2 vertically cross-linked between I336C and N353C (i.e. equivalent to I328C and S345C in rP2X2) was simulated in the presence of a membrane potential generated by a constant electric field (see Methods). In order to capture $NMDG^+$ permeation events on the simulation timescale (i.e. < 50 ns), the ion channel devoid of the extracellular domain was simulated in the presence of a large membrane potential (up to -2 V), in the absence of MAM and with harmonic restraints on the backbone atoms to preserve its open-pore conformation. The MD results show that our open-state model of zfP2X4 is permeable to $NMDG^+$ (**Fig. 4** and **Video 1**) with a permeation rate of $7 \times 10^7\ s^{-1}$, which is approximately one order of magnitude lower than that simulated in the presence of Na^+ (**Table S1**). Of note, these results closely match the ratio measured from single-channel recordings, although the absolute values obtained from modeling were largely higher than those determined experimentally. This is likely due to the non-physiological value of the electrochemical driving force that was used in MD. These simulations reveal that the difference in permeability observed for Na^+ versus $NMDG^+$ is due to a more complex permeation mechanism for the latter, which involves a selection for permeation based on both the molecular conformation and the orientation of the organic cation relative to the pore axis. By monitoring the end-to-end distance and the orientation of $NMDG^+$ along a series of successful permeation events sampled by MD, we found that to be able to cross the constriction point the organic cation must adopt a fully extended conformation (d > 7.5Å) and have the charged nitrogen atom facing downwards along the electrochemical gradient ($\theta < -50^\circ$) (**Fig. 4**). In addition, the simulations indicated that before populating a permeable conformation, the flexible $NMDG^+$ needs to sample several conformations and orientations, which significantly hinders its permeability, consistent with low unitary conductance of single-channel $NMDG^+$ currents. Hence, the simulation results confirm that the open-channel state elicited by MAM is permeable to $NMDG^+$ and provide an atomistic picture of the permeation mechanism.

Permeation of YO-PRO-1 was also investigated by MD, however, in sharp contrast to results obtained for $NMDG^+$, no permeation event was sampled under similar simulation conditions (see **Table S1**).

Selected homomeric P2X receptors conduct large natural molecules in response to ATP

Our data reveal that the permeability to large cations develops within milliseconds upon ATP application, with the same time course as permeability to small cations. We thus asked whether this process is also true for other P2X members, especially for the fast-desensitizing P2X1 and P2X3 receptors, which were presumed to be 'non dilating'. To this end, we recorded ATP-gated currents in HEK cells transfected with rat P2X1, P2X3, P2X4, P2X5, P2X7, human P2X2 and P2X3 receptors in symmetric $NMDG^+$ solutions (**Fig. 5A** and **Fig. S8**). We observed fast and robust $NMDG^+$ currents for all these P2X receptors, expect for P2X1, which for unknown reasons was not functional in symmetric $NMDG^+$ solution (no ATP-gated current was observed in the control solution $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$). Importantly, we provide evidence that $NMDG^+$ can permeate the rat and human P2X3 receptors, demonstrating that these desensitizing P2X receptors do indeed carry the ability to rapidly enter a state that is wide enough to allow the passage of large molecules.

Finally, having shown that rapid activation of P2X receptors allows permeation of $NMDG^+$, we sought to determine which natural compounds can transit through the pore. We focused on positively charged compounds that share a similar size to $NMDG^+$. We selected spermidine, which is a natural polyamine known to modulate many ion channels (38), and produced symmetric spermidine solutions (see Methods). We observed robust inward spermidine whole-cell currents following rapid application of ATP in cells expressing the human P2X2 and P2X3 receptors while the membrane was held at -60 mV (**Fig. 5B**). Of note, MD simulations show that the ATP-bound, zfP2X4 open state is also permeable to spermidine (**Video 2**). In addition, the simulations indicate that its permeation rate ($5 \times 10^8\ s^{-1}$) is 7-fold faster than that of $NMDG^+$ under the same membrane potential. The symmetrical structure of spermidine in addition to the presence of positive charges at the extremities make both the conformational and orientational barriers for permeation almost vanish, thus drastically enhancing its permeability relative to $NMDG^+$ despite their similar size. These data therefore uncover a novel P2X signaling, in which large molecules can rapidly permeate through the pore in response ATP binding.

Discussion

In this paper we uncover the molecular mechanism underlying the permeability of P2X receptors to large organic cations, and identify an important natural ion channel modulator able to flow through the ATP-gated pore. Our data tackle the pore dilation paradigm, which has remained for nearly 20 years, one of the most enigmatic features of ionotropic purinergic receptors (19, 20). Until recently, the dogma concerning pore dilation was that the channel undergoes a progressive expansion, over time reaching a

Submission PDF

diameter wide enough to allow permeation of large cations, such as $NMDG^+$ and YO-PRO-1. However, a recent study challenged this model by elegantly demonstrating that P2X channels rapidly develop an $NMDG^+$ current upon ATP binding and lack the slow phase of pore dilation (32). Our results are not only consistent with this study, but further establish that, in striking contrast to current beliefs, the open state that is reached upon milliseconds following ATP binding is also permeable to large molecules. This important finding raises considerable questions concerning the previously predominant view which suggested that the initial I_1 open state is only selective to small cations, such as Na^+, K^+ and Ca^{2+}. The immediate implication of our results is that the structure of the open pore of the ATP-bound state must be sufficiently wide to accommodate large molecules. From the X-ray structures of the ATP-bound zfP2X4 receptor (8), and very recently the ATP-bound human P2X3 (hP2X3) receptor (10), this seems to be the case, as the minimal cross-section of an extended $NMDG^+$ (6 Å × 6 Å × 12.5 Å) is less than the diameter of the open pore (~7 Å for zfP2X4 and 6.4 Å for hP2X3). However, reliable $NMDG^+$ permeation by MD simulations cannot be made on the zfP2X4 X-ray structure because the pore systematically collapses within a few ns (< 5) of equilibration (36), likely due to the lack of the intracellular domain which was removed for crystallization purposes (8). By using an improved model of the open state of zfP2X4 (36), which was equilibrated by 50-ns MD in a physiological environment and stabilized by three vertically cross-linked MAM-2 molecules, we provide clear evidence that both $NMDG^+$ and the natural cation spermidine may flow through the ion pore of the ATP-bound state. We found, however, that the flow of $NMDG^+$ was significantly lower than that of Na^+, as the former needs to 'snake' through the permeating pathway in a fully linear conformation, with the positively charged nitrogen head group pointing downward along the electrochemical gradient. The conformational confinement to this extended form, along with specific orientational constraints in the narrowest region of the pore, introduces significant barriers which hinder cation permeability, thus revealing a complex mechanism for $NMDG^+$ permeation. These molecular requirements therefore cause a decrease in the overall rate of $NMDG^+$ flow. This conclusion is fully consistent with the low unitary conductance of single-channel $NMDG^+$ currents that we (present study), and others (16, 33, 39), have measured for P2X2 and P2X7 receptors.

In contrast to $NMDG^+$, we were unable to sample permeation events for YO-PRO-1 in MD simulations. Because the minimal cross-section of the dye (7 Å × 8 Å × 19 Å) reaches the outer limits of the open pore (~7 Å), it is possible that YO-PRO-1 needs to sample more conformations and orientations before a successful permeation can occur, a process that would take considerably more time. As a result, the flux of this fluorescent dye would be extremely low, likely below that of $NMDG^+$. Such a molecular sampling-limited step may help to explain the apparent delayed entry of fluorescent dyes that were typically used for monitoring P2X apparent pore dilation.

An important finding of this study is that the molecular motions driving $NMDG^+$ conductance are very similar to those that lead to Na^+ flow. By using our recently reported "opto-tweezers" approach (36), we tested the ability of three photo-switchable cross-linkers of different lengths to optically control $NMDG^+$ permeability of thirteen cysteine mutants. We observed reliable $NMDG^+$ permeation with only seven out of the thirty-nine tested combinations, and found a clear correlation between light-gated $NMDG^+$ currents and light-gated Na^+ currents. The specificity of cross-linked residues and the size dependence of the MAMs strengthen the conclusion that the employed 'tweezers' do not induce disorder in the protein, but rather can be used as mechanical actuators to justly monitor naturally relevant motions. We identified two molecular motions that lead to permeation of large organic cations: a horizontal outward separation of the extracellular ends of TM2 helices, and a vertical motion, in which the N- and C-termini of TM2 helices from adjacent subunits come closer together or change their orientations relative to one another, most likely through a change of the helical structure. Importantly, such similar molecular motions were also identified during channel gating (36), suggesting that ATP binding drives the rapid opening of a pore that is simultaneously selective to both small and large cations. As we do not have evidence for a time-dependent increase of the permeability of large cations, our data thus support the conclusion that pore dilation is not an intrinsic property of the channel itself. However, we do not rule out the possibility that pore dilation does exist, but if this were the case, it must require a regulatory element that is external to the P2X pore and which would be lost in our experimental conditions.

One intriguing feature of the mechanism revealed by the "opto-tweezers" approach is that it raises the possibility to open the channel in a state that is not fully open. We found that an insufficient horizontal outward separation, or inappropriate vertical motions of two adjacent TM2 helices failed to open $NMDG^+$ conductance, but not Na^+ conductance, suggesting that the pore is partially open. A further variation, by only a few Å, of adjacent helices induced an $NMDG^+$ permeation in addition to the Na^+ flow, thus allowing the pore to become fully opened. The physiological relevance of these partially open states remains unclear, but they might be related to dynamic changes of other biophysical properties of P2X receptors, such as ATP potency and rectification, as reported previously (40, 41). Another possibility would be that these partially open states might correspond to the actual I_1 state. However, we do not favor this hypothesis because we provide no evidence that ATP binding naturally drives the opening of the channel in partially open states that are only selective to small cations.

Finally, we have identified spermidine as a natural cation able to permeate through the ATP-gated open state. Polyamines are well-known to modulate the activity of many ion channels, including synaptic ligand-gated ion channels (38). Importantly, we show that even desensitizing receptors, such as hP2X3, which have been considered thus far as "non-dilating" pores, are able to briefly activate their pores in an open state, allowing for a transient flow of spermidine. This finding has considerable physiological significance because it discloses an unsuspected role of polyamines in P2X signaling, and more generally because it raises the possibility that activation of P2X receptors may allow for the exchange of other physiological molecules between cells, such as amino acids. Notably, a recent study exploited the large-pore property of P2X receptors to deliver small membrane-impermeable drugs to diseased retina cells (42). We thus propose that besides the critical role of the permeation of inorganic cations, the passage of small sized metabolites, like spermidine, through the ATP-gated open P2X pore may contribute to alternative physiological responses. These findings open up new horizons in P2X signaling.

Materials and Methods

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

For **MAM-1** synthesis, 498 mg (2.348 mmol) of (*E*)-4,4'-(diazene-1,2-diyl)dianiline and 462.3 mg (4.715 mmol, 2 eq) of maleic anhydride were mixed in 20 mL of anhydrous THF and left one hour at 4°C. The resulting product was centrifuged (4 minutes, 8,000 *g*) and the precipitate was resolubilized in 20 mL of anhydrous THF. Then, 0.5 mL (5.324 mmol, 2.3 eq) of acetic anhydride and 50.2 mg of sodium acetate were added. The mixture was heated under microwave conditions (20 min, 110°C). Distilled water was added (100 mL) and after centrifugation (10 min, 8,000 *g*), the precipitate was resolubilized in 100 mL of methanol and an orange solid was obtained by slowly adding cold water. After filtration, purification was carried out

Unauthenticated

by Flash-column chromatography (silica) with dichloromethane and ethyl acetate (gradient 100:0 => 95:5). After evaporation of the solvent, the pure **MAM-1** was obtained as a bright orange solid (36% yield). NMR ^{1}H ($CDCl_3$): δ (ppm) 8.01 (4H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.55 (4H, d, *J* = 8.8 Hz), 6.88 (4H, s). NMR ^{13}C ($CDCl_3$): δ (ppm) 169.16, 151.23, 134.42, 133.72, 126.22, 123.70. (ESI-HMRS): (m/z, $[M+H]^+$): calculated for $C_{20}H_{13}N_4O_4^+$: 373.0859 found : 373.0932.

For synthesis of intermediate (**1**), 398 mg (1.875 mmol) of (*E*)-4,4'-(diazene-1,2-diyl)dianiline and 726.8 mg (4.7 mmol, 2.5 eq) of 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetic acid were solubilized in a mixture of anhydrous DMF/acetonitrile. 1.108 g (4.7 mmol, 2.5 eq) of HATU and 0.65 mL of anhydrous triethylamine (4.7 mmol, 2.5 eq) were then added. The mixture was agitated at room temperature for 20 h. After extraction ($NaHCO_3$, 3x ethyl acetate), the crude product was washed with acetone. The supernatant was purified by Flash-column chromatography (silica) with ethyl acetate and heptane (60:40). An orange product was obtained (compound **1**, 51% yield). NMR ^{1}H (acetone-d_6): δ (ppm) 9.66 (1H, s), 7.78 (2H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.76 (2H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 8.9 Hz), 7.01 (2H, s), 6.78 (2H, d, *J* = 8.9 Hz), 4.41 (2H, s). NMR ^{13}C (DMSO-d6): δ (ppm) 170.64, 165.11, 152.47, 139.70, 138.55, 136.20, 134.95, 128.15, 125.90, 123.50, 122.23, 118.86, 112.85, 112.52, 68.49, 55.81, 32.08, 29.58.

For synthesis of **MAM-2**, 200 mg (0.5725 mmol) of (**1**) was mixed with 112.3 mg (1.145 mmol, 2 eq) of maleic anhydride and heated under microwave conditions (110°C, 90 min) in acetone. The obtained precipitate was filtered and resuspended in acetone, then heated 5 min at 60°C with 0.12 mL of triethylamine (0.8588 mmol, 1.5 eq). 0.54 mL of acetic anhydride were then added (5.725 mmol, 10 eq) with a catalytic amount of manganese acetate (III) and the mixture was heated under microwave conditions (90 min, 110°C). After addition of water and filtration, 46.1 mg of **MAM-2** was obtained (19% yield). NMR ^{1}H (DMSO-d6): δ (ppm) 10.66 (1H, s), 7.97 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.92 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.79 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.58 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.23 (2H, s), 7.16 (2H, s), 4.34 (2H, s). NMR ^{13}C (acetone-d6): δ (ppm) 171.30, 170.38, 166.17, 152.11, 149.51, 142.76, 135.71, 135.60, 135.25, 127.78, 124.83, 123.80, 120.53, 41.46. (ESI-HMRS): (m/z, $[M+H]^+$): 429.1073 calculated for $C_{22}H_{15}N_5O_5^+$, found: 429.1069.

The synthesis of **MAM-3** was carried out as previously described (36).

Molecular biology. Cysteine mutations were introduced into a rP2X2 receptor background in which Cys9, Cys348 and Cys430 were mutated to threonine (P2X2-3T) (35) using KAPA HiFi HotStart PCR kit (Cliniscience, France). All mutations were confirmed by DNA sequencing (GATC-Biotech).

Expression in cultured cells. Human embryonic kidney (HEK-293) and TSA-201 cells were cultured and transiently transfected using phosphate calcium procedure with the pcDNA3.1(+) vectors (0.05-0.1 µg for single channel recordings, 0.3 µg for whole-cell recordings and 10 µg for cell surface cross-linking) and a vector encoding a green fluorescent protein (0.3 µg), as previously described (43).

Patch-clamp electrophysiology. Single-channel recordings using outside-out configuration were carried out using HEK-293 cells at room temperature 24 h after transfection. Recording pipettes pulled from borosilicate glass (Harvard Apparatus) were coated with Sylgard 184 (Dow Corning Co.) and fire polished to yield resistances of 10–20 MΩ (Sutter model p-97). The holding potential was -120 mV. The extracellular solution contained 132.6 mM NaCl or NMDG (Sigma), 0.3 mM $CaCl_2$, 0.25 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7.3 adjusted with NaOH (for NaCl solution) or HCl solution (for NMDG solution). The intracellular solution contained either 132.6 mM NMDG, 9.46 mM HEPES, and 10 mM EDTA, adjusted to pH 7.3, first approximately with a 5% HF solution, then more precisely with 0.5% HF with Polypropylene (PP) pipettes (Dominique Dutscher, France) or 132.6 mM NaF, 9.46 mM HEPES, and 10 mM EDTA, adjusted to pH 7.3 with NaOH. Osmolarity was adjusted to 290-310 mOsmol kg^{-1} with glucose. Data were acquired with a patch-clamp amplifier (HEKA EPC 10) using PATCHMASTER software (HEKA Co.), sampled at 4-10 kHz and low-pass filtered at 2.9 kHz. For off-line analysis, data were refiltered to give a cascaded filter corner frequency (f_c) of either 1 kHz or 100 Hz. For data analyses, FitMaster (HEKA Electroniks, v2x73,2) and IGOR PRO (WaveMetrics, v6.37A) softwares were used. Channel events were detected by using TAC software (Bruxton Co.) and conductance levels were measured by all-points amplitude histograms fitted to Gaussian distributions. Fitting procedures to access the time constant were based on the single-exponential decay equation function: $I_t = I_0 + A \exp(-t/\tau)$, where I_t is the instantaneous current, I_0 and A are the residual current and maximal amplitude, respectively, t is the time in seconds, and τ is the time constant in seconds.

Whole-cell recordings were performed 24-48 h after transfection in HEK-293 cells. Normal external solution (NES) contained 140 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, adjusted to pH 7.3 with NaOH. Normal internal solution (NIS) contained 140 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, adjusted to pH 7.3 with NaOH. For MAMs incubation, cells were incubated before recordings at room temperature with, respectively, MAM-1 (10 µM for 5 min, 1% final concentration of DMSO in NES), MAM-2 (10 µM for 10 min, 1% DMSO in NES), and MAM-3 (3 µM for 20 min, 1% DMSO in NES) and 3 µM ATP. After treatment, cells were washed out with NES. Patch pipettes contained 140 mM NMDG, 10 mM HEPES and 10 mM EDTA, pH adjusted with HCl to 7.3. To measure $NMDG^+$ permeation, extracellular solution contained 140 mM NMDG and 10 mM HEPES, pH 7.3. The solution was then exchanged to NaCl solution containing 140 mM NaCl and 10 mM HEPES, pH 7.3. For control experiments, these solutions were supplemented with 30 µM ATP. For spermidine permeation experiments, whole-cell recordings were performed 24-48 h after transfection. Patch pipettes contained 33 mM spermidine, 10 mM HEPES and 10 mM EDTA, pH adjusted to 7.3 with HCl. The extracellular solution contained 33 mM spermidine and 10 mM HEPES, pH 7.3, supplemented with 30 µM ATP. Osmolarity of all these solutions was adjusted as described above. Current density was obtained by dividing the current by the cell membrane capacitance.

Cell-surface cross-linking. Cross-linking of cell-surface receptors was performed as follows. TSA-201 cells in dishes were transfected with pcDNA3.1(+) vectors containing the mutant constructs. After 24 h or 48 h, cells in dishes were washed with ice cold PBS that contained 154 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 4.2 mM Na_2HPO_4, 1.47 mM KH_2PO_4, pH 7.0, supplemented with 1 mM $MgCl_2$ and 0.4 mM $CaCl_2$. Then, cells were incubated under gentle agitation with 50 µM photo-switchable cross-linker in the presence of 3 µM ATP in ice-cold PBS, for 20 minutes (MAM-3) or 15 minutes (MAM-1, MAM-2). Quenching of unreacted MAM solution was carried out by a 10-minute incubation with 10 mM N-acetyl-L-cysteine methyl ester (Sigma-Aldrich), in ice cold PBS, pH 8.0. Dishes were rapidly washed with PBS and incubated with a thiol-cleavable, membrane-impermeant reagent sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate (Sulfo-NHS-SS-Biotin, ThermoFisher Scientific, France) in PBS at pH 8.0 for 30 minutes under gentle agitation. Unreacted Sulfo-NHS-SS-Biotin was quenched by incubation with 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Biosolve Chemicals) in ice-cold PBS, pH 8.0 for 10 minutes. Cells were solubilized in lysis buffer and the supernatant was incubated overnight with neutravidin-agarose beads (ThermoFisher Scientific, France) as previously described (43). Protein samples were separated on 4-15% SDS-PAGE gels in Tris/Glycine/SDS running buffer (Bio-Rad, France). Samples were transferred to a nitrocellulose membrane as described (43), which was then incubated in TPBS (PBS supplemented with 1% nonfat dry milk, 0.5% bovine serum albumin, and 0.05% Tween 20) in order to block the membrane. The membrane was incubated in TPBS buffer overnight at 4°C with mouse anti-c-Myc antibody (ThermoFisher Scientific, France) diluted at 1:2,500. After three washes with TPBS, the blot was incubated with peroxidase-conjugated sheep anti-mouse antibody for 2 h (dilution 1:10,000; GE Healthcare life Sciences, France) at room temperature and washed a further three times with TPBS, and developed using Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent (Dominique Dutscher, France).

Fluorescence measurements. Fluorescence was measured using an Olympus IX73 (Olympus LUCPlanFLN 20×/0.45 PH1) with ProgRes MF-cool camera. Images were captured at 0.5 Hz. For each experiment, YO-PRO-1 (ThermoFisher) fluorescence was measured from three single cells per field with excitation at 455 nm (ET-EGFP filter, Chroma). For the double mutant I328C/S345C, cells were first incubated with 10 µM MAM-2 in the presence of 3 µM ATP for 10 minutes and washed with NES buffer. Then, cells were incubated with 10 µM YO-PRO-1 in NES, and following 10 minutes of incubation, cells were irradiated at 365 nm for 5 s. For single mutants I328C and S345C, the same protocol was carried out, except that activation was achieved by 530 nm irradiation and that cells were briefly pre-irradiated at 365 nm before YO-PRO-1 incubation in order to reset the azobenzene in the *cis* state. In control experiments with the P2X3-3T, the incorporation of 10 µM YO-PRO-1 was measured in response to 30 µM ATP.

Molecular modeling. The end-to-end distances for the free MAM-1 and MAM-2 molecules in solution (∼10,000 atoms with water molecules) were obtained from all-atom Molecular Dynamics (MD) simulations performed with ACEMD (44). Height 100 ns-long unrestrained MD simulations were computed in the NVT ensemble at 310 K for the *cis* and *trans* configurations and for the R/R, S/R, R/S, and S/S stereoisomers. The mean distances between the S–S atoms were computed by averaging over the four stereoisomers for a total of n = 200,000 per *cis* or *trans* configuration. Normalized probability distributions of the S–S distance were obtained by clustering all distance values using a bin width of 0.5 Å. The permeation mechanism of Na^+, $NMDG^+$, YO-PRO-1^{2+} and $spermidine^{3+}$ in P2X was explored by all-atom MD simulations starting from a relaxed open-state model of zfP2X4 stabilized by three vertical MAM-2 photo-switchable cross-linkers fused at the positions I336C/N353C in cis configuration. The latter model (∼138,000 atoms) was produced following the procedure described previously (36), with a few differences: (i) three MAM-2 (instead or MAM-3) cross-linkers were fused to zfP2X4 with the glycine unit placed downward near N353C; (ii) the 2-ns equilibration MD was followed by a production of 50 ns with no positional restraints; (iii) in addition to the distance restraints mimicking the internal TM1/TM2 Cd^{2+} binding site (45), the symmetry of the P2X trimer was loosely controlled by using the "Symmetry Restraints" command in NAMD with force constants of 0.25 and 1.0 kcal/mol/A^2 for the extracellular and the transmembrane domains, respectively; (iv) the side chain of L351 involved in the new TM2-TM2 interface was simulated using four non-interacting copies (46) together with the R/R, R/S, S/R, and S/S stereoisomers of MAM-2.

For the MD simulations of cation permeation, two modifications were introduced in the resulting model of the P2X open state. First, the MAM-2 linkers were removed (while keeping the mutated residues into cysteines) to minim the physiological conditions. Second, the extracellular domain of the receptor was deleted to reduce the size of the system and to enhance the sampling of permeation events on the simulation timescale.

Confidential

This modification was done by keeping residues [28-59] and [333-365] and introducing a peptide bond between D59 and F333 at the top of the transmembrane domain. The resulting structure was energy-minimized for 5000 steps with NAMD 2.11 (47) using the CHARMM force-field version 36 (48). $NMDG^+$, YO-PRO-1^{2+} and spermidine^{3+} parameters were obtained from the CHARMM general force-field (49). During all simulations, harmonic restraints (5 kcal/mol/Å^2) on the backbone atoms were applied to preserve the configuration of the transmembrane domain as in the MAM2-equilibrated model. The receptor was then embedded into a pre-equilibrated 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) lipid bilayer, solvated with TIP3P water molecules and NaCl at 0.15 M or 1 M concentration using VMD (50). To study permeation of large organic cations, Na^+ ions were replaced by $NMDG^+$, YO-PRO-1^{2+} or spermidine^{3+} (51). All simulations were performed with periodic boundary conditions and Particle Mesh Ewald long-range electrostatics. The system ($\sim$ 90,000 atoms) was minimized during 5,000 steps, briefly thermalized (600ps) to 300K and equilibrated for 2 ns in the NPT ensemble at 1 atm pressure. Production runs were performed in NVT ensemble imposing a membrane potential to increase the ion permeation probability on the simulation timescale. The membrane potential V_m was generated by introducing a constant electric field E_z on all atoms along the z -axis perpendicular to the membrane plane (52): $E_z = V_m / L_z$ where L_z is the size of the simulated system in the z direction. The membrane potential was set to the following voltages: -2, -1.5 and -1 V. Analysis of ion permeation was done using Tcl scripting in VMD, whereas the pore profiles were computed by the program HOLE (53). The End-to-End distance of permeant $NMDG^+$ is computed at each simulation step as the distance between the two terminal carbons. To compute the horizontality we selected a vector from the center of mass of the molecule to the terminal carbon linked to the nitrogen, then the complement of the polar angle is computed. The z-coordinate of the center of mass of permeant $NMDG^+$ is plotted in function of the two previous observables.

Data Analysis. All experiments were performed at least four times from at least two transfections, and values are presented as mean ± s.e.m. For modeling, values of distribution of *cis* and *trans* configurations are presented as mean ± s.e. The number of cells or patches used for the experiments is provided in the text or corresponding figure legend.

Supplementary Information is available in the online version of the paper.

Acknowledgments

We thank Pr Hongbo Zhao and Dr François Rassendren for providing human P2X2 and human P2X3 receptors, respectively, and Dr Frederic Bolze and Romain Vauchelles for imaging advising. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE11-0004-01 to T.G.), the Ministère de la Recherche, and the Fondation Pierre et Jeanne Spiegel. Financial support from the International Center for Frontier Research in Chemistry (icFRC) and the Agence Nationale de la Recherche through the LabEx project Chemistry of Complex Systems (ANR-10-LABX-0026 CSC to M.C.) is gratefully acknowledged.

Submission PDF

1. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509(7500):310-317.
2. Khakh BS, North RA (2012) Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 76(1):51-69.
3. Wirkner K, Sperlagh B, Illes P (2007) P2X3 receptor involvement in pain states. *Mol Neurobiol* 36(2):165-183.
4. Yan D, *et al.* (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(6):2228-2233.
5. Pijacka W, *et al.* (2016) Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat Med* 22(10):1151-1159.
6. North RA, Jarvis MF (2013) P2X receptors as drug targets. *Mol Pharmacol* 83(4):759-769.
7. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460(7255):592-598.
8. Hattori M, Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485(7397):207-212.
9. Kasuya G, *et al.* (2016) Structural Insights into Divalent Cation Modulations of ATP-Gated P2X Receptor Channels. *Cell Rep* 14(4):932-944.
10. Mansoor SE, *et al.* (2016) X-ray structures define human P2X3 receptor gating cycle and antagonist action. *Nature* 538(7623):66-71.
11. Karasawa A, Kawate T (2016) Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *Elife* 5.
12. Browne LE, Jiang LH, North RA (2010) New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 31(5):229-237.
13. Habermacher C, Dunning K, Chataigneau T, Grutter T (2016) Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology* 104:18-30.
14. Ding S, Sachs F (1999) Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *J Gen Physiol* 113(5):695-720.
15. Evans RJ (1996) Single channel properties of ATP-gated cation channels (P2X receptors) heterologously expressed in Chinese hamster ovary cells. *Neurosci Lett* 212(3):212-214.
16. Riedel T, Schmalzing G, Markwardt F (2007) Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X7 receptor-operated single-channel currents. *Biophys J* 93(3):846-858.
17. Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A (1999) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* 2(4):315-321.
18. Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat. Neurosci.* 2(4):322-330.
19. Rokic MB, Stojilkovic SS (2013) Two open states of P2X receptor channels. *Front Cell Neurosci* 7:215.
20. Wei L, Caseley E, Li D, Jiang LH (2016) ATP-induced P2X Receptor-Dependent Large Pore Formation: How Much Do We Know? *Front Pharmacol* 7:5.
21. Compan V, *et al.* (2012) P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J Neurosci* 32(12):4284-4296.
22. Jiang LH, *et al.* (2005) N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 289(5):C1295-1302.
23. Pelegrin P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25(21):5071-5082.
24. Eickhorst AN, Berson A, Cockayne D, Lester HA, Khakh BS (2002) Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. *J Gen Physiol* 120(2):119-131.
25. Fisher JA, Girdler G, Khakh BS (2004) Time-resolved measurement of state-specific P2X2 ion channel cytosolic gating motions. *J Neurosci* 24(46):10475-10487.
26. Khakh BS, Egan TM (2005) Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics. *J Biol Chem* 280(7):6118-6129.
27. Chaumont S, Khakh BS (2008) Patch-clamp coordinated spectroscopy shows P2X2 receptor permeability dynamics require cytosolic domain rearrangements but not Panx-1 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(33):12063-12068.
28. Yan Z, Li S, Liang Z, Tomic M, Stojilkovic SS (2008) The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J Gen Physiol* 132(5):563-573.
29. Shinozaki Y, *et al.* (2009) Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X(4) receptors. *PLoS Biol* 7(5):e1000103.
30. Khadra A, *et al.* (2012) Gating properties of the P2X2a and P2X2b receptor channels: experiments and mathematical modeling. *J Gen Physiol* 139(5):333-348.
31. Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA (2013) P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *J Neurosci* 33(8):3557-3566.
32. Li M, Toombes GE, Silberberg SD, Swartz KJ (2015) Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 18(11):1577-1583.
33. Ding S, Sachs F (1999) Ion permeation and block of P2X(2) purinoceptors: single channel recordings. *J Membr Biol* 172(3):215-223.
34. Sorge RE, *et al.* (2012) Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med* 18(4):595-599.
35. Li M, Chang TH, Silberberg SD, Swartz KJ (2008) Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* 11(8):883-887.
36. Habermacher C, *et al.* (2016) Photo-switchable tweezers illuminate pore-opening motions of an ATP-gated P2X ion channel. *Elife* 5:e11050.
37. Browne LE, *et al.* (2014) Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(1):521-526.
38. Guerra GP, Rubin MA, Mello CF (2016) Modulation of learning and memory by natural polyamines. *Pharmacol Res*.
39. Pippel A, *et al.* (2017) Localization of the gate and selectivity filter of the full-length P2X7 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(11):E2156-E2165.
40. Clyne JD, Brown TC, Hume RI (2003) Expression level dependent changes in the properties of P2X2 receptors. *Neuropharmacology* 44(3):403-412.
41. Fujiwara Y, Kubo Y (2004) Density-dependent changes of the pore properties of the P2X2 receptor channel. *J Physiol* 558(Pt 1):31-43.
42. Tochitsky I, *et al.* (2016) How Azobenzene Photoswitches Restore Visual Responses to the Blind Retina. *Neuron*.
43. Jiang R, *et al.* (2010) A putative extracellular salt bridge at the subunit interface contributes to the ion channel function of the ATP-gated P2X2 receptor. *J. Biol. Chem.* 285(21):15805-15815.
44. Harvey MJ, Giupponi G, De Fabritiis G (2009) ACEMD: Accelerating Biomolecular Dynamics in the Microsecond Time Scale. *Journal of Chemical Theory and Computation* 5(6):1632-1639.
45. Heymann G, *et al.* (2013) Inter- and intrasubunit interactions between transmembrane helices in the open state of P2X receptor channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(42):E4045-4054.
46. Roitberg A, Elber R (1991) Modeling side chains in peptides and proteins: application of locally enhanced sampling and simulated annealing methods to find minimum energy conformations. *J Chem Phys* 95:9277–9287.
47. Phillips JC, *et al.* (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26(16):1781-1802.
48. Best RB, *et al.* (2012) Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone phi, psi and side-chain chi(1) and chi(2) dihedral angles. *J Chem Theory Comput* 8(9):3257-3273.
49. Vanommeslaeghe K, *et al.* (2010) CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem* 31(4):671-690.
50. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14(1):33-38, 27-38.
51. Onasch F, *et al.* (1984) The interactions between nucleic acids and polyamines. III. Microscopic protonation constants of spermidine. *Biophys Chem* 19(3):245-253.
52. Roux B (2008) The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer simulations. *Biophys J* 95(9):4205-4216.
53. Smart OS, Neduvelil JG, Wang X, Wallace BA, Sansom MS (1996) HOLE: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J Mol Graph* 14(6):354-360, 376.

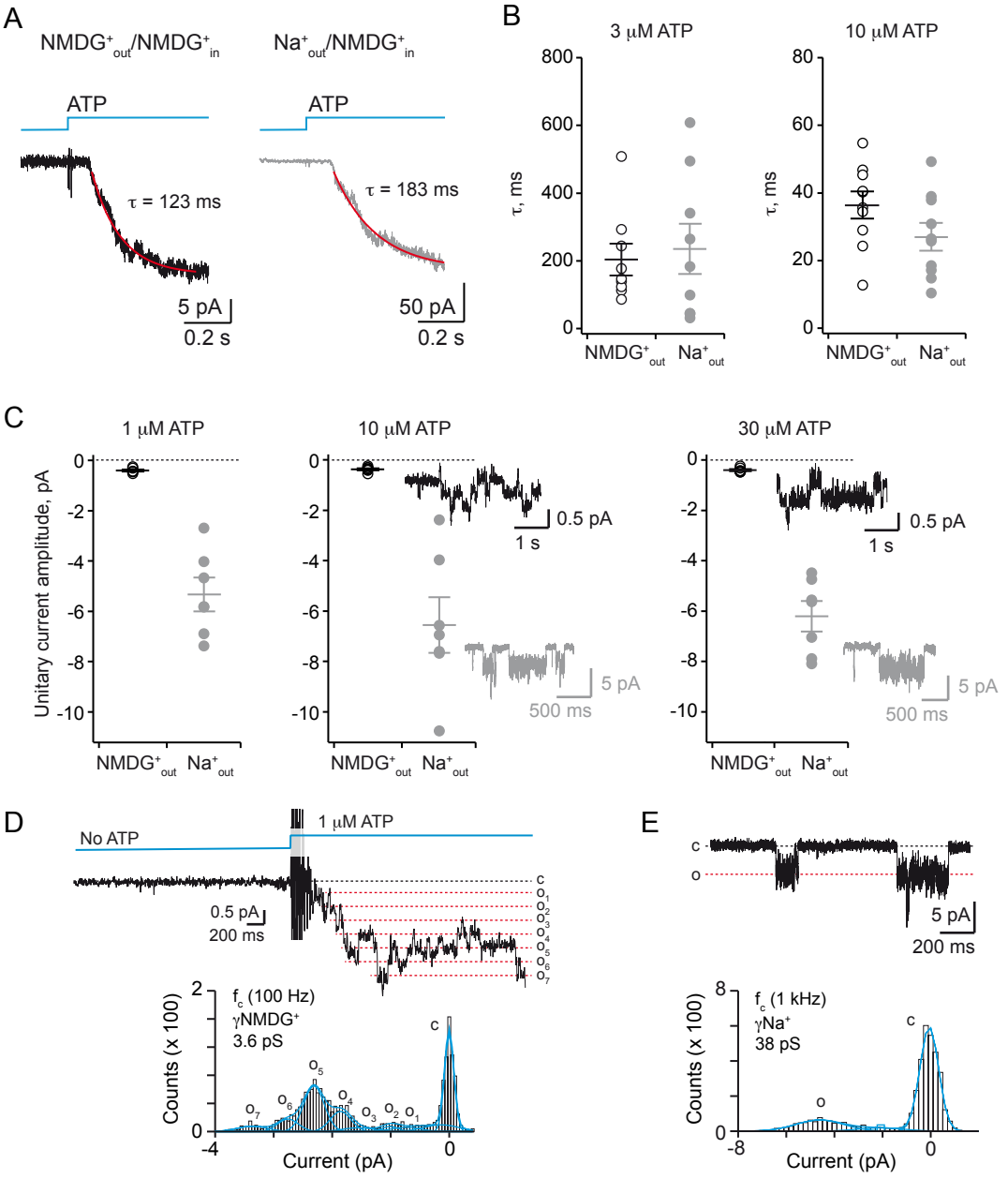

Fig. S1. Kinetics and unitary conductance of NMDG⁺ currents from outside-out patches expressing the P2X2-3T receptor.

(A) Determination of the activation time constant τ by fitting NMDG⁺ currents (left, black trace) or Na^+ currents (right, grey trace), induced by 3 μM ATP (blue traces), to a single-exponential decay function. Currents were recorded from the same patch at -120 mV using the same protocol as described in Figure 1A. Red curves indicate fitted traces. (B) Pooled data, presented as individual τ values and as mean ± s.e.m., obtained at 3 μM (n = 9 patches) and 10 μM ATP (n = 10) in $NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solution (black lines and dots) and in $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solution (grey lines and dots). (C) Unitary current amplitude determined from single-channel recordings at indicated ATP concentrations in $NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solution (black) and in $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solution (grey) recorded at -120 mV. Data, presented as individual values and as mean ± s.e.m. (n = 7 patches for all ATP concentrations, except for 1 and 30 μM ATP in $NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$ for which n = 6, because NMDG⁺ currents cannot be clearly resolved in the seventh patch), acquired in $NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$ and in $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solutions were sampled at 10 kHz and filtered at a final f_c of 100 Hz (black lines and dots) or 1 kHz (grey lines and dots), respectively. Representative recordings are shown next to the relevant mean values for each concentration, except for 1 μM ATP for which representative traces are already shown in Figure 1C. (D) *Top*, single-channel recording of P2X2-3T current elicited by 1 μM ATP recorded in symmetric $NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solution at -120 mV. Data were sampled at 10 kHz and filtered at a final f_c of 100 Hz. Note the absence of unitary currents in the absence of ATP, whereas discernable channel openings (downward deflections indicated by red dashed lines and denoted o_1 to o_7) are visible following fast application of ATP. Baseline current, which corresponds to closed channels (c), is indicated by a black dashed line. *Bottom*, corresponding all-points amplitude histogram of single-channel NMDG⁺ currents. Distributions were fit by a sum of nine Gaussians. For this patch, the mean unitary conductance of NMDG⁺ current is 3.6 pS. (E) *Top*, single-channel recording of P2X2-3T current elicited by 1 μM ATP recorded in symmetric Na^+_{out}/Na^+_{in} solution (see Methods) at -120 mV. Data were filtered at a final f_c of 1 kHz. Channel openings (o) are downward deflections indicated by the red dashed line. Baseline current, which corresponds to closed channels (c), is indicated by a black dashed line. *Bottom*, corresponding all-points amplitude histogram of single-channel Na^+ currents. Distributions were fit by a sum of three Gaussians. For this patch, the mean unitary conductance of Na^+ current is 38 pS.

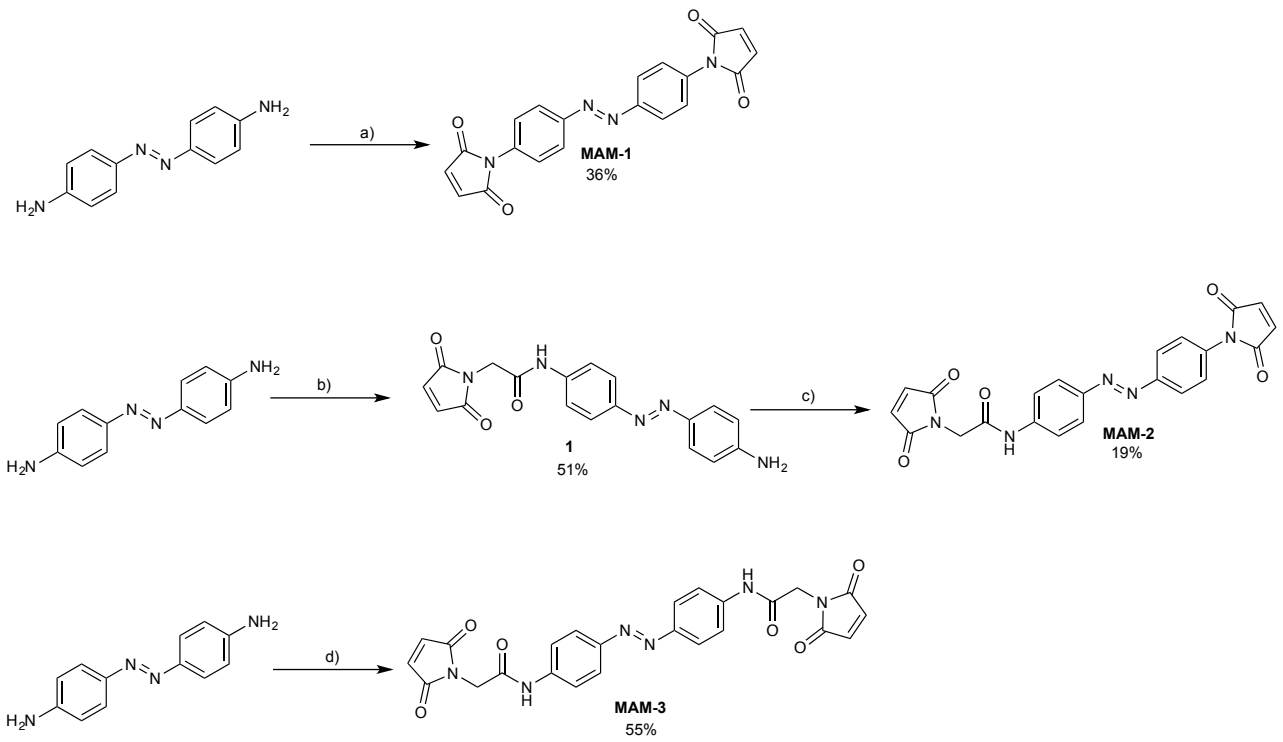

Fig. S2. Chemical synthesis of azobenzene cross-linkers MAMs.
a) 1. maleic anhydride, THF, 60 min, 4°C; 2. Acetic anhydride, sodium acetate (cat.), THF, 20 min, 110°C MW. b) 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetic acid, HATU, DIPEA, ACN/DMF, 20 h, RT. c) 1. maleic anhydride, acetone, 90 min, 110°C MW ; 2. Et3N, acetone, 5 min, 60°C ; 3.acetic anhydride, manganese acetate (cat.), acetone, 90 min, 110°C MW. d) 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetic acid, HATU, DIPEA, ACN/DMF, 20 h, RT.

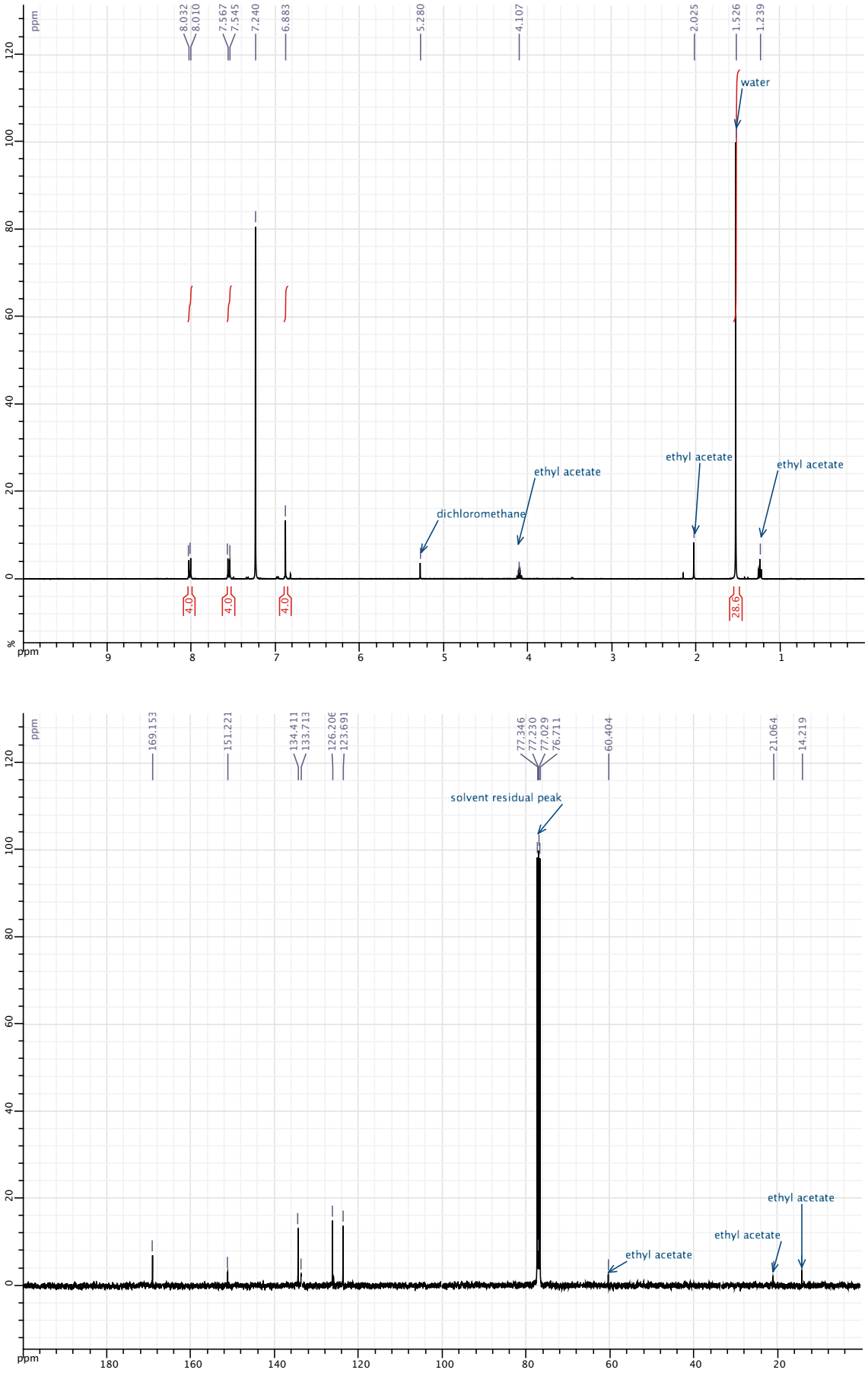

Fig. S3. ^{1}H and ^{13}C NMR of MAM-1.

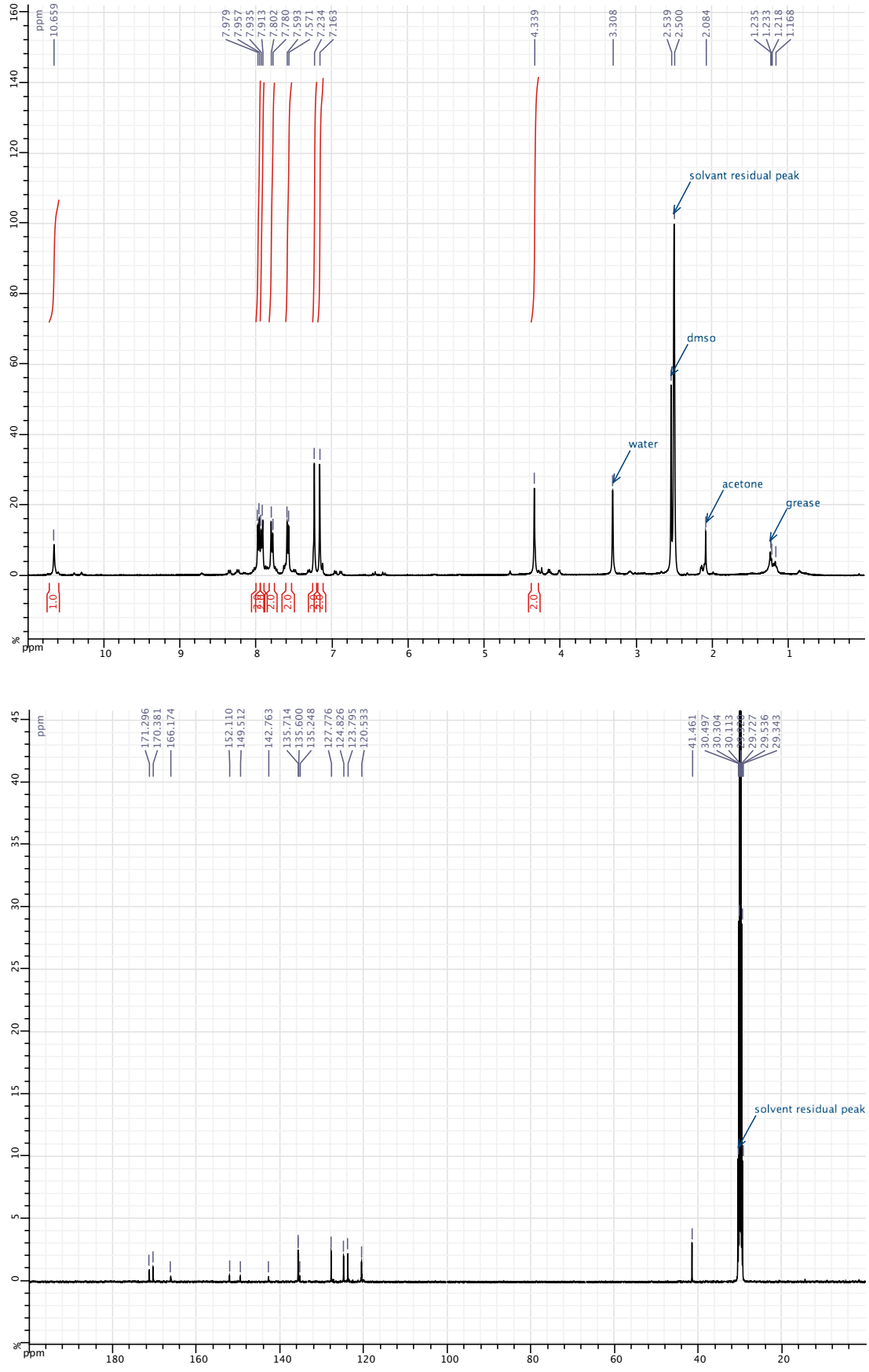

Fig. S4. ^{1}H and ^{13}C NMR of MAM-2.

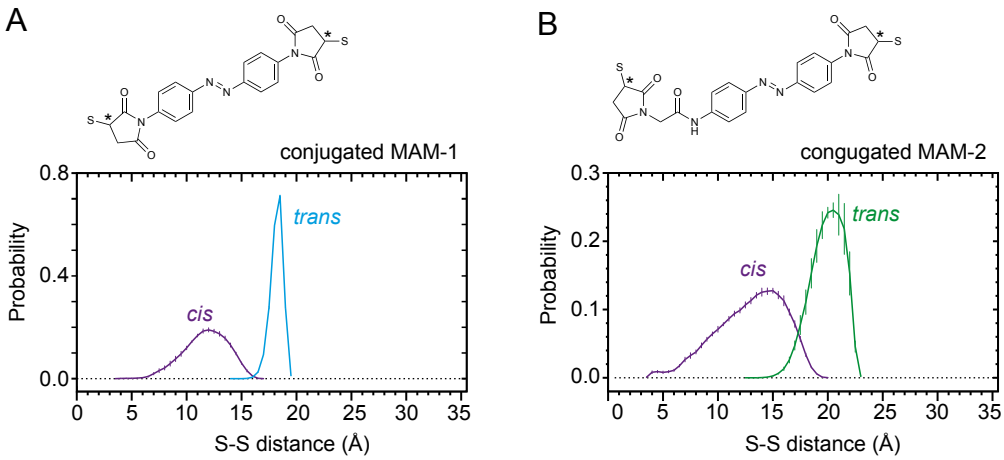

Fig. S5. Distribution of *cis* and *trans* configurations for MAM-1 and MAM-2.
Normalized probability distributions for the end-to-end distance of thiol conjugated MAM-1 (A) and MAM-2 (B) in solution in *trans* and *cis* configurations. Shown is the S-S distance computed from two sulfur atoms of the four stereoisomers (R/S, S/R, R/R and S/S indicated by *) following reaction with maleimides as shown in inset. The error bars denote the standard deviation (n = 4) for the stereoisomers. Distribution for MAM-3 is described elsewhere (36).

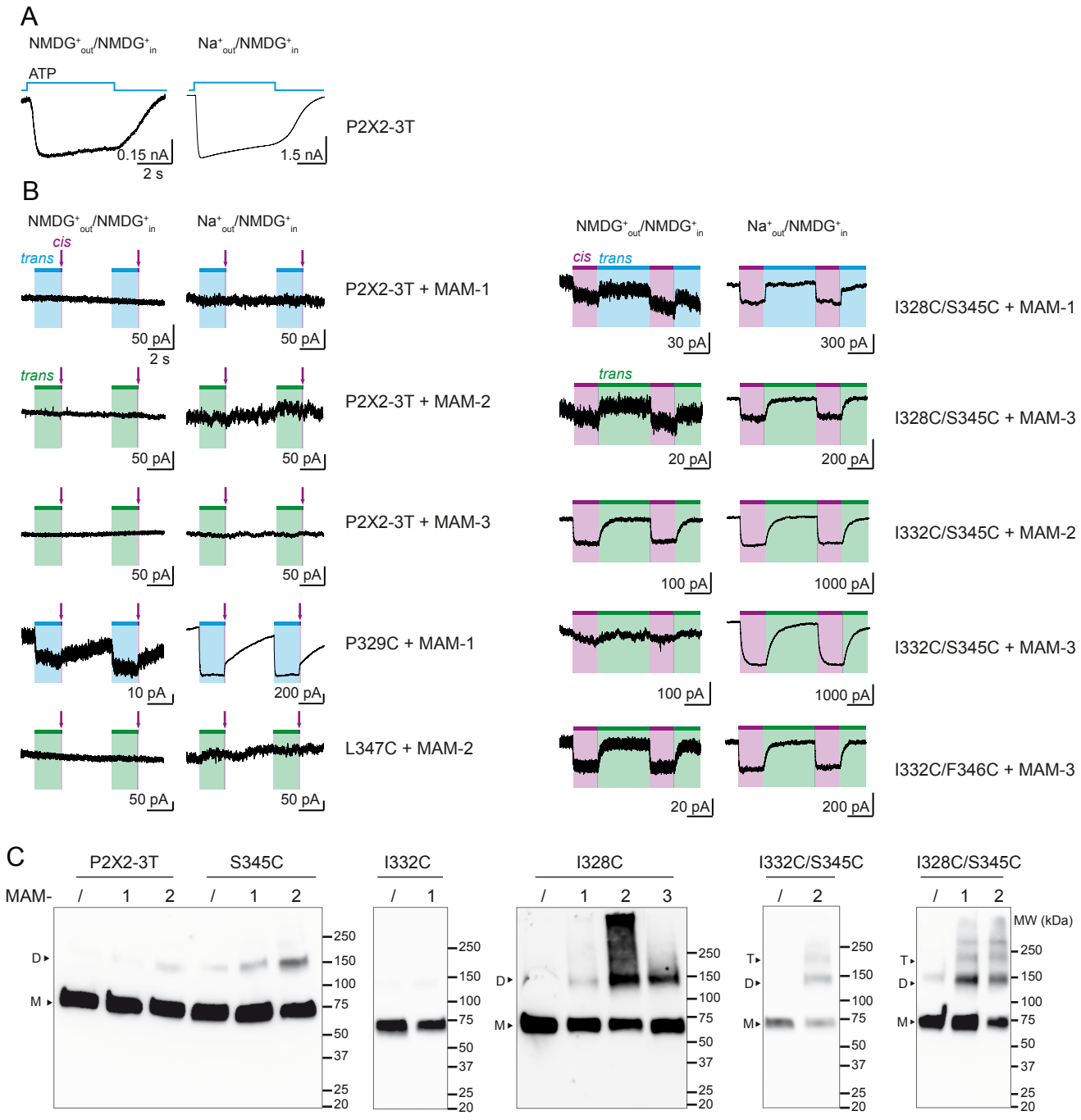

Fig. S6. Molecular mechanism of NMDG⁺ permeation through the lens of 'opto-tweezers'.

(A) Macroscopic ATP (30 μM)-gated currents recorded at -60 mV from HEK-293 cells expressing the P2X2-3T. Cells were first bathed in extracellular $NMDG^+$ solution ($NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$, left), and then rapidly exchanged to extracellular Na^+ solution ($Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$, right). (B) Macroscopic light-gated currents recorded at -60 mV from HEK-293 cells expressing the indicated mutants treated with the indicated MAMs. Recordings were made as described in panel (A). Illumination was carried out, as indicated, at 365-nm (violet bars) and 455-nm (blue bars) or 530-nm (green bars) to elicit the *cis* and *trans* states of the azobenzene, respectively. Short illuminations (80 ms) are indicated by violet arrows. For single treated mutants treated, cells were briefly pre-irradiated at 365 nm (80 ms) before recordings. (C) Western blot analysis of cell-surface MAMs cross-linking of the indicated P2X2-3T constructs expressed in TSA-201 cells, after treatment with MAM-1, MAM-2, MAM-3 or without MAM (indicated by /). Monomer, dimer and trimer are indicated.

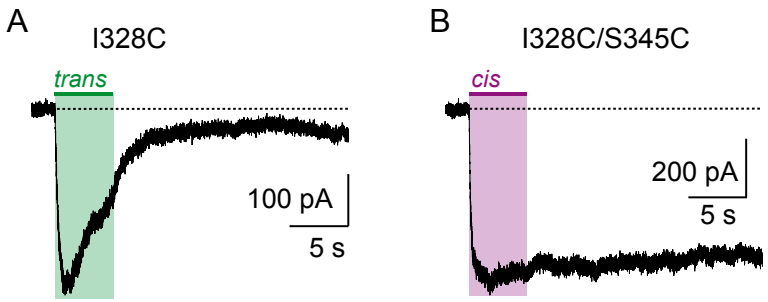

Fig. S7. Stability of the light-gated currents in single and double cysteine mutants treated with MAM-2.
Macroscopic light-gated currents recorded at -60 mV from HEK-293 cells expressing either the single mutant I328C (A) or the double mutant I328C/S345C (B) treated with MAM-2. Illumination at 530 nm (green bar) or 365 nm (violet bar) for 5 seconds induced either transient (I328C, remaining current measured 18 s after the end of irradiation: 3 ± 3%, n = 5) or stable light-gated currents (I328C/S345C, 69 ± 7%, n = 4). Before recordings, cells were pre-irradiated at 365 nm (for I328C) or 525 nm (for I328C/S345C). Internal pipette contained NIS and extracellular bath contained NES (see Methods).

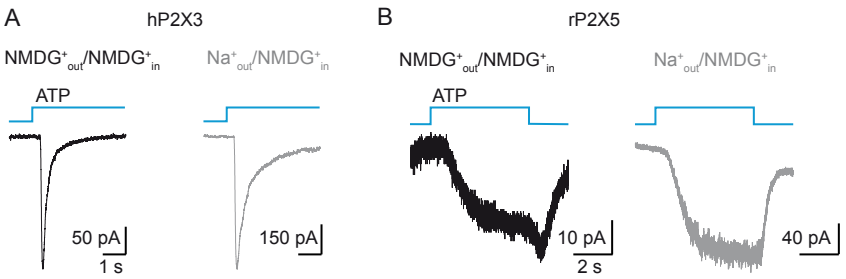

Fig. S8. P2X receptors are permeable to natural organic cations.
Macroscopic ATP-gated currents recorded at -60 mV from HEK-293 cells expressing the human P2X3 receptors (A) or rat P2X5 receptors (B). Recordings were first made in symmetric $NMDG^+_{out}/NMDG^+_{in}$ solution (black traces), and then in $Na^+_{out}/NMDG^+_{in}$ (grey traces) solution. ATP concentration was 30 μM. For hP2X3 receptors, ATP applications were spaced by 3 minutes. For all traces, ATP application lasted 5 s.

Discussion générale

Au cours de ma thèse, la parution d'un article (Li *et al*, 2015) a été un tournant important car il a démontré que l'augmentation de la perméabilité du $NMDG^+$ mesurée grâce au E_{rev} était un artéfact dû aux conditions bi-ioniques ($NMDG^+_{EXT}/Na^+_{INT}$). Or nos résultats nous ont permis d'aller plus loin en mettant en évidence que le pore des récepteurs P2X est perméant, à la fois aux petits et aux gros cations et ce à la même échelle de temps. Nous pouvons dire que la dilatation n'est pas une caractéristique intrinsèque du pore car la dilatation implique une dimension temporelle de l'expansion du pore permettant l'augmentation progressive de la perméabilité $NMDG^+$. Or nous montrons clairement que les taux d'activation en présence de $NMDG^+$ et Na^+ sont semblables sans réelle influence de la concentration de l'ATP. Ce qui indique que dans nos conditions, le phénomène de dilation n'existe pas. Mais surtout nous démontrons que les récepteurs P2X ne possèdent pas d'état de conductance I2, le passage des petits et gros cations s'effectue par le canal simplement ouvert. Bien sûr nous n'excluons pas l'hypothèse d'une oscillation très rapide de la taille du pore permettant le passage des cations inorganiques rendant plus difficiles le passage des grosses molécules. De plus, si la dilatation existe elle nécessiterait le recrutement d'une protéine tiers comme la panexine associée aux récepteurs P2X7. Cette dilatation permettra le passage de molécule encore plus grosse.

Durant ces expériences, nous avons quantifié le passage du $NMDG^+$ par rapport au Na^+ montrant que le Na^+ est environs 10 fois plus perméant que le $NMDG^+$. La dynamique moléculaire a permis de modéliser ce passage et montre que le $NMDG^+$ doit adopter la bonne conformation et orientation pour le passage à travers le pore ce qui explique les résultats de conductance obtenu en électrophysiologie.

Ces résultats sont importants car ils nous permettent d'appréhender les différents résultats obtenus durant mes différents projets. Notamment j'ai confirmé que la construction zfP2X4-Cne présentait aucun courant rentrant induit par le passage du $NMDG^+$. Or dans ces mêmes expériences j'ai testé la réponse ATP en présence de Na^+ de cette construction pour vérifier son activité, j'ai constaté des faibles courants (-33.25 ± 3.32 pA). Or si nous analysons ces résultats à

la lumière des nouvelles données. Nous pouvons dire simplement que le nombre d'acide aminé tronqué diminue fortement l'expression de surface du zfP2X4-C (Kawate *et al*, 2009) ; ce qui induit une diminution drastique des courants enregistrés. Et comme nous l'avons vu, le $NMDG^+$ est 10 fois moins perméant que le Na^+, ce qui pourrait expliquer que nous n'observons aucun courant porté par le $NDMG^+$ car la limite technologique nous empêche de le quantifier. Dans le même projet, j'ai montré que la construction zfP2X4-A basée sur nos mesures de variation du E_{rev} ne montrait pas d'augmentation de la perméabilité. Mais surtout, j'en suis arrivé à la conclusion que le pore était directement perméant au $NMDG^+$. Cette caractéristique partagée avec le récepteur P2X5 (Bo *et al*, 2003)est intrigante car dans les conditions ioniques ($NMDG^+_{EXT}/Na^+_{INT}$) nous nous attendons à une sortie massive de Na^+ et donc un courant sortant puis rentrant or ce n'est pas le cas. Il est donc important de comprendre cette différence portée par ces deux récepteurs. Une piste envisagée est, comme pour de la construction zfP2X4-C, celle l'expression de surface. L'ablation de certaines parties des domaines cytoplasmiques sur la construction zfP2X4-A entraine une diminution de son expression de surface, pas assez pour qu'on puisse encore discerner les courants $NMDG^+$ mais suffisante pour altérer la variation du $E_{rev.}$ Le mécanisme sous-jacent de cette altération n'est pas clair. L'influence de l'expression de surface est décrite en conditions bi-ioniques dans un précèdent article (Fujiwara & Kubo, 2004). Ils montrent clairement que la diminution de l'expression de surface a tendance à empêcher toute variation du E_{rev}, ce que nous interprétons dès lors comme une inhibition de la dilatation. Nos expériences en conditions symétriques sur le récepteur P2X5 ($NMDG^+_{EXT}/NMDG^+_{INT}$) montrent un passage du $NMDG^+$ mais n'apportent pas d'informations complémentaires permettant de comprendre cet intriguant phénomène. C'est pourquoi il est important d'étudier les différences structurales portées par ces deux récepteurs, car ils peuvent aboutir à une autre explication montrant une influence de la zone de sélectivité du pore perméant au $NMDG^+$.

L'utilisation de la stratégie employant les MAM s'est avéré intéressante, elle a permis de confirmer l'existence des deux mouvements permettant une ouverture du canal. Cependant, nous avons remarqué que contrairement à mes précédents résultats en condition bi ionique ($NMDG^+_{EXT}/Na^+_{INT}$), les deux mouvements induisent le passage net du $NMDG^+$. La différence est seulement observée sur le mouvement horizontal lors des tests de perméabilité au $NMDG^+$ en

condition asymétrique dans mon précèdent projet. En effet, nous observions lors de l'application du protocole un fort courant sortant porté par le Na^+ puis un très faible courant rentrant $NMDG^+$ consécutif à l'application d'un nombre important du protocole lumineux. Au regard de nos derniers résultats, il est très facile d'expliquer ces données. En effet, suite à une déplétion sodique trop importante favorisée par ce mouvement horizontal, nous observons un courant sortant important. Ce mouvement est cependant immédiatement perméant au $NMDG^+$ mais le courant résultant est masqué par la composante sodique. Et c'est seulement après plusieurs applications du protocole et la sortie massive du Na^+ intracellulaire que nous pouvons observer un faible courant de $NMDG^+$. L'autre information importante est la différence entre le mouvement vertical et horizontal en condition bi-ionique. En effet pourquoi observe-t-on une déplétion lors du mouvement horizontal et pas vertical ? Il serait intéressant de comprendre moléculairement pourquoi le mouvement horizontal facilite la sortie de sodium.

Une autre observation remarquable obtenue grâce à cette stratégie est l'influence qu'a l'incrémentation de la taille du pore grâce aux différents MAM sur le ratio $I_{NMDG+/Na+}$. Ainsi si le mouvement est suffisamment important nous obtenons des ratios similaires aux expériences en ATP, comme si nous avions atteint l'ouverture maximale et naturel du pore. Dans les cas où le ratio calculé est plus faible cela peut démontrer que l'écartement des hélices par la lumière n'est pas suffisant pour que le $NMDG^+$ puisse passer correctement. Cette information est importante car cela démontre que le pore peut être ouvert grâce aux molécules photoisomérisables et donc perméant aux petits cations mais pas assez pour permettre le passage de gros cations. Ce qui indique que, outre l'orientation et la conformation des molécules, la taille du pore joue aussi un rôle dans le passage des cations organiques. Un test pourra permettre de confirmer cette hypothèse, en faisant muter certains acides aminés situés dans la lumière du pore, cela permettra l'augmentation artificielle de la taille du pore. En utilisant par exemple les mutants N333A, T336A, L338C connu pour faciliter le passage du YO-PRO-1 (Virginio *et al*, 1999a). Il s'agira d'utiliser ces mutants en enregistrant la conductance du $NMDG^+$ en configuration 'outside out' et vérifiant si la valeur obtenue est supérieure à celle de référence dans mes travaux.

Le passage de gros cations pose la question du rôle physiologique sous-jacent. Outre le fait que nous avons découvert que la spermidine, une molécule physiologique, peut traverser le pore, il

est important de comprendre les divers résultats mettant en évidence un lien entre la dilatation et la douleur neuropathique (voir 3.3) et ce, à la lumière du changement de paradigme. Prenons l'exemple de la mutation H155T issue d'un polymorphisme génétique sur les récepteurs P2X7 d'humain, présenté comme augmentant la dilation et la perception de la douleur (Sorge *et al*, 2012). Or l'allèle T155 est hyperfonctionnelle, montrant des courants ATP plus importants que l'allèle H155. De plus, nous savons que l'expression de surface de l'allèle H155 est moins importante que l'allèle T155 (Bradley *et al*, 2011). En partant de nos résultats sur la perméabilité et ces données sur l'expression de surface, il est possible de comprendre l'influence réelle de ces mutations. Ainsi l'augmentation de surface induit une augmentation des courants transitant par les récepteurs P2X7. Et partant du postulat que le ratio est identique entre les allèles, l'augmentation des récepteurs adressés en surface des cellules induirait indubitablement une augmentation du passage des molécules par effet conjugué de l'ensemble de récepteurs et non par expansion intrinsèque du pore.

Conclusion

En conclusion nous avons remis en question le paradigme de la dilatation proposé il y a presque 20 ans. Grâce à cela nous sommes les premiers à avoir déterminé que les récepteurs P2X devenaient rapidement perméants aux gros cations en parallèles des petits cations suite l'application de l'ATP.

Nos résultats en dynamique moléculaire ont révélé que le flux du $NMDG^+$ est environ 10 fois plus faible que celui du Na^+, ce qui est la conséquence de la nécessité d'un criblage conformationel du $NMDG^+$ au début pore. En tenant compte de ces résultats, nous avons pu apporter une explication des données obtenues au début de ma thèse. Mais aussi, nous sommes les premiers à avoir étendu la caractéristique de perméabilité du pore aux gros cations à l'ensemble des récepteurs P2X homomériques.

Nous avons pu voir que l'utilisation des molécules photoisomérisables est un outil puissant car elles nous ont permis d'avoir un contrôle spatio-temporel du récepteur P2X2. Grace à cette

stratégie nous avons montré que les petits cations et les gros cations partagent les mêmes mécanismes moléculaires aux niveaux des hélices montrant qu'a l'état ouvert, le pore est perméant aux petits et gros cations et ce à la même échelle temporelle.

La démonstration du passage de grosses molécules reste certes une information importante mais soulève un certain nombre d'interrogations ; notamment sur l'intérêt d'un tel passage. Les études en Spermidine permettent d'ouvrir une nouvelle voie de signalisation impliquant les récepteurs P2X. Elles ont pour objectif de montrer l'importance de nos travaux pour la compréhension du rôle physiologique des récepteur P2X et donner un sens à cette perméabilité particulière.

Il s'agira désormais de comprendre le rôle physiologique de cette capacité permettant le passage de molécules importantes. Il faudra notamment tester des mutations au niveau de la lumière du pore, et se concentrer sur la partie restrictive au passage du $NMDG^+$. Ces mutations devront augmenter la taille du pore en limitant l'encombrement stérique dû à la chaine latérale des acides aminés. Mais il faudra surtout analyser l'ensemble des données obtenues ces dernières années, spécifiquement les mutations en se basant sur les nouvelles conditions expérimentales $NMDG^+$ symétriques et déterminer par exemple leur contribution sur l'expression de surface.

Bibliographie

Abdelhamid RE & Sluka KA (2015) ASICs Mediate Pain and Inflammation in Musculoskeletal Diseases. *Physiology* **30:** 449–459

Acuña-Castillo C, Morales B & Huidobro-Toro JP (2000) Zinc and copper modulate differentially the P2X4 receptor. *J. Neurochem.* **74:** 1529–1537

Adriouch S, Dox C, Welge V, Seman M, Koch-Nolte F & Haag F (2002) Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X7 Receptor. *J. Immunol.* **169:** 4108–4112

Alberto AVP, Faria RX, Couto CGC, Ferreira LGB, Souza C a. M, Teixeira PCN, Fróes MM & Alves LA (2013) Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **386:** 775–787

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2002) General Principles of Cell Communication. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26813/ [Accessed February 9, 2017]

Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M & Rogers SW (2009) Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* **89:** 73–120

Althoff T, Hibbs RE, Banerjee S & Gouaux E (2014) X-ray structures of GluCl in apo states reveal a gating mechanism of Cys-loop receptors. *Nature* **512:** 333–337

Alves LA, de Melo Reis RA, de Souza CAM, de Freitas MS, Teixeira PCN, Neto Moreira Ferreira D & Xavier RF (2014) The P2X7 receptor: Shifting from a low- to a high-conductance channel — An enigmatic phenomenon? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838:** 2578–2587

Ase AR, Honson NS, Zaghdane H, Pfeifer TA & Séguéla P (2015) Identification and characterization of a selective allosteric antagonist of human P2X4 receptor channels. *Mol. Pharmacol.* **87:** 606–616

Baconguis I, Bohlen CJ, Goehring A, Julius D & Gouaux E (2014) X-Ray Structure of Acid-Sensing Ion Channel 1–Snake Toxin Complex Reveals Open State of a Na+-Selective Channel. *Cell* **156:** 717–729

Banghart M, Borges K, Isacoff E, Trauner D & Kramer RH (2004) Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat. Neurosci.* **7:** 1381–1386

Banke TG, Chaplan SR & Wickenden AD (2010) Dynamic changes in the TRPA1 selectivity filter lead to progressive but reversible pore dilation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **298:** C1457–C1468

Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S & Panchin Y (2004) The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* **83:** 706–716

Barnes NM, Hales TG, Lummis SCR & Peters JA (2009) The 5-HT3 receptor – the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* **56:** 273–284

Baron R (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2:** 95–106

Beg AA & Jorgensen EM (2003) EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nat. Neurosci.* **6:** 1145–1152

Bennett JP, Cockcroft S & Gomperts BD (1981) Rat mast cells permeabilized with ATP secrete histamine in response to calcium ions buffered in the micromolar range. *J. Physiol.* **317:** 335–345

Bernier L-P, Ase AR, Boué-Grabot E & Séguéla P (2012) P2X4 receptor channels form large noncytolytic pores in resting and activated microglia. *Glia* **60:** 728–737

Bo X, Jiang L-H, Wilson HL, Kim M, Burnstock G, Surprenant A & North RA (2003) Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Mol. Pharmacol.* **63:** 1407–1416

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

Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G & Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* **8:** 1263–1268

Bradley HJ, Baldwin JM, Goli GR, Johnson B, Zou J, Sivaprasadarao A, Baldwin SA & Jiang L-H (2011) Residues 155 and 348 Contribute to the Determination of P2X7 Receptor Function via Distinct Mechanisms Revealed by Single-nucleotide Polymorphisms. *J. Biol. Chem.* **286:** 8176–8187

Brake AJ, Wagenbach MJ & Julius D (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371:** 519–523

Browne LE, Compan V, Bragg L & North RA (2013) P2X7 Receptor Channels Allow Direct Permeation of Nanometer-Sized Dyes. *J. Neurosci.* **33:** 3557–3566

Browne LE, Nunes JPM, Sim JA, Chudasama V, Bragg L, Caddick S & Alan North R (2014) Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111:** 521–526

Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A & Monyer H (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100:** 13644–13649

Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* **24:** 509–581

Burnstock G (2008a) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7:** 575–590

Burnstock G (2008b) Endothelium-derived vasoconstriction by purines and pyrimidines. *Circ. Res.* **103:** 1056–1057

Burnstock G & Verkhratsky A (2012a) Early History of Purinergic Signalling. In *Purinergic Signalling and the Nervous System* pp 7–66. Springer Berlin Heidelberg Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-28863-0_2 [Accessed February 22, 2017]

Burnstock G & Verkhratsky A (2012b) Receptors for Purines and Pyrimidines. In *Purinergic Signalling and the Nervous System* pp 119–244. Springer Berlin Heidelberg Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-28863-0_5 [Accessed February 22, 2017]

Cankurtaran-Sayar S, Sayar K & Ugur M (2009) P2X7 receptor activates multiple selective dye-permeation pathways in RAW 264.7 and human embryonic kidney 293 cells. *Mol. Pharmacol.* **76:** 1323–1332

Cao E, Liao M, Cheng Y & Julius D (2013) TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* **504:** 113–118

Changeux J-P, Leuzinger W & Huchet M (1968) Specific binding of acetylcholine to acetylcholinesterase in the presence of eserine. *FEBS Lett.* **2:** 77–80

Changeux JP, Ryter A, Leuzinger W, Barrand P & Podleski T (1969) On the association of tyrocidine with acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **62:** 986–993

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

Chaumont S & Khakh BS (2008) Patch-clamp coordinated spectroscopy shows P2X2 receptor permeability dynamics require cytosolic domain rearrangements but not Panx-1 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105:** 12063–12068

Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G & Wood JN (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* **377:** 428–431

Chessell IP, Simon J, Hibell AD, Michel AD, Barnard EA & Humphrey PPA (1998) Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS Lett.* **439:** 26–30

Chung M-K, Güler AD & Caterina MJ (2008) TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat. Neurosci.* **11:** 555–564

Clarke CE, Benham CD, Bridges A, George AR & Meadows HJ (2000) Mutation of histidine 286 of the human P2X4 purinoceptor removes extracellular pH sensitivity. *J. Physiol.* **523 Pt 3:** 697–703

Clyne JD, Wang L-F & Hume RI (2002) Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **22:** 3873–3880

Cockcroft S & Gomperts BD (1979) ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature*

279: 541–542

Coddou C, Codocedo JF, Li S, Lillo JG, Acuña-Castillo C, Bull P, Stojilkovic SS & Huidobro-Toro JP (2009) Reactive oxygen species potentiate the P2X2 receptor activity through intracellular Cys430. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29:** 12284–12291

Coddou C, Lorca RA, Acuña-Castillo C, Grauso M, Rassendren F & Huidobro-Toro JP (2005) Heavy metals modulate the activity of the purinergic P2X4 receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **202:** 121–131

Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP & Stojilkovic SS (2011) Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* **63:** 641–683

Collo G, North RA, 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

Compans B, Choquet D & Hosy E (2016) Review on the role of AMPA receptor nano-organization and dynamic in the properties of synaptic transmission. *Neurophotonics* **3:** 041811

Corringer P-J, Baaden M, Bocquet N, Delarue M, Dufresne V, Nury H, Prevost M & Van Renterghem C (2010) Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels: new insight from bacterial homologues. *J. Physiol.* **588:** 565–572

Corringer P-J, Poitevin F, Prevost MS, Sauguet L, Delarue M & Changeux J-P (2012) Structure and Pharmacology of Pentameric Receptor Channels: From Bacteria to Brain. *Structure* **20:** 941–956

Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW & De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* **438:** 1017–1021

Coutinho-Silva R & Persechini PM (1997) P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *Am. J. Physiol.* **273:** C1793-1800

Damer S, Niebel B, Czeche S, Nickel P, Ardanuy U, Schmalzing G, Rettinger J, Mutschler E & Lambrecht G (1998) NF279: a novel potent and selective antagonist of P2X receptor-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* **350:** R5-6

Danigo A, Magy L & Demiot C (2013) TRPV1 dans les neuropathies douloureuses - Des modèles animaux aux perspectives thérapeutiques. *médecine/sciences* **29:** 597–606

Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nat. Methods* **8:** 26–29

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

Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Faltynek CR & Jarvis MF (2004) Mitogen-Activated Protein Kinase and Caspase Signaling Pathways Are Required for P2X7 Receptor (P2X7R)-Induced Pore Formation in Human THP-1 Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308:** 1053–1061

Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P & Jarvis MF (2009) Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **157:** 1203–1214

Eickhorst AN, Berson A, Cockayne D, Lester HA & Khakh BS (2002) Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. *J. Gen. Physiol.* **120:** 119–131

Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA & Surprenant A (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol. Pharmacol.* **48:** 178–183

Evans RJ, Lewis C, Virginio C, Lundstrom K, Buell G, Surprenant A & North RA (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

Ewald RC & Cline HT (2009) NMDA Receptors and Brain Development. In *Biology of the NMDA Receptor*, Van Dongen AM (ed) Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5287/ [Accessed February 9, 2017]

Faria RX, DeFarias FP & Alves LA (2005) Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **288:** C260–C271

Fernandes HB & Raymond LA (2009) NMDA Receptors and Huntington's Disease. In *Biology of the NMDA Receptor*, Van Dongen AM (ed) Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5279/ [Accessed February 9, 2017]

Fisher JA, Girdler G & Khakh BS (2004) Time-resolved measurement of state-specific P2X2 ion channel cytosolic gating motions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24:** 10475–10487

Fiske CH & Subbarow Y (1929) PHOSPHORUS COMPOUNDS OF MUSCLE AND LIVER. *Science* **70:** 381–382

Fujiwara Y & Kubo Y (2004) Density-dependent changes of the pore properties of the P2X2 receptor channel. *J. Physiol.* **558:** 31–43

Fujiwara Y & Kubo Y (2006) Regulation of the desensitization and ion selectivity of ATP-gated P2X2 channels by phosphoinositides. *J. Physiol.* **576:** 135–149

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

Gerevich Z, Zadori ZS, Köles L, Kopp L, Milius D, Wirkner K, Gyires K & Illes P (2007) Dual effect of acid pH on purinergic P2X3 receptors depends on the histidine 206 residue. *J. Biol. Chem.* **282:** 33949–33957

Gomperts BD (1983) Involvement of guanine nucleotide-binding protein in the gating of Ca2+ by receptors. *Nature* **306:** 64–66

Gu BJ, Rathsam C, Stokes L, McGeachie AB & Wiley JS (2009) Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X7 complex: this dissociation regulates P2X7 pore formation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **297:** C430–C439

Gürel G, Gustafson MA, Pepper JS, Horvitz HR & Koelle MR (2012) Receptors and Other Signaling Proteins Required for Serotonin Control of Locomotion in Caenorhabditis elegans.

Genetics **192:** 1359–1371

Habermacher C, Dunning K, Chataigneau T & Grutter T (2016a) Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology* **104:** 18–30

Habermacher C, Martz A, Calimet N, Lemoine D, Peverini L, Specht A, Cecchini M & Grutter T (2016b) Photo-switchable tweezers illuminate pore-opening motions of an ATP-gated P2X ion channel. *eLife* **5:** e11050

Hanukoglu I (2016) ASIC and ENaC type sodium channels: conformational states and the structures of the ion selectivity filters. *FEBS J.*

Hashimoto M & Kokubun S (1995) Contribution of P2-purinoceptors to neurogenic contraction of rat urinary bladder smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **115:** 636–640

Hattori M & Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485:** 207–212

He M-L, Zemkova H, Koshimizu T, Tomić M & Stojilkovic SS (2003) Intracellular calcium measurements as a method in studies on activity of purinergic P2X receptor channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285:** C467-479

Henley JM & Wilkinson KA (2013) AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues Clin. Neurosci.* **15:** 11–27

Heymann G, Dai J, Li M, Silberberg SD, Zhou H-X & Swartz KJ (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

Hibell AD, Kidd EJ, Chessell IP, Humphrey PPA & Michel AD (2000) Apparent species differences in the kinetic properties of P2X7 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **130:** 167–173

Ikeda T (2003) Pharmacological effects of ivermectin, an antiparasitic agent for intestinal strongyloidiasis: its mode of action and clinical efficacy. *Nihon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacol. Jpn.* **122:** 527–538

Inoue K, Tsuda M & Koizumi S (2004) ATP- and adenosine-mediated signaling in the central

nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *J. Pharmacol. Sci.* **94:** 112–114

Jarvis MF (2010) The neural-glial purinergic receptor ensemble in chronic pain states. *Trends Neurosci.* **33:** 48–57

Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB & Gouaux E (2007) Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* **449:** 316–323

Jensik PJ, Holbird D, Collard MW & Cox TC (2001) Cloning and characterization of a functional P2X receptor from larval bullfrog skin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281:** C954-962

Jiang L-H, Rassendren F, Mackenzie A, Zhang Y-H, Surprenant A & North RA (2005) N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289:** C1295-1302

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

Joffre M (2001) Électrophysiologie moléculaire Hermann

Kaczmarek-Hájek K, Lörinczi E, Hausmann R & Nicke A (2012) Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal.* **8:** 375–417

Karasawa A & Kawate T (2016) Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *eLife* **5:**

Kawate T, Michel JC, Birdsong WT & Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* **460:** 592–598

Kawate T, Robertson JL, Li M, Silberberg SD & Swartz KJ (2011) Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. *J. Gen. Physiol.* **137:** 579–590

Khadra A, Tomić M, Yan Z, Zemkova H, Sherman A & Stojilkovic SS (2013) Dual Gating Mechanism and Function of P2X7 Receptor Channels. *Biophys. J.* **104:** 2612–2621

Khakh BS, Bao XR, Labarca C & Lester HA (1999a) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat. Neurosci.* **2:** 322–330

Khakh BS & Egan TM (2005) Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics. *J. Biol. Chem.* **280:** 6118–6129

Khakh BS & Lester HA (1999) Dynamic selectivity filters in ion channels. *Neuron* **23:** 653–658

Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C & Lester HA (1999b) Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19:** 7289–7299

King BF, Liu M, Pintor J, Gualix J, Miras-Portugal MT & Burnstock G (1999) Diinosine pentaphosphate (IP5I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **128:** 981–988

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

Kobilka BK (2007) G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1768:** 794–807

Koukouli F, Rooy M, Tziotis D, Sailor KA, O'Neill HC, Levenga J, Witte M, Nilges M, Changeux J-P, Hoeffer CA, Stitzel JA, Gutkin BS, DiGregorio DA & Maskos U (2017) Nicotine reverses hypofrontality in animal models of addiction and schizophrenia. *Nat. Med.*

Kramer RH, Mourot A & Adesnik H (2013) Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. *Nat. Neurosci.* **16:** 816–823

Kuhn TS (1996) The Structure of Scientific Revolutions University of Chicago Press

Lakowicz JR (2013) Principles of Fluorescence Spectroscopy Springer Science & Business Media

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

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.*

Levine JD & Alessandri-Haber N (2007) TRP channels: Targets for the relief of pain. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1772:** 989–1003

Levitz J, Pantoja C, Gaub B, Janovjak H, Reiner A, Hoagland A, Schoppik D, Kane B, Stawski P, Schier AF, Trauner D & Isacoff EY (2013) Optical Control of Metabotropic Glutamate Receptors. *Nat. Neurosci.* **16:** 507–516

Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, 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

Li M, Kawate T, Silberberg SD & Swartz KJ (2010) Pore-opening mechanism in trimeric P2X receptor channels. *Nat. Commun.* **1:** 44

Li M, Toombes GES, Silberberg SD & Swartz KJ (2015) Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* **18:** 1577–1583

Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dinsart C, Van Sande J, Maenhaut C, Simons MJ, Dumont JE & Vassart G (1989) Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science* **244:** 569–572

Lingueglia E, de Weille JR, Bassilana F, Heurteaux C, Sakai H, Waldmann R & Lazdunski M (1997) A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J. Biol. Chem.* **272:** 29778–29783

Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC & Dahl G (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett.* **581:** 483–488

Lohmann K (1929) Ueber die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* Available at: https://edoc.mdc-berlin.de/9123/ [Accessed February 22, 2017]

Lorca RA, Coddou C, Gazitúa MC, Bull P, Arredondo C & Huidobro-Toro JP (2005) Extracellular histidine residues identify common structural determinants in the copper/zinc P2X2 receptor

modulation. *J. Neurochem.* **95:** 499–512

Lutz C, Otis TS, DeSars V, Charpak S, DiGregorio DA & Emiliani V (2008) Holographic photolysis of caged neurotransmitters. *Nat. Methods* **5:** 821–827

Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, van Biesen T, Kowaluk EA & Jarvis MF (1999) Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Mol. Pharmacol.* **56:** 1171–1181

Mansoor SE, Lü W, Oosterheert W, Shekhar M, Tajkhorshid E & Gouaux E (2016) X-ray structures define human P2X3 receptor gating cycle and antagonist action. *Nature* **538:** 66–71

Manzini S, Hoyle CH & Burnstock G (1986) An electrophysiological analysis of the effect of reactive blue 2, a putative P2-purinoceptor antagonist, on inhibitory junction potentials of rat caecum. *Eur. J. Pharmacol.* **127:** 197–204

Marques-da-Silva C, Chaves MM, Castro NG, Coutinho-Silva R & Guimaraes MZP (2011) Colchicine inhibits cationic dye uptake induced by ATP in P2X2 and P2X7 receptor-expressing cells: implications for its therapeutic action. *Br. J. Pharmacol.* **163:** 912–926

Maruyama K (1991) The Discovery of Adenosine Triphosphate and the Establishment of Its Structure. *J. Hist. Biol.* **24:** 145–154

Masin M, Kerschensteiner D, Dümke K, Rubio ME & Soto F (2006) Fe65 interacts with P2X2 subunits at excitatory synapses and modulates receptor function. *J. Biol. Chem.* **281:** 4100–4108

Michel AD, Clay WC, Ng SW, Roman S, Thompson K, Condreay JP, Hall M, Holbrook J, Livermore D & Senger S (2008) Identification of regions of the P2X(7) receptor that contribute to human and rat species differences in antagonist effects. *Br. J. Pharmacol.* **155:** 738–751

Michel AD, Kaur R, Chessell IP & Humphrey PP (2000) Antagonist effects on human P2X(7) receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1. *Br. J. Pharmacol.* **130:** 513–520

Migita K, Haines WR, Voigt MM & Egan TM (2001) Polar residues of the second transmembrane domain influence cation permeability of the ATP-gated P2X(2) receptor. *J. Biol. Chem.* **276:** 30934–30941

Monif M, Reid CA, Powell KL, Smart ML & Williams DA (2009) The P2X7 Receptor Drives Microglial Activation and Proliferation: A Trophic Role for P2X7R Pore. *J. Neurosci.* **29:** 3781–3791

Monod J, Wyman J & Changeux JP (1965) ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL. *J. Mol. Biol.* **12:** 88–118

Mourot A, Tochitsky I & Kramer RH (2013) Light at the end of the channel: optical manipulation of intrinsic neuronal excitability with chemical photoswitches. *Front. Mol. Neurosci.* **6:** 5

Neher E & Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260:** 799–802

North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **82:** 1013–1067

Olsen RW & DeLorey TM (1999) GABA Receptor Physiology and Pharmacology. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28090/ [Accessed February 8, 2017]

Olsen RW, Sapp DM, Bureau MH, Turner DM & Kokka N (1991) Allosteric actions of central nervous system depressants including anesthetics on subtypes of the inhibitory gamma-aminobutyric acidA receptor-chloride channel complex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **625:** 145–154

Paukert M, Hidayat S & Gründer S (2002) The P2X(7) receptor from Xenopus laevis: formation of a large pore in Xenopus oocytes. *FEBS Lett.* **513:** 253–258

Pelegrin P & Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* **25:** 5071–5082

Pelegrin P & Surprenant A (2009) The P2X(7) receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1beta release. *Purinergic Signal.* **5:** 129–137

Penuela S, Gehi R & Laird DW (2013) The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828:** 15–22

Petrou S, Ugur M, Drummond RM, Singer JJ & Walsh JV (1997) P2X7 purinoceptor expression in Xenopus oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype. *FEBS Lett.* **411:** 339–345

Pfeiffer ZA, Aga M, Prabhu U, Watters JJ, Hall DJ & Bertics PJ (2004) The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *J. Leukoc. Biol.* **75:** 1173–1182

Priel A & Silberberg SD (2004) Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *J. Gen. Physiol.* **123:** 281–293

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO & Williams SM (2001) Ligand-Gated Ion Channels. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11150/ [Accessed February 21, 2017]

Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North RA & Surprenant A (1997a) Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J.* **16:** 3446–3454

Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA & Surprenant A (1997b) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* **272:** 5482–5486

Riedel T, Schmalzing G & Markwardt F (2007) Influence of Extracellular Monovalent Cations on Pore and Gating Properties of P2X7 Receptor-Operated Single-Channel Currents. *Biophys. J.* **93:** 846–858

Roger S, Pelegrin P & Surprenant A (2008) Facilitation of P2X7 Receptor Currents and Membrane Blebbing via Constitutive and Dynamic Calmodulin Binding. *J. Neurosci.* **28:** 6393–6401

Samways DSK, Khakh BS, Dutertre S & Egan TM (2011) Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108:** 13800–13805

Samways DSK, Khakh BS & Egan TM (2012) Allosteric Modulation of Ca2+ flux in Ligand-gated Cation Channel (P2X4) by Actions on Lateral Portals. *J. Biol. Chem.* **287:** 7594–7602

Samways DSK, Li Z & Egan TM (2014) Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front. Cell. Neurosci.* **8:** 6

Schilling WP, Wasylyna T, Dubyak GR, Humphreys BD & Sinkins WG (1999) Maitotoxin and

P2Z/P2X7purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **277:** C766–C776

Schliebs R (2005) Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease--interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem. Res.* **30:** 895–908

Schroder K & Tschopp J (2010) The Inflammasomes. *Cell* **140:** 821–832

Schwiebert EM & Kishore BK (2001) Extracellular nucleotide signaling along the renal epithelium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280:** F945-963

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

Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA & Petrou S (2003) P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J. Biol. Chem.* **278:** 8853–8860

Smeal RM, Keefe KA & Wilcox KS (2008) Differences in excitatory transmission between thalamic and cortical afferents to single spiny efferent neurons of rat dorsal striatum. *Eur. J. Neurosci.* **28:** 2041–2052

Soltoff SP, McMillian MK, Lechleiter JD, Cantley LC & Talamo BR (1990) Elevation of [Ca2+]i and the activation of ion channels and fluxes by extracellular ATP and phospholipase C-linked agonists in rat parotid acinar cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **603:** 76-90-92

Sorge RE, Trang T, Dorfman R, Smith SB, Beggs S, Ritchie J, Austin J-S, Zaykin DV, Vander Meulen H, Costigan M, Herbert TA, Yarkoni-Abitbul M, Tichauer D, Livneh J, Gershon E, Zheng M, Tan K, John SL, Slade GD, Jordan J, et al (2012) Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat. Med.* **18:** 595–599

Soto F, Lambrecht G, Nickel P, Stühmer W & Busch AE (1999) Antagonistic properties of the suramin analogue NF023 at heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology* **38:** 141–149

Steinberg TH, Newman AS, Swanson JA & Silverstein SC (1987) ATP4- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J. Biol. Chem.* **262:** 8884–8888

Sun C, Heid ME, Keyel PA & Salter RD (2013) The Second Transmembrane Domain of P2X7 Contributes to Dilated Pore Formation. *PLoS ONE* **8:** Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3629090/ [Accessed October 16, 2014]

Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA & Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* **272:** 735–738

Terakita A (2005) The opsins. *Genome Biol.* **6:** 213

Thompson AJ, Lester HA & Lummis SCR (2010) The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Q. Rev. Biophys.* **43:** 449–499

Tochitsky I, Banghart MR, Mourot A, Yao JZ, Gaub B, Kramer RH & Trauner D (2012) Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Chem.* **4:** 105–111

Torres GE, Egan TM & Voigt MM (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* **274:** 6653–6659

Toulme E, Garcia A, Samways D, Egan TM, Carson MJ & Khakh BS (2010) P2X4 receptors in activated C8-B4 cells of cerebellar microglial origin. *J. Gen. Physiol.* **135:** 333–353

Trang T & Salter MW (2012) P2X4 purinoceptor signaling in chronic pain. *Purinergic Signal.* **8:** 621–628

Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW & Inoue K (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **424:** 778–783

Tye KM, Prakash R, Kim S-Y, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, Thompson KR, Gradinaru V, Ramakrishnan C & Deisseroth K (2011) Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature* **471:** 358–362

Unger B (1846) Das Guanin und seine Verbindungen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **59:** 58–68

Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A & Buell G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* **371:** 516–519

Veitinger S (2011) The Patch-Clamp Technique. *Leica Sci.* Available at: http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/ [Accessed March 15, 2017]

Virginio C, Church D, North RA & Surprenant A (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* **36:** 1285–1294

Virginio C, MacKenzie A, North RA & Surprenant A (1999a) Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J. Physiol.* **519 Pt 2:** 335–346

Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA & Surprenant A (1999b) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* **2:** 315–321

Virginio C, North RA & Surprenant A (1998a) Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones. *J. Physiol.* **510:** 27–35

Virginio C, Robertson G, Surprenant A & North RA (1998b) Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Mol. Pharmacol.* **53:** 969–973

Visentin S, Renzi M, Frank C, Greco A & Levi G (1999) Two different ionotropic receptors are activated by ATP in rat microglia. *J. Physiol.* **519 Pt 3:** 723–736

Volgraf M, Gorostiza P, Numano R, Kramer RH, Isacoff EY & Trauner D (2006) Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat. Chem. Biol.* **2:** 47–52

Wildman SS, Brown SG, Rahman M, Noel CA, Churchill L, Burnstock G, Unwin RJ & King BF (2002) Sensitization by extracellular Ca(2+) of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1). *Mol. Pharmacol.* **62:** 957–966

Wildman SS, King BF & Burnstock G (1999) Modulatory activity of extracellular H+ and Zn2+ on ATP-responses at rP2X1 and rP2X3 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **128:** 486–492

Wirkner K, Sperlagh B & Illes P (2007) P2X3 Receptor Involvement in Pain States. *Mol.*

Neurobiol. **36:** 165–183

Witten IB, Lin S-C, Brodsky M, Prakash R, Diester I, Anikeeva P, Gradinaru V, Ramakrishnan C & Deisseroth K (2010) Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science* **330:** 1677–1681

Yan Z, Khadra A, Li S, Tomić M, Sherman A & Stojilkovic SS (2010) Experimental Characterization and Mathematical Modeling of P2X7 Receptor Channel Gating. *J. Neurosci.* **30:** 14213–14224

Yan Z, Li S, Liang Z, Tomić M & Stojilkovic SS (2008) The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J. Gen. Physiol.* **132:** 563–573

Yan Z, Liang Z, Tomic M, Obsil T & Stojilkovic SS (2005) Molecular determinants of the agonist binding domain of a P2X receptor channel. *Mol. Pharmacol.* **67:** 1078–1088

Yen MR & Saier MH (2007) Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94:** 5–14

Yu SP & Kerchner GA (1998) Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J. Neurosci. Res.* **52:** 612–617

Zemkova H, Khadra A, Rokic MB, Tvrdonova V, Sherman A & Stojilkovic SS (2015) Allosteric regulation of the P2X4 receptor channel pore dilation. *Pflugers Arch.* **467:** 713–726

Zhang F, Wang L-P, Boyden ES & Deisseroth K (2006) Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat. Methods* **3:** 785–792

Mahboubi HARKAT

Etude moléculaire de la dilatation des récepteurs P2X

Résumé

Les récepteurs P2X sont des canaux cationiques non sélectifs, perméables aux ions Na+, K+ et Ca2+. Leur activation par l'ATP, pour des potentiels de membrane proches du potentiel de repos des cellules, induit un influx de cations entraînant une dépolarisation membranaire. Les récepteurs P2X, issus de l'oligomérisation de trois sous-unités identiques (homotrimères) ou hétérologues (hétérotrimères), possèdent tous une partie hydrophobe transmembranaire et une partie hydrophile et glycosylée extracellulaire. Les récepteurs P2X sont impliqués dans de nombreux rôles physiologiques, et possèdent une grande distribution tissulaire.

De plus depuis une vingtaine d'année un état de conductance particulier du canal a été découvert permettant le passage de grosses molécules. Nommé état dilaté ou dilatation du pore, cette état conductance était considéré comme un processus lent dissocier de l'état de conductance permanentant le passage des du Na^+.

Notre approche multiple nous a permis de comprendre le mécanisme de dilatation. Or suite à nos résultats en électrophysiologie, nous avons montré que les récepteurs étaient immédiatement dilatés dans une échelle de temps de la milliseconde. Les résultats obtenus avec nos molécules photoisomérisables ont permis de confirmer que la dilation était un processus rapide. Mais surtout de résoudre le mécanisme moléculaire de l'état dilaté. En effet sous l'effet de la lumière, deux mouvements ont pu être observés. Nous avons déterminé qu'une polyamine, la spermidine, pouvait passer à travers le canal, ce qui n'avait jamais été démontré auparavant. Nous pensons que ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives physiologiques dans la signalisation P2X.

Mots clés : P2X, Dilatation, Single Channel, Azobenzene, YO-PRO-1, Spermidine

Abstract

P2X receptors are nonselective cation channels, permeable to Na^+, K^+ and $Ca2^+$ ions. Their activation by ATP, for membrane potentials close to the resting potential of the cells, induces an influx of cations leading to membrane depolarization. P2X receptors, derived from the oligomerization of three identical (homotrimeric) or heterologous (heterotrimeric) subunits, all possess a transmembrane hydrophobic domain and an extracellular hydrophilic and glycosylated domain. P2X receptors involved in many physiological roles, and have a high tissue distribution.

Moreover, since twenty years, a particular conductance of the canal has been discovered allowing the passage of large molecules; which named "dilated state or dilatation of the pore", this conductance state was considered as a slow process dissociating from the state of conductance which allows the passage of Na^+.

Our several approach allowed us to understand the mechanism of dilation. However, following our results in electrophysiology, we showed that receptors were immediately dilated in a millisecond time scale. Our results with our photoisomerizable molecules confirmed that dilation was a rapid process. But above all, it solves the molecular mechanism of the dilated state. Indeed under the effect of light, two movements could be observed. We determined that a polyamine, spermidine, could pass through the canal, which had never been demonstrated before. We believe that these results open new physiological perspectives in P2X signaling.

Keywords: P2X, Pore dilation, Single channel, Azobenzene, dye uptake, Spermidine