



HAL
open science

Étude de l'augmentation du trafic en surface des récepteurs P2X4 de l'ATP à l'aide de nouveaux modèles murins transgéniques : implications dans les processus mnésiques et la sclérose latérale amyotrophique

Eléonore Bertin

► **To cite this version:**

Eléonore Bertin. Étude de l'augmentation du trafic en surface des récepteurs P2X4 de l'ATP à l'aide de nouveaux modèles murins transgéniques : implications dans les processus mnésiques et la sclérose latérale amyotrophique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0341 . tel-03270867

HAL Id: tel-03270867

<https://theses.hal.science/tel-03270867>

Submitted on 25 Jun 2021

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 Bordeaux
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

**POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE
BORDEAUX**

Mention Sciences, Technologies et Santé
Spécialité Neurosciences

Présentée par Éléonore BERTIN

Le 13 Décembre 2019

**Étude de l'augmentation du trafic en surface des récepteurs P2X4 de
l'ATP à l'aide de nouveaux modèles murins transgéniques : implications
dans les processus mnésiques et la sclérose latérale amyotrophique**

Soutenue publiquement devant le jury composé de :

M. Pascal BRANCHEREAU	Pr. Université de Bordeaux	Président
Mme Séverine BOILLEE	CR, INSERM, Paris	Rapportrice
M. Rodrigo CUNHA	Pr. Université de Coimbra	Rapporteur
Mme Lauriane ULMANN	MCU, Université de Montpellier	Examinatrice
Mme Sandrine BERTRAND	DR, CNRS, Bordeaux	Invitée
M. Éric BOUE-GRABOT	DR, CNRS, Bordeaux	Directeur de thèse

**À mes parents,
À mes sœurs,
À ma famille,
À mes amis,
À Jérôme.**

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury, le **Dr. Séverine Boillée**, le **Pr. Rodrigo Cunha**, le **Dr. Lauriane Ulmann** et le **Pr. Pascal Branchereau** pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement le **Dr. Séverine Boillée** et le **Pr. Rodrigo Cunha** d'avoir accepté de tenir le rôle de rapporteurs de ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse **Éric Boué-Grabot** pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce projet au sein de cette équipe formidable où règne la bonne humeur et l'entraide, dans laquelle je me suis pleinement épanouie d'un point de vue professionnel et humain. Je te suis extrêmement reconnaissante pour ton encadrement au quotidien qui a été plus qu'à la hauteur en m'apportant soutien, disponibilité, bienveillance, aide et sympathie, sans compter les opportunités enrichissantes que tu m'as offertes comme la présentation de mon travail dans de nombreux congrès, qui plus est à l'international. Durant ces trois années de thèse, j'ai énormément appris en matière de réflexion scientifique, j'ai pu enrichir mes connaissances de manière globale et progresser dans la communication écrite et orale grâce à tes conseils. Cette expérience m'a beaucoup appris sur moi, m'a permis de repousser mes limites et de renforcer ma confiance en moi, pour cela un grand merci !

Je remercie également grandement **Sandrine Bertrand** d'avoir secondé Éric pour mon encadrement. Toujours à l'écoute, pleine d'empathie, de bon conseil, d'un grand soutien et très impliquée dans l'encadrement de tes étudiants, tu as une passion pour la recherche qui est communicative. Ton œil d'expert dans le domaine de la SLA m'a été d'une grande aide pour mener à bien ce projet de thèse et tes encouragements m'ont beaucoup réconfortée. Un grand merci pour le temps et les efforts que tu as investis dans mon encadrement, je t'en suis très reconnaissante.

Je tenais tout particulièrement à remercier **Audrey Martinez**, qui a été comme une grande sœur voire une seconde maman au laboratoire, en m'apprenant tous les filons des *western blot* et autres techniques de biochimie qui n'ont plus de secret pour moi aujourd'hui ! Merci pour ta gentillesse, ton soutien, tes bons conseils, ta patience, ton investissement, et tous nos rires et nos discussions à la paillasse. Je n'oublierai pas notre duo de choc, les « Eric's Angels », et nos expériences menées en tandem dans la salle de biochimie. Un énorme merci pour m'avoir

secondée pour les expériences durant l'écriture de ma thèse, tu m'as ôté une sacrée épine du pied ! Continue à être telle que tu es, une personne au grand cœur, une wonder woman à toute épreuve, et continues de veiller sur tes futurs étudiants comme tu l'as fait avec moi.

Je tiens également à remercier **Karine Masse** pour son soutien et ses conseils durant ces trois années de thèse. Toujours de bonne humeur et pleine d'énergie, c'était un réel plaisir de travailler au sein de la même équipe. Merci pour ta compagnie tardive les soirs de dur labeur et tes conseils avisés en réunion.

Je remercie toutes les personnes de l'IMN et de l'INICIA qui m'ont formée aux différentes techniques durant ma thèse pour leur gentillesse et leur pédagogie. Leur aide m'a été très précieuse. Un grand merci à **Laura, Evelyne** et **Sandra** de m'avoir aidée pour les manips d'histologie et livré leurs petites astuces pour réussir de belles immuno ! Merci à **Marie-Hélène**, mon binôme d'anglais favori, pour ses conseils sur les anticorps, son entraide et sa sympathie lors de nos covoiturages. Je tenais également à remercier **François Georges** d'avoir pris le temps de me montrer ses expériences d'électrophysiologie *in vivo* qui étaient très instructives. Merci pour ta pédagogie, les explications étaient très claires. Merci également à **Massimo** avec qui j'ai partagé le même bureau en zone nord pour sa joie de vivre et sa sympathie. Ta technique pour prélever la moelle épinière en quelques secondes m'a fait gagner un temps fou ! Un grand merci à **Anne Fayoux** qui s'est occupée des animaux pour le projet SLA et m'a appris à évaluer le comportement moteur des souris. J'ai appris que l'on pouvait faire nager des souris !

Évidemment je tiens à remercier tous les étudiants et amis de l'aquarium avec qui je partage un bureau commun et sans qui la thèse aurait été beaucoup moins fun. **Marine, Margaux, Miguel, Marie-Laure, Frederica, Sophie, Alexia, Loïc...** et toutes nos discussions plus ou moins loufoques, nos chamailleries, le partage de nos galères de thésards, de nos trucs et astuces pour les manips... sans oublier les sucreries ! **Marine**, sans aucun doute mon plus grand soutien dans ce bureau. On s'est connus il y a un peu plus de trois ans maintenant, et on ne se quitte plus ! Voir ta petite tête au-dessus de mon écran, nos RU, nos discussions et nos petites pauses thé philosophiques vont beaucoup me manquer... **Frederica**, une très belle rencontre ! Ton sourire et ta bonne humeur ont mis un peu du soleil d'Italie dans ce bureau ! J'espère que l'on se reverra vite ici ou ailleurs *bella* ! **Margaux**, une superbe rencontre dans ce labo ! Merci de nous avoir fait connaître les joies des U.S.A., de sa junk food et ses grattes ciels immenses ! Meilleur guide

ever, on s'est vraiment bien éclatée, à refaire for sure ! **Sophie**, la sagesse incarnée dans ce bureau (du moins en apparence). Heureusement qu'il y a des gens sérieux comme toi ici qui peuvent allumer mon ordi tard le soir pour que je travaille à distance ! C'était un plaisir de travailler à tes côtés et j'espère qu'on fera d'autres social event/soirées ensemble (car il faut aussi se détendre). **Alexia** la nouvelle petite recrue de la team Boué-Grabot ! A toutes les fois où je t'ai pris en flagrant délit d'écoute de R&B 2000's et à nos fous rires. Je te lègue Xavier le Xénope anti-stress avec plaisir en tant que nouvelle thésarde. A toi la relève, j'espère qu'il te portera chance. **Miguel** (et non pas Migwel), le latino et médecin du groupe. Ce fut un plaisir de partager nos astuces de western blot et autres histoires dans ce bureau. Bonne chance à toi à Barcelone pour ta nouvelle vie ! Mais avant ça, il faudra bien fêter nos thèses !

Je remercie également tous les étudiants qui ont été de passage à l'IMN et qui ont contribué aux projets de l'équipe depuis mon arrivée : **Thomas, Kjara, Axel, Stella, Enzo, Mathilde, Loann**, merci pour votre bonne humeur, votre motivation et votre implication. C'était un plaisir de travailler avec vous, je vous souhaite bonne chance pour la suite et au plaisir de vous recroiser. **Thomas**, tu as été un super coéquipier, et les manips sont passées beaucoup plus vite en ta compagnie. Merci de m'avoir initié aux expériences de comportement « anakamuranesques » et appris à apprivoiser ces petites souris parfois récalcitrantes. **Kjara**, une très belle rencontre ! Merci pour ta bonne humeur quotidienne au labo qui faisait plaisir à voir. Je suis heureuse que l'on continue à se voir malgré la distance. Que de bons souvenirs en ta compagnie à Londres et à Chicago ! *You are welcome anytime in my house.*

Merci aux étudiants de l'INCA, notamment **Angelo, Théo** et **Camille** pour leur sympathie et pour m'avoir prêté leur badge un bon nombre de fois ! Merci à **Angelo** pour m'avoir tout expliqué sur le plethysmographe et son logiciel qui n'est pas des plus intuitif ! **Théo**, merci pour ton accueil chaleureux à chaque fois que je passe à l'INCA, pour ton aide et nos discussions qui rendent les manips beaucoup plus agréables. **Camille** un grand merci pour m'avoir écoutée répéter ma mi-thèse et pour tes conseils bienveillants, garde ta bonne humeur et ta gentillesse qui animent le labo. Je garderai en mémoire une superbe expérience de ce voyage à Chicago en ta compagnie : vive les congrès !

Je remercie également toutes les personnes que j'aurais pu oublier qui ont croisé mon chemin durant cette thèse. Merci à toutes les personnes du Neurocampus avec qui j'ai sympathisé, grâce

à vous tous, je garderai de très bons souvenirs de mon passage à l'IMN et de cette belle et difficile expérience qu'est la thèse.

Je tenais également à remercier tous mes **collaborateurs** que je n'aurais pas cités qui ont participé à l'élaboration des articles scientifiques et des communications dans lesquels je suis impliquée. Merci pour le travail de qualité que vous avez fourni. Merci également aux différents organismes d'avoir financé ces projets, en particulier **l'ARSLA** et le **LabexBrain**, sans qui rien n'aurait été possible.

J'adresse un immense merci à toutes les personnes qui m'ont guidée vers cette voie, qui m'ont donné envie de découvrir le monde de la Biologie et de la Recherche et qui m'ont formée au cours de mon cursus scolaire et Universitaire. Tout d'abord merci à mes professeurs d'SVT qui ont su attiser ma curiosité et mon envie d'apprendre grâce à leur pédagogie. Merci à **Alain Gadeau**, mon maître de stage de master 1 de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Merci pour votre bienveillance et vos conseils formateurs qui ont contribué à l'accomplissement de mon parcours jusqu'ici. Un énorme merci à **Matthieu Raoux** que je ne remercierai jamais assez pour avoir cru en moi et m'avoir pris sous son aile lors mon stage de master 2. Tes conseils bienveillants et constructifs ont été très formateurs pour moi. Je te remercie vivement pour ton implication, ta pédagogie, ta gentillesse et ton altruisme qui m'ont fait grandir aux niveaux professionnel et personnel.

Je tenais à adresser un énorme merci aux filles rencontrées en zone nord il y a trois ans de cela : **Ludivine, Marine et Léa**. Comme quoi emballer des cartons ça rapproche. Merci pour tous ces moments de rire, de folie, de partage, de confidences et tout le soutien que vous m'avez apporté. Ma petite **Léa** j'espère que l'on se reverra bientôt pour fêter ma thèse ou pour d'autres occasions *of course* ! **Ludivine** et **Marine**, les gens se rappelleront sûrement de notre trio d'enfer à l'IMN, toujours en train de rigoler ou de se chamailler. On a passé tellement d'étapes depuis ces trois ans, des moments heureux, des moments forts et des moments tristes, car une thèse ce n'est pas un long fleuve tranquille, ni la vie d'ailleurs. Mais à plusieurs on est plus fortes ! Merci d'être comme vous êtes les filles, sans vous ça ne serait vraiment pas pareil. J'ai rencontré des amis pour la vie ici et j'en suis très heureuse.

Bastien, la personne la plus sociable de l'IMN... et la plus altruiste ! Tu es vraiment quelqu'un sur qui on peut compter. Un énorme merci pour ton aide dans ce labo et dans la vie, merci pour tous tes conseils et pour ta bonne humeur. Je me rappellerai toujours de nos longues discussions dans cette petite cafet. A nos prochaines soirées karaoké !

Un grand merci à tous mes amis BCPP avec qui on a fait les 400 coups (vous voyez je ne renie pas mes origines) : **Solène, Stéphane, Mélanie, Grégoire, Valentin, Thomas**. Même si nous sommes éparpillés aux quatre coins de la France, nous continuons à faire perdurer la tradition BCPP et c'est ça l'amitié longue durée ! Merci à vous tous pour tous ces bons moments, tous nos délires, nos discussions, nos soirées, notre entraide, merci de me faire rire avec vos messages ! Vous êtes comme une deuxième famille.

Je tenais également à remercier tous mes acolytes de « l'amicale bordelaise » rencontrés au fil de ma vie Bordelaise : **Ulysse, Tati, Julien, Ousmane, Gérald, Tony, Florian, Elsa, Yanice, Eric, Béné et JJ et Ayla** qui sont maintenant les heureux parents de la petite **Annae** ! Merci pour m'avoir permis de décompresser pendant ces dures années de thèse, merci d'avoir été là et mille merci aux cupidons du groupe pour avoir initié la plus belle rencontre de ma vie : **Jérôme**.

Je n'oublie pas non plus mes petites parisiennes **Camille et Justine** qui ont toujours été là pour moi dans les meilleurs moments comme dans les plus difficiles. Merci à vous pour tous ces bons moments passés à vos côtés et pour votre soutien. Vous êtes des amies en or !

Mon petit **Nichi**, une très belle rencontre du master BCPP qui est devenue une amitié solide grâce au stage de Master 1, bravant le temps et la distance depuis ! Heureusement que tu étais là durant cette période.... Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi ! Tu es vraiment un ami sur qui je peux compter, un ami pour la vie.

Myriam, ma plus vieille et plus fidèle amie sur qui j'ai toujours pu compter et une des meilleures personnes que je connaisse. Je te remercie énormément pour tout le soutien, toute l'amitié et toute l'aide que tu as pu m'apporter. Je me rappelle encore quand nous étions au lycée... nous avons bien évolué depuis, mais notre amitié n'a pas changé !

Je souhaite également remercier du fond du cœur toute ma famille qui m'a toujours soutenue dans mes choix et apporté beaucoup d'amour. Une grande pensée pour **mes grands-parents**,

Tatie Françoise et mon **Parrain** que j'espère rendre fière. **Papa**, c'est en partie grâce à ton attrait pour les sciences que j'en suis arrivée là aujourd'hui. Merci de m'avoir fait découvrir et aimer le monde de la Biologie dès le plus jeune âge en m'initiant à toutes sortes de vulgarisations scientifiques. **Maman**, tu me voyais déjà dans le monde de la Biologie depuis mes premiers cours d'SVT. Merci d'avoir toujours cru en moi. Un grand merci à mes sœurs **Myriam** et **Claire** pour tout leur soutien, merci à elles pour toutes ces années de rire, de folie, de chamaillerie. Avoir des sœurs comme vous est le plus beau cadeau que nos parents m'aient donné. En particulier merci à **Claire** pour m'avoir supporté (dans les deux sens du terme) et facilité la tâche de nombreuses fois lors de l'écriture de mon manuscrit. Ce manuscrit est l'occasion pour moi de vous dire à tous combien je vous aime et combien je suis reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Je souhaite finir ces remerciements par ma moitié, **Jérôme**, la meilleure personne qu'il m'ait été donné de connaître dans ma vie. Je te remercie du fond du cœur pour tout ce que tu as fait pour moi, pour toute ton aide jusqu'à des heures pas possibles pour mettre en forme ce manuscrit, ton aide dans la vie de tous les jours pour me faciliter la tâche, pour tout ton soutien et ton amour. Je te remercie de me rendre heureuse chaque jour, de faire ressortir la vraie Éléonore et de faire de ma vie un vrai bonheur. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu es. Tu es tout pour moi, je t'aime mon amour.

RESUME

La signalisation purinergique ainsi que l'augmentation en surface des récepteurs ionotropiques P2X4 activé par l'ATP sont exacerbés dans divers troubles du SNC dont la sclérose latérale amyotrophique (SLA), maladie incurable caractérisée par la formation d'agrégats protéiques entraînant une dégénérescence des motoneurones (MN). Le récepteur P2X4 a une expression étendue dans le système nerveux central (SNC) au niveau des neurones et des cellules gliales ainsi que dans divers types cellulaires périphériques. Une question clé concernant le rôle de la signalisation purinergique dans la physiologie et la physiopathologie est la fonction de l'augmentation du nombre de récepteurs P2X4 en surface observée dans différents types cellulaires de manière spécifique.

Pour élucider les fonctions cellulaires spécifiques du récepteur P2X4 dans un contexte pathologique, une lignée de souris transgéniques conditionnelle (P2X4mCherryIN floxée) a été créée permettant la substitution du motif d'internalisation de P2X4 par la protéine fluorescente mCherry, sous la dépendance de la Cre recombinase, empêchant ainsi l'endocytose constitutive du récepteur P2X4. Nous avons validé et caractérisé deux lignées de souris *knock-in* (KI) exprimant le récepteur mutant d'internalisation P2X4mCherryIN dans les neurones excitateurs du cerveau antérieur (CamK2) ou dans toutes les cellules exprimant le récepteur P2X4 de façon native (CMV). Comme attendu, la substitution génétique du récepteur P2X4 sauvage par le mutant P2X4mCherryIN dans les deux modèles de souris *knock-in* n'altère pas la distribution ni la localisation subcellulaire du récepteur P2X4 mais conduit à une augmentation accrue de son trafic à la surface de manière cellule-spécifique. D'un point de vue fonctionnel, ces modèles ont permis de démontrer que l'augmentation du récepteur P2X4 à la surface des neurones excitateurs diminue l'anxiété et altère la mémoire en raison de la modulation de la plasticité synaptique dans la région CA1 de l'hippocampe.

Dans le but d'élucider l'implication du récepteur P2X4 dans la pathogenèse de la SLA, nous avons croisé le nouveau modèle de souris KI CMV (ou P2X4KI) généré exprimant le récepteur P2X4 augmenté en surface dans toutes les cellules qui expriment nativement le récepteur P2X4 ou bien un modèle de souris transgénique délétée pour le gène *p2rx4* (P2X4KO) avec le modèle murin de SLA le plus couramment utilisé portant la mutation SOD1-G93A humaine (SOD1) pour la génération de souris double-transgéniques SOD1:P2X4KI et SOD1:P2X4KO. De manière intéressante, l'ablation du récepteur P2X4 ainsi que l'expression du mutant d'internalisation chez les souris SOD1 ont un impact significatif et positif sur les performances motrices et la survie des animaux, ce qui révèle un rôle actif bien que complexe des récepteurs P2X4 dans la progression de la SLA. Chez les souris SOD1, l'expression de P2X4 dans la moelle épinière (ME), est initialement limitée au MN puis augmente au niveau de la microglie pendant la phase symptomatique, et le récepteur P2X4 joue un rôle double sur l'expression des marqueurs d'inflammation pendant la progression de la maladie. Parallèlement, l'expression à la surface du récepteur P2X4 augmente de manière significative dans les macrophages péritonéaux des souris SOD1 au cours de la progression de la SLA, et ce dès les stades présymptomatiques, ce qui suggère que le récepteur P2X4 pourrait représenter un biomarqueur précoce de la SLA. De plus, nous révélons que le mécanisme sous-jacent à l'augmentation en surface du récepteur P2X4 dans les modèles de SLA au fil du temps peut s'expliquer par une altération compétitive et progressive de l'internalisation constitutive des récepteurs par les protéines mutantes SOD1.

A l'avenir, ce nouveau modèle de souris KI innovant permettant d'étudier la fonction de l'augmentation en surface du récepteur P2X4 de manière cellule-spécifique dans le SNC mais également au niveau des cellules périphériques, pourra représenter un outil majeur pour l'étude de nombreuses autres pathologies au-delà de la SLA.

ABSTRACT

ATP signaling and surface P2X4 ATP-gated receptor channels are upregulated in various neurological disorders including amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a fatal motoneuron (MN) disease characterized by protein misfolding and aggregation leading to cellular degeneration. P2X4 displays a widespread distribution in the central nervous system (CNS) neurons and glial cells as well as in multiple peripheral cell types throughout the body. A key question regarding the role of purinergic signaling in health and disease is the function of this upregulated surface P2X4 state observed in specific cell types.

To elucidate the cell-specific functions of P2X4 in a pathological context, a conditional transgenic knock-in P2X4 mouse line (Floxed P2X4mCherryIN) was created allowing the Cre activity-dependent genetic swapping of the internalization motif of P2X4 by the fluorescent protein mCherry to prevent constitutive endocytosis of P2X4. We describe and characterize two distinct knock-in mouse lines expressing non-internalized P2X4mCherryIN either in excitatory forebrain neurons (CamK2) or in all cells natively expressing P2X4 (CMV). The genetic substitution of wild-type P2X4 by non-internalized P2X4mCherryIN in both knock-in mouse models does not alter the sparse distribution and subcellular localization of P2X4 but leads to a cell-specific increased surface P2X4 expression mimicking the pathological upregulated P2X4 state. We provide evidence that the increase in P2X4 at the surface of excitatory neurons decreases anxiety and impairs memory processing due to alteration of synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region.

To unravel the implication of P2X4 in ALS pathogenesis, we generate innovating double transgenic mice called SOD1:P2X4KI and SOD1:P2X4KO using the new knock-in CMV mice model expressing the upregulated P2X4 receptor in all cells that expressed natively the P2X4 receptor (P2X4KI) or transgenic mice lacking the P2X4 gene (P2X4KO) with most commonly used ALS model carrying the human SOD1-G93A mutation (SOD1). Interestingly, the ablation of the P2X4 gene as well as the expression of non-internalized P2X4 in SOD1 mice have a significant and positive impact on motor performances and animal survival revealing that P2X4 are active and complex players in ALS progression. In SOD1 mice spinal cord, the expression of P2X4 is initially restricted to MN and increased in microglia during the symptomatic phase of ALS, and P2X4 has a dual role on inflammation markers expression during the progression of the disease. In parallel, P2X4 surface expression significantly increased in peritoneal macrophages of SOD1 mice during ALS progression even from the presymptomatic stages suggesting that P2X4 may represent an early biomarker of ALS. Moreover, we reveal that the mechanism underlying the surface upregulation of P2X4 receptor in ALS models over the time can be explained by a competitive and progressive alteration of P2X4 constitutive internalization by SOD1 misfolded protein leading to MN death and associated neuroinflammation.

Overall, we provide an innovative knock-in P2X4 model to study the functional contributions of upregulated P2X4 receptor in specific cells of the nervous system but also in peripheral tissues throughout the body that will be helpful for study many others pathologies besides ALS.

ABRÉVIATIONS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACh	acétylcholine
ADNc	ADN complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
AMP	adénosine monophosphate
AMPA	acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMPAR	récepteur AMPA
ARNm	ARN messenger
ATP	adenosine-5'-triphosphate
BBG	Brilliant Blue G
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
C9orf72	<i>chromosome 9 open reading frame 72</i>
Ca²⁺	calcium
CALHM1	<i>modulateur de l'homéostasie calcique 1</i>
CB	bleu de Cibacron 3G-A
CB2	récepteur aux cannabinoïdes 2
Cl⁻	chlorure
COX-2	cyclooxygénase-2
Cu²⁺	cuiivre
DENN	<i>differentially expressed in normal and neoplastic cells</i>
DFT	démence fronto-temporale
EC₅₀	concentration nécessaire pour induire la moitié de la réponse maximale
EMG	électromyogramme
ERAD	protéines associées au RE
ESC	cellule souche embryonnaire
FUS	<i>fused in Sacroma</i>
GABA	acide γ -aminoboturique
GABA_AR	récepteur GABA _A
GABAR	récepteur GABA
H⁺	proton
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
iNPC	cellule neurale progénitrice reprogrammée
iPSC	cellule souche pluripotente reprogrammée
IRM	imagerie par résonnance magnétique
IVM	ivermectine
JNM	jonction neuromusculaire
KO	<i>knock-out</i>
LCR	liquide céphalorachidien
LPS	lipopolysaccharide
LT	lymphocyte T
LTD	dépression à long terme
LTP	potentialisation à long terme
Mg²⁺	magnésium
MMP-9	métalloprotéinase matricielle-9

MN	motoneurone
NA	noradrénaline
NfL	chaîne légère des neurofilaments
NKT	lymphocytes T <i>natural killer</i>
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMDAR	récepteur NMDA
NO	monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
NPC	cellule neurale progénitrice
iNPC	cellule neurale progénitrice reprogrammée
NT	neurotransmetteur
O₂	dioxygène
O₂⁻	anion superoxyde
OPN	optineurine
PANX1	pannexine 1
Pi	phosphate inorganique
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIPn	phosphoinositide
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
pNfH	chaîne lourde phosphorylée des neurofilaments
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RE	réticulum endoplasmique
ROS	espèce réactive de l'oxygène
SLA	sclérose latérale amyotrophique
SNC	système nerveux central
SNP	système nerveux périphérique
SOD1	superoxyde dismutase 1
TDP-43	<i>transactive response DNA-binding protein</i>
TGN	réseau trans-Golgi
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TLS	translocated in liposarcoma
TM	domaine transmembranaire
UPR	<i>unfolded protein response</i>
VCP	<i>valosin-containing protein</i>
VNUT	<i>vesicular nucleotide transporter</i>
VRAC	canaux anioniques régulés par le volume
Zn²⁺	ion zinc

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
Chapitre 1 : la signalisation purinergique	1
1.1 L'ATP comme molécule de signalisation extracellulaire.....	1
1.1.1 Structure et synthèse de l'ATP	1
1.1.2 Découverte de l'ATP comme molécule de signalisation extracellulaire	2
1.1.3 Libération d'ATP dans le milieu extracellulaire	3
1.1.3.1 Les différentes voies de la libération d'ATP.....	3
1.1.3.1.1 Exocytose vésiculaire.....	4
1.1.3.1.2 Voies conductives : canaux et pores	5
1.1.3.1.3 Altération de l'intégrité de la membrane.....	6
1.1.3.2 Métabolisation de l'ATP extracellulaire.....	6
1.1.3.3 L'ATP comme molécule pro-inflammatoire.....	7
1.2 Les récepteurs aux purines et pyrimidines.....	8
1.2.1 Les récepteurs métabotropiques P1 à l'adénosine	9
1.2.1.1 Structure et voies de signalisation	9
1.2.1.2 Distribution, rôles physiologiques et physiopathologie.....	9
1.2.2 Les récepteurs métabotropiques P2Y.....	10
1.2.2.1 Structure et voies de signalisation	10
1.2.2.2 Distribution, rôles physiologiques et physiopathologie.....	10
1.2.3 Les récepteurs ionotropiques P2X	11
1.2.3.1 Structure moléculaire et fonctions.....	11
1.2.3.1.1 Architecture générale	11
1.2.3.1.2 Site de liaison à l'ATP	13
1.2.3.1.3 Partie extracellulaire.....	14
1.2.3.1.4 Domaines transmembranaires TM1 et TM2.....	14
1.2.3.1.5 Parties intracellulaires N- et C-terminales.....	15
1.2.3.2 Assemblage des sous-unités et propriétés.....	17
1.2.3.2.1 Homotrimères et propriétés pharmacologiques.....	17
1.2.3.2.2 Hétérotrimères et propriétés pharmacologiques	20
1.2.3.3 Modulations allostériques	21
1.2.3.3.1 Modulation par les ions divalents	21
1.2.3.3.2 Modulation par les protons.....	22
1.2.3.3.3 Modulation par les phosphoinositides.....	22

1.2.3.3.4	Modulation par les lipopolysaccharides	23
1.2.3.3.5	Modulation par les stéroïdes.....	23
1.2.3.3.6	Cas de l'ivermectine et du récepteur P2X4.....	23
1.2.3.3.7	Modulation par l'éthanol.....	24
1.2.3.4	Interaction avec d'autres protéines et récepteurs-canaux	25
1.2.3.5	Trafic.....	26
1.2.3.5.1	Localisation subcellulaire et trafic	26
1.2.3.5.2	Trafic du récepteur P2X4	27
1.2.3.6	Localisation, fonctions et rôles physiopathologiques	29
1.2.3.6.1	Périphérie.....	30
1.2.3.6.1.1	Cellules épithéliales et sécrétion	30
1.2.3.6.1.2	Hépatocytes et régénération du foie	30
1.2.3.6.1.3	Système cardiovasculaire.....	30
1.2.3.6.1.4	Cellules sanguines, thrombose, immunité et inflammation.....	31
1.2.3.6.1.5	Système nerveux sensoriel et périphérique.....	33
1.2.3.6.2	Système nerveux central et rôle clé du récepteur P2X4.....	33
1.2.3.6.2.1	Modulation de la transmission synaptique excitatrice	36
1.2.3.6.2.2	Modulation de la transmission synaptique inhibitrice.....	38
1.2.3.6.2.3	Communication neuro-gliale	40
1.2.3.6.2.4	Physiopathologie	40
	Pathologies liées à l'alcool :.....	41
	Inflammation post-ischémique :	41
	Douleur chronique :	42
	Neuroinflammation et maladies neurodégénératives :.....	45
Chapitre 2 : la sclérose latérale amyotrophique		47
2.1	Généralités	47
2.1.1	Aspects cliniques et épidémiologiques	47
2.1.1.1	Symptômes et description clinique.....	47
2.1.1.2	Épidémiologie.....	48
2.1.1.3	Diagnostic et traitement	49
2.1.2	Étiologie	51
2.1.2.1	Génétique de la SLA.....	51
2.1.2.1.1	Les mutations SOD1	52
2.1.2.1.2	Les mutations TDP-43 et FUS/TLS.....	54
2.1.2.1.3	Les mutations C9ORF72	55
2.1.2.2	Formes sporadiques de SLA	57

2.2	Modèles de SLA.....	58
2.2.1	Modèle murin SOD1G93A	58
2.2.1.1	Les souris SOD1	58
2.2.1.2	Les variants SOD1-G93A	59
2.2.1.3	Évolution de la pathologie chez la souris SOD1-G93A	59
2.2.2	Autres modèles de SLA	62
2.2.2.1	Les souris TDP-43	62
2.2.2.2	Les souris FUS/TSL.....	63
2.2.2.3	Les souris C9ORF72.....	65
2.2.2.4	Autres modèles hors modèles murins	66
2.3	Physiopathologie de la SLA.....	68
2.3.1	Dégénérescence sélective des motoneurones	68
2.3.2	Mécanismes impliqués.....	69
2.3.2.1	Agrégats protéiques	69
2.3.2.2	Autophagie	71
2.3.2.3	Stress du réticulum endoplasmique	72
2.3.2.4	Stress oxydatif.....	73
2.3.2.5	Altérations mitochondriales	74
2.3.2.6	Altération du transport axonal.....	75
2.3.2.7	Excitotoxicité glutamatergique.....	76
2.3.2.8	Modification de l'excitabilité neuronale.....	78
2.3.2.9	L'hypothèse <i>dying back</i>	80
2.3.2.10	Neuroinflammation.....	81
2.3.2.10.1	Rôle des astrocytes.....	82
2.3.2.10.2	Rôle de la microglie.....	83
2.3.2.10.3	Rôle des cellules périphériques.....	84
2.3.2.11	Rôle de la signalisation purinergique.....	85
	Problématique & Objectifs.....	88
	ARTICLES.....	91
	Résumé article I.....	93
	Article I.....	97
	Résumé article II.....	144
	Article II.....	155
	DISCUSSION GENERALE.....	195
1.	Nouveau modèle de souris KI conditionnelle pour l'étude de l'augmentation en surface du récepteur P2X4	198

1.1.	Création d'un mutant d'internalisation P2X4mCherryIN fonctionnel.....	198
1.2.	Les souris KI comme outil valide pour l'étude de l'expression cellule-spécifique du mutant d'internalisation P2X4mCherryIN	198
1.3.	Impact fonctionnel de l'expression du P2X4mCherryIN chez les souris KI : modulation de la plasticité synaptique et des fonctions mnésiques.....	200
1.4.	Limites du modèle KI pan cellulaire : phénomènes de compensation ?	201
1.5.	Intérêt du nouveau modèle de souris KI conditionnelles et perspectives.....	202
2.	Le modèle de souris KI comme outil pour l'étude du rôle du récepteur P2X4 dans la physiopathologie de la SLA	203
2.1.	Génération de modèles double-transgéniques à partir du modèle de souris KI.	203
2.2.	Dualité du rôle du récepteur P2X4 dans la SLA ?	203
2.3.	Phénomène de compensation dans le modèle SOD1:P2X4KI ?.....	205
2.4.	Rôle intracellulaire du P2X4 altéré dans les modèles SOD1:P2X4KO et SOD1:P2X4KI ?	205
2.5.	Augmentation en surface du récepteur P2X4 dans les modèles SOD1 et mécanisme impliqué	206
2.6.	Le récepteur P2X4 comme biomarqueur précoce et cible thérapeutique de la SLA ?	208
3.	Conclusion	209
	BIBLIOGRAPHIE	211
	ANNEXES	281

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique de l'ATP.....	1
Figure 2 : Les différentes voies de libération d'ATP	3
Figure 3 : Les différents récepteurs purinergiques.....	8
Figure 4 : Structure d'une sous-unité P2X.....	13
Figure 5 : Cinétique d'activation et de désensibilisation des récepteurs P2X lors d'une application brève ou prolongée d'ATP.....	18
Figure 6 : Neuromodulation des synapses excitatrices et inhibitrices par les récepteurs P2X	39
Figure 7 : Mécanisme d'action potentiel du récepteur P2X4 dans la douleur neuropathique .	44
Figure 8 : Techniques de diagnostic de la SLA	50
Figure 9 : Fréquence des gènes mutés retrouvés dans la SLA depuis 1990	52
Figure 10 : Principales mutations de la protéine SOD1 connues pour être impliquées dans la SLA.....	53
Figure 11 : Chronologie de la neurodégénérescence observée chez la souris SOD1-G93A...	61
Figure 12 : Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dégénérescence des MN	69
Figure 13: Résumé schématique du mécanisme de l'augmentation en surface du récepteur P2X4 et ses conséquences dans les modèles de SLA.....	207

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques pharmacologiques des sous-unités P2X.....	19
Tableau 2 : Principales fonctions physiologiques des différents sous-types de récepteurs P2X déterminées grâce à l'utilisation d'animaux transgéniques	29
Tableau 3 : Principaux symptômes et signes cliniques témoignant de l'atteinte des neurones moteurs corticaux et des MN spinaux	48
Tableau 4 : Certitude de diagnostic basé sur les critères d'El Escorial revisité.....	50

INTRODUCTION

Chapitre 1 : la signalisation purinergique

1.1 L'ATP comme molécule de signalisation extracellulaire

1.1.1 Structure et synthèse de l'ATP

L'adenosine-5'-triphosphate (ATP) de formule chimique $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ est un nucléotide commun à tous les organismes, des bactéries aux mammifères, formé à partir d'un nucléoside et d'un triphosphate. Dans les cellules animales, l'ATP est généré en grande majorité lors de la phosphorylation oxydative au niveau de la chaîne respiratoire de la membrane des mitochondries, mais aussi au cours de la glycolyse dans le cytosol, à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (P_i) par l'action de l'ATP-synthase. La molécule d'ATP est utilisée par les cellules dans le métabolisme énergétique intracellulaire (Knowles, 1980). L'hydrolyse de la liaison phosphate terminale à haute énergie de l'ATP, ainsi clivée en $ADP + P_i$, va fournir l'énergie libre nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme, à la division cellulaire, au transport actif ou encore à la contraction musculaire.

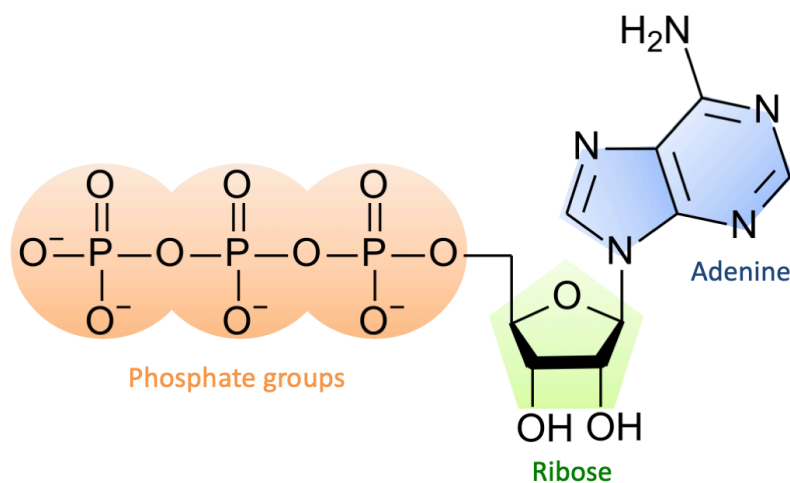


Figure 1 : Structure chimique de l'ATP

1.1.2 Découverte de l'ATP comme molécule de signalisation extracellulaire

L'ATP a été identifiée pour la première fois en 1929 par le biochimiste Karl Lohmann et parallèlement par les biochimistes américain Cyrius Fiske et indien Yellapragada SubbaRow comme étant la source d'énergie au sein des cellules (Fiske, 1929; Lohmann, 1929).

Ce n'est qu'en 1962 que son rôle en dehors de la cellule a été mis en évidence par Geoffrey Burnstock qui, au cours de ses recherches sur le système nerveux autonome, contrôlant des fonctions dépendantes du muscle lisse telles que les contractions de l'intestin et de la vessie, a constaté une signalisation neuronale n'impliquant pas des neurotransmetteurs (NT) classiques tels que l'acétylcholine (ACh) ou la noradrénaline (NA) (Burnstock and Holman, 1962) mais l'ATP. Suite aux données publiées en 1959 par Pamela Holton suggérant que les nerfs sensoriels libéraient des molécules d'ATP (Holton, 1959), G. Burnstock proposera l'existence de nerfs purinergiques libérant de l'ATP comme NT (Burnstock, 1972). C'est en 1978 que ce même auteur suggéra l'existence de plusieurs familles de récepteurs pour l'ATP, (purinorécepteurs P2) et son produit final de dégradation l'adénosine (purinorécepteurs P1) (Burnstock, 1978). Plusieurs études ont ensuite montré que l'activation des récepteurs P2 pouvait avoir des effets cellulaires différents (Hogaboom et al., 1980), menant Geoffrey Burnstock et son collaborateur Charles Kennedy en 1985 à anticiper l'existence des différents sous-types de récepteurs P2, qu'ils appelleront P2X et P2Y (Kennedy and Burnstock, 1985). A la fin des années 1980, des agonistes sélectifs comme la β , γ -methylene-L-ATP et l'ADP- β -F ont permis de distinguer les récepteurs P2X des P2Y (Kennedy, 1990). Il est devenu de plus en plus clair que les récepteurs P2X étaient des récepteurs-canaux cationiques impliqués dans des actions rapides de neurotransmission, tandis que les récepteurs P2Y étaient des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, impliqués dans les réponses cellulaires plus lentes, faisant intervenir des seconds messagers. Par la suite, dans les années 1990 le clonage moléculaire a définitivement révélé l'existence de plusieurs sous-types des récepteurs métabotropiques P2Y et des récepteurs-canaux P2X qui présentent des propriétés fonctionnelles et pharmacologiques distinctes. On compte aujourd'hui 8 sous-types de récepteurs P2Y et 7 sous-types de récepteurs P2X qui ont été clonés chez l'humain.

1.1.3 Libération d'ATP dans le milieu extracellulaire

Depuis les avancées de ces 50 dernières années engendrées par la découverte de Geoffrey Burnstock et ses collaborateurs montrant que l'ATP était libéré des nerfs sympathiques du canal déférent et fonctionnait comme un NT, la libération d'ATP a été identifiée dans de nombreux autres types cellulaires. Hormis les cellules excitables, on retrouve une action de la signalisation purinergique dans beaucoup de cellules épithéliales et immunitaires, et des études au niveau du foie, de la vésicule biliaire et des voies aériennes ont démontré que l'ATP agissait comme un potentiel signal autocrine/paracrine (Okada et al., 2006; Roman and Fitz, 1999; Taylor et al., 1999). L'ATP extracellulaire et ses métabolites sont connus pour moduler de nombreuses fonctions dans l'organisme dont le système immunitaire, nerveux, respiratoire, hépatique et urinaire. Dans le système nerveux, les cellules neuronales, gliales et microgliales stockent et libèrent de l'ATP, et expriment des récepteurs purinergiques. Il existe donc une communication inter-cellulaire complexe basée sur les purines. En conditions basales, la concentration d'ATP dans les cellules est de l'ordre du mM et peut atteindre plus de 100 mM dans certains compartiments tels que les vésicules de sécrétion (Bankston and Guidotti, 1996; Van der Kloot, 2003).

L'ATP, bien que négativement chargée, ne peut pas simplement diffuser à travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Plusieurs mécanismes, régulés ou non régulés, existent pour déclencher la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire : la stimulation de la voie de l'exocytose vésiculaire, l'activation de canaux ou transporteurs ou bien de manière non contrôlée lors de la mort cellulaire *via* la membrane plasmique endommagée.

1.1.3.1 Les différentes voies de la libération d'ATP

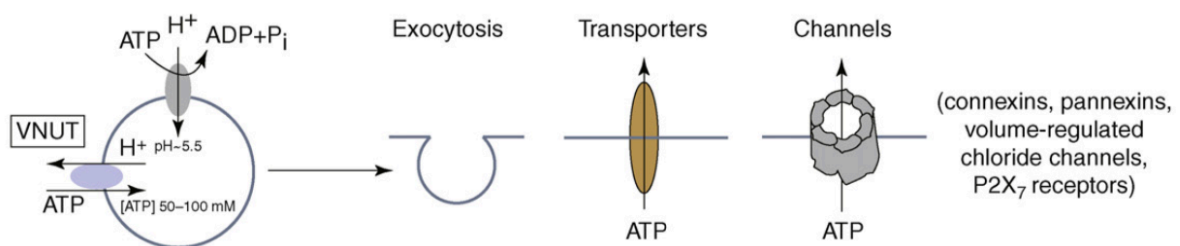


Figure 2 : Les différentes voies de libération d'ATP (d'après Abbracchio et al. 2009)

1.1.3.1.1 Exocytose vésiculaire

L'ATP est retrouvé dans les granules de sécrétion de plusieurs cellules dont les neurones, les cellules gliales et les cellules sécrétrices parmi lesquelles on retrouve les cellules endocrines, dont les cellules chromaffines et β -pancréatiques, les cellules exocrines telles que les cellules épithéliales des voies aériennes, les cellules acineuses pancréatiques et les mastocytes et neutrophiles (Lazarowski, 2012).

L'ATP est libéré des granules *via* l'exocytose dépendante du calcium (Ca^{2+}). Dans les neurones, l'ATP qui est stocké dans des vésicules proches de la membrane présynaptique est libéré dans la fente synaptique par exocytose après stimulation, de la même manière qu'un NT classique (Burnstock, 2006a). L'ATP est probablement présent dans toute vésicule synaptique ou sécrétrice à des concentrations différentes et peut être co-emmagasiné ou co-libéré avec d'autres NTs comme l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (Jo and Schlichter, 1999), la NA (Starke et al., 1991) ou le glutamate (Mori et al., 2001). La neurotransmission synaptique purinergique rapide a été décrite au niveau des neurones périphériques (Evans et al., 1992; Silinsky et al., 1992) et également dans certaines structures du cerveau comme l'habenula et le cortex (Edwards et al., 1992; Pankratov et al., 2002a). Toutefois, l'importance physiologique de la transmission purinergique synaptique dans le système nerveux central (SNC) est moins claire que dans le système nerveux périphérique (SNP) (Khakh and North, 2012).

Plus récemment, l'exocytose de l'ATP dépendante du Ca^{2+} a été décrite au niveau des cellules gliales dont les astrocytes, cellules macrogliales en forme d'étoile fournissant une grande variété de supports fonctionnels aux neurones, et la microglie, constituant le stock de macrophages résidents du SNC qui proviennent du sac vitellin et sont apparentées aux cellules immunitaires myéloïdes (Bowser and Khakh, 2007; Gordon et al., 2005; Imura et al., 2013). Dans les astrocytes, l'ATP est libéré en conditions physiologiques *via* des microvésicules et des lysosomes par exocytose induite par une élévation de Ca^{2+} intracellulaire (Lalo et al., 2014; Lalo et al., 2016; Zhang et al., 2007).

L'accumulation d'ATP dans les vésicules se fait grâce à un transporteur vésiculaire de nucléotides dépendant de l'ion chlorure (Cl^-) VNUT qui appartient à la famille des transporteurs d'anions SLC17 (Sawada et al., 2008). Ce transporteur est composé de 12 segments transmembranaires et de deux segments N- et C-terminaux intracellulaires. L'activité de VNUT est dépendante du gradient chimique créé par la pompe à protons V/H^+ ATPase ainsi que les ions Cl^- . VNUT reconnaît préférentiellement l'ATP, le GTP et l'ADP et est inhibé par le diATP.

VNUT a été identifié dans de très nombreux organes et tissus (Moriyama et al., 2017). Au niveau du SNC, VNUT a été mis en évidence dans les neurones de la moelle épinière (ME), de l'hippocampe et du cervelet (Larsson et al., 2012) ainsi que dans les astrocytes et la microglie (Imura et al., 2013; Oya et al., 2013).

1.1.3.1.2 Voies conductives : canaux et pores

L'ATP peut également être extrudé hors de la cellule *via* des pores ou des canaux tels que les transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC), les connexines ou hémicanaux pannexines, les canaux anioniques plasmalemmes voltage-dépendants (ou canaux maxi anioniques), les canaux anioniques régulés par le volume (VRAC), les modulateurs de l'homéostasie calcique 1 (CALHM1) et les récepteurs-canaux P2X7 (Andersson, 2015; Pankratov et al., 2006; Scemes et al., 2007). La sortie d'ATP *via* ces canaux se fait sous l'action d'un gradient électrochimique. En effet, l'ATP intra- et extracellulaire se trouve majoritairement couplée à l'ion magnésium (Mg^{2+}) sous la forme anionique $MgATP^{2-}$ et son potentiel d'équilibre se situe entre +169 et +185 mV suggérant une sortie d'ions vers le milieu extracellulaire aux potentiels de membranes physiologiques. De plus, en conditions basales, les concentrations intracellulaires d'ATP sont bien plus élevées (1-10 mM) que dans le milieu extracellulaire (autour de 10 nM) (Taruno, 2018).

Dans les astrocytes, en plus de l'exocytose d'ATP dépendante du Ca^{2+} , une libération d'ATP non-vésiculaire a également été décrite suggérant la participation d'hémicanaux connexines et/ou de canaux sensibles au volume (Fields and Burnstock, 2006; Garre et al., 2010; Gordon et al., 2005) cependant ce mécanisme de libération est très rare en condition physiologique (Lalo et al., 2014). Plus récemment, un rôle majeur du récepteur P2X7 dans la libération d'ATP astrocytaire a été mis en évidence dans des conditions de stress cellulaire comme lors de l'inflammation, l'hypoxie ou le trauma (Xiong et al., 2018). La libération d'ATP de manière contrôlée a également lieu lors l'apoptose des cellules *via* les hémicanaux pannexine-1 suite au clivage médié par les caspases-3 et -7 (Ayna et al., 2012; Chekeni et al., 2010).

1.1.3.1.3 Altération de l'intégrité de la membrane

Une altération de l'intégrité de la membrane cellulaire, comme lors de la nécrose des cellules, entraîne la sortie non contrôlée de grande quantité d'ATP contenue dans les stocks intracellulaires ainsi que d'autres molécules cytosoliques dont des enzymes (Cook and McCleskey, 2002; Sikora et al., 2014). Ce relargage massif d'ATP dans le milieu extracellulaire devient alors toxique pour les cellules avoisinantes, augmentant leur taux de Ca^{2+} intracellulaire *via* l'activation spécifique des récepteurs purinergiques présents à leur surface. Des processus d'apoptose sont alors activés, ce qui a pour conséquence d'engendrer en cascade de nouvelles libérations massives d'ATP (Placido et al., 2006; Schulze-Lohoff et al., 1998; Zheng et al., 1991).

1.1.3.2 Métabolisation de l'ATP extracellulaire

Une fois libérée dans le milieu extracellulaire, l'ATP a une demi-vie de quelques secondes, très rapidement dégradée par des exonucléotidases incluant les ectonucléosides triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPD), les ectonucléotides pyrophosphatases (E-NPP) et/ou phosphodiesterases, les alcalines phosphatases et les ecto-5'-nucleotidases. Les E-NTPD et les E-NPP hydrolysent l'ATP et l'ADP en adénosine monophosphate (AMP) qui est ensuite hydrolysée en adénosine par les ecto-5'-nucleotidases. Les alcaline phosphatases hydrolysent de la même manière les nucléosides tri, di et monophosphates. Les dinucléosides polyphosphates, le NAD^+ et les sucres UDP sont les substrats des E-NPP uniquement. En dehors de la voie catabolique, la rephosphorylation de nucléotides par des kinases (ectonucleoside diphosphate kinase et adenylate kinase) et la resynthèse d'ATP extracellulaire a également lieu. Les concentrations extracellulaires sont donc peu stables, estimées de l'ordre de quelques nM en conditions basales (Joseph et al., 2003; Okada et al., 2006). Même si l'ATP extracellulaire est rapidement dégradée et présente en faible quantité, sa concentration est néanmoins suffisante pour activer localement ses récepteurs cibles lors de sa libération.

L'ATP ainsi que de ses métabolites, une fois hors de la cellule vont pouvoir aller se fixer et activer de nombreux récepteurs purinergiques. Typiquement, une concentration de 3-500 nM d'ATP est requise pour l'activation maximale de 50% des récepteurs purinergiques présents à la surface des cellules (1000 fois moins que la concentration d'ATP intracellulaire), ce qui n'affecte pas les stocks intracellulaires d'ATP requis pour le métabolisme énergétique.

1.1.3.3 L'ATP comme molécule pro-inflammatoire

La survenue de mécanismes physiopathologiques associés à la destruction cellulaire favorise une accumulation massive d'ATP extracellulaire qui constitue un signal de danger déclenchant une cascade inflammatoire. Dans les tissus chroniquement enflammés, l'ATP et l'adénosine extracellulaires peuvent être élevées pendant de longues périodes (Cekic and Linden, 2016). L'importance de l'ATP dans le processus d'inflammation a été établie au cours des dernières décennies (Cekic and Linden, 2016; Idzko et al., 2014). Il est aujourd'hui bien admis que les récepteurs purinergiques sont intimement associés à de nombreuses pathologies telles que les douleurs chroniques (Bernier et al., 2018) ou certaines maladies neurodégénératives (Burnstock, 2016).

La libération de nucléotides par les cellules endommagées, *via* l'activation des récepteurs purinergiques, permet aux cellules inflammatoires stimulées telles que les macrophages, la microglie, les neutrophiles et les cellules endothéliales d'ajuster avec précision les réponses autocrines/paracrines lors d'inflammations aiguës et chroniques, mais également de déclencher des cascades de signalisation dans les cellules parenchymateuses (Junger, 2011). Les cellules inflammatoires activées génèrent un microenvironnement pro-inflammatoire *via* la sécrétion de cytokines permettant aux phagocytes, tels que les neutrophiles et les macrophages, de migrer vers le tissu endommagé et de procéder à la phagocytose des corps nécrotiques et des débris cellulaires (Elliott et al., 2009; Iyer et al., 2009; McDonald et al., 2010; Qu et al., 2011; Ravichandran, 2011; Trautmann, 2009). Dans les maladies aiguës et chroniques, les fonctions effectrices clés des cellules inflammatoires sont régulées par la signalisation purinergique ce qui en fait une cible prometteuse pour le développement de nouveaux traitements (Dosch et al., 2018). Dans le SNC, une quantité importante d'ATP libérée par la microglie lors de la neuroinflammation activant les récepteurs P2X exprimés par les neurones de l'hippocampe et de la ME (Beamer et al., 2016; Beggs et al., 2012; Butt, 2011; George et al., 2016). Dans les douleurs chroniques, l'ATP vésiculaire est libérée par les neurones, la microglie et les cellules immunitaires en réponse à l'inflammation (Kato et al., 2017) et l'activation des récepteurs P2X situés au niveau de la microglie conduit à la production de cytokines inflammatoires (Chessell et al., 2005). De manière générale, l'augmentation d'ATP extracellulaire dans le SNC favorise l'astrogliose, active la microglie et ses réponses neuro-inflammatoires et augmente le risque de neurotoxicité majoritairement *via* l'activation des récepteurs à l'ATP P2X4, P2X7 et P2Y1 et à l'adénosine A_{2A} (Rodrigues et al., 2015).

1.2 Les récepteurs aux purines et pyrimidines

Les récepteurs purinergiques sont sans doute les récepteurs les plus abondants dans les tissus des mammifères (Abbracchio et al., 2009). Les réponses induites par l'activation des purinocepteurs sont très vastes et peuvent avoir des effets à court terme comme la neurotransmission, la neuromodulation, la sécrétion l'agrégation plaquettaire, la chémoattraction et l'inflammation aigue, mais aussi des effets trophiques à plus long terme, impliquant la prolifération cellulaire, la différenciation, la motilité et la mort lors du développement, ainsi que la régénération, la cicatrisation, la sténose, le renouvellement des cellules épithéliales, le cancer et le vieillissement (Burnstock, 2006b; Burnstock and Verkhratsky, 2010). Comme nous l'avons mentionné plus haut, en 1978, la distinction entre les récepteurs à l'adénosine (récepteurs P1) et les récepteurs à l'ATP (récepteurs P2) a été établie par Geoffrey Burnstock. Par la suite, les récepteurs P2 ont été subdivisés en récepteurs P2X ionotropiques et P2Y métabotropiques sur la base de leur mécanisme d'action et leur pharmacologie, puis confirmé par leur clonage moléculaire (Brake et al., 1994; Lustig et al., 1993; Ralevic and Burnstock, 1998; Valera et al., 1994; Webb et al., 1993).

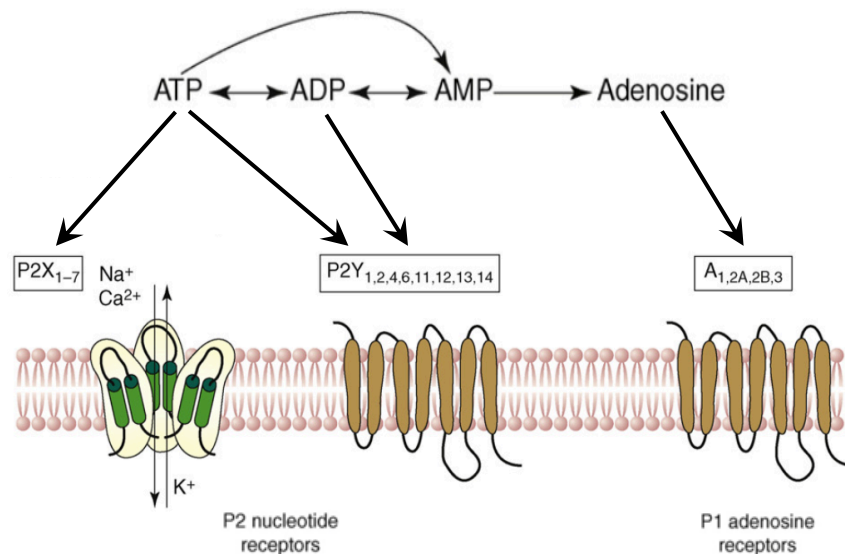


Figure 3 : Les différents récepteurs purinergiques (d'après Abbracchio et al. 2009). L'ATP est transformée en ADP, en AMP puis en adénosine par les différentes ectoenzymes présentes à proximité de la membrane. L'ATP peut agir sur les récepteurs P2X et certains récepteurs P2Y. Les récepteurs P2Y sont activés par l'ADP. L'adénosine agit sur 4 types de récepteurs P1.

1.2.1 Les récepteurs métabotropiques P1 à l'adénosine

1.2.1.1 Structure et voies de signalisation

Les quatre types de récepteurs P1 à l'adénosine A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃ (AR) sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs possèdent sept segments transmembranaires constitués d'hélices α , un domaine terminal NH₂ extracellulaire et un segment terminal COOH intracellulaire couplé aux protéines G. A₁R et A₃R sont couplés aux protéines G_{i/o} qui inhibent la production d'AMP cyclique (AMPc) tandis que A_{2A}R et A_{2B}R stimulent la production d'AMPc *via* G_s. L'AMPc conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA) agissant sur différents effecteurs. D'autres combinaisons de couplage aux protéines G ont été reportées selon le type cellulaire concerné mais tous les récepteurs à l'adénosine activent au moins une sous-famille de protéine kinase activée par un mitogène (MAP kinases) (Schulte and Fredholm, 2003).

1.2.1.2 Distribution, rôles physiologiques et physiopathologie

Les récepteurs P1 sont impliqués dans de nombreuses fonctions telles que la défense immunitaire, la modulation du rythme cardiaque et sont fortement exprimés dans le SNC (Abbracchio and Ceruti, 2007). Au niveau de ce dernier, l'activation des récepteurs A₁ ou A_{2A} dont les effets sont opposés, module de manière complexe la physiologie des neurones et de la glie, le développement neural, la transmission synaptique et la signalisation neurogliale (Dare et al., 2007; Fellin et al., 2006; Lopes et al., 2002). A cette complexité est associée un *cross-talk* entre les deux récepteurs avec une habilité du récepteur A_{2A} excitateur à contrôler la fonction inhibitrice du récepteur A₁ (Lopes et al., 1999). Ces récepteurs sont également impliqués dans diverses pathologies telles que les maladies inflammatoires (Hasko et al., 2008), l'ischémie/reperfusion cardiaques (Eltzschig and Eckle, 2011), ainsi que les maladies neurodégénératives (Fredholm et al., 2007). Récemment Pagnussat et ses collaborateurs ont montré que l'activation du récepteur A_{2A} était nécessaire et suffisante pour déclencher des troubles de la mémoire (Pagnussat et al., 2015). Cette étude a également suggéré que le récepteur A₁, également impliqué dans les troubles de la mémoire et connu pour inhiber la libération d'ACh dans le cortex limbique (Cunha et al., 1994), pourrait être impliqué de manière sélective dans l'altération de la mémoire d'origine cholinergique (Pagnussat et al., 2015).

1.2.2 Les récepteurs métabotropiques P2Y

1.2.2.1 Structure et voies de signalisation

Les récepteurs P2Y, premier groupe de la famille des récepteurs P2, sont également des RCPG. Ils sont subdivisés en deux sous-groupes divergents par leur séquence en acides aminés. Le premier groupe, les *P2Y₁-like receptors*, comprend les récepteurs P2Y₁ (activé par l'ADP), P2Y₂ (activé par l'UTP et l'ATP), P2Y₄ (activé par l'UTP), P2Y₆ (activé par l'UDP) et P2Y₁₁ (activé par l'ATP) qui sont principalement couplés aux protéines G_q/G₁₁ activant la voie de libération du Ca²⁺ du réticulum *via* la phospholipase C/inositol triphosphate. Le deuxième groupe, les *P2Y₁₂-like receptors*, comprend les récepteurs P2Y₁₂ (activé par l'ADP), P2Y₁₃ (activé par l'ADP) et P2Y₁₄ (activé par l'UDP), la plupart exclusivement couplés à la protéine G_{i/o} qui inhibe d'adénylyl cyclase, diminuant la production d'AMPc et l'activité de la PKA, mais aussi agissant sur la modulation des canaux ioniques (Abbracchio et al., 2006). Les mêmes sous-types de récepteurs P2Y peuvent également être couplés à différentes protéines G en fonction de leur conformation. Dans certaines conditions, les récepteurs P2Y sont capables d'interagir directement avec d'autres protéines sans intervention des protéines G (Erb et al., 2001). Les récepteurs P2Y peuvent former des homo- ou hétérodimères entre eux (Ecke et al., 2008) ou avec d'autres récepteurs comme le récepteur à l'adénosine A₁ (Fischer and Krugel, 2007).

1.2.2.2 Distribution, rôles physiologiques et physiopathologie

L'action des nucléotides *via* l'activation des récepteurs P2Y est extrêmement étendue du fait de leur expression ubiquitaire, notamment dans les cellules immunitaires (Le Duc et al., 2017) et épithéliales (Klepeis et al., 2004). Dans le SNC, les récepteurs P2Y sont largement distribués au niveau des neurones et de la glie où ils jouent un grand rôle dans la neurotransmission, la neurogénèse et la communication intercellulaire (Guzman and Gerevich, 2016; Illes, 2012). On les retrouve dans plusieurs pathologies du SNC dont l'épilepsie (Alves et al., 2018), la douleur (Gerevich and Illes, 2004) ainsi que les maladies neurodégénératives (Erb et al., 2015).

1.2.3 Les récepteurs ionotropiques P2X

Le deuxième groupe de la famille des récepteurs P2 est la famille des récepteurs P2X qui sont des récepteurs-canaux de l'ATP. Ils sont exprimés chez la plupart des vertébrés, certains invertébrés et quelques organismes plus primitifs mais ils sont absents chez les organismes procaryotes contrairement à la plupart des autres canaux ioniques. La fixation de l'ATP entraîne l'ouverture d'un canal intrinsèque au récepteur qui est perméable aux cations de manière non sélective (sodium (Na⁺), potassium (K⁺) et Ca²⁺). Chez les mammifères, ils sont retrouvés sous forme d'homo- ou d'hétéro-trimères formés par des sous-unités individuelles encodées par sept gènes différents allant de P2X1 à P2X7 qui ont été définis par ordre de clonage (Nicke et al., 1998). Pour certaines sous-unités, notamment P2X4 et P2X7, les gènes sont adjacents, reflétant probablement une duplication génétique récente au cours de l'évolution (Bavan et al., 2009). Les sept sous-types P2X clonés chez l'homme et le rat possèdent entre 379 (rP2X6) et 595 (rP2X7 et hP2X7) acides aminés et partagent entre 35 et 54% d'homologie de séquence (Kaczmarek-Hajek et al., 2012). Le premier récepteur P2X1 fut cloné par expression dans des ovocytes de Xénope en 1994 à partir de fractions progressives d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) réalisée à partir des ARN messagers (ARNm) de cellules musculaires lisses du canal déférent de rat où l'ATP provoque directement sa contraction. (Valera et al., 1994). Une approche similaire à partir d'ARN de cellules PC12 a ensuite permis de cloner le récepteur P2X2 (Brake et al., 1994). Les autres membres de la famille des récepteurs P2X ont ensuite été identifiés par des approches basées sur les homologies de séquence à partir de nombreux tissus jusqu'en 1996, où le dernier récepteur P2X7 fut caractérisé (North, 2002).

1.2.3.1 Structure moléculaire et fonctions

1.2.3.1.1 Architecture générale

L'identification moléculaire de la sous-unité P2X1 en 1994 (Brake et al., 1994) n'indiqua aucune homologie de séquence avec d'autres canaux ioniques. La topologie des récepteur P2X fut établie à la suite de plusieurs études suggérant que chaque sous-unité était constituée deux domaines transmembranaires (TM) organisés en hélice α reliés par une large boucle extracellulaire et deux domaines N- et C- terminaux intracellulaires (Brake et al., 1994; Jiang et al., 2001; Li et al., 2004; Newbolt et al., 1998; Rassendren et al., 1997; Silberberg et al., 2005; Valera et al., 1994). Une association trimérique des récepteurs P2X a ensuite été proposée (Barrera et al., 2005; Jiang et al., 2003; Mio et al., 2005; Mio et al., 2009; Nakazawa et al., 2005; Nicke et al., 1998; Shinozaki et al., 2009; Stoop et al., 1999). Des études de perméabilité

au Ca^{2+} ont suggéré que le domaine transmembranaire 1 (TM1) avait une position périphérique et que le TM2 constituait la paroi du pore (Samways and Egan, 2007; Samways et al., 2008). Une autre équipe a également montré par des expériences de mutation que le TM1 n'était que peu impliqué dans la conduction ionique du canal (Jiang et al., 2001; Li et al., 2008).

La résolution récente de la structure du récepteur zP2X4 tronqué de poisson zèbre cristallisé, premièrement dans son état fermé en absence d'ATP (Kawate et al., 2009) puis dans son état ouvert lié à l'ATP (Hattori and Gouaux, 2012), a définitivement confirmé la stœchiométrie trimérique ainsi que l'architecture globale des récepteurs P2X précédemment suggérées avec l'organisation précise en trois dimensions et le repliement de chaque sous-unité. Le zP2X4 a un domaine extracellulaire de 70 Å et une région TM plus petite d'environ 28 Å. La forme globale de chaque sous-unité peut être comparée à celle d'un dauphin, permettant la distinction structurale des différentes régions. Le large ectodomaine riche en disulfides et fortement glycosylé représente le corps du dauphin. Il est composé de résidus hautement conservés organisés en feuillets β conférant une structure rigide, stabilisés par cinq ponts disulfures. Les domaines TM représentent la queue du dauphin et sont organisés en hélice α . TM1 est positionné de manière périphérique à TM2. Les trois hélices α associées de TM2 bordent le pore du canal. L'entrée du canal est définie par la région hydrophobe, à mi-chemin de la longueur de l'hélice TM2. La structure résolue en absence d'ATP à l'état fermé révèle des interfaces inter- et intra-sous-unités, chaque monomère pouvant tourner autour de ses voisins sur un axe de symétrie perpendiculaire au plan de la membrane, renfermant une cavité. Deux voies d'entrée des ions potentielles ont pu être identifiées : une voie centrale dans laquelle les ions entrent de manière verticale *via* trois vestibules connectés entre eux, positionnés au niveau de l'axe central du récepteur, et une voie alternative latérale dans laquelle les ions passent dans le canal par trois fenêtres localisées au-dessus de l'entrée du pore. Des études basées sur la physico-chimie (Kawate et al., 2009; Samways et al., 2011) ont suggéré que les ions extracellulaires empruntaient la voie latérale en entrant préférentiellement par les fenêtres avant de circuler à travers le pore. La structure du récepteur P2X4 a été confirmée par la suite, du moins partiellement chez le rat (Igawa et al., 2015).

Plus récemment, la structure cristallisée du récepteur P2X3 humain (hP2X3), sous sa forme complète présentant les domaines intracellulaires non tronqués, a été déterminée par rayons X par Mansoor et ses collaborateurs (Mansoor et al., 2016). La visualisation du récepteur dans tous les états (fermé en absence d'agoniste, ouvert en présence d'agoniste, désensibilisé en présence d'agoniste et fermé en présence d'antagoniste) a révélé le mécanisme d'activation et

d'inhibition du récepteur pour la première fois en élucidant les réarrangements conformationnels sous-jacents à l'ouverture des récepteurs P2X et en révélant les interactions responsables de l'inhibition compétitive. Il a été découvert que la structure du récepteur à l'état ouvert contenait un motif intracellulaire appelé coiffe cytoplasmique qui crée des fenestrations cytoplasmiques latérales bordées de phospholipides favorisant la sortie d'eau et d'ions. De manière intéressante, il a été suggéré que la coiffe stabilise l'état ouvert et les propriétés du canal mais n'est pas nécessaire à l'ouverture des canaux P2X.

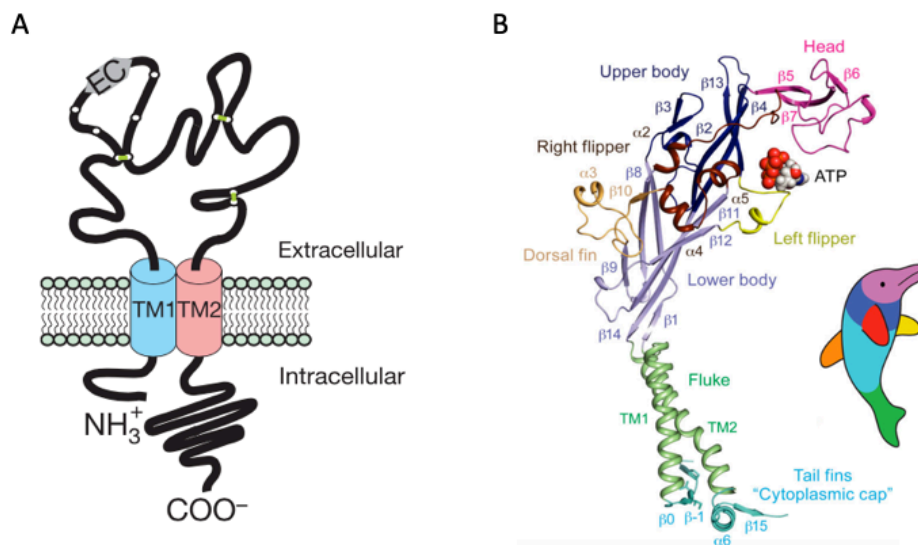


Figure 4 : Structure d'une sous-unité P2X (d'après Mansoor et al., 2016). **A.** Représentation schématique de la structure moléculaire des récepteurs P2X (d'après Khakh and North, 2006). **B.** Structure cristallographique du récepteur humain P2X3. Chaque sous-unité possède une forme de dauphin dont les différentes parties sont représentées par différentes couleurs.

1.2.3.1.2 Site de liaison à l'ATP

La combinaison de multiples études a permis de mettre en évidence huit résidus hautement conservés critiques pour la liaison à l'ATP (Adriouch et al., 2008; Ennion et al., 2000; Fischer et al., 2007; Jiang et al., 2000; Jiang et al., 2011; Roberts et al., 2008; Wilkinson et al., 2006; Yan et al., 2006; Zemkova et al., 2007). Wilkinson et ses collaborateurs ont démontré que deux sous-unités étaient impliquées dans la formation du site de liaison (Wilkinson et al., 2006). Les résidus identifiés dans la liaison de l'ATP forment un *cluster* restreint, localisé entre deux sous-unités, entouré par la tête et la nageoire gauche d'une sous-unité et par la nageoire dorsale de l'autre. D'autres interactions impliquées dans la liaison de l'ATP ont également pu être révélées (Hattori and Gouaux, 2012). De nombreuses études ont suggéré que l'ouverture du canal

résultait de la liaison de trois molécules d'ATP (Bean, 1990; Ding and Sachs, 1999; Jiang et al., 2003). Ceci a ensuite été définitivement confirmé par la résolution de la structure cristallographique des récepteurs P2X (Hattori and Gouaux, 2012; Mansoor et al., 2016). Ces études cristallographiques ont suggéré en plus l'existence d'états intermédiaires avec un ou deux ligands liés, corroboré par des études de *cross-linking* et de mutagenèse (Fryatt et al., 2016; Stelmashenko et al., 2012). Cependant la mesure des changements conformationnels en temps réel a démontré que les récepteurs P2X s'ouvrent généralement dans un état « triligand » (Fryatt et al., 2016).

1.2.3.1.3 *Partie extracellulaire*

Dans la boucle extracellulaire, des sites de N-glycosylation importants pour la fonction du récepteur et son adressage à la membrane ont été mis en évidence (Hattori and Gouaux, 2012; Lenertz et al., 2010; Rettinger et al., 2000; Torres et al., 1998; Vacca et al., 2011). Dix cystéines impliquées dans la formation de ponts disulfures sont conservées dans la partie extracellulaire de toutes les sous-unités P2X et semblent importantes pour la bonne conformation des récepteurs, leur fonction et leur adressage à la membrane (Clyne et al., 2002; Ennion and Evans, 2002a). Une étude a également montré que ces cystéines pourraient être impliquées dans la potentialisation de la fonction de P2X₄ par le zinc (Zn²⁺) (Li et al., 2013a). Le changement conformationnel de la région extracellulaire menant à l'ouverture du canal après liaison de l'ATP implique un rétrécissement de la fente entre la tête et la nageoire dorsale, le mouvement de la nageoire gauche, et la transmission de ce mouvement par le bas du corps aux hélices TM réalisant l'ouverture du canal (Hattori and Gouaux, 2012; Huang et al., 2014a; Jiang et al., 2012; Kowalski et al., 2015; Lorinczi et al., 2012; Roberts et al., 2012).

1.2.3.1.4 *Domaines transmembranaires TM1 et TM2*

Les hélices transmembranaires TM1 et TM2 de chaque sous-unité délimitent la queue du dauphin. La queue des trois sous-unités forme le pore du canal avec TM2 recouvrant le tunnel interne et TM1 positionné en périphérie de TM2. TM1 et TM2 sont tous deux couplés structurellement à la partie basse du corps et sont impliquées dans de nombreuses propriétés des récepteurs P2X notamment leur conductance unitaire et rectification, leurs propriétés de désensibilisation ainsi que leur voltage-dépendance (Cao et al., 2009; Fujiwara et al., 2009; Keceli and Kubo, 2009, 2014; Werner et al., 1996). La résolution de la structure cristallographique des récepteurs P2X a permis de confirmer leur rôle dans l'emplacement du pore, la perméabilité aux ions et dans les réarrangements structuraux. En conditions normales,

l'ouverture du pore des récepteurs P2X est contrôlée par la fixation d'ATP. Cependant plusieurs études ont suggéré que le réarrangement des domaines TM était suffisant pour initier l'activation du canal (Browne et al., 2014; Cao et al., 2009; Cao et al., 2007; Habermacher et al., 2016; Lemoine et al., 2013; Rothwell et al., 2014).

Comparé au domaine extracellulaire, l'orientation précise des hélices TM et la position des résidus du domaine extracellulaire formant le pore ionique restent à ce jour moins bien définies par la cristallographie aux rayons-X. La structure du récepteur hP2X3 dans son état lié à l'ATP fournit jusqu'à présent la seule information structurale détaillée sur la région intracellulaire (Mansoor et al., 2016), indiquant que l'état ouvert est stabilisé par un agencement en forme de coiffe dans les régions N- et C-terminales intracellulaires.

Durant une application prolongée d'ATP, la perméabilité relative à un cation organique de grande taille semble augmenter pour certains récepteurs P2X (P2X7, P2X2 et P2X4) suggérant une dilatation du canal lors d'une stimulation soutenue (Browne et al., 2013; Khakh et al., 1999a; Virginio et al., 1999), cependant il est maintenant clair que ce phénomène était dû à un artefact (Li et al., 2015). De plus, les premières études sur la perméabilité ionique suggèrent l'existence d'un stade ouvert commun aux récepteurs P2X (Evans et al., 1996; Harkat et al., 2017). L'absence de dilatation des pores est également corroborée par des études sur le récepteur P2X7 purifié suggérant une ouverture complète instantanée (Karasawa et al., 2017). Il est donc clair que des grosses molécules sont capables de passer à travers les récepteurs P2X, cependant la question de savoir si une stimulation prolongée des récepteurs entraîne le recrutement de voies de perméabilité supplémentaires reste encore non résolue (Di Virgilio et al., 2018).

1.2.3.1.5 Parties intracellulaires N- et C-terminales

Les parties N- et C-terminales cytosoliques des récepteurs P2X sont très variables d'une sous-unité à l'autre.

La queue N-terminale est courte (environ 30 acides aminés) et présente un site conservé de liaison à la protéine kinase C (PKC) retrouvé dans la plupart des sous-unités. La phosphorylation de la PKC entraîne la modulation des fonctions du récepteur. Des études ont montré que des mutations de ce site entraînaient une altération de la désensibilisation des récepteurs P2X1 et P2X2 (Boue-Grabot et al., 2000; Ennion and Evans, 2002b) et une modulation des courants induits par l'ATP du récepteur P2X3 (Stanchev et al., 2006).

La queue C-terminale est de longueur variable (de 30 à 240 acides aminés approximativement) et la séquence est la moins conservée parmi les sept sous-unités. Elle comporte un motif juxtamembranaire conservé YXXXX (X représentant n'importe quel acide aminé), situé juste en aval du TM2, impliqué dans la rétention à la membrane. Des mutations au niveau de ce motif altèrent le trafic des récepteurs à la membrane et augmentent leur internalisation ainsi que leur dégradation lysosomale (Chaumont et al., 2004). La queue C-terminale comporte également d'autres motifs impliqués dans l'endocytose des récepteurs (Royle et al., 2002), dans les changements de perméabilité (Eickhorst et al., 2002), dans la liaison avec le lipopolysaccharide (LPS) (Denlinger et al., 2001) et dans l'interaction avec d'autres protéines (Kim et al., 2001; Masin et al., 2006). Des études de mutagenèse et de pharmacologie ont montré que la phosphorylation de certains résidus de la partie C-terminale des sous-unités P2X4 et P2X7 était impliquée dans la régulation de leur fonction (Kim et al., 2001). En ce qui concerne le récepteur P2X4, cette phosphorylation est médiée par la PKA dépendante de l'AMPc (Brown and Yule, 2010). Les récepteurs P2X4 présentent également la particularité de contenir dans leur partie C-terminale un motif d'internalisation non-canonique atypique YXXGL reconnu par la protéine adaptatrice AP2 permettant leur internalisation constitutive dépendante de la clathrine (Bobanovic et al., 2002; Royle et al., 2002; Royle et al., 2005). Par conséquent, les récepteurs P2X4 sont retrouvés majoritairement dans des compartiments intracellulaires tels que les endosomes et lysosomes. Leur partie extracellulaire fortement glycosylée leur permet de résister au milieu acide des lysosomes. Les récepteurs P2X4 peuvent être activés par l'ATP présent dans ces compartiments intracellulaires lors de la variation du pH intravésiculaire et semblent participer à la fusion des vésicules endo-lysosomales (Murrell-Lagnado and Frick, 2019). Ils constituent également une réserve de récepteurs qui peuvent être réinsérés à la membrane plasmique rapidement. Un motif di-leucine au niveau de leur partie N-terminale est également important pour leur localisation lysosomale (Qureshi et al., 2007).

1.2.3.2 Assemblage des sous-unités et propriétés

1.2.3.2.1 *Homotrimères et propriétés pharmacologiques*

De nombreuses études ont permis la caractérisation biophysique et pharmacologique des récepteurs homotrimériques qui sont tous fonctionnels excepté la sous-unité P2X6 qui ne semble pas former de trimère (Barrera et al., 2005) et la sous-unité P2X5 qui est peu fonctionnelle sous forme d'homotrimère (Bo et al., 2003).

L'agoniste endogène de tous les récepteurs P2X est l'ATP. Les différents sous-types peuvent se distinguer par leur sensibilité à l'ATP qui est très variable d'une sous-unité à l'autre. La concentration d'ATP nécessaire pour induire la moitié de la réponse maximale (EC_{50}) varie entre des concentrations de l'ordre du sub-micromolaire pour les sous-unités P2X1, P2X3 et P2X5, à une dizaine de μM pour les sous-unités P2X2, P2X4 et P2X6 et supérieure à 100 μM pour la sous-unité P2X7 (Kaczmarek-Hajek et al., 2012).

La vitesse de désensibilisation des différents sous-types P2X a été déterminée en système recombinant (North, 2002) ainsi les récepteurs P2X homomériques peuvent être classifiés en plusieurs groupes. Les sous-types P2X1 et P2X3 sont des récepteurs-canaux à désensibilisation rapide tandis que les sous-types P2X2, P2X4, P2X5 et P2X7 ont une désensibilisation lente ou sont non désensibilisants. L'implication de plusieurs résidus situés dans les régions proximales intracellulaires ont été mis en évidence dans ces phénomènes de désensibilisation (Allsopp and Evans, 2011; Smith et al., 1999). La cristallisation du récepteur P2X3 semble confirmer ces résultats montrant l'absence de la coiffe cytoplasmique dans la structure désensibilisée (Mansoor et al., 2016). Les différentes cinétiques de désensibilisation observées pour les différentes sous-unités P2X seraient alors dues à la vitesse de déstabilisation de cette coiffe suite à l'activation du récepteur.

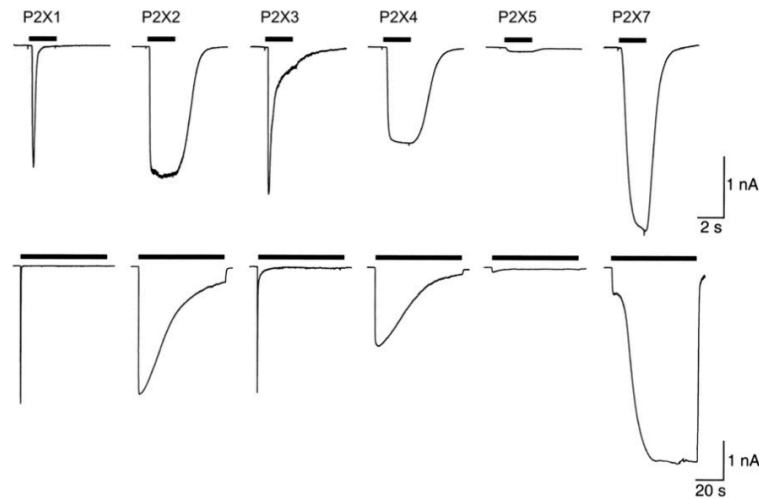


Figure 5 : Cinétique d'activation et de désensibilisation des récepteurs P2X lors d'une application brève ou prolongée d'ATP (d'après North 2002). Comparaison des désensibilisations rapides (haut) et lentes (bas) des différents homomères des récepteurs P2X de rat exprimés en système recombinant. Les courants sont enregistrés en patch-clamp configuration cellule entière dans des cellules HEK.

Tous les agonistes des récepteurs P2X connus jusqu'à ce jour sont des analogues des nucléotides, principalement dérivés de la molécule d'ATP, tels que le ATP γ S et l' $\alpha\beta$ -meATP qui sont plus stables d'un point de vue métabolique, le 2-MeSATP, le $\beta\gamma$ -meATP et le Bz-ATP. Aucun agoniste n'est sélectif d'un sous-type en particulier bien qu'ils aient des affinités préférentielles. L' $\alpha\beta$ -meATP active préférentiellement les sous-types P2X1 et P2X3 et est également un agoniste partiel du P2X4. Le $\beta\gamma$ -meATP active préférentiellement le sous-type P2X1 et le Bz-ATP présente une affinité préférentielle pour le P2X7 mais aussi le P2X1 et P2X2 avec une efficacité supérieure ou proche de celle de l'ATP. La suramine, le dérivé de pyridoxalphosphate, le PPADS, et le RB-2 comptent parmi les antagonistes non-sélectifs les plus anciens et les plus largement utilisés. D'autres molécules plus sélectives ont été développées. Parmi elles, le NF449 est une des plus sélectives pour le sous-type P2X1 et le NF770 a une sélectivité modérée pour les récepteurs P2X2. Des analogues plus puissants (composés MRS) avec une certaine sélectivité pour les sous-types P2X1 (MRS 2220) ; P2X1 et P2X3 (MRS 2257) ; P2X1, P2X3 et P2X7 (MRS 2159) ont été développés (Coddou et al., 2011b). L'analogue des nucléotides TNP-ATP est un antagoniste compétitif des récepteurs P2X1, P2X2, P2X3, P2X2/3 et P2X4 (King et al., 1997; Virginio et al., 1998). De nouveaux types d'antagonistes, pour la plupart non nucléotidiques et plus sélectifs, ont été développés durant les vingt dernières années suite aux nombreuses études montrant l'implication des récepteurs P2X dans différentes pathologies. Aujourd'hui différents types d'antagonistes commerciaux sont disponibles excepté pour les sous-types P2X5 et P2X6. Ils sont principalement dérivés d'antagonistes non spécifiques comme la suramine et le RB-2 et sont

efficaces à des concentrations nM (Jacobson and Muller, 2016). En ce qui concerne le récepteur P2X4, qui a été relativement difficile à cibler, le 5-BDBD est apparu comme un puissant bloqueur (Donnelly-Roberts et al., 2008). Plus récemment, le PSB-12054, le PSB-12062 et le BX430 ont été développés comme antagonistes sélectifs du récepteur P2X4 humain actifs à des concentrations submicromolaires mais peu efficaces sur les récepteurs P2X4 des rongeurs (Ase et al., 2015; Hernandez-Olmos et al., 2012). Finalement, un autre antagoniste sélectif du récepteur P2X4 efficace chez le rongeur a pu être identifié, le NP-1815-PX ayant des effets anti-allodyniques chez la souris (Matsumura et al., 2016).

	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X7
AGONISTS (EC₅₀ μM)						
ATP	0,1-1	1-30	1	10	10	100
ADP	30	300	50	>100	300	>300
2-meSATP	0,1-1	3-10	0,3	1-100	10	10
ATPγS	10	1-30	1	-	-	-
αβ-meATP	1-3	>300	1	>300	>300	>300
βγ-meATP	10	>300	>300	-	-	>100
Bz-ATP	3-30	30	-	-	500	3
ANTAGONISTS (IC₅₀ μM)						
Suramin	1	10	3	>300	4	500
PPADS	1	1	1	>300	3	50
TNT-ATP	0,006	1	0,001	15	-	>30
RB-2	>5	1,4	>10	>10	-	0,01
NF279	0,019	0,76	1,62	>10		2,8
NF449	0,001	47	1,8	>10		>10
RO-1	3	>100	>100			
NF770	0,94	0,019	0,074	>10		>10
PSB-1011	0,422	0,079	0,494	>10		>10
A-317491	2,5	4,1	0,022	2,7		8,6
RO-4 (AF-353)	>5	>5	0,008	>5		>5
RO-51 (AF-906)			0,009			
5-BDBD				1,6		
PSB-12054	6,52	>10	10	0,19		>10
PSB-12062	>10	>10	>10	1,38		>10
BX-430	5		5	0,54	5	>50
NP-1815-PX	>30	7,3	>30	0,26		>30
A804598						0,021
A740003						0,069
GSK1482160						0,003
JNJ-55308942						0,010
Potentialisateurs (EC₅₀ μM)						
Ivermectin				0,1-3		3
Cibracon Blue			1,4	3-30		
MRS 2219	5,9					
PSB-10129		0,49				

Tableau 1 : Caractéristiques pharmacologiques des sous-unités P2X (d'après Khakh and North, 2012 ; Jacobson and Muller 2016 ; Matsumura et al., 2016 ; Stokes et al., 2017 ; Bhattacharya, 2018). Sensibilité des 7 sous-unités aux principaux agonistes non-sélectifs (vert), antagonistes non sélectifs (rouge), antagonistes sélectifs (jaune, valeurs IC₅₀ en gras) et potentialisateurs (bleu).

1.2.3.2.2 *Hétérotrimères et propriétés pharmacologiques*

Le fait que le profil d'expression de nombreuses sous-unités P2X se chevauchent, que l'expression de récepteurs homomériques P2X5 et P2X6 dans des systèmes hétérologues soit très limitée et que les propriétés fonctionnelles des récepteurs P2X natifs soient différentes de celles retrouvées dans un système hétérologue, a rapidement conduit à l'hypothèse que les récepteurs P2X, comme la plupart des récepteurs ionotropiques, forment des hétéromères. L'existence des hétéromères P2X est maintenant bien établie cependant la composition spécifique ainsi que la présence dans les tissus natifs restent dans la plupart des cas énigmatiques.

L'hétérotrimère P2X2/3 a été le premier mis en évidence (Radford et al., 1997). Il est aujourd'hui le mieux caractérisé et son association a été confirmée en tissus natifs au niveau du système sensoriel où il est impliqué dans la transmission douloureuse (Cockayne et al., 2005). Les hétéromères P2X1/5 et P2X2/5 ont également été caractérisés en systèmes hétérologues et en tissus natifs. Il a été montré que l'hétéromère P2X1/5 modulait l'excitabilité des astrocytes corticaux (Lalo et al., 2008; Palygin et al., 2010), et que l'hétéromère P2X2/5 (Compan et al., 2012) était présent au niveau du cerveau et de la ME, cependant son rôle précis reste à être élucidé. Selon une étude publiée en 1999 basée sur des expériences de co-immunoprécipitation, la plupart des sous-unités P2X excepté la sous-unité P2X7 sont capables de s'hétéromériser dans un système recombinant (Torres et al., 1999). P2X7 semble interagir avec P2X4 dans un même complexe sans pour autant s'hétéromériser. Ainsi on retrouve l'hétéromérisation des sous-unités P2X1/2, P2X1/4, P2X2/4 et P2X2/6 cependant leur existence et fonctionnalité en tissu natif reste inconnues. L'analyse biochimique et/ou fonctionnelle des hétéromères P2X2/3 et P2X2/6 exprimés de manière hétérologue indique une stœchiométrie fixe de P2X2(3)₂ (Jiang et al., 2003) et de P2X(2)₂6 (Hausmann et al., 2012). Des expériences de co-immunoprécipitation avec l'hétéromère P2X1/2 suggèrent une stœchiométrie P2X1(2)₂ (Aschrafi et al., 2004). En revanche, des expériences de microscopie à force atomique ont montré une stœchiométrie variable dépendante du niveau d'expression pour les hétéromères P2X2/6 (Barrera et al., 2007). En 2014, des études de co-immunoprécipitation et de microscopie à force atomique ont mis en évidence la formation du complexe hétérotrimérique contenant trois sous-unités différentes P2X2/P2X4/P2X6 dans un système recombinant (Antonio et al., 2014).

Pour la plupart des hétéromères, la cinétique d'activation et les propriétés de liaison au ligand des sous-unités sont combinées. La sous-unité avec la désensibilisation la plus lente domine généralement la cinétique tandis que la sous-unité avec la plus haute affinité pour l'agoniste ou l'antagoniste augmente la sensibilité de l'hétéromère pour ce ligand. La pharmacologie ciblant les hétéromères reste limitée, il n'existe aucun ligand sélectif à ce jour bien que les antagonistes sélectifs de l'homomère P2X1 et de P2X3, NF449 et A317491 respectivement, ciblent également les hétéromères P2X1/5 et P2X2/3 (Coddou et al., 2011b).

1.2.3.3 Modulations allostériques

La fonction des récepteurs P2X est régulée par de nombreux modulateurs allostériques très variés : des petites molécules comme les protons (H^+) ou les ions, ainsi que des molécules plus grandes comme les lipides, les stéroïdes, les kinases, l'éthanol et l'ivermectine (IVM) (Coddou et al., 2011b).

1.2.3.3.1 Modulation par les ions divalents

Certains ions peuvent avoir des actions complexes de modulation allostérique sur les récepteurs P2X en fonction du sous-type de récepteur. Plusieurs sites de liaison non conservés ont été identifiés au niveau de l'ectodomaine des différents sous-types (Acuna-Castillo et al., 2000; Coddou et al., 2007; Coddou et al., 2003; Huidobro-Toro et al., 2008). Les récepteurs P2X sont principalement modulés par les ions divalents Zn^{2+} , Ca^{2+} , cuivre (Cu^{2+}) et Mg^{2+} .

Le Mg^{2+} inhibe directement les sous-types P2X1, P2X3 et P2X7 tandis que le récepteur P2X2 et l'hétéromère P2X2/3 y sont moins sensibles lorsqu'ils sont activés par des concentrations d'ATP supramaximales (Li et al., 2013b). Le Zn^{2+} a une action inhibitrice sur la fonction du récepteur P2X1 et P2X7 de manière concentration-dépendante, tandis qu'il potentialise faiblement le récepteur P2X3 avec un effet maximal à 10 μM . Une réduction de courant du récepteur P2X3 est observée à des concentrations plus hautes, suggérant l'existence de deux sites allostériques, un de haute affinité avec un effet potentialisateur, et un de basse affinité avec un effet inhibiteur (Wildman et al., 1999). De la même manière, les récepteurs P2X2, P2X4, et P2X5 sont modulés de façon biphasique par le Zn^{2+} avec un effet potentialisateur à faibles concentrations, et un effet inhibiteur à fortes concentrations (Coddou et al., 2007; Lorca et al., 2005; Nagaya et al., 2005; Wildman et al., 2002). Le Cu^{2+} a également des effets opposés sur les récepteurs P2X2, potentialisateur à des concentrations micromolaires et inhibiteur à partir de concentrations de l'ordre du millimolaire, excepté pour le récepteur P2X2 humain (hP2X2)

pour lequel le Cu^{2+} a uniquement une action inhibitrice, révélant la spécificité des modes de modulation par les métaux suivant les espèces (Lorca et al., 2005; Punthambaker and Hume, 2014). De manière intéressante, en ce qui concerne le récepteur P2X4, le Zn^{2+} et le Cu^{2+} ont des actions modulatrices différentielles (Acuna-Castillo et al., 2000). En effet, alors que le Zn^{2+} potentialise l'activité du récepteur à des faibles concentrations, le Cu^{2+} l'inhibe, dû à une différence d'affinité pour les différents sites allostériques pour ces deux métaux (Acuna-Castillo et al., 2000). Le récepteur P2X7 est également inhibé par le Cu^{2+} , de la même manière que par le Zn^{2+} (Liu et al., 2008). Une étude récente se basant sur la structure du récepteur P2X de tique (*Amblyomma maculatum*) a permis de décrire deux sites de liaison des ions Zn^{2+} et Mg^{2+} (Kasuya et al., 2017). Un premier site de liaison M1, localisé dans une chambre entre les sous-unités, permettant la potentialisation par le Zn^{2+} en facilitant les changements structuraux induits par l'ATP, et M2, couplé au site de liaison de l'ATP contribuant à la régulation par le Mg^{2+} . En ce qui concerne les récepteurs P2X2, P2X3, P2X5 et P2X7, l'action de l'agoniste orthostérique est diminuée par la présence de Ca^{2+} extracellulaire et ce, indépendamment de la concentration de l'agoniste, le Ca^{2+} agissant donc comme un inhibiteur allostérique (Yan et al., 2011). Le récepteur P2X1 est lui insensible au Ca^{2+} alors que l'hétéromère P2X1/5 est potentialisé par une augmentation de Ca^{2+} (Haines et al., 1999).

1.2.3.3.2 Modulation par les protons

Le pH a aussi un effet sur la modulation des récepteurs P2X. Une acidification augmente les réponses aux agonistes des récepteurs P2X2 de rat (King et al., 1997). De la même manière, avec une cinétique différente, les hétéromères P2X2/6 (King et al., 2000) et P2X1/2 (Brown et al., 2002) sont modulés par les H^+ . Tous les autres récepteurs P2X homomériques sont inhibés par une acidification du pH (Coddou et al., 2011a). Cette caractéristique de modulation par les H^+ permet de distinguer le récepteur P2X2 parmi les autres sous-unités.

1.2.3.3.3 Modulation par les phosphoinositides

Les phospholipides peuvent réguler de manière allostérique les récepteurs P2X en agissant sur leur partie C-terminale. Les phosphoinositides (PIPn) augmentent les courants des récepteurs P2X probablement en provoquant un changement de conformation aboutissant à une altération de l'ouverture du pore (Bernier et al., 2013). Les PIPn exercent un effet direct sur les sous-types P2X1, P2X2 et P2X4 et également sur les hétéromères P2X1/5 et P2X2/3 *via* un motif polyphasique composé de résidus positivement chargés dans la région C-terminale juxtamembranaire (Bernier et al., 2008a; Bernier et al., 2008b; Bernier et al., 2012; Fujiwara

and Kubo, 2006). Ce microdomaine n'est pas conservé chez les sous-types P2X3, P2X5 et P2X7 (Bernier et al., 2012), cependant il a été montré que les récepteurs P2X3 et P2X7 sont fonctionnellement modulés par les PIPn (Bernier et al., 2012; Zhao et al., 2007), certainement *via* une régulation indirecte ou un autre motif non-identifié. Les récepteurs P2X5 de mammifères quant à eux ne sont pas sensibles à la régulation par les PIPn (Ase et al., 2010).

1.2.3.3.4 *Modulation par les lipopolysaccharides*

Le LPS est une large molécule constituée d'un lipide et d'un polysaccharide retrouvée dans la membrane cellulaire des bactéries Gram négatives. Ces molécules agissent comme des endotoxines et induisent une forte réponse immunitaire. Il a été montré que le LPS pouvait moduler la production de nombreux médiateurs inflammatoires *via* le récepteur P2X7 présentant un domaine conservé de liaison au LPS dans sa partie C-terminale (Denlinger et al., 2001).

1.2.3.3.5 *Modulation par les stéroïdes*

En plus d'influencer l'expression des récepteurs P2X en modulant leur transcription (Fan et al., 2009; Holbird et al., 2001; Urabe et al., 2009; Wang et al., 2008), les stéroïdes peuvent également avoir des effets allostériques sur les récepteurs P2X. Les effets sont variés et dépendent du type de stéroïde ainsi que du sous-type de récepteur P2X. En l'absence d'information sur le ou les sites de liaison de stéroïdes, il n'est pas à exclure que ces molécules fassent intervenir la voie de signalisation des protéines G modifiant directement ou indirectement les courants ATP.

1.2.3.3.6 *Cas de l'ivermectine et du récepteur P2X4*

L'IVM est un agoniste des récepteurs-canaux chlorure du glutamate des invertébrés présents dans leurs cellules nerveuses et musculaires et est utilisé comme molécule antiparasitaire chez les humains et les animaux (Silberberg et al., 2007). Certains récepteurs-canaux de mammifères tels que les récepteurs nicotiques et du GABA sont modulés par l'IVM. Elle est également un modulateur allostérique positif sélectif des récepteurs P2X4 au sein de la famille P2X (Agboh et al., 2004; Khakh et al., 1999b; Priel and Silberberg, 2004). L'IVM seule n'active pas directement le récepteur P2X4 mais potentialise le courant induit par l'ATP avec une EC₅₀ d'environ 0,25 µM (Gao et al., 2015; Priel and Silberberg, 2004). L'IVM potentialise également l'activité du récepteur P2X7 humain, mais a un effet limité sur le récepteur P2X7 de souris et de rat (Norenberg et al., 2012). Des études récentes suggèrent que l'IVM influence la

consommation d'alcool, le filtrage sélectif sensorimoteur et le contrôle moteur induits par la modulation des récepteurs P2X4 impliqués dans le maintien de l'homéostasie dopaminergique (Bortolato et al., 2013; Franklin et al., 2014; Franklin et al., 2015; Khoja et al., 2016). Bien que la structure cristallisée du récepteur P2X4 ait été résolue, les sites de liaison de l'IVM reste à ce jour encore inconnus. Priel et Silberberg ont précédemment montré que l'IVM n'interagissait pas avec les domaines intracellulaires (Priel and Silberberg, 2004). Les auteurs ont émis l'hypothèse de l'existence de deux sites de liaison à l'IVM sur la partie extracellulaire du récepteur P2X4 : un de haute affinité qui augmente l'amplitude du courant induit par l'ATP en diminuant la désensibilisation du canal, et un autre de faible affinité qui ralentit la désactivation du courant principalement en stabilisant la conformation ouverte du canal. Des analyses fonctionnelles sur des récepteurs chimères et mutants ont ensuite montré que l'IVM interagissait préférentiellement avec la partie extracellulaire des domaines TM du récepteur P2X4 ouvert, près de la surface de la membrane plasmique (Jelinkova et al., 2008; Popova et al., 2013; Silberberg et al., 2007). Plus récemment, des résidus aromatiques localisés dans la fenestration latérale, qui connecte les domaines extracellulaires et TM formant le pore, ont été identifiés comme contribuant à la sensibilité à l'IVM du récepteur P2X4 (Gao et al., 2015; Kawate et al., 2009; Rokic et al., 2013). Une autre étude a montré que l'IVM ne potentialisait pas la fonction d'un récepteur P2X4 muté au niveau de sa séquence de liaison à AP2 en C-terminal, séquence impliquée dans son endocytose constitutive et que l'IVM pouvait également augmenter le nombre de récepteurs P2X4 en surface (Toulme et al., 2006).

1.2.3.3.7 Modulation par l'éthanol

Les cibles les plus importantes de l'éthanol associées à ses actions toxiques sont les récepteurs ionotropiques et métabotropiques neuronaux comme les récepteurs au GABA, à la glycine, à la nicotine, à la sérotonine ou au glutamate (Crews et al., 1996). Les récepteurs P2X sont également modulés par l'éthanol. L'éthanol inhibe l'activité des sous-types P2X2 et P2X4 tandis qu'il potentialise celle du récepteur P2X3 (Davies et al., 2005; Davies et al., 2002). Plusieurs résidus impliqués dans la modulation des récepteurs P2X par l'éthanol ont été identifiés au niveau extracellulaire à l'interface de l'ectodomaine et leurs domaines TM (Asatryan et al., 2008; Popova et al., 2010; Xiong et al., 2004).

1.2.3.4 Interaction avec d'autres protéines et récepteurs-canaux

La diversité des propriétés des récepteurs P2X peut être expliquée par des interactions physiques transitoires ou permanentes avec des protéines associées. Les interactions physiques transitoires incluent les protéines impliquées dans la synthèse et la maturation protéique comme les enzymes de glycosylation et les protéines chaperonnes ainsi que les protéines participant au trafic et à l'ancrage des récepteurs. Les fonctions des récepteurs matures peuvent être modifiées par des molécules de signalisation intracellulaires, par des enzymes telles que les kinases et *via* le dialogue avec d'autres récepteurs ou protéines membranaires (Kaczmarek-Hajek et al., 2012). A l'heure actuelle, peu de protéines nécessaires au transport ou à l'ancrage des récepteurs P2X ont été identifiées, cependant ils interagissent avec de nombreux autres récepteurs-canaux du SNC, leur conférant un rôle central dans la neuromodulation (voir partie 1.2.3.6.2 Système nerveux central et rôle clé du récepteur P2X4).

Une étude de caractérisation des récepteurs P2X dans les neurones sympathiques a montré que la stimulation simultanée des récepteurs P2X et des récepteurs nicotiques de l'ACh aboutissait à un courant qui n'équivalait pas à la somme des réponses individuelles, suggérant une inhibition croisée (Nakazawa, 1994). Plus récemment d'autres travaux ont mis en évidence l'inhibition croisée des récepteurs P2X avec une large gamme de récepteurs ionotropiques dont les récepteurs GABA_A, GABA_C et 5-HT₃ qui repose sur des interactions physiques entre les domaines intracellulaires des deux familles de récepteurs (Boue-Grabot et al., 2003; Boue-Grabot et al., 2004a; Boue-Grabot et al., 2004b; Emerit et al., 2016; Shrivastava et al., 2011b; Toulme et al., 2007). Il a également été démontré que l'inhibition croisée entre le récepteur nicotinique $\alpha 6$ et P2X2/3 était impliquée dans la régulation de la douleur chronique (Wieskopf et al., 2015). En plus d'avoir un effet sur la fonction des récepteurs, ces interactions physiques peuvent aussi contribuer à leur trafic. Dans les neurones de l'hippocampe, il a été montré que les récepteurs P2X2 modulent l'adressage vers les dendrites des récepteurs GABA_A et des récepteurs 5-HT_{3A} (Boue-Grabot et al., 2004b; Emerit et al., 2016). Ces découvertes récentes démontrent que les récepteurs P2X ont des rôles importants dans la régulation de la signalisation dans le SNC.

1.2.3.5 Trafic

Les récepteurs P2X trimériques s'assemblent et sont glycosylés au sein du réticulum endoplasmique (RE), puis trafiquent *via* le réseau trans-Golgi (TGN) vers la membrane plasmique. Ils sont ensuite internalisés et, soit recyclés à la surface, soit adressés aux endosomes et les lysosomes tardifs. La cinétique de ces processus détermine la distribution des récepteurs. Ainsi, les récepteurs P2X sont majoritairement retrouvés au niveau de la membrane plasmique excepté les sous-unités P2X6 et hP2X5 résidents au RE et le récepteur P2X4 qui présente la particularité d'être constitutivement internalisé dans les compartiments endolysosomaux.

1.2.3.5.1 Localisation subcellulaire et trafic

Le seul récepteur de séquence complète retenu dans le RE est le sous-type P2X6 qui est donc non-fonctionnel (Ormond et al., 2006). La sous-unité P2X6 est capable de s'hétéromériser avec les sous-unités P2X2 et P2X4 pour former des complexes stables et fonctionnels exprimés à la membrane plasmique et ayant des propriétés de trafic similaires aux récepteurs homomériques P2X2 et P2X4 (Barrera et al., 2007; Barrera et al., 2005; Bobanovic et al., 2002; Ormond et al., 2006). Le récepteur hP2X5 fait également partie de la catégorie des récepteurs P2X résidents au RE dû à l'expression d'un allèle prédominant donnant lieu à un variant de l'exon 10 délété qui est conservé dans le RE (Bo et al., 2003; Compan et al., 2012; Kotnis et al., 2010).

Les récepteurs P2X2 et P2X7 transitent relativement lentement par la voie de sécrétion. Le récepteur P2X2 est exprimé de manière stable à la membrane plasmique mais lorsqu'il est exprimé de manière hétérologue, son accumulation y est lente. Ce trafic lent faciliterait les interactions avec d'autres protéines modulant la stabilité, le ciblage et la fonction des récepteurs à la membrane plasmique (Bobanovic et al., 2002; Chaumont et al., 2008; Shrivastava et al., 2011b). Le trafic du récepteur P2X7 dépend du type cellulaire et de l'espèce. Il est majoritairement intracellulaire dans les monocytes et lymphocytes humains mais devient majoritairement membranaire lors de la différenciation des monocytes et macrophages, tout comme dans les macrophages et la microglie des rongeurs (Boumechache et al., 2009; Gu et al., 2000; Gudipaty et al., 2001; Hickman et al., 1994). Des études de mutagenèse suggèrent que cette régulation du trafic implique le domaine C-terminal cytoplasmique du récepteur (Denlinger et al., 2003).

Le récepteur P2X1 est principalement exprimé à la membrane plasmique, interagissant avec la protéine *shock protein 90* qui favorise son trafic à la membrane, cependant, étant vite

désensibilisé, il peut subir une internalisation et un recyclage agoniste-dépendant ponctuel, de même que le récepteur P2X3 (Ennion and Evans, 2001; Lalo et al., 2010; Lalo et al., 2012; Vacca et al., 2009). L'internalisation agoniste-dépendant du récepteur P2X3 se fait dans les lysosomes où le récepteur est rapidement dégradé (Vacca et al., 2009).

En plus de moduler le trafic des récepteurs P2X, la liaison de l'agoniste peut également avoir un effet sur leur mobilité au niveau du plan latéral de la membrane plasmique, ce qui déclenche un afflux local de Ca^{2+} . En réponse à l'ATP, les récepteurs P2X2 et P2X4 ont une mobilité augmentée, avec deux populations : des *pools* de récepteurs lents et d'autres rapides (Richler et al., 2011; Toulme and Khakh, 2012). A l'heure actuelle, l'implication de cette mobilité latérale accrue dans la signalisation des récepteurs P2X reste à être établie.

1.2.3.5.2 Trafic du récepteur P2X4

En conditions basales, le récepteur P2X4 est peu présent à la surface des cellules étant fortement et constitutivement internalisé dans les neurones mais aussi dans les cellules endothéliales, la microglie et les macrophages. Comme déjà mentionné, l'endocytose constitutive du récepteur P2X4 dépendante de la clathrine est provoquée par l'interaction entre le domaine C-terminal de P2X4 et la sous-unité $\mu 2$ du complexe adaptateur (AP2) de la même manière que les motifs canoniques (Qureshi et al., 2007; Royle et al., 2002). Deux motifs d'internalisation du récepteur P2X4 ont été identifiés dans le domaine C-terminal au niveau des tyrosines 372 et 378. Par mutagenèse il a été montré que le motif atypique $\text{Y}_{378}\text{XXGL}$ est préférentiellement utilisé pour l'internalisation des récepteurs P2X4. Le motif canonique caché par des interactions permettant la formation du pore, est rendu inaccessible pour la liaison avec AP2 (Royle et al., 2005). En effet, des mutations ponctuelles du motif $\text{Y}_{378}\text{XXGL}$, augmentent de manière importante le nombre de récepteurs P2X4 en surface. Le récepteur P2X4 internalisé est ensuite préférentiellement adressé vers les endosomes et les lysosomes (Royle et al., 2005). Cet adressage implique un motif dileucine L22 et I23 du domaine N-terminal du récepteur dont la mutation diminue le nombre de récepteurs dans les lysosomes et augmente le nombre de récepteurs P2X4 à la membrane plasmique. De ce fait, le récepteur P2X4 est majoritairement retrouvé dans des *pools* intracellulaires en condition physiologique. (Qureshi et al., 2007). Qureshi *et al.* ont également montré que le récepteur P2X4 n'était étonnement pas clivé dans l'environnement acide et protéolytique des lysosomes. Il est en effet protégé de la protéolyse par un complexe de 6 oligosaccharides liés sur sa partie extracellulaire (Qureshi et al., 2007).

La localisation lysosomale du récepteur P2X4 coïncide avec la présence d'ATP au niveau des lysosomes dans les astrocytes (Zhang et al., 2007), la microglie (Dou et al., 2012) et les hépatocytes (Besnard et al., 2016). La présence d'ATP dans les lysosomes est due au transporteur de nucléotides vésiculaire VNUT/SLC17A9 présent dans la membrane lysosomale transportant l'ATP à travers celle-ci (Cao et al., 2014). Huang *et al.* ont montré, par des expériences de *whole-lysosome patch clamp* des lysosomes, que le récepteur P2X4 lysosomal est activé par l'ATP luminal lorsque le pH est à 7,4 (Huang et al., 2014b), expliquant que, en condition physiologique, les niveaux élevés d'ATP dans les lysosomes, ayant un pH compris entre 3,5 et 5, ne conduisent pas à l'activation du récepteur P2X4. Une stratégie originale a récemment été développée pour suivre la distribution cellulaire du récepteur P2X4 dans divers compartiments (Xu et al., 2014). En utilisant une construction du récepteur fusionné avec une protéine fluorescente sensible au pH (pHluorin), les auteurs ont démontré que le récepteur P2X4 été préférentiellement localisé dans les compartiments cellulaires acides (Xu et al., 2014). De plus, il a été montré que l'activation du récepteur P2X4 intracellulaire était impliquée dans la fusion des endosomes et des lysosomes tardifs. Plus précisément, l'entrée de Ca^{2+} par le récepteur P2X4 active la calmoduline qui s'associe au récepteur lui-même et favorise la fusion et la vacuolisation des vésicules (Cao et al., 2015; Murrell-Lagnado and Frick, 2019). Au niveau des lysosomes, de plus en plus d'évidences tendant à montrer que le récepteur P2X4 joue un rôle physiologique, notamment dans la sécrétion de surfactant par les cellules épithéliales pulmonaires (Fois et al., 2018; Miklavc et al., 2011; Thompson et al., 2013), cependant les conditions de son activation au sein des lysosomes restent floues.

De manière intéressante, il a été montré que le trafic de surface des récepteurs P2X4 est augmenté en réponse à des stimuli qui favorisent l'exocytose des lysosomes dans les macrophages et dans des cultures de lignée microgliales (Qureshi et al., 2007; Toulme et al., 2010). Une augmentation de l'expression et/ou du trafic en surface du récepteur P2X4 a été montrée dans de nombreuses conditions physiopathologiques telles que la douleur chronique, et les maladies neurodégénératives au niveau de la microglie et/ou des neurones (Apolloni et al., 2009; Beggs et al., 2012; Burnstock, 2008; Casanovas et al., 2008; Cavaliere et al., 2003; Franke and Illes, 2006) suggérant un rôle important de l'expression du récepteur P2X4 et de la régulation de son trafic de surface dans l'étiologie de ces pathologies.

1.2.3.6 Localisation, fonctions et rôles physiopathologiques

Les récepteurs P2X sont exprimés dans de nombreux types cellulaires et sont présents au niveau de la peau, des muscles, du colon, de l'intestin, du pancréas, du cœur, des vaisseaux, de la vessie et également au niveau du SNC et SNP dans les neurones et les cellules gliales. Du fait de leur expression très étendue, ils ont de multiples fonctions au sein de l'organisme et sont également associés à de nombreuses pathologies qui sont évoquées rapidement ci-dessous, avec un rôle central du récepteur P2X4 dans le SNC qui est abordé plus en détail.

Subtype	Phenotype (mouse model)	Physiological function
P2X1	Male infertility (KO)	Smooth muscle contraction
	Impaired kidney function (KO)	Renal autoregulation
	Reduced arterial thrombosis (KO)/prothrombotic phenotype (TG)	Platelet activation
P2X2	Impaired synaptic facilitation (KO)	Regulation of transmitter release in hippocampus
	Reduced inflammatory pain (KO, DKO)	Nociceptive signalling
	Impaired peristalsis in small intestine (KO)	Intestinal neurotransmission
	Attenuated ventilatory response to hypoxia (KO, DKO)	Carotid body function
	Urinary bladder hyporeflexia (KO, DKO)	Sensory neurotransmission
	Impaired taste sensing (DKO)	Gustatory signalling
	Abnormal skeletal neuromuscular junctions (KO)	Endplate formation
P2X3	Impaired hippocampal LTD (KO)	Regulation of synaptic plasticity
	Reduced pain responses (KO, DKO)	Nociceptive signalling
	Impaired peristalsis in small intestine (KO)	Intestinal neurotransmission
	Urinary bladder hyporeflexia (KO, DKO)	Sensory neurotransmission
	Impaired temperature sensitivity (KO)	Thermal sensation
	Impaired taste sensing (DKO)	Gustatory signalling
P2X4	Decreased hippocampal LTP (KO)	Regulation of synaptic plasticity
	Reduced inflammatory and neuropathic pain (KO)	Modulation of chronic pain (regulation of BDNF and PGE2 release from activated microglia/macrophages)
	Higher blood pressure, lack of vascular remodelling, decreased flow-induced release of NO (KO) Improved heart function (TG)	Regulation of vascular tone Control of contractility of the cardiomyocytes
P2X7	Abolished IL-1 β release, diminished inflammatory responses (KO)	Pro-inflammatory cytokine release
	Reduced inflammatory and neuropathic pain (KO)	Immune cells activation
	Skeletal abnormalities (KO)	Bone metabolism
	Reduced fluid secretion in salivary gland and pancreas (KO)	Regulation of exocrine gland secretion

Tableau 2 : Principales fonctions physiologiques des différents sous-types de récepteurs P2X déterminées grâce à l'utilisation d'animaux transgéniques (d'après Kaczmarek-Hajek et al., 2012). KO = animaux *knock-out* ; DKO = animaux double *knock-out* ; TG = souris transgéniques.

1.2.3.6.1 Périphérie

1.2.3.6.1.1 Cellules épithéliales et sécrétion

Le récepteur P2X4, tout comme le récepteur P2X7 qui lui est proche phylogénétiquement, est principalement associé à des épithéliums sécrétoires, permettant le transport direct d'ions tels que le Ca^{2+} , le Na^{2+} et le K^{+} à travers la membrane plasmique (Novak, 2011). Les récepteurs P2X4 et P2X7 sont particulièrement étudiés au niveau des cellules sécrétoires pancréatiques et salivaires, qui répondent à l'ATP et dans lesquelles l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire due à ces récepteurs est un facteur clé dans le processus d'exocytose (Bhattacharya et al., 2012; Hansen et al., 2008; Novak, 2011). Dans les cellules épithéliales pulmonaires, le récepteur P2X4 est associé à l'exocytose de surfactants pulmonaires et au transport de fluide alvéolaire (Miklavc et al., 2013), ce qui en fait un acteur clé de l'homéostasie des voies respiratoires. On retrouve également les récepteurs P2X4 et P2X7 interagissant de manière fonctionnelle au niveau de l'épithélium des glandes salivaires conduisant à l'exocytose (Bhattacharya et al., 2012; Casas-Pruneda et al., 2009).

1.2.3.6.1.2 Hépatocytes et régénération du foie

Au niveau du foie, le récepteur P2X4 est exprimé dans les hépatocytes et les cellules de Kupfer et son activation contribue à la régénération du foie (Gonzales et al., 2010). Chez les souris P2X4 KO, une régénération retardée, une nécrose des hépatocytes et une cholestase ont été observées dû à une adaptation biliaire altérée (Besnard et al., 2016). Ainsi, lors de la régénération hépatique post-chirurgicale, P2X4 contribue au contrôle complexe de l'homéostasie biliaire par le biais de mécanismes impliquant des lysosomes péri-canaliculaires.

1.2.3.6.1.3 Système cardiovasculaire

Au niveau du système cardiovasculaire, les récepteurs P2X sont impliqués dans la régulation du tonus vasculaire avec la contribution du récepteur P2X1 dans la constriction artérielle (Ralevic and Dunn, 2015) et du récepteur P2X3 présent au niveau des chémorécepteurs aortiques et carotidiens, agissant dans le contrôle plus centralisé de la pression artérielle (Piskuric and Nurse, 2013). Un rôle du récepteur P2X4 dans le contrôle de la pression sanguine a également été reporté : l'augmentation de la pression sanguine est l'un des premiers phénotypes décrit chez la souris P2X4 KO (Yamamoto et al., 2006) et un tel rôle a été retrouvé chez l'Homme chez lequel est associé un polymorphisme de perte de fonction du récepteur P2X4 humain à une augmentation de la pression artérielle (Stokes et al., 2011). En effet, dans

la physiologie l'activation du récepteur P2X4 par l'ATP, et l'influx de Ca^{2+} en résultant, provoque la libération de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales conduisant à la relaxation des muscles lisses artériels (Ralevic and Dunn, 2015). De plus, un rôle potentiel de la voie des récepteurs P2X7 et de l'inflammasome est suggéré dans l'athérosclérose, facteur de risque cardiovasculaire important, qui comporte une composante inflammatoire (Stachon et al., 2017).

1.2.3.6.1.4 Cellules sanguines, thrombose, immunité et inflammation

Les récepteurs P2X sont exprimés sur une variété de cellules sanguines et immunitaires et des implications fonctionnelles ont pu être démontrées pour les sous-types P2X1, P2X4 et P2X7. Leurs rôles prédominants sont : la coagulation sanguine pour le récepteur P2X1, qui est impliqué dans le phénomène de thrombose (Oury et al., 2015), et les réponses immunitaires et l'inflammation pour les récepteurs P2X4 et P2X7.

Dans l'asthme, les courants fonctionnels induits par les récepteurs P2X1 sont réduits, associés à une diminution de l'adhésion des éosinophiles (Wright et al., 2016). Le récepteur P2X4 est élevé chez les patients asthmatiques et dans les modèles murins d'asthme (Zech et al., 2016). L'inhibition du récepteur P2X4 dans le modèle de souris asthmatiques soulage de multiples symptômes associés tels que l'éosinophilie, l'inflammation, la production de mucus et l'infiltration cellulaire dans les voies respiratoires (Chen et al., 2016; Zech et al., 2016).

Des études récentes ont montré un rôle du récepteur P2X7 dans l'infection et l'inflammation (Di Virgilio et al., 2017). En effet, le récepteur P2X7 joue un rôle dans le rejet d'allogreffe (Amores-Iniesta et al., 2017; Vergani et al., 2014) et son activation est impliquée dans la réponse des macrophages aux infections (Csoka et al., 2015). Les rôles thérapeutiques potentiels des activateurs ou modulateurs allostériques positifs du récepteur P2X7 ont également été évoqués dans le traitement du VIH (Graziano et al., 2015; Michel et al., 2008). Dans les cellules inflammatoires, l'activation du récepteur P2X7 peut conduire à l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui initie la libération d'interleukines pro-inflammatoires (Albalawi et al., 2017). Un rôle du récepteur P2X4 a également pu être décelé dans l'inhibition de l'infection, bien qu'il soit beaucoup moins documenté que celui du récepteur P2X7 (Coutinho-Silva et al., 2003; Fairbairn et al., 2001; Lammas et al., 1997; Pettengill et al., 2012; Stober et al., 2001). Dans les cellules épithéliales gingivales, P2X4 potentialise la production de ROS et l'activation de l'inflammasome NLRP3 autrement induite par l'activation du récepteur P2X7 (Hung et al., 2013). En plus de leurs rôles fonctionnels dans les cellules

immunitaires, les récepteurs P2X7 sont également exprimés par une variété de carcinomes (Burnstock and Di Virgilio, 2013; Di Virgilio and Adinolfi, 2017).

Le récepteur P2X4 joue un rôle majeur dans l'inflammation de par sa forte expression dans les cellules immunitaires périphériques notamment les monocytes et les macrophages ainsi que dans la microglie activée au niveau du SNC (Antonioli et al., 2019; Vazquez-Villoldo et al., 2014). Dans les monocytes, le récepteur P2X4 est le plus abondants des sous-types P2X, suivi par le P2X7 et P2X1 (Layhadi and Fountain, 2017). Les macrophages péritonéaux murins expriment des récepteurs P2X4 et P2X7 actifs et fonctionnels (Brone et al., 2007; Sim et al., 2007). Le récepteur P2X4 a également été détecté dans les macrophages alvéolaires chez l'homme et le rat (Stokes and Surprenant, 2009). Les auteurs ont décrit une régulation dynamique du récepteur au cours des différentes phases d'activation des macrophages avec une augmentation à la surface rapide en réponse à la phagocytose (Stokes and Surprenant, 2009). En revanche, l'activation classique des macrophages provoquée par leur incubation avec IFN- γ et TNF- α ou avec IFN- γ et le LPS, réduit le trafic à la surface des récepteurs P2X4 et diminue les courants induits par l'ATP sans affecter le niveau protéique total du récepteur (Stokes and Surprenant, 2009). L'activation alternative des macrophages avec IL-4 ou IL-13 ne modifie ni l'expression, ni le trafic en surface ni la fonction de ces récepteurs (Stokes and Surprenant, 2009). D'après ces observations, les auteurs ont émis l'hypothèse d'un scénario dans lequel un stimulus inflammatoire ou bactérien induirait le trafic rapide des récepteurs P2X4 à la surface des macrophages, provoquant un afflux croissant de Ca²⁺ favorisant ainsi leur activité (Stokes and Surprenant, 2009). Après l'activation des macrophages, un mécanisme de rétroaction se développe certainement pour freiner le trafic des récepteurs P2X4 vers la membrane permettant de faciliter l'arrêt de l'inflammation (Stokes and Surprenant, 2009). Des études récentes ont mis en évidence des interactions moléculaires et fonctionnelles entre les récepteurs P2X4 et P2X7 (Kawano et al., 2012a; Kawano et al., 2012b; Perez-Flores et al., 2015). En particulier, une interaction physique entre les deux récepteurs se produit *via* leur pontage par l'extrémité C-terminale du récepteur P2X7 (Perez-Flores et al., 2015) et est facilitée par la présence d'ATP extracellulaire (Perez-Flores et al., 2015). Kawano et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle du récepteur P2X4 dans la modulation des fonctions inflammatoires dépendantes du récepteur P2X7 en montrant une interaction fonctionnelle entre les récepteurs P2X4 et P2X7 entraînée par une modulation des concentrations du Ca²⁺ intracellulaire (Kawano et al., 2012a).

1.2.3.6.1.5 Système nerveux sensoriel et périphérique

L'ATP peut être libéré par un grand nombre de types cellulaires, y compris les cellules épithéliales et les kératinocytes, en réponse à un stimulus, par exemple suite à une pression ou une extension qui va provoquer une distension de leur membrane plasmique. L'ATP ainsi libéré et l'activation des récepteurs P2X présents dans les terminaisons nerveuses va permettre la transduction du signal. Ce mécanisme est impliqué dans le réflexe de miction de la vessie (Cockayne et al., 2005; Edwards et al., 1992; Edwards et al., 1997; Jo and Schlichter, 1999; Pankratov et al., 2002a; Pankratov et al., 2007; Pankratov et al., 2002b), la sensation de goût (Kinnamon and Finger, 2013), l'audition (Housley et al., 2013; Yan et al., 2013) et le toucher (Moehring et al., 2018).

Les papilles gustatives libèrent de l'ATP qui agit sur les récepteurs P2X3 et P2X2/3. L'inactivation génétique des récepteurs P2X2 et P2X3 ainsi que le blocage pharmacologique des récepteurs contenant la sous-unité P2X3, abolissent ou réduisent de manière significative les réponses à différents aliments (Kinnamon and Finger, 2013).

Les récepteurs P2X2 contribuent à la transduction auditive avec un rôle au niveau des cils et des cellules de soutien. Des études menées chez l'Homme ont montré qu'un polymorphisme négatif dominant entraîne une perte auditive progressive apparaissant de manière significative au début de la vingtaine (Yan et al., 2013). Les souris KO pour le récepteur P2X2 présentent également une perte auditive et ont été utilisées pour montrer que le récepteur P2X2 dans la cochlée était impliqué dans l'adaptation à des niveaux sonores élevés (Housley et al., 2013).

Des études utilisant des approches optogénétiques pour contrôler le potentiel de membrane dans les kératinocytes, ont montré que ces derniers étaient impliqués dans la sensation de toucher, la pression conduisant à une dépolarisation de leur membrane et à une libération d'ATP. D'autres travaux portant sur l'ablation génétique de P2X2 spécifiquement dans les neurones sensoriels ont montré que l'ATP agissait *via* les récepteurs P2X4 pour induire la sensation de toucher en utilisant un antagoniste spécifique du récepteur et l'IVM (Moehring et al., 2018).

1.2.3.6.2 *Système nerveux central et rôle clé du récepteur P2X4*

Dans le SNC, l'ATP libérée par les cellules gliales et les neurones active les récepteurs P2X présents au niveau des neurones en pré- et postsynaptique mais également au niveau des astrocytes et de la microglie, déclenchant divers processus au sein de ces cellules (Beamer et al., 2016; Butt, 2011; Fields and Burnstock, 2006; Garre et al., 2010; George et al., 2016;

Gordon et al., 2005; Gordon et al., 2009; Gourine et al., 2010; Halassa et al., 2009; Lalo et al., 2014; Lalo et al., 2016; Pougnet et al., 2014; Rasooli-Nejad et al., 2014). Parmi les récepteurs P2X, P2X4 ainsi que P2X2 et P2X6 sont les sous-types les plus répandus et abondamment exprimés au sein du SNC, retrouvés dans la plupart des neurones et les cellules gliales (Amadio et al., 2007; Buell et al., 1996; Guo et al., 2005; Soto et al., 1996a; Soto et al., 1996b; Tsuda et al., 2003a; Vazquez-Villoldo et al., 2014).

En ce qui concerne le récepteur P2X4, Soto et ses collègues ont mesuré des taux élevés d'ARNm P2X4 dans des cellules granulaires du gyrus denté, les cellules pyramidales des régions CA1/CA3 de l'hippocampe mais aussi dans les cellules de Purkinje du cervelet (Soto et al., 1996a). La microscopie électronique suggère une localisation du récepteur P2X4 dans les régions péri-synaptiques des terminaisons post-synaptiques et au niveau des terminaisons présynaptiques (Rubio and Soto, 2001). Des études immunohistochimiques montrent également que le récepteur est exprimé dans les interneurons GABAergiques et les neurones épineux GABAergiques du striatum et de la substance noire de rat (Amadio et al., 2007). Le récepteur P2X4 est exprimé dans l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure où il est impliqué dans la régulation des fonctions hypothalamo-hypophysaires du SNC (Stojilkovic, 2009). Des études immunohistochimiques ont identifié le récepteur P2X4 sur des neurones des noyaux paraventriculaires, arqués et pré-optiques de l'hypothalamus. Dans ce dernier, la fonction des récepteurs P2X4 a pu être enregistrée ainsi que dans les cellules lactotropes de l'hypophyse (Cham et al., 2006; He et al., 2003; Stojilkovic and Zemkova, 2013; Vavra et al., 2011; Zemkova et al., 2010). Il a également été démontré que le récepteur P2X4 s'exprimait dans les neurones corticaux somatosensoriels (Lalo et al., 2007), les neurones des ganglions du nodose (Tan et al., 2009), du trijumeau (Luo et al., 2006), vestibulaires (Ito et al., 2010) et de la rétine (Wheeler-Schilling et al., 2001) mais aussi dans des neurones de la ME (Bardoni et al., 1997; Kobayashi et al., 2005). Le développement d'une souris exprimant la tdTomato sous le contrôle du promoteur du récepteur P2X4 a pu confirmer la distribution étendue du récepteur dans le SNC ainsi que sa surexpression dans la microglie activée. Ces travaux ont également mis en évidence la nouvelle contribution du récepteur P2X4 dans la régulation de la prise alimentaire avec un rôle présynaptique dans le noyau arqué hypothalamique potentialisant la libération de GABA (Xu et al., 2016).

Bien qu'il existe de solides preuves d'une transmission rapide médiée par l'ATP *via* les récepteurs P2X au niveau du système périphérique, une telle forme de transmission synaptique au niveau du SNC est plus rare (Abbracchio et al., 2009). A la suite de la première évidence de

l'existence de courants rapides postsynaptiques médiées par l'ATP enregistrés au niveau de l'habenula (Edwards et al., 1992; Edwards et al., 1997), une transmission synaptique rapide induite par l'activation des récepteurs P2X postsynaptiques a également été rapportée dans plusieurs régions du cerveau telles que le *locus coeruleus*, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cortex ainsi que dans la ME (Jo and Schlichter, 1999; Lalo et al., 2011; Pankratov et al., 2002a; Pankratov et al., 2002b; Villa et al., 2016). Cependant, les courants post-synaptiques médiés par les récepteurs P2X nécessitent généralement une forte stimulation électrique des fibres afférentes et ont une faible amplitude (Lalo et al., 2016). Aucune preuve d'initiation de potentiel d'action induite par l'activation des récepteurs P2X par l'ATP libéré au niveau synaptique n'existe à ce jour dans le CNS. Seulement de rares courants postsynaptiques excitateurs spontanés ou miniatures induits par les récepteurs P2X ont pu être enregistrés au niveau des synapses centrales, traduisant l'idée que les récepteurs P2X post-synaptiques n'ont pas un grand rôle dans la neurotransmission excitatrice rapide dans les synapses du cerveau (Khakh and North, 2012), même si différentes sous-unités P2X ont pu être détectées au niveau postsynaptique dans les synapses glutamatergiques (Rodrigues et al., 2005).

Plusieurs études ont suggéré que les récepteurs P2X postsynaptiques et l'ATP co-libéré avec les principaux NT rapides tels que le glutamate ou le GABA (Khakh and North, 2012) modulaient les réponses synaptiques induites par les récepteurs au glutamate et au GABA. Des travaux récents ont montré que l'ATP libéré par les cellules gliales agissant sur les récepteurs P2X postsynaptiques avait des effets sur la quantité de NT libérée et la plasticité des synapses excitatrices et inhibitrices de plusieurs zones du cerveau (Gordon et al., 2005; Gordon et al., 2009; Lalo et al., 2014; Lalo et al., 2016; Pougnet et al., 2016; Pougnet et al., 2014). Les récepteurs P2X sont également présents au niveau présynaptique (Rodrigues et al., 2005) et des effets présynaptiques des récepteurs P2Y et P2X sur la libération de glutamate, de GABA et d'autres NT ont été reportés dans différentes régions du cerveau et de la ME (Abbracchio et al., 2009; Burnstock, 2007; Gomez-Villafuertes et al., 2001; Gu and MacDermott, 1997; Rodrigues et al., 2005; Rodrigues et al., 2015). Ces résultats suggèrent que le rôle principal de la signalisation purinergique dans le SNC est la neuromodulation plutôt que la neurotransmission rapide (Khakh and North, 2012). En effet, jusqu'à présent, aucune des synapses cérébrales décrites n'utilise l'ATP comme NT principal. L'ATP est un co-transmetteur fréquemment co-libérée par les terminaisons glutamatergiques ou GABAergiques (Jo and Schlichter, 1999; Lalo et al., 2016; Mori et al., 2001; Pankratov et al., 2002a; Villa et al., 2016).

La microscopie électronique a indiqué que les récepteurs P2X2, P2X4 et P2X6 étaient exprimés de manière prédominante dans les neurones du SNC au niveau post-synaptique. Ces récepteurs sont présents majoritairement à la marge de la densité post-synaptique au niveau de l'espace péri- et extrasynaptique (Rubio and Soto, 2001). Les récepteurs de l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) et de l'acide γ -aminobutyrique A (GABA_AR), qui interviennent respectivement dans la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice rapide, sont au contraire concentrées dans la membrane postsynaptique en face des sites de libération des NT (Baude et al., 1995; Hansen et al., 1991). Les AMPAR et GABA_AR sont plus ou moins mobiles à la surface des cellules alternant entre des périodes de grande mobilité dans les régions extrasynaptiques et des périodes d'immobilisation au niveau des synapses (Triller and Choquet, 2005). En revanche, les récepteurs P2X sont très mobiles à la surface des cellules. P2X2 est hautement mobile dans les dendrites et à la périphérie des synapses mais semble ne pas entrer dans la densité post-synaptique (Richler et al., 2011). Les récepteurs P2X4 sont également très mobiles à la surface de la microglie et la diffusion des deux récepteurs est facilitée lors de leur activation par l'ATP (Toulme and Khakh, 2012). L'absence de courant synaptique détectable induit par l'activation des récepteurs P2X est également en accord avec le fait que les récepteurs P2X4 sont peu présent à la surface en conditions normales (Bobanovic et al., 2002; Jo et al., 2011).

1.2.3.6.2.1 Modulation de la transmission synaptique excitatrice

Les récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) et AMPAR jouent des rôles critiques dans la transmission synaptique excitatrice et la plasticité du SNC (Kessels and Malinow, 2009).

Les AMPAR sont des récepteurs cationiques tétramériques, activés par le glutamate, composés de sous-unités GluA1-A4 (Traynelis et al., 2010). Ces récepteurs sont fortement exprimés au niveau de la densité post-synaptique des synapses excitatrices glutamatergiques et sont responsables de la dépolarisation synaptique. Leur diffusion latérale ainsi que leur trafic intracellulaire (endocytose/exocytose), conduit à la potentialisation à long terme (LTP) et à la dépression à long terme (LTD), connus pour sous-tendre des fonctions cognitives telles que l'apprentissage et la mémoire (Heine et al., 2008; Kessels and Malinow, 2009; Malinow and Malenka, 2002). Le trafic des AMPAR est régulé par de nombreuses modifications post-traductionnelles de leurs domaines intracellulaires ainsi que par l'interaction avec d'autres protéines (Anggono and Huganir, 2012; Nicoll et al., 2006). Les changements rapides bidirectionnels du nombre d'AMPA synaptiques sont principalement déclenchés par

l'activation des NMDAR ou de mGluR pendant la plasticité synaptique. Des études ont montré que l'activation des récepteurs P2X postsynaptiques par la libération d'ATP des astrocytes modulaient également le trafic de surface des AMPAR provoquant des changements durables de l'activité synaptique (Gordon et al., 2005; Pougnet et al., 2014).

Une première étude a montré qu'une stimulation des récepteurs noradrénergiques astrocytaires entraînait une libération d'ATP par les astrocytes qui menait à une augmentation des courants miniatures excitateurs post synaptiques (mEPSC) enregistrés dans les neurones du noyau paraventriculaire hypothalamique (Gordon et al., 2005). Cette augmentation est due à l'influx de Ca^{2+} induit par l'activation des récepteurs P2X postsynaptiques et la stimulation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) favorisant l'insertion des AMPAR à la synapse. L'effet de l'ATP est bloqué par l'utilisation du *Brilliant Blue G* (BBG) suggérant l'implication des récepteurs P2X7, cependant comme P2X7 est rarement exprimé dans les neurones (Kaczmarek-Hajek et al., 2018), ce mécanisme est certainement restreint à des populations neuronales spécifiques et pourrait impliquer d'autres sous-types de P2X, comme l'hétéromère P2X2/5 aux propriétés fonctionnelles similaires (Compan et al., 2012).

De manière opposée, une deuxième étude a montré que l'activation des récepteurs P2X postsynaptiques par l'ATP astrocytaire, certainement P2X2, module l'efficacité synaptique glutamatergique au niveau de l'hippocampe, mais en diminuant de manière durable les courants synaptiques AMPA (Pougnet et al., 2014) provoquant ainsi une dépression synaptique dans la région CA1 de l'hippocampe. L'entrée de Ca^{2+} via l'ouverture des récepteurs P2X2 ou P2X4 déclenche l'internalisation des AMPAR dépendante de la dynamine associée à une phosphorylation de la sous-unité GluA1 par la CaMK2 (Pougnet et al., 2016; Pougnet et al., 2014).

Ces études montrent que la libération d'ATP astrocytaire activant les récepteurs P2X peut moduler positivement ou négativement la transmission glutamatergique synaptique selon les régions étudiées et/ou le sous-type de récepteur P2X impliqué.

Les NMDAR sont des récepteurs cationiques activés par le glutamate et leur co-agoniste la glycine ou la D-serine et sont responsables de la phase lente des potentiels synaptiques excitateurs (PPSE). Ils sont impliqués dans les phénomènes de plasticité à long terme. La manipulation des récepteurs P2X module l'expression de la LTP dépendante des NMDAR dans les neurones CA1 de l'hippocampe. En effet, l'inhibition pharmacologique des récepteurs P2X

facilite l'induction de la LTP dépendante des NMDAR (Pankratov et al., 2009; Pankratov et al., 2002b) suggérant que l'activation des récepteurs P2X réduit cette LTP.

Une autre étude réalisée chez les souris P2X4 KO a mis en évidence une implication des récepteurs P2X4 dans la modulation de la LTP suggérant à l'inverse que les récepteurs P2X4 favorisent la LTP (Sim et al., 2006). En effet, l'enregistrement extracellulaire des potentiels de champs de la région CA1 de l'hippocampe chez ces souris a révélé une LTP sensiblement réduite comparée aux souris WT. L'IVM, modulateur allostérique positif du récepteur P2X4, augmente la LTP chez les souris WT alors qu'elle est inefficace chez des souris P2X4 KO (Sim et al., 2006). Ces résultats suggèrent que la potentialisation spécifique de P2X4 contribue au renforcement de l'activité synaptique au cours de la LTP *via* le récepteur P2X4 et l'entrée de Ca^{2+} qui favoriseraient l'incorporation à la membrane de récepteurs NMDA (Baxter et al., 2011).

Cependant, l'IVM n'a pas d'effet sur les fEPSP (ou fEPSC) lorsque les stimulations sont appliquées à basses fréquences, mais son effet est réel lors de stimulations téaniques, suggérant une activation du récepteur P2X4 que lors d'activités neuronales soutenues. Une autre étude a montré que l'ATP, provenant des synapses excitatrices individuelles ou des cellules gliales, pouvait activer les récepteurs P2X des neurones néocorticaux et réduire les courants induits par les NMDAR (Lalo et al., 2016). Cet effet est reversé chez les souris P2X4 KO chez qui la LTP est augmentée, suggérant un rôle inhibiteur des récepteurs P2X4 sur la LTP.

Le rôle des récepteurs P2X4 dans la plasticité à long terme reste donc controversé, mais l'ensemble de ces travaux montrent que les récepteurs P2X postsynaptiques jouent un rôle important et complexe dans la modulation bidirectionnelle de la transmission excitatrice glutamatergique et inhibitrice GABAergique.

1.2.3.6.2.2 Modulation de la transmission synaptique inhibitrice

La transmission synaptique inhibitrice est assurée en grande partie par le GABA dans le SNC. Il agit sur deux types de récepteurs au niveau des synapses : les récepteurs-canaux $GABA_A$, qui entraînent une entrée de Cl^- et une hyperpolarisation membranaire lorsqu'ils sont activés et les récepteurs métabotropiques $GABA_B$ associé aux protéines Go ou Gi. La modulation directe des récepteurs GABA ($GABAR$) par les récepteurs P2X postsynaptiques, a été identifiée dans l'hypothalamus où le blocage de l'endocytose constitutive des récepteurs P2X4 entraîne une dépression des courants GABAergiques et de ce fait, une augmentation de l'excitabilité

neuronale, dû à un couplage physique entre le récepteur P2X4 et GABA_AR (Jo and Boue-Grabot, 2011; Jo et al., 2011). Comme nous l'avons vu précédemment, d'autres interactions physiques ont été décrites pour les récepteurs GABA_A et 5-HT3 avec les sous-types P2X2 et P2X3 qui provoquent des inhibitions fonctionnelles croisées et un changement de l'adressage des récepteurs GABA_A et 5-HT3 (Boue-Grabot et al., 2004a; Boue-Grabot et al., 2004b; Shrivastava et al., 2011a). Une étude récente a montré que la libération d'ATP astrocytaire au niveau du cortex module l'inhibition GABAergique *via* des phénomènes de phosphorylation dépendants de l'entrée de Ca²⁺ par les récepteurs P2X (Lalo et al., 2014). La diminution de l'inhibition GABAergique par les récepteurs P2X peut faciliter l'induction de la LTP.

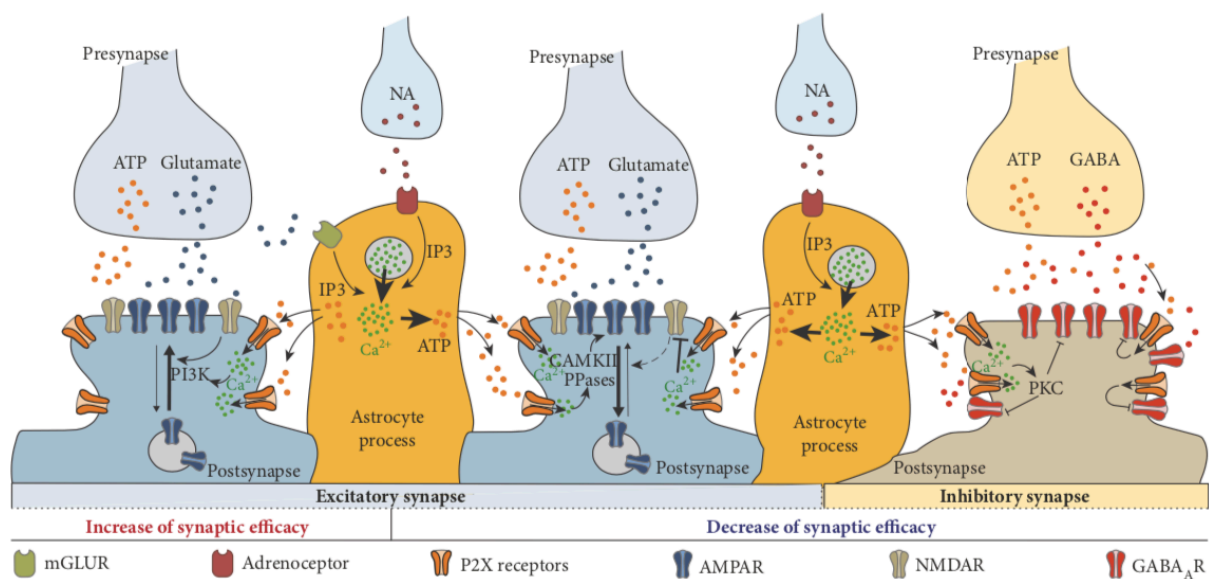


Figure 6 : Neuromodulation des synapses excitatrices et inhibitrices par les récepteurs P2X (d'après Boué-Grabot and Pankratov 2017). Résumé des mécanismes de modulation de l'activité des synapses suite à l'activation des récepteurs P2X postsynaptiques suite à une libération d'ATP astrocytaire ou neuronale. La noradrénaline (NA) et le glutamate entraînent une libération d'ATP par les astrocytes (orange). L'activation des récepteurs P2X post-synaptiques au niveau des synapses glutamatergiques (bleu) peut provoquer soit une insertion des AMPAR de manière dépendante de la PI3K menant à une augmentation de l'excitabilité (LTP) (gauche) soit une internalisation des AMPAR dépendant de la CaMK2 conduisant à une dépression synaptique (LTD) (milieu). Les récepteurs P2X peuvent également altérer la plasticité des synapses glutamatergiques en inhibant la fonction des NMDAR en interférant avec le complexe PSD95-NMDAR. Au niveau des synapses inhibitrices (marron), la libération d'ATP gliale ou neuronale diminue l'efficacité GABAergique par des altérations directes ou indirectes des GABA_AR (droite).

1.2.3.6.2.3 Communication neuro-gliale

La signalisation purinergique joue un rôle important dans la communication entre les neurones et les cellules gliales. En effet, d'une part toutes les classes de cellules gliales (oligodendrocytes, cellules macrogliales formant la gaine de myéline le long des axones, astrocytes et microglie) expriment des récepteurs purinergiques. D'autre part, ces cellules sont également capables de libérer des purines et jouent un rôle important dans la signalisation entre les cellules gliales elles-mêmes ainsi qu'entre les cellules gliales et les neurones comme nous venons de le voir par l'action de l'ATP astrocytaire sur la modulation synaptique.

Durant les dix dernières années, une attention particulière a été portée sur la microglie qui exprime majoritairement les sous-types P2X4 et P2X7. De manière fort intéressante, l'expression de P2X4 ainsi que le nombre de récepteurs à la surface et totale sont fortement augmentés dans de nombreuses conditions physiopathologiques où la microglie est activée (voir partie 1.2.3.6.2.4 Physiopathologie).

Au niveau des astrocytes, on retrouve l'expression des récepteurs P2X1, P2X5 et P2X7 *in situ* et *in vivo* (Dixon et al., 2004; Franke et al., 2004; Fumagalli et al., 2003; Kukley et al., 2001). L'expression du récepteur P2X4 a été révélée par immunomarquage, notamment sur des astrocytes S100 β positifs au niveau de l'hippocampe de rat dans les régions CA1, CA3 et du gyrus denté (Kukley et al., 2001). Cependant, aucune expression de l'ARNm du récepteur n'a été détectée dans les astrocytes corticaux isolés de souris, ce qui est en accord avec les études fonctionnelles sur des astrocytes corticaux isolés (Jabs et al., 2007; Lalo et al., 2008). Par conséquent, il existe aujourd'hui peu de preuves de la présence du récepteur P2X4 dans les astrocytes. Par contre, l'expression de plusieurs types de récepteurs P2, y compris P2X4, a été démontrée dans les oligodendrocytes (Agresti et al., 2005).

1.2.3.6.2.4 Physiopathologie

Les récepteurs P2X, notamment les sous-types P2X4 et P2X7, *via* leur implication dans les processus inflammatoires, sont impliqués dans de nombreuses pathologies du SNC telles que les ischémies cérébrales, l'épilepsie, les maladies neurodégénératives ou encore certaines maladies neuropsychiatriques comme la dépression, l'anxiété ou les addictions. En ce qui concerne le récepteur P2X4, son expression ainsi que son trafic peuvent être altérés en conditions physiopathologiques. De tels dysfonctionnements ont été reportés dans de nombreuses pathologies avec une surexpression à la surface et/ou totale du récepteur au niveau

des neurones et/ou de la glie (Burnstock, 2017b). Nous décrivons ici plus particulièrement le rôle clé des récepteurs P2X4 dans différentes pathologies du SNC.

Pathologies liées à l'alcool :

Plusieurs études ont démontré que le récepteur P2X4 jouait un rôle dans l'addiction à l'alcool (Wyatt et al., 2014; Yardley et al., 2012). Les récepteurs P2X4 sont exprimés dans des régions cérébrales clés impliquées dans les propriétés de renforcement à l'alcool et d'autres drogues (Kimpel et al., 2007), ce qui conforte le rôle du récepteur dans la dépendance à l'alcool, probablement *via* sa modulation dans le système dopaminergique mésolimbique, système de récompense du cerveau (Khoja et al., 2016). *In vitro*, des concentrations faibles d'éthanol de l'ordre de quelques mM sont capables d'inhiber le récepteur P2X4. Il est aujourd'hui supposé que l'éthanol bloque le canal à l'état ouvert, mais n'affecte pas sa désactivation (Davies et al., 2005; Ostrovskaya et al., 2011). Les résidus Trp46, His241, Asp331 et Met336 ont été identifiés pour être à l'origine des effets de l'éthanol sur l'ouverture du récepteur P2X4 (Popova et al., 2010; Popova et al., 2013; Xiong et al., 2005). Un comportement accru de consommation d'éthanol est observé chez les souris P2X4 KO, ce qui suggère que le récepteur P2X4 pourrait être impliqué dans la consommation et/ou la préférence pour l'alcool (Asatryan et al., 2011; Franklin et al., 2014). Il a été démontré que l'expression du gène P2X4 était plus faible chez les rats qui préféraient l'alcool que chez ceux qui ne le préféraient pas, ce qui suggère une corrélation entre l'expression du récepteur P2X4 et la consommation d'alcool (Franklin et al., 2015; Kimpel et al., 2007). L'IVM est capable de bloquer l'action inhibitrice de l'éthanol sur le récepteur P2X4 indiquant qu'elle pourrait interférer avec la liaison de l'éthanol sur le canal (Asatryan et al., 2010). Des études ont également identifié un rôle pour P2X4 dans la régulation de la neurotransmission dopaminergique dans le système mésolimbique. Dans les neurones dopaminergiques du système mésolimbique, il a été démontré que P2X4 jouait un rôle dans la médiation du comportement de consommation d'alcool (Franklin et al., 2015). L'activité du récepteur P2X4 a également été associée à d'autres comportements impliquant la neurotransmission dopaminergique, notamment au contrôle moteur et à la synchronisation sensorimotrice (Khoja et al., 2016).

Inflammation post-ischémique :

L'inflammation post-ischémique est associée à une libération d'ATP accrue. Alors que le déficit énergétique et l'excitotoxicité du glutamate provoquent la mort neuronale immédiatement après l'ischémie, l'activation des cellules inflammatoires du cerveau provoque

des lésions persistantes qui évoluent au cours des heures qui suivent. Un certain nombre d'études signalent une augmentation de l'expression de P2X4 dans les cellules microgliales après une lésion de la ME, une ischémie cérébrale et un traumatisme cérébral (Hu et al., 2014). La microglie est rapidement activée et acquiert une forme amiboïde motile. L'activation du récepteur P2X4 microglial par l'ATP libéré des cellules endommagées par l'ischémie est impliquée dans la chémotaxie *via* la modulation de la voie de signalisation des PI3K (Ohsawa et al., 2007). P2X4 est également responsable de la production de cytokines proinflammatoires par la microglie lors d'une exposition à l'hypoxie (Li et al., 2011). Le récepteur P2X4 aurait également un rôle à jouer dans la neuroprotection (Ozaki et al., 2016) : stimulé par des chocs de pression dans la paroi des vaisseaux sanguins, il favorise la production d'ostéopontine, une molécule neuroprotectrice. Ainsi, P2X4 est impliqué dans un mécanisme par lequel les cellules endothéliales vasculaires induisent une tolérance ischémique.

Douleur chronique :

La douleur est une modalité sensorielle encodée par des neurones nociceptifs spécialisés situés au niveau des ganglions de la racine dorsale (DRG) de la ME. La douleur chronique est une douleur persistante résultant d'une modification des voies de traitement de la douleur dans la ME (Basbaum et al., 2009). Elle peut être d'origine neuropathique, provoquée par la lésion d'un nerf périphérique due à un traumatisme, une infection ou une pathologie. On parle de neuropathie. La douleur chronique peut également être due à une lésion des tissus provoquant une inflammation, on parle alors de douleur inflammatoire. Dans les deux cas, la douleur peut survenir spontanément en l'absence d'un stimulus manifeste ou peut être évoquée par un stimulus non douloureux devenant douloureux (allodynie) ou par un stimulus douloureux devenant encore plus douloureux (hyperalgésie).

La première évidence du rôle clé du récepteur P2X4 microglial dans la pathologie fut apportée dans les douleurs neuropathiques par Tsuda et collaborateurs. Utilisant des oligonucléotides P2X4 antisens, ils ont montré le rôle majeur de l'augmentation des récepteurs P2X4 dans la microglie de la ME dans l'allodynie mécanique qui survient à la suite d'une atteinte nerveuse périphérique (Tsuda et al., 2003a). L'utilisation de la souris P2X4 KO a ensuite confirmé le rôle du récepteur P2X4 dans l'établissement et le maintien des douleurs neuropathiques (Tsuda et al., 2009; Ulmann et al., 2008; Ulmann et al., 2010a). Tsuda et ses collègues ont montré que l'expression du récepteur P2X4 augmente dans la microglie spinale après une lésion nerveuse qui provoque une allodynie tactile. Le blocage pharmacologique du récepteur P2X4 avec du

TNP-ATP ainsi que la diminution de son expression à l'aide de nucléotides antisens supprime l'allodynie suggérant un rôle clé du récepteur P2X4 dans la douleur neuropathique. En 2005, il a été démontré que la communication neurogliale était essentielle au développement de l'allodynie et que le facteur critique impliqué était le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Coull et al., 2005). La stimulation par l'ATP de la microglie spinale activée en conditions neuropathiques provoque la sécrétion de BDNF, qui, *via* l'activation des récepteurs TrkB au niveau des neurones spinaux modifie l'activité de l'échangeur KCC2 entraînant une inversion du gradient chlore. Le changement des courants GABAergiques provoquent l'hyperexcitabilité des neurones spinaux et l'allodynie tactile. En 2008, Ulmann et ses collaborateurs à l'aide de la souris P2X4KO ont fourni la preuve directe que l'activation des récepteurs P2X4 microgliaux est cruciale pour la sécrétion de BDNF, la cascade de signalisation qui en découle et le développement de l'allodynie (Ulmann et al., 2008). De plus, une autre étude a montré que la surexpression du récepteur P2X4 microglial et sa relocalisation des lysosomes vers la surface dépendent de CCL2 (Beggs et al., 2012; Trang et al., 2009). Cependant, des données récentes ont révélé que ce mécanisme pourrait être limité aux mâles puisque les rongeurs femelles ne présentent pas de régulation positive de P2X4 dans la microglie (Mapplebeck et al., 2016; Sorge et al., 2015). Ce dimorphisme sexuel suggère que différentes signalisations cellulaires sont responsables de la douleur chez les souris mâles et femelles. Chez les femelles, le mécanisme pourrait être médié par les lymphocytes, impliquant par exemple des récepteurs GABA_A ou des récepteurs P2 autres que les P2X4. Plus récemment, une étude a montré que le récepteur P2X4 était impliqué dans la tolérance à la morphine (Horvath et al., 2010) et l'hyperalgésie induite par la morphine (Ferrini et al., 2013). La morphine augmente la migration microgliale *in vitro* de manière dépendante du récepteur opioïde μ , et les oligonucléotides antisens P2X4 réduisent le développement de la tolérance à la morphine chez le rat (Horvath and DeLeo, 2009; Horvath et al., 2010). En outre, Ferrini et al. ont démontré que l'hyperalgésie de la morphine nécessitait une *uprégulation* des récepteurs P2X4 induite par les récepteurs opioïdes dans la microglie rachidienne. Le blocage de la voie BDNF-TrkB inverse l'hyperalgésie. Par conséquent, l'axe microglial ATP-P2X4-BDNF semble être une voie centrale impliquée dans l'établissement des seuils de douleur (Ferrini et al., 2013).

Récemment, Lalisse et ses collaborateurs ont démontré pour la première fois, en plus de l'action du récepteur P2X4 au niveau de la microglie activée dans la ME lors de la douleur neuropathique, que le récepteur P2X4 était également exprimé dans les DRG et contrôlait la libération de BDNF *via* l'influx de Ca²⁺ dans ces derniers, contribuant à l'hyperexcitabilité

durant la douleur chronique inflammatoire (Lalisse et al., 2018). Le rôle prédominant du récepteur P2X4 dans la douleur chronique inflammatoire a été confirmé dans une autre étude qui a également démontré une action du récepteur dans l'hyperexcitabilité des neurones sensitifs de la corne dorsale de la ME lors d'une inflammation périphérique (Aby et al., 2018).

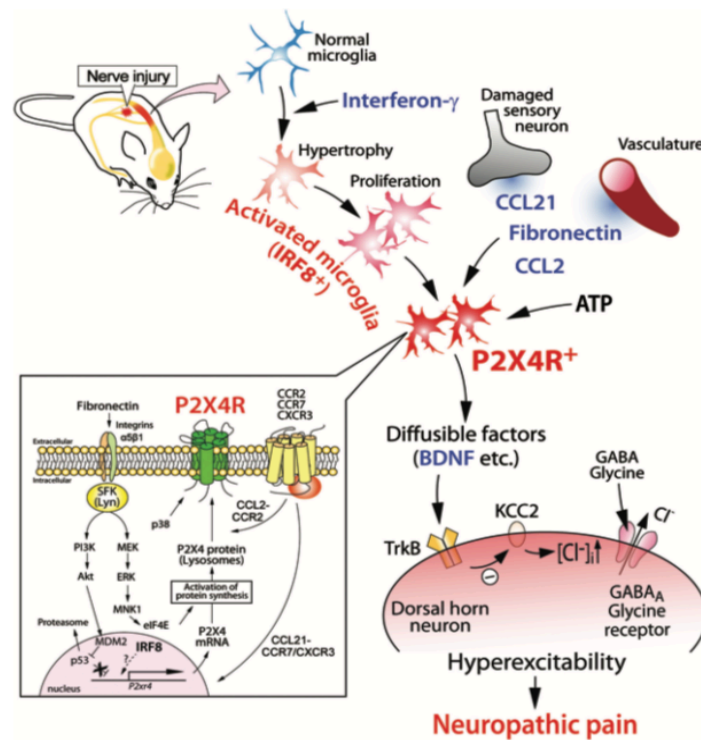


Figure 7 : Mécanisme d'action potentiel du récepteur P2X4 dans la douleur neuropathique (d'après Tsuda et al., 2013). La lésion d'un nerf périphérique active la microglie présente dans la corne dorsale de la ME. Plusieurs facteurs (CCL21, CCL2, la fibronectine) vont conduire à la surexpression du récepteur P2X4 dans la microglie. La signalisation CCL2 favorise le trafic du récepteur P2X4 à la surface de la microglie. Le récepteur P2X4 activé par l'ATP va induire la libération de facteurs diffusibles tels que le BDNF qui entraîne la diminution de l'expression du transporteur du chlore KCC2 via son récepteur TrkB, causant une augmentation de Cl^- intracellulaire et un changement du gradient anionique transmembranaire. L'activation des récepteurs du GABA et de la glycine, aboutissant normalement à l'hyperpolarisation des neurones va conduire à une sortie de Cl^- et donc à une dépolarisation rendant les neurones hyperexcitables et entraînant des phénomènes de douleur neuropathique.

Neuroinflammation et maladies neurodégénératives :

L'augmentation de l'expression et/ou du trafic de surface des récepteurs P2X4 a également été observé dans la microglie ou les neurones dans plusieurs pathologies inflammatoires et neurodégénératives du SNC telles que l'épilepsie (Ulmann et al., 2013), la maladie d'Alzheimer (Varma et al., 2009), la sclérose en plaque (Di Virgilio and Sarti, 2018; Domercq and Matute, 2019) et la SLA (Casanovas et al., 2008).

La neuroinflammation provoquée par l'injection *in vivo* de LPS chez la souris, induit une activation microgliale et une augmentation de P2X4 (Xu et al., 2016) et provoque dans un deuxième temps une perte microgliale rapide dans la ME. Cette perte peut être respectivement atténuée ou augmentée par un blocage ou une activation du récepteur P2X4 (Vazquez-Villoldo et al., 2014). Dans un modèle de souris épileptique, le déficit en P2X4 conduit également à une protection partielle contre l'activation microgliale et la mort cellulaire qui s'en suit. Bien que les crises épileptiques induites par le kaïnate ne soient pas inhibées de manière visible chez les souris invalidées pour P2X4, il existe une réduction notable de la mort cellulaire hippocampique, ainsi que de l'amplitude des courants sortants dépolarisants (Ulmann et al., 2013). L'expression de P2X4 est elle-même uprégulée dans les foyers inflammatoires et dans la microglie activée dans la ME de rats atteints d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale ainsi que dans le nerf optique de patients atteints de sclérose en plaques (Vazquez-Villoldo et al., 2014). L'expression de P2X4 dans la microglie augmente également lors d'une lésion nerveuse et entraîne à la fois la libération de prostaglandine E2 et la stimulation de la neurotrophine BDNF (Ulmann et al., 2008; Ulmann et al., 2010a). P2X4 intervient donc dans la mort précoce des cellules microgliales au cours de la neuroinflammation. Sa modulation offre donc la possibilité de contrôler le devenir de la microglie activée et éventuellement d'induire une microgliose bénéfique pour les lésions et les maladies du SNC.

Les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et de Parkinson sont associées à une neuroinflammation (Estes and McAllister, 2016) et sont des pathologies pour lesquelles la microglie semble être centrale (Joers et al., 2017; Saijo and Glass, 2011). De plus, le récepteur P2X4 semble jouer un grand rôle dans l'homéostasie de la dopamine qui est altérée dans la maladie de Parkinson (Khoja et al., 2016). Dans la maladie d'Alzheimer, le fragment β -amyloïde 1-42 ($A\beta_{1-42}$) contribue au dysfonctionnement synaptique et à la mort neuronale. Une étude a reporté que ce fragment $A\beta_{1-42}$ favorisait l'accumulation du récepteur P2X4 dans les neurones (Varma et al., 2009). Cette étude a également suggéré que l'induction de la

dysfonction synaptique et de la mort neuronale par ce fragment β -amyloïde pouvait être due à un clivage protéolytique du récepteur P2X4. Ce clivage provoque le ralentissement du temps de fermeture du canal et empêche l'internalisation agoniste-dépendante, provoquant l'augmentation du récepteur en surface des neurones et induit, de ce fait, une toxicité due à l'entrée accrue de Ca^{2+} (Varma et al., 2009).

Dans la SLA, les mécanismes sous-jacents à la dégénération sélective des MNs restent aujourd'hui encore non élucidés. Un lien a été établi entre P2X4 et la SLA. En effet, des travaux ont montré une augmentation de l'expression de P2X4 dans les MNs de souris SOD1-G93A, modèle murin de SLA le plus couramment utilisé, avant leur dégénérescence (Casanovas et al., 2008). D'autres travaux ont montré une dualité de l'activation des P2X4 sur la survie des MNs suivant les concentrations d'ATP (Andries et al., 2007). En outre, l'IVM qui potentialise la fonction des récepteurs P2X4, augmente sensiblement la durée de vie des souris SOD1-G93A (Andries et al., 2007). Comme pour les autres maladies neuroinflammatoires, le récepteur P2X4 pourrait intervenir dans la neuroinflammation associée à la SLA qui est connue pour être impliquée dans le mécanisme de dégénérescence des MNs (Liu and Wang, 2017). De manière intéressante, plusieurs études ont montré une implication du récepteur P2X7 dans cette pathologie (Cieslak et al., 2019), notamment dans la modulation de l'autophagie (Fabrizio et al., 2017), ainsi que dans la neuroinflammation induite par la microglie suivant le stade de la maladie, tantôt bénéfique, tantôt délétère (Apolloni et al., 2013a; Apolloni et al., 2014; Sluyter et al., 2017). Un croisement entre les voies de signalisation des récepteurs P2X4 et P2X7 pourrait être envisagé avec une action microgliale, l'un activant la signalisation de l'autre. En effet, dans les macrophages murins, le récepteur P2X4 est à l'origine de la régulation des fonctions inflammatoires du récepteur P2X7 (Kawano et al., 2012a). Bien que son rôle reste à être élucidé dans la pathogenèse de la SLA, le récepteur P2X4 apparaît donc comme une cible thérapeutique potentielle.

Chapitre 2 : la sclérose latérale amyotrophique

2.1 Généralités

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale incurable affectant le système moteur, caractérisée par une dégénérescence progressive et sélective des neurones moteurs du cortex ainsi que des MNs du tronc cérébral et de la ME, conduisant à une paralysie progressive et à une atrophie musculaire. Également appelée maladie de Charcot, du nom du clinicien et neurologue Jean-Martin Charcot à l'origine de sa description en 1869 (Charcot, 1869), la SLA a une évolution rapide une fois les premiers symptômes moteurs apparus, le décès des patients survient en moyenne 3 à 5 ans après le diagnostic, la plupart du temps suite à une paralysie respiratoire.

2.1.1 Aspects cliniques et épidémiologiques

2.1.1.1 Symptômes et description clinique

Deux grands types de symptômes sont observés chez les patients SLA suivant le type de neurones moteurs touchés. La dégénérescence des neurones corticaux moteurs projetant vers la moelle (neurones cortico-spinaux), provoque une raideur musculaire et une spasticité tandis que celle des MNs spinaux induit une excitabilité électrique excessive de ces neurones, conduisant à des contractions musculaires spontanées (fasciculations) et à une perte progressive de leur connectivité avec leurs muscles cibles qui s'atrophient. La forme spinale de la SLA qui est majoritaire se traduit par une atteinte des membres avec des difficultés de manipulation des objets pour une atteinte des membres supérieurs, et des tendances à trébucher lorsque les membres inférieurs sont touchés. La forme bulbaire, qui représente environ un quart des cas de SLA, touche en premier lieu les MN du tronc cérébral innervant les muscles oro-pharyngiens, conduisant à des troubles de la déglutition et de la parole associés ou non à une hypersialorrhée chez les patients. La forme la plus rare, ayant également le plus mauvais pronostic, est la forme respiratoire où les muscles de la respiration sont atteints en premier (McDermott and Shaw, 2008). Chez environ deux tiers des patients présentant une SLA d'origine spinale, la dégénérescence va se propager au niveau bulbaire au cours de l'évolution de la maladie. La dégénérescence neuronale est restreinte aux neurones moteurs corticaux et aux MNs spinaux innervant des muscles squelettiques. Cependant certaines populations de neurones moteurs résistent à la dégénérescence lors du développement d'une SLA. Dans le tronc cérébral, les MNs des noyaux III oculomoteur, IV trochléaire et VI abducens innervant les muscles

permettant les mouvements des yeux et des paupières sont épargnés (Haenggeli and Kato, 2002; Leveille et al., 1982; Reiner et al., 1995). Dans la moelle épinière, les MN sacrés du noyau d'Onufrowicz innervant les muscles périnéaux et les sphincters sont aussi résistants à la progression de la SLA (Mannen, 1991; Mannen et al., 1977, 1982). La raison de la préservation de ces neurones reste à ce jour inconnue, de même que les causes de l'apparition de la SLA.

Cortical motor neuron damage	Spinal MN injuries
Muscle stiffness	Hypotonia
Spasticity	Fasciculations
Hypersialorrhea	Cramps
Slowing down of fine movements	Poor motor coordination
Exaggeration of reflexes	Reduction of reflexes
Muscle weakness	Muscle weakness
Swallowing and speech disorders	Muscular atrophy
Spasmodic crying and laughter	Hyperexcitability of MN

Tableau 3 : Principaux symptômes et signes cliniques témoignant de l'atteinte des neurones moteurs corticaux et des MN spinaux

2.1.1.2 Épidémiologie

Bien que la SLA soit considérée comme une maladie rare, elle n'en reste pas moins la maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Son incidence dans le monde est de 2 à 5 nouveaux cas diagnostiqués par an pour 100 000 habitants avec 120 000 nouveaux cas par an (Boillee et al., 2006a; Chio et al., 2013). Sa prévalence est de 4 à 8 cas pour 100 000 personnes, du fait du décès rapide des patients après diagnostic (McDermott and Shaw, 2008). En France, on compte 3 à 4 nouveaux cas par jour. L'incidence mondiale de la SLA est hétérogène avec une incidence plus élevée chez les populations caucasiennes que chez les populations asiatiques, hispaniques et africaines (Cronin et al., 2007). Il existe des zones très localisées comme l'île américaine de Guam dans le Pacifique ainsi que la péninsule de Kii au Japon, où l'incidence a atteint des taux record (100 fois plus élevée que la moyenne) à cause de l'exposition à des particules toxiques comme la BMAA, neurotoxine produite par certaines bactéries (Gajdusek and Salazar, 1982; Garruto et al., 1985; Lee, 2011). Une légère prédominance masculine est constatée chez les patients atteints de SLA, avec un ratio de 1,3 hommes atteints pour 1 femme avec un âge moyen d'apparition de la maladie de 64 ans (Blasco et al., 2012). La majorité des patients ne survivent pas au-delà de 3 ans après

l'apparition de symptômes mais certains patients peuvent survivre plusieurs décennies après l'apparition des symptômes sans qu'on connaisse la cause de ces disparités d'évolution (Rowland and Shneider, 2001).

Environ 10% des cas de SLA sont familiaux (fSLA) et mettent en jeu des mutations génétiques causales transmises à la descendance, généralement hérité d'un gène dominant. Les 90% de cas de SLA restants sont d'origine sporadiques (sSLA), c'est-à-dire sans histoire familiale (Alsultan et al., 2016; Camu et al., 1999). Une apparition dans la période jeune adulte est généralement révélatrice d'une SLA liée à FUS.

2.1.1.3 Diagnostic et traitement

Le diagnostic de la SLA repose sur des signes cliniques traduisant une atteinte du MN, complété par des examens neurologiques et des études généalogiques et génétiques pour les cas familiaux (Gordon, 2011). Le diagnostic est complété par des examens sanguins, ainsi que des électromyogrammes (EMG) et de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) mettant en évidence à la fois la dénervation et l'atteinte neuronale liée aux phénomènes neurodégénératifs (Daube, 2000; de Carvalho et al., 2008). Plusieurs études sont actuellement en cours afin de développer des biomarqueurs pronostics de la maladie pour compléter le diagnostic, tels que la chaîne légère (NfL) et la chaîne lourde phosphorylée (pNfH) des neurofilaments présents dans le sérum et le liquide céphalorachidien (LCR) des patients (Oeckl et al., 2016; Steinacker et al., 2016). En l'absence de marqueurs diagnostiques, la Fédération Mondiale des Neurologues a établi un test d'évaluation (El Escorial, 1991, Airlie House 1998) suivant des critères cliniques et paracliniques d'inclusion ou d'exclusion permettant de trier les patients ayant une atteinte des neurones moteurs corticaux et/ou des MNs spinaux (Bresch et al., 2014; Brooks et al., 2000). Ces critères permettent de poser un diagnostic avec des degrés variables de certitude (Appel et al., 1987). Le temps entre l'apparition des premiers symptômes de la SLA et le diagnostic est approximativement de 12 mois, délai pouvant être problématique pour un traitement efficace qui nécessite une intervention précoce.

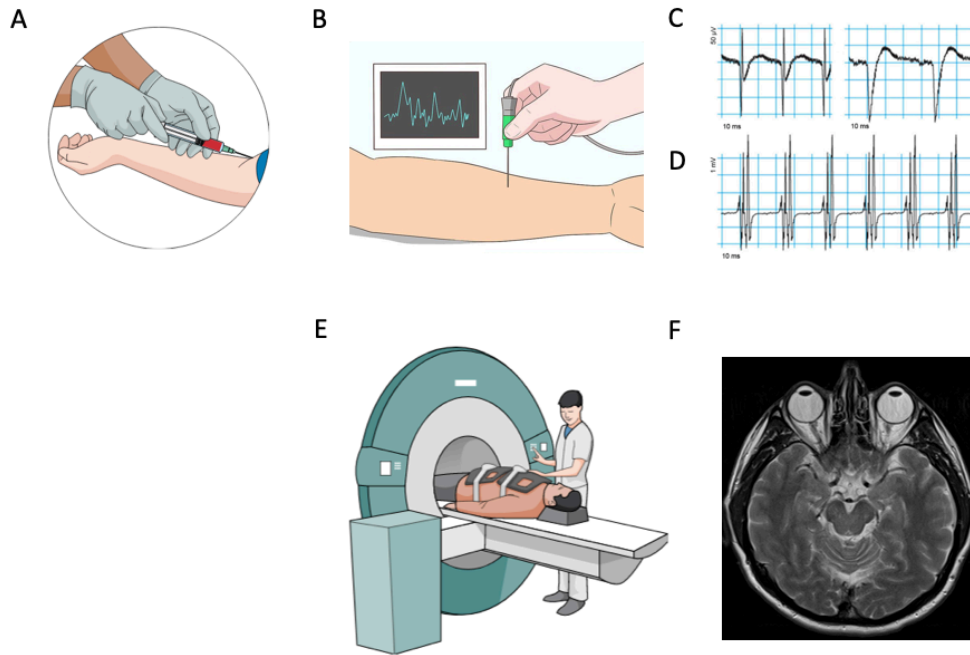


Figure 8 : Techniques de diagnostic de la SLA (adapté de Vulvic et al., 2014). **A.** Examens sanguins pour la recherche de biomarqueurs pronostiques de la maladie. **B.** Électromyogramme (EMG) permettant d'enregistrer l'activité électrique des muscles. **C.** Exemple d'enregistrement EMG montrant une dénervation progressive (potentiels de fibrillations et ondes positives) témoignant d'une dégénérescence des MN, accompagnée par **D.** des changements neurogènes chroniques (grande amplitude, longue durée, potentiels d'actions polyphasiques) montrant une réduction du recrutement volontaire des unités motrices. Une altération de l'EMG n'est pas spécifique de la SLA lorsqu'elle est observée de manière isolée, cependant la sensibilité et la spécificité des résultats ainsi que leur conformité à certains critères permettent d'établir le diagnostic combiné aux autres techniques décrites ici. **E.** Imagerie par résonance magnétique (IRM) et **F.** exemple d'image IRM d'un cerveau humain typique.

Level of certainty	Degree of involvement
Suspected ALS	UMN signs only in one or more regions, or LMN signs only in one or more regions
Possible ALS	UMN and LMN signs in one region, or UMN signs in at least two regions, or UMN and LMN signs in two regions without UMN signs rostral to the LMN signs
Probable ALS	UMN and LMN signs in two regions with some UMN signs rostral to the LMN signs
Laboratory-supported probable ALS	UMN signs in one or more regions with LMN involvement by EMG in at least two regions
Definite ALS	UMN and LMN signs in three regions
Laboratory-supported familial ALS	UMN and LMN signs in one region and confirmatory genetic testing

Tableau 4 : Certitude de diagnostic basé sur les critères d'El Escorial révisité (d'après Tiryaki and Horak, 2014). ALS = amyotrophic lateral sclerosis ; UMN = upper motor neuron ; EMG = electromyography

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif contre la SLA, cependant deux types de soins, généralement combinés, sont proposés aux patients par les médecins : des soins palliatifs permettant de prendre le relais de certaines fonctions vitales comme la respiration *via* la ventilation sous pression voire la trachéotomie, et la nutrition, par gastrotomie permettant de couvrir les dépenses énergétiques importantes des patients (Bourke et al., 2006) et des traitements médicamenteux. Le premier traitement médicamenteux apparu sur le marché fut le riluzole (RILUTEK®, Sanofi, France), rallongeant l'espérance de vie des malades de quelques mois (Bensimon et al., 1994; Miller et al., 2007). Les effets protecteurs du riluzole sont encore mal compris, mais il est admis qu'il inhibe les courants Na^+ voltage dépendants et minimise le phénomène d'excitotoxicité en diminuant la libération de glutamate (Jehle et al., 2000) et en favorisant la recapture (Doble, 1996). Bien que ce traitement soit assez controversé, il reste aujourd'hui le seul ayant démontré son efficacité sur la prolongation de la survie des patients. Plus récemment, l'utilisation d'une autre molécule, l'Edaravone (RIDICAVA®, Mitsubishi Tanabe Pharma, Japon), un antioxydant développé à l'origine pour le traitement des accidents cardiovasculaires (AVC), a été approuvée par la *Food and Drug Administration* (FDA) dans le traitement de la SLA, bien que son utilisation soit complexe et ses effets modestes. En effet, ce traitement s'effectue par voie intraveineuse en perfusion de 60 mg par cycle de 14 jours par mois et provoque une diminution de la progression de la maladie sur quelques semaines chez seulement 7% des patients traités, n'affectant pas la survie et sans preuve à ce jour d'effets à plus long terme.

2.1.2 Étiologie

2.1.2.1 Génétique de la SLA

Parmi les mutations causales de la SLA identifiées chez l'homme, la majorité concerne les gènes *SOD1* (12 à 23,5%), *FUS* (4,1%), *TARDBP* (0,5 à 5%) et *C9ORF72* (39,3%) (Alsultan et al., 2016; Brown and Al-Chalabi, 2017). Une partie de ces mutations causant la SLA est également responsable du développement de démences fronto-temporales (DFT) ce qui est cohérent avec le fait que de nombreux patients atteints de SLA ont des symptômes de DFT et *vice versa* (Radford et al., 2015). Certaines mutations génétiques sont associées à la SLA mais ne sont pas causales : ce sont des facteurs génétiques de susceptibilité, c'est-à-dire qu'elles augmentent le risque de développer la maladie mais ne sont pas suffisantes pour déclencher la SLA. Ces mutations constituent un terrain génétique favorable au développement de la maladie et les patients sont définis comme « à risque ».

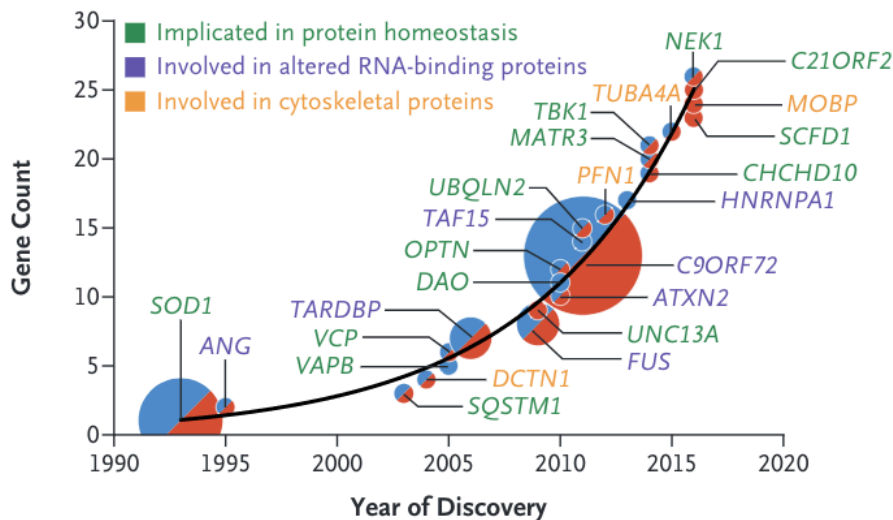


Figure 9 : Fréquence des gènes mutés retrouvés dans la SLA depuis 1990 (D'après Brown and Al-Chalabi, 2017). La taille de chaque cercle reflète la proportion de tous les cas de fSLA associés à des mutations de ce gène. Les cercles bleus indiquent que les gènes sont associés uniquement aux fSLA, les cercles rouges aux sSLA et les cercles à moitié bleus et à moitié rouge aux deux. Lorsque l'information sur la fréquence n'est pas disponible dans la littérature, un cercle de taille équivalente à une fréquence de 1% est tracé.

2.1.2.1.1 Les mutations *SOD1*

Dans environ 20% des cas génétiques de SLA et 2% des cas sporadiques, c'est la protéine superoxyde dismutase 1 (*SOD1*) qui est mutée (Acevedo-Aroza et al., 2011; Andersen and Al-Chalabi, 2011; Pasinelli and Brown, 2006; Saccon et al., 2013). Le gène codant pour la protéine *SOD1* est situé sur le chromosome 21 au niveau du locus q22.1 et la transmission des mutations se fait de manière autosomique dominante dans la plupart des cas (Bowling et al., 1993; Rosen et al., 1993; Siddique et al., 1991). La *SOD1* est une métalloprotéine homodimérique de 153 acides aminés possédant une activité anti-oxydante en catalysant la dismutation des anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en dioxygène (O_2) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). *SOD1* est le premier gène à avoir été mis en cause dans les cas familiaux de SLA (Rosen et al., 1993) et on dénombre aujourd'hui plus de 180 mutations ponctuelles dans cette protéine causant la SLA (liste actualisée sur : <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>). Les mutations *SOD1* les plus communément identifiées sont : la mutation *SOD1*D90A, responsable d'une forme de SLA à évolution lente sur plus de 10 ans, retrouvée de manière importante en Scandinavie (Andersen and Al-Chalabi, 2011) ; la mutation *SOD1*A4V, la plus répandue en Amérique du Nord (50% des mutations *SOD*) et ayant une évolution fulgurante (Juneja et al., 1997; Saeed et al., 2009) ; et la mutation *SOD1*G93A pour qui il existe un modèle murin, qui est, à l'heure actuelle, le

modèle animal le plus utilisé et le mieux caractérisé et qui présente des symptômes moteurs proches de ceux observés chez les patients SLA. De manière intéressante, des études ont démontré que la pathogénicité des mutations SOD1 était due à un gain de fonction toxique létal pour la cellule menant à la neurodégénération et non à une perte ou un gain de la fonction antioxydante de la protéine (Andrus et al., 1998; Bruijn et al., 1998; Bruijn et al., 2004; Reaume et al., 1996). En effet, chez les patients portant une mutation SOD1 hétérozygote, si ce changement suffit pour entraîner une altération de la fonction de la protéine SOD1, cela n'entraîne pas forcément la SLA (Pasinelli and Brown, 2006). De plus, les souris KO pour la SOD1 ne présentent aucune atteinte des MNs ni de déficit moteur caractéristique de la SLA, alors que les souris transgéniques exprimant une forme humaine mutée développent les symptômes, malgré l'expression de la protéine SOD1 endogène (Gurney et al., 1994; Reaume et al., 1996). Ces mutations favoriseraient la formation d'agrégats protéiques toxiques pour les cellules, cependant, le rôle exact de cette protéine mutante dans la physiopathologie de la SLA reste encore mal connu (Pasinelli et al., 2004). Il est aujourd'hui admis que les protéines SOD1 mutantes mal repliées s'accumulent dans les MNs et les cellules gliales de la ME, ce qui entraînerait de l'excitotoxicité, ainsi que le dysfonctionnement mitochondrial, l'axonopathie et l'altération du trafic endosomal (Bosco et al., 2010). On retrouve chez les patients atteints de SLA liée à la protéine SOD1, une perte neuronale dans la région de la corne antérieure de la ME et des inclusions ressemblant à des écheveaux qui sont positives à p62, un marqueur de dégradation des protéines qui est spécifique du système d'autophagie sélective.

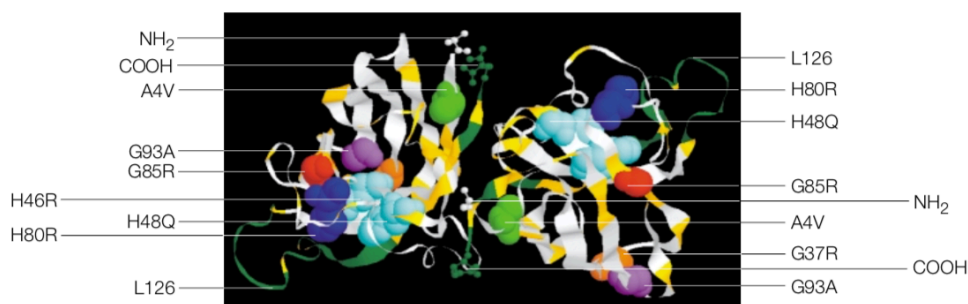


Figure 10 : Principales mutations de la protéine SOD1 connues pour être impliquées dans la SLA (d'après Cleveland and Rothstein, 2001). Les positions de ces mutations sont indiquées dans la structure tridimensionnelle de la protéine SOD1 humaine cristallisée (Protein Data Bank entrée 1SPD). Les mutations sont dispersées dans la protéine au niveau des feuillets- β , du canal du site actif, à l'interface du dimère et au niveau des résidus coordonnant le Cu^{2+} dans le site actif. Les mutations sont colorées et le squelette polypeptidique est gris. Les 20 acides aminés de la partie C-terminale sont tronqués dans différents mutants et sont colorés en vert.

2.1.2.1.2 Les mutations TDP-43 et FUS/TLS

En 2006, l'identification d'une protéine de liaison à l'ADN de 43 kDa, appelée TDP-43 pour *transactive response DNA-binding protein*, en tant que composant majeur des inclusions de protéines ubiquitinylées dans le SNC de patients atteints de SLA sporadique, fut une grande découverte dans le champ de la SLA (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Les grandes avancées en génétique ont ensuite rapidement permis le séquençage du gène codant pour TDP-43 (*TARDBP*) de même que l'identification des mutations dans TDP-43 en tant que facteur causal des cas de SLA sporadiques et familiales, ainsi que de rares cas de FTD (Gitcho et al., 2008; Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008). TDP-43 est impliqué dans l'épissage, la transcription et le transport de l'ARN et est exprimé de manière ubiquitaire dans la plupart des tissus et des types cellulaires, y compris les neurones et les cellules gliales du SNC. Des études sur la SLA, la FTD et la SLA-FTD ont montré que TDP-43 est clivée, hyperphosphorylée, ubiquitinée ou mal localisée dans le cytoplasme sous la forme d'inclusions insolubles (Arai et al., 2006; Feiguin et al., 2009; Kwong et al., 2007; Neumann et al., 2009; Neumann et al., 2006). TDP-43 se trouve à l'origine dans le noyau des MNs sains et une déplétion nucléaire de TDP-43 avec des agrégations cytosoliques est caractéristique de la plupart des formes de SLA. Il est difficile de savoir si la mort des MNs résulte de la perte de fonction de TDP-43 nucléaire, de l'accumulation toxique d'agrégats TDP-43 dans le cytoplasme ou des deux. Il est également possible que la clairance nucléaire de TDP-43 soit un changement cellulaire retrouvé en phase terminale résultant de diverses autres agressions en amont. A ce jour plus de 40 mutations dans TDP-43 ont été identifiées, principalement retrouvées dans le domaine C-terminal riche en glycine (Lagier-Tourenne and Cleveland, 2009). Ces mutations, la plupart du temps dominantes représentent environ 1-3% des cas de SLA familiaux (Daoud et al., 2009; Valdmanis et al., 2009) et 5% des cas sporadiques et familiaux combinés (Mackenzie et al., 2010). Cependant on retrouve des inclusions TDP-43 chez pratiquement tous les cas de sSLA (Tan et al., 2017).

En 2009, des mutations dans une autre protéine de liaison à l'ARN/ADN se liant à l'ARN, connue sous deux noms : *Fused in Sacroma* ou *Translocated in Liposarcoma*, appelée ici FUS/TLS, a été identifiée dans 5 % des cas de SLA familiales, et comme étant responsable des formes précoces de la maladie (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Bien que TDP-43 et FUS présentent des structures, des fonctions et une physiopathologie similaires dans la SLA, les altérations de TDP-43 sont notamment absentes dans les cas de SLA liée à FUS (Kwiatkowski et al., 2009; Ticozzi et al., 2009). Comme la protéine TDP-43, la protéine FUS/TLS est séquestrée dans le cytosol des neurones moteurs affectés par la SLA. Des

mutations faux-sens et affectant l'épissage semblent se regrouper dans l'extrémité 3' principale du gène, perturbant ainsi le signal de localisation nucléaire (NLS) (Lagier-Tourenne and Cleveland, 2009). Les mutations du FUS entraînent une perte sévère de MNs dans la ME, une perte modérée des neurones moteurs corticaux, et sont associées à la SLA juvénile (Kwiatkowski et al., 2009; Ticozzi et al., 2009). Les patients atteints de SLA liée à FUS développent des schémas phénotypiques distincts : certains développent une SLA apparaissant de manière précoce avec une progression clinique agressive, et d'autres développent une SLA plus tardive, avec une progression plus lente de la maladie (Ravits et al., 2013). Les analyses pathologiques ont montré que les mutations qui tronquent le gène FUS peuvent générer des phénotypes plus agressifs que les mutations faux-sens (Waibel et al., 2013). Plus de 40 mutations, pour la plupart dominantes, ont maintenant été décrites chez les patients, avec ou sans antécédents familiaux apparents, correspondant à environ 4% des cas familiaux de SLA et de rares cas sporadiques (Mackenzie et al., 2010).

Un cas inhabituel de SLA a été récemment signalé avec des mutations dans les gènes FUS et TARDBP (King et al., 2015). Ce cas particulier présentait une mutation FUS P525L ainsi que la mutation tronquée TARDBP Y374X, montrant une pathologie FUS modérée et aucune pathologie TDP-43, avec des inclusions granulaires p62 positives et TDP-43 négatives dans la ME, le cortex moteur et le néocortex (King et al., 2015).

2.1.2.1.3 Les mutations *C9ORF72*

Plus récemment, une mutation consistant en la répétition d'un hexanucleotide (GGGGCC) au niveau du premier intron entre les exons non-codants 1a et 1b du gène *C9orf72* (pour *chromosome 9 open reading frame 72*) a été identifiée chez des patients fSLA (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Le gène *C9orf72* est situé sur le chromosome 9 et code pour une protéine du même nom retrouvée dans la plupart des neurones et dont la fonction est mal connue. Elle posséderait un domaine DENN (*differentially expressed in normal and neoplastic cells*) impliqué dans la régulation de l'activité des GTPases cellulaires et interviendrait dans le trafic endosomal et la régulation de l'autophagie dans les neurones (Farg et al., 2014; Marat et al., 2011; Zhang et al., 2012). L'expansion des répétitions pathologiques peut s'étendre à des centaines de répétitions chez les individus porteurs de la lésion génétique (contre une trentaine chez un individu sain), présentant des caractéristiques pathologiques inhabituelles, notamment des foyers d'ARN et des agrégats de répétitions de dipeptides produites à partir de la traduction des répétitions associées non-ATG (RAN) de l'ARN à

expansion répétée, de la même manière que pour les agrégats TDP-43 positifs. De plus, les mutations de C9orf72 semblent favoriser la mauvaise localisation de TDP-43 dans le cytoplasme, en plus des malformations des molécules d'ARN (Zhang et al., 2015). La répétition de l'héxanucléotide dans ce gène est retrouvée chez presque la moitié des patients, avec 40% chez les patients atteints de fSLA et 10% chez les cas sporadiques (Majounie et al., 2012; Rademakers and van Blitterswijk, 2013). Elle constitue aujourd'hui un facteur génique d'une grande importance, étant la plus fréquente des mutations retrouvées chez les patients fSLA (Vatovec et al., 2014; Vucic et al., 2014). Cette mutation est également retrouvée chez 40% de patients atteint de DFT (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Comme pour les autres formes de SLA associées à la FTD, la raison pour laquelle certains patients présentant une expansion excessive de répétitions C9ORF72 répétées vont déclarer une SLA alors que d'autres vont présenter une FTD seule, n'est pas claire. Et tandis que certains patients présentent à la fois une SLA et une FTD, d'autres patients avec des expansions ne déclarent aucune maladie dans aucune des deux catégories. La mutation C9ORF72 induirait une dégénérescence neuronale de populations bien spécifiques et différentes chez les patients SLA et FTD. L'une des hypothèses pour expliquer cette atteinte différente serait une variation du nombre de copies de l'hexanucleotide ainsi qu'une expression spatio-temporelle différente, en se manifestant en premier dans les lobes frontal et temporal (FTD), ou bien dans les neurones moteurs (SLA) (Gomez-Tortosa et al., 2013; van Blitterswijk et al., 2013). En outre, une étude a montré à partir d'échantillons de cerveau et de sang de patients qu'il n'y avait pas de corrélation cohérente entre la taille de la répétition et la gravité de la maladie (van Blitterswijk et al., 2013).

Il existe trois hypothèses actuelles concernant le mécanisme de la maladie, qui ne s'excluent pas toutes mutuellement. La première invoque un scénario de perte de fonction C9ORF72, dans lequel l'extension répétée provoque une régulation négative de C9ORF72 contribuant à la maladie. La deuxième hypothèse concerne la dysrégulation de l'ARN, des foyers d'ARN nucléaires étant présents chez les patients atteints de C9ORF72. La séquestration d'ARN dans ces foyers pourrait perturber l'homéostasie normale de l'ARN en détournant des protéines de liaison essentielles et des facteurs d'épissage, ou éventuellement à cause des répétitions d'ARN formant des structures secondaires anormales, entraînant une toxicité induite par l'ARN. La troisième hypothèse implique l'accumulation toxique de protéines de répétition sens et antisens sous la forme de répétitions di-peptidiques qui s'accumulent dans le cerveau et la moelle épinière (Gitler and Tsuiji, 2016).

2.1.2.2 Formes sporadiques de SLA

L'étiologie de la SLA sporadique reste à l'heure actuelle largement inconnue, avec l'hypothèse d'interactions complexes entre susceptibilité génique et action de l'environnement.

Plusieurs études d'association pangénomique (GWAS) ont été réalisées pour la SLA sporadique et ont identifié une variété de locus à risque. Beaucoup de ces études n'ont pas été reproduites dans les grandes cohortes. Le résultat le plus robuste obtenu par GWAS était le locus du chromosome 9p qui a contribué à l'identification de C9ORF72. Cependant, cette étude comportait un mélange de cas familiaux et sporadiques. Outre l'identification des loci de susceptibilité, des études d'association pangénomiques ont également été utilisées pour l'identification de variants génétiques pouvant influencer le phénotype de la SLA. Une méta-analyse récente de l'*International Consortium on Amyotrophic Lateral Sclerosis Genetics*, basée sur des échantillons d'association pangénomique, a identifié un locus sur le chromosome 1p34 modulant l'âge de l'apparition de la maladie. D'autres loci ont également été identifiés comme impliqués dans la modification de la survie (KIFAP3, UNC13A) ou dans l'âge d'apparition de la maladie (VEGF, APOE ...). Cependant, certaines de ces études n'ont pas été répliquées avec succès (Saeed et al., 2006; Wills et al., 2009).

Les facteurs environnementaux liés à la SLA sont difficiles à identifier dû aux nombreux biais. Le tabagisme a été associé à un risque accru de SLA dans certaines études, avec certains sous-groupes pouvant présenter un risque plus élevé (Alonso et al., 2010). L'activité physique est un autre facteur de risque largement étudié. En effet, un certain nombre de sportifs de haut niveau sont atteints de SLA et, bien souvent, les personnes atteintes de SLA ont un IMC faible et des niveaux de participation plus élevés aux sports de loisirs (Scarmeas et al., 2002). Nous ne savons toujours pas si le fait d'avoir des niveaux d'activité physique plus élevés ou d'être génétiquement prédisposé à de grandes prouesses sportives augmente le risque de SLA (Lacorte et al., 2016). Les produits chimiques tels que les métaux lourds, les hydrocarbures aromatiques ambiants, les pesticides et les cyanotoxines, ont également été décrits comme facteurs de risque, cependant les preuves sont mitigées (Bozzoni et al., 2016; Delzor et al., 2014; Malek et al., 2015; Rooney et al., 2016). Les traumatismes, y compris les traumatismes crâniens, apparaissent également comme un facteur de risque dans la méta-analyse (Wang et al., 2017).

2.2 Modèles de SLA

2.2.1 *Modèle murin SOD1G93A*

2.2.1.1 Les souris SOD1

La souris transgénique SOD1-G93A, surexprimant le gène codant pour la protéine SOD1 humaine mutée, a été le premier véritable modèle animal de SLA à émerger et reste aujourd'hui encore la lignée de souris la plus utilisée pour l'étude de la SLA (Gurney et al., 1994). De nombreux autres modèles transgéniques SOD1 ont ensuite été conçus à l'aide de variants de séquence de patients issus de fragments génomiques, notamment la mutation G37R humaine (Wong et al., 1995), la mutation G85R humaine (Bruijn et al., 1997) et la mutation G86R de souris (Ripps et al., 1995). Pour chacune d'elle un acide aminé : la glycine (G) a été remplacée par une alanine (A) ou une arginine (R) à une position donnée (93, 85, 37 ou 86). Ces souris transgéniques expriment de hauts niveaux de SOD1 mutée de manière étendue dans tout l'organisme, sous le contrôle du promoteur SOD1 endogène. L'expression du gène SOD1 humain muté chez la souris, sur fond de l'enzyme endogène, induit un gain de fonction toxique de la protéine quelle que soit la nature de la mutation (Gurney et al., 1994; Turner and Talbot, 2008).

Ces souris mutantes développent un phénotype et des symptômes moteurs proches de ceux observés chez les patients atteints de SLA (Cleveland and Rothstein, 2001; Gurney et al., 1994), bien que chaque lignée diffère quelque peu en termes d'atteintes, d'apparition et de progression des symptômes. Néanmoins, les souris SOD1 partagent les caractéristiques suivantes : une agrégation de protéines, une perte importante de neurones moteurs et une dénervation axonale accompagnées d'une paralysie progressive et d'une réduction de la durée de vie (Philips and Rothstein, 2015). Des différences au niveau de la réaction cellulaire aux différentes mutations SOD1 ont cependant été reportées avec une vacuolisation des MNs chez les souris SOD1-G93A et G37R (Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995) qui n'est pas présente chez la souris SOD1-G85R (Bruijn et al., 1998). Il a été montré que les atteintes motrices étaient directement liées à la présence de la protéine SOD1 mutée. En effet, la surexpression de la protéine humaine non mutée n'induit, quant à elle, aucun dommage neuronal (Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995). De plus, il a également été montré que la présence du transgène wtSOD1 humain pouvait accélérer la maladie chez les souris SOD1-G93A et qu'un seuil de mutant SOD1 était requis pour le développement d'un phénotype SLA (Deng et al., 2006).

Comme évoqué plus haut, des souris chez lesquelles l'expression de la SOD a été supprimée ont également été développées (Turner and Talbot, 2008). Les premières descriptions de la souris SOD1 KO ont indiqué une absence de phénotype moteur. Des études plus poussées ont montré qu'il s'agissait d'un modèle de stress oxydatif chronique (Reaume et al., 1996). Ces souris ont une durée de vie réduite de 30% et présentent une atrophie musculaire, une faiblesse et une dénervation liées au vieillissement musculaire rapide (Fischer et al., 2012; Flood et al., 1999; Muller et al., 2006). Cependant, aucune perte de neurones moteurs spinaux ou de fibres nerveuses motrices pouvant évoquer ce qui est retrouvé dans la SLA n'a été observé (Flood et al., 1999; Shefner et al., 1999).

2.2.1.2 Les variants SOD1-G93A

Il existe de nombreuses variantes de souris SOD1-G93A suivant le nombre de copies du transgène qu'elles expriment, influençant notamment l'âge d'apparition des symptômes et la vitesse d'évolution de la maladie (Dal Canto and Gurney, 1994, 1997; Radunovic and Leigh, 1996). Deux variants de souris SOD1-G93A sont principalement utilisés : les souris SOD1-G93A *low expressor line* et les *high expressor line*. Les souris SOD1-G93A *low expressor line* expriment un nombre réduit de copies du transgène (<15 copies) (Dal Canto and Gurney, 1997; Deitch et al., 2014; Gurney, 1997). Chez ces souris, la progression de la maladie est lente et leur espérance de vie est d'environ 400 jours (Dal Canto and Gurney, 1997). La lignée SOD1-G93A *high expressor line*, la plus utilisée, dont les souris expriment un grand nombre de copies du transgène (20-25 copies) (Alexander et al., 2004; Chiu et al., 1995), présentent un léger affaiblissement des membres postérieurs avec un déclin de force musculaire globale et ce dès 40 à 50 jours (P40-P50 ; phase asymptomatique) (Kanning et al., 2010; Veldink et al., 2003; Wooley et al., 2005). A partir de 90 à 100 jours (P90-P100 ; phase symptomatique) est observé une paralysie nette des membres postérieurs avec une évolution très rapide de la maladie (Gurney et al., 1994). En l'absence d'euthanasie, le décès survient généralement dans les deux semaines qui suivent la paralysie, dû à une insuffisance respiratoire, avec une médiane de survie d'environ 130 jours (Alexander et al., 2004; Choi et al., 2008; Dal Canto and Gurney, 1997; Gurney et al., 1994).

2.2.1.3 Évolution de la pathologie chez la souris SOD1-G93A

Les différents aspects pathologiques développés par la souris SOD1-G93A ont été répertoriés par Kanning et ses collaborateurs (Kanning et al., 2010). En effet, un grand nombre de mécanismes cellulaires et moléculaires complexes sont impliqués dans la neurodégénérescence

conduisant *in fine* à la mort de ce modèle sévère de SLA aux alentours de 4-5 mois suivant le « fond » génétique (Heiman-Patterson et al., 2005).

De nombreux changements ont lieu bien avant que la force musculaire soit réduite, et ceci dès les stades juvéniles (Amendola and Durand, 2008; Amendola et al., 2004; Bendotti et al., 2001; Bories et al., 2007b; Durand et al., 2006; Leroy et al., 2014; Mourelatos et al., 1996; van Zundert et al., 2012), voire même embryonnaires (Martin et al., 2013). En effet, dès les stades précoces, des altérations ont été décrites à différents niveaux, notamment des propriétés électrophysiologiques des MNs associées à des altérations intracellulaires comme la fragmentation de l'appareil de Golgi, des modifications mitochondriales et de la vacuolisation, ainsi que des changements fins du comportement moteur. S'en suit autour de P50, bien avant que la paralysie ne soit visible, une activation astrogliale et microgliale dans la ME ainsi qu'une ubiquitination des protéines et un stress du RE dans les MNs de grande taille (de type *fast fatigable* (FF)), conduisant à une dégénérescence valérienne de l'axone des MNs et à la dénervation des fibres musculaires associées (fibres IIb), avec un déclin rapide de la force musculaire (Gerber et al., 2012; Mancuso et al., 2011a; Mancuso et al., 2011b; Mead et al., 2011; Veldink et al., 2003; Wooley et al., 2005). Au cours des mois suivants, ces changements s'exacerbent et se généralisent à d'autres unités motrices, entraînant une perte importante de neurones moteurs et une paralysie musculaire. C'est autour de P90, moment où la paralysie motrice devient apparente, qu'a lieu la perte neuronale et musculaire la plus dramatique (Hegedus et al., 2007).

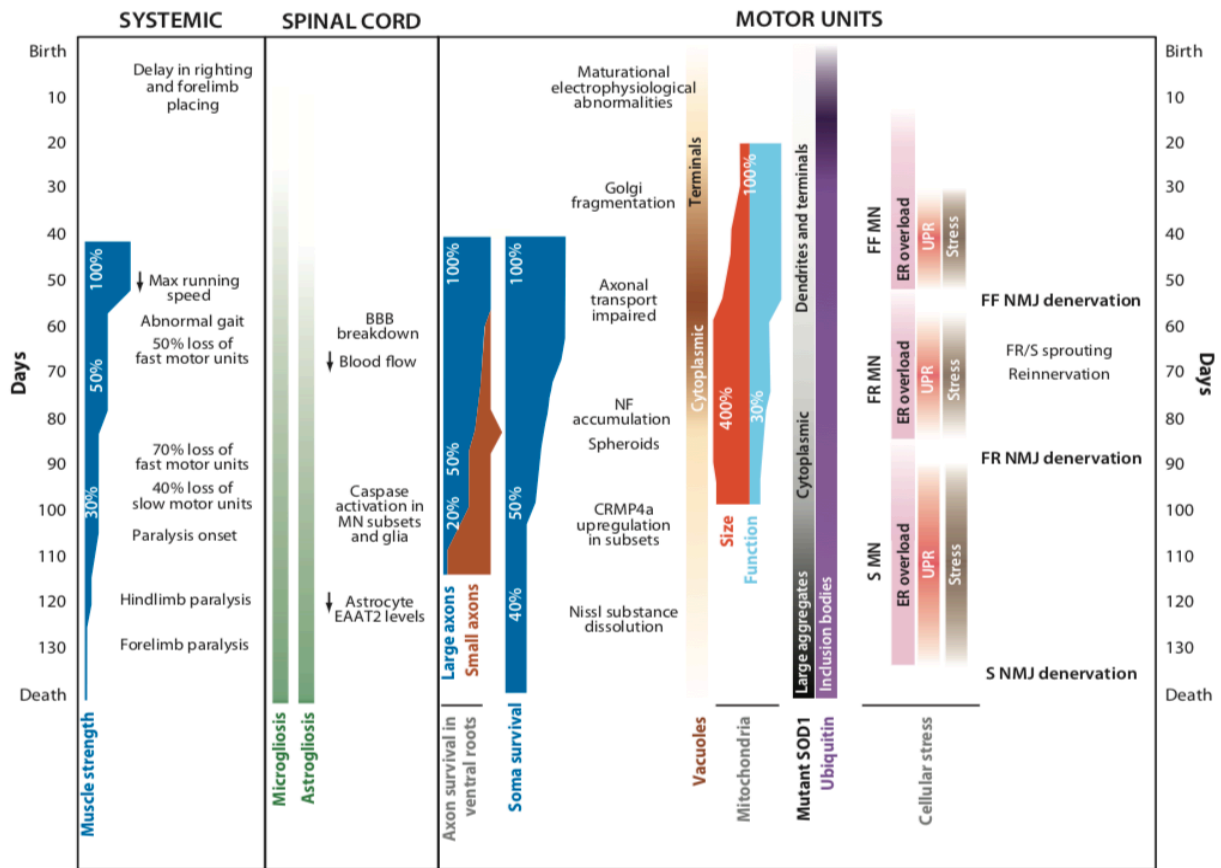


Figure 11 : Chronologie de la neurodégénérescence observée chez la souris SOD1-G93A (D'après Kanning et al., 2010). Ce diagramme donne une vue d'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires complexes conduisant à la mort neuronale dans le modèle sévère de SLA SOD1-G93A *high-expressor* au bout de 130 jours environ. Certains paramètres n'ont pas été étudiés aux stades précoces, en conséquence ont été indiqués sur ce schéma leur premières mises en évidence connues.

L'étude des souris SOD1, notamment les souris SOD1-G93A, a permis de caractériser le phénotype des animaux, très proches de celui retrouvé chez les patients SLA, mais également de décrire une partie des mécanismes cellulaires conduisant à la dégénérescence sélective des MNs. Les souris SOD1-G93A ont énormément contribué à notre compréhension de la toxicité du glutamate, de l'implication de la glie, des défauts de transport axonal, des anomalies mitochondriales, du repliement des protéines et d'autres anomalies cellulaires liées à la maladie (Ilieva et al., 2009). On dispose aujourd'hui de nombreuses données comportementales, électrophysiologiques et moléculaires concernant ces animaux. Ce modèle, comme tout modèle, présente évidemment des limites, notamment l'atteinte motrice au niveau des membres supérieurs qui se met en place plus tardivement (Benatar, 2007). Cependant, depuis sa création en 1994, il reste encore aujourd'hui le modèle le plus utilisé parmi les modèles animaux disponibles pour la SLA, témoignant de sa pertinence.

2.2.2 Autres modèles de SLA

Bien que le modèle SOD1, notamment SOD1-G93A, soit prédominant depuis plus d'une vingtaine d'années, d'autres modèles de SLA ont émergés suite à la découverte de l'implication de nouveaux gènes, chacun ayant ses avantages et ses limites. Une grande variété de modèles de SLA existent à ce jour chez plusieurs espèces animales (souris, rat, poisson-zèbre, drosophile, *C elegans*, levure) (Van Damme et al., 2017).

2.2.2.1 Les souris TDP-43

Bien que les mutations de TDP-43 soient relativement rares et représentent 4% des formes familiales de SLA, leur découverte reste un événement majeur dans la chronologie de la génétique de la SLA, donnant lieu à la génération d'environ 20 modèles murins (Picher-Martel, 2016; Liu et al., 2013).

Les premiers modèles murins générés ont été créés par des stratégies transgéniques de surexpression d'ADNc TDP-43 humain de type sauvage et mutant, dans le cerveau, la ME, le cœur et les muscles squelettiques, en utilisant le promoteur du gène de la protéine prion (*Prnp*) (Borchelt et al., 1996; Stallings et al., 2010; Wegorzewska et al., 2009; Xu et al., 2010; Xu et al., 2011). Bien que les caractéristiques des différents modèles varient légèrement, la surexpression de TDP-43 sous sa forme sauvage ou mutée (>2 fois le niveau de protéine endogène) n'est pas bien tolérée dans ces modèles, entraînant l'apparition précoce de phénotypes neurologiques. Les souris transgéniques accumulent des agrégats pathologiques de protéines ubiquitinyllées dans des populations neuronales spécifiques, conduisant à un phénotype moteur sévère caractérisé par des anomalies morphologiques neuronales, des inclusions cytoplasmiques et des degrés variables de sévérité de la pathologie au niveau de la ME suivant les modèles. Les niveaux d'expression de TDP-43 mutant sont en corrélation avec la sévérité du phénotype, les modèles ayant les niveaux d'expression les plus élevés mourant au cours des premières semaines. Cependant, l'agrégation de TDP-43 est rare ou absente dans ces modèles (Stallings et al., 2010; Wegorzewska et al., 2009; Xu et al., 2010; Xu et al., 2011). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'expression du transgène TDP-43 humain sauvage et mutant (A315T et G298S) sous le contrôle du promoteur murin *Thy1*, spécifique des neurones excitateurs (Shan et al., 2010; Wils et al., 2010). Les souris homozygotes pour le transgène TDP-43 sauvage présentent une maladie agressive et ont une durée de vie moyenne d'environ 26 jours (Wils et al., 2010). Encore une fois ici, le phénotype observé chez les souris exprimant

le gène humain muté est le même que celui des souris exprimant le gène humain non muté, révélant un effet toxique de la protéine TDP-43 humaine chez les souris.

D'autres stratégies dans la génération de souris TDP-43 ont permis d'incorporer des fragments de génome humain, permettant de générer des souris transgéniques exprimant le TDP-43 humain mutant (A315T et G298S) ou sauvage sous le contrôle du promoteur TDP-43 endogène (Swarup et al., 2011). L'expression du TDP-43 humain dans la ME est trois fois plus élevée chez les souris transgéniques que chez la souris de type sauvage. Des inclusions de TDP-43 ubiquitinyllées nucléaires et cytosoliques ont été observées chez des souris transgéniques TDP-43 mutantes à l'âge de 10 mois. Cependant, ces souris ne progressent pas vers un phénotype paralytique et ont une durée de vie normale (Swarup et al., 2011).

Récemment, un autre modèle de souris à expression conditionnelle exprimant une forme de TDP-43 dans laquelle le signal de localisation nucléaire (NLS) est manquant a été conçu (Walker et al., 2015). Ce modèle permet l'expression cellule-spécifique du transgène TDP-43. Ainsi, l'expression de ce mutant TDP-43 sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde du neurofilament (NEFH) permettant l'expression dans le cerveau et la ME, donne lieu à un phénotype neurodégénératif progressif mimant la SLA. En effet des déficits moteurs, une dénervation des jonctions neuromusculaires (JNM), une perte des MNs, une délocalisation de TDP-43 ainsi qu'une mort prématurée des souris au bout de 8 à 20 semaines sont observées. Une réversion de ce phénotype est constatée par l'administration de doxycycline désactivant l'expression du TDP-43 mutant, même après que le début de la neurodégénérescence ait eu lieu (Walker et al., 2015).

2.2.2.2 Les souris FUS/TSL

Près d'une douzaine de modèles de souris FUS ont été conçues, notamment des souris *knock-in* et Cre-inductibles, mettant en jeu des pertes de fonction et des surexpressions transgéniques, la plupart présentant des mutations perturbant la séquence NLS de FUS (Nolan et al., 2016). Les mutations de perte de fonction du FUS dans les souches de souris consanguines entraînent une instabilité chromosomique et la mort périnatale des animaux (Hicks et al., 2000). La perte de FUS n'aboutit pas à des phénotypes de SLA (Kino et al., 2015), ce qui conforte l'idée d'un gain de fonction toxique de la protéine mutée (Scekic-Zahirovic et al., 2017; Sharma et al., 2016).

Un modèle murin *knock-in* Cre-inductible permettant de supprimer de manière conditionnelle la NLS de FUS a été généré (Scekic-Zahirovic et al., 2016). A partir de ce modèle, des souris

hétérozygotes ont été créés présentant une seule copie du gène FUS dépourvue de NLS en plus de l'allèle de type sauvage, les souris homozygotes étant non viables. Ces souris présentent une localisation cytoplasmique de FUS ainsi qu'une perte progressive des neurones moteurs avec 30% de perte à 22 mois, sans jamais progresser vers le stade final de la maladie (Scekic-Zahirovic et al., 2017).

Une série de lignées transgéniques a été créée, où des ADNc de type sauvage ou différents mutants FUS ont été insérés dans le locus du gène de la protéine tau (*Mapt*) associés aux microtubules. Ces souris présentent également une cassette lox stop de sorte que les ADNc insérés restent silencieux jusqu'à ce qu'ils soient activés par la Cre-recombinase. Les souris contenant les formes mutantes de FUS présentent des anomalies au niveau des jonctions neuromusculaires suivies d'une dégénérescence des MNs, une mauvaise localisation et une agrégation cytoplasmique de FUS. Ces souris ne progressent cependant pas vers la paralysie ou ne développent pas de symptômes retrouvés en phase terminale de la maladie (Sharma et al., 2016).

Une étude récente a décrit un modèle *knock-in* humanisé reproduisant une anomalie en 3' dans un gène d'épissage (Devoy et al., 2017). L'exon 15 de souris, contenant la séquence NLS, a été remplacé par la séquence humaine, ce qui a entraîné un nouveau décalage de cadre dans l'exon 15. Ces souris présentent des altérations progressives de la motricité, associées à une dénervation ainsi qu'une perte progressive des MNs spinaux (20% de perte à 18 mois) avec une légère réduction de la durée de vie à 22 mois. Chez ces souris, une augmentation de la localisation cytoplasmique de FUS est observée, avec cependant une présence nucléaire (25% comparé au WT). De plus, le mutant ne forme pas d'agrégats et ne montre qu'une légère coloration diffuse dans la région périnucléaire (Devoy et al., 2017).

Des souris transgéniques surexprimant FUS présentant un phénotype sévère et agressif de type SLA ont pu être générées (Mitchell et al., 2013; Qiu et al., 2014; Shelkovnikova et al., 2013). L'utilisation de certains promoteurs, tels que ceux des gènes *Prnp* ou *Thy1*, entraîne des niveaux d'expression neuronale chez les animaux transgéniques supérieurs aux niveaux endogènes typiques. Ces souris développent rapidement des altérations motrices à 3-4 mois conduisant à la mort prématurée sous quelques jours après l'apparition des symptômes. Des inclusions cytoplasmiques FUS ont été identifiées principalement dans les MNs, et une neuroinflammation est également visible dans le tronc cérébral et la ME de ces souris. De manière intéressante, un

effet du fond génétique a été observé chez ces souris faisant passer la survie de 50-75 jours à 130-180 jours lorsque les souris sont maintenues sur fond C57BL/6J.

2.2.2.3 Les souris C9ORF72

Des modèles de souris C9ORF72 avec des mutations avec perte de fonction ont été conçus par plusieurs groupes (Dickinson et al., 2016; Jiang et al., 2016; Koppers et al., 2015; O'Rourke et al., 2016). Un allèle conditionnel a été utilisé pour générer à la fois une perte constitutive et une perte neuronale spécifique de C9ORF72. Aucun déficit phénotypique chez ces souris n'a été découvert (Koppers et al., 2015). Deux autres modèles d'inactivation de la lignée germinale ont également été étudiés (Dickinson et al., 2016; O'Rourke et al., 2016). Ces modèles développent une splénomégalie progressive et une lymphadénopathie avec accumulation de cellules ressemblant à des macrophages engorgés. L'expression de C9orf72 est élevée dans les cellules myéloïdes et sa perte chez ces souris KO conduit à une accumulation lysosomale et à une réponse immunitaire altérée des macrophages et de la microglie. On observe également une neuroinflammation qui se met en place au fur et à mesure de la progression de la maladie chez ses modèles, similaire à celle observée chez les patients atteints d'une SLA causée par une mutation C9orf72. Aucuns symptômes caractéristiques de la SLA comme les altérations motrices, n'a toutefois été noté (O'Rourke et al., 2016). De manière intéressante, dans une deuxième évaluation indépendante de l'allèle C9orf72, des déficits auto-immuns ont été notés, mais une diminution significative de la survie au-delà de 100 jours a également été observée (Burberry et al., 2016). La cause de la mortalité observée dans cette étude n'est pas clairement définie, mais étant donné les déficits auto-immuns connus, l'environnement pourrait facilement jouer un rôle. Un troisième modèle de KO indépendant a également montré que les souris développaient un phénotype immunitaire robuste caractérisé par une expansion myéloïde, une activation des cellules T et une augmentation du nombre de plasmocytes. Les auteurs de cette étude ont signalé que ces souris présentaient également des auto-anticorps élevés et des signes de glomérulonéphropathie à médiation immunitaire (Atanasio et al., 2016). Ces études ne vont pas dans le sens de l'hypothèse que la SLA associée à C9orf72 soit causée par une perte de la fonction des gènes, cependant elles servent à introduire un élément de prudence concernant les approches thérapeutiques visant à réduire globalement C9orf72, qui pourrait déclencher de possibles maladies auto-immunes.

En 2015-2016, plusieurs groupes ont caractérisés des souris transgéniques générées en utilisant le système de transgénèse BAC contenant des répétitions C9ORF72 humaines et des contrôles

de type sauvage (Jiang et al., 2016; Liu et al., 2016; O'Rourke et al., 2016; Peters et al., 2015). Les quatre groupes ont tous rapporté que leurs animaux transgéniques exprimant beaucoup de répétitions, développaient la pathologie caractéristique de la SLA liée à C9ORF72, c'est-à-dire des *loci* d'ARN nucléaire et des inclusions cytoplasmiques dues aux répétitions mais aucune dégénérescence des MNs, ce qui fait qu'ils ne sont pas utilisés à l'heure actuelle. Quelques différences existent entre les différents modèles, notamment au niveau du nombre de répétitions (généralement compris entre 400-500 et pouvant aller jusqu'à 1000 répétitions) (O'Rourke et al., 2016), ainsi qu'au niveau de la progression des symptômes liés à la pathologie.

2.2.2.4 Autres modèles hors modèles murins

Bien que la souris soit le rongeur le plus communément utilisé pour la création de modèles mammifères transgéniques, certaines études portant sur les rats génétiquement modifiés ont montré leur intérêt pour l'étude de la SLA. En effet, certaines mutations chez le rat n'entraînent pas les mêmes effets que chez la souris. La surexpression du gène humain FUS/TSL sauvage, notamment, n'aboutit pas à la dégénérescence neuronale comme retrouvée chez le modèle murin et chez l'homme (Huang et al., 2011), ce qui ouvre la voie pour de nouvelles études sur l'effet de cette mutation impliquée dans les fSLA.

Des modèles animaux, autres que les modèles mammifères, ont également été générés afin d'améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires à l'origine de la SLA. Ainsi, l'étude d'organismes moins complexes, dont les caractéristiques physiologiques et les réseaux neuronaux sont mieux connus, permet de cibler plus spécifiquement les mécanismes intracellulaires induits par des mutations génétiques. On compte parmi ces modèles de SLA, le poisson zèbre, la drosophile ou encore le nématode (Babin et al., 2014; Joyce et al., 2011; Li et al., 2013c; Murakami et al., 2012; Sasayama et al., 2012; Stepto et al., 2014). En effet, chacun de ces animaux possède des avantages propres en termes de séquençage de leur génome, d'accessibilité des cellules et de la simplification de la visualisation des phénotypes mutés.

Depuis une dizaine d'années, les avancées sur le développement des cellules souches pluripotentes reprogrammées (iPSC) à partir de fibroblastes humains (Takahashi et al., 2007) ont permis de modéliser *in vitro*, non seulement les fSLA, mais également les sSLA beaucoup plus répandues. En 2008, la première culture de neurones moteurs reprogrammés à partir d'iPSC de patients SLA a vu le jour (Dimos et al., 2008). Depuis, différentes techniques ont été développées pour produire des lignées d'iPSC *via* la reprogrammation génétique de multiples cellules somatiques dont les adipocytes (Taura et al., 2009) et les kératinocytes (Aasen et al.,

2008). De plus, de nombreuses méthodes de conversion directe ont été développées pour produire des cellules neurales progénitrices reprogrammées (iNPC) (Meyer et al., 2014) et des neurones moteurs (Son et al., 2011) à partir de cellules de patients. Des cellules neurales progénitrices (NPC) ont également été isolées d'échantillon de ME de patients postmortem puis différenciées en neurones moteurs, en astrocytes et en oligodendrocytes *in vitro* (Haidet-Phillips et al., 2011) permettant de modéliser toutes les formes de SLA *in vitro* sans introduire d'altérations épigénétiques majeures. En 2014, des astrocytes primaires ont été isolés à partir de biopsies de ME et de cerveau de patients (Re et al., 2014), fournissant un modèle *in vitro* précieux pour étudier les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la SLA au cours de la progression de la maladie.

2.3 Physiopathologie de la SLA

L'ensemble des modèles animaux que nous venons de décrire et notamment les souris SOD1 ont permis une meilleure compréhension de la physiopathologie de la SLA. Cependant, les mécanismes conduisant à la sélectivité de la dégénérescence accrue des MNs caractéristique de la maladie restent encore aujourd'hui mal compris. La SLA est vraisemblablement une maladie multifactorielle impliquant l'interaction de nombreux processus pathologiques cellulaires et moléculaires qui joueraient un rôle déterminant dans les mécanismes dégénératifs. Parmi eux sont reportés une agrégation de protéines mal repliées, des dysfonctions mitochondriales, un stress oxydatif, une altération du transport axonal, une excitotoxicité glutamatergique, ainsi que des processus neuroinflammatoires impliquant les cellules gliales environnantes, et de manière plus précoce, une modification de l'excitabilité neuronale.

2.3.1 Dégénérescence sélective des motoneurones

Les gènes mutés dans la SLA sont exprimés de manière ubiquitaire dans tout le système nerveux ainsi que dans divers autres tissus, cependant ils provoquent une dégénérescence quasi-sélective des neurones moteurs corticaux et des MNs spinaux. À l'heure actuelle, on ignore pourquoi ces MNs sont si vulnérables aux mutations SOD1, FUS, TDP-43 et C9ORF72 retrouvées dans la SLA. En outre, alors que les MNs sont ciblés de manière sélective, nous avons vu plus haut que certains sous-groupes de MN étaient relativement résistants à la dégénérescence (Comley et al., 2016; Hedlund et al., 2010). Il existe un gradient de vulnérabilité parmi les MNs de la ME où les unités motrices plus rapides, présentant des MNs α les plus gros (de type FF) sont affectées avant les unités motrices plus lentes, innervées par les MNs α plus petits de type Slow (S) et Fatigue Resistant (FR) (Pun et al., 2006). Par conséquent, les muscles « rapides », dépendants principalement de la glycolyse et ayant un métabolisme plus oxydant, sont paralysés avant les muscles plus « lents » (Hegedus et al., 2007). Les facteurs à l'origine de cette dégénérescence sélective progressive et ordonnée sont encore inconnus à l'heure actuelle. Cet effet serait dû à une capacité différente de ces neurones à gérer l'accumulation de protéines mal configurées (Saxena et al., 2009) les FR et S résistants plus longtemps que les FF. La consommation énergétique importante des MNs de type F comparativement aux autres MNs a également été évoquée (Kanning et al., 2010).

2.3.2 Mécanismes impliqués

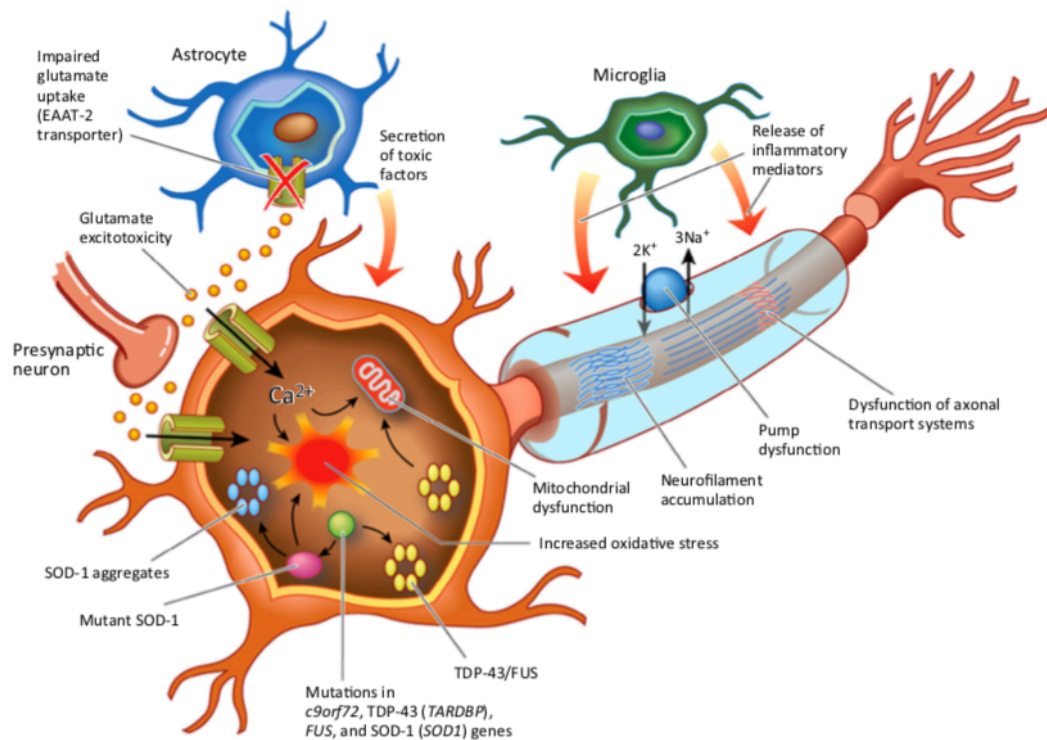


Figure 12 : Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dégénérescence des MN (D'après Vucic et al., 2014). Les mécanismes physiopathologiques de la neurodégénérescence sélective des MN dans la SLA sont multifactoriels et complexes, impliquant des facteurs moléculaires et génétiques. Des dysfonctionnements astrocytaires peuvent notamment aboutir à une diminution de la recapture du glutamate extracellulaire et ainsi contribuer à une augmentation de l'excitotoxicité glutamatergique. Cette excitotoxicité du glutamate est liée à une augmentation d'entrée des ions Na^+ et Ca^{2+} activant des voies enzymatiques dépendantes du Ca^{2+} impliquées dans la dégénérescence neuronale. De plus, une augmentation de la genèse de radicaux libres augmentant le stress oxydatif et contribuant à la dégénérescence a été constatée chez les patients SLA. Les mutations des gènes *c9orf72*, *TARDBP* (TDP43) et *FUS* induisent des dysfonctionnements du métabolisme de l'ARN conduisant à la formation d'agrégats protéiques intracellulaires. Les mutations du gène *SOD1* quant à elles, augmentent le stress oxydatif, induisent des dysfonctionnements mitochondriaux, forment des agrégats protéiques et affectent le transport axonal. L'activation de la microglie chez les sujets SLA provoque la libération de facteurs pro inflammatoires, ajoutant à la toxicité cellulaire.

2.3.2.1 Agrégats protéiques

L'agrégation anormale de protéines en corps d'inclusion dans les MNs est une caractéristique pathologique bien connue dans les SLA de type familial et sporadique (Sun et al., 1975; Takahashi et al., 1972). En effet certaines mutations retrouvées chez les patients ainsi que dans les modèles animaux de SLA, comme celle du gène *SOD1* ou *TDP-43*, entraînent une mauvaise conformation des protéines et aboutissent à la formation d'agrégats protéiques cytoplasmiques toxiques pour les cellules (Bruijn et al., 1997; Watanabe et al., 2001). En effet, en plus d'empêcher la protéine de jouer son rôle physiologique, ces agrégats ont la capacité de se lier à d'autres protéines, désorganisant ainsi complètement la cellule et ses organites (Shaw and

Valentine, 2007). Plusieurs travaux ont révélé une grande variété de types d'inclusions protéiques dans les MNs lors de la SLA, notamment des inclusions ressemblant à des écheveaux qui sont réactives pour l'ubiquitine, des inclusions filamenteuses plus petites contenant des protéines de neurofilament, et des corps de Bunina, petites inclusions granulaires d'origine lysosomale (Blokhuis et al., 2013). Des études ont montré que les souris qui avaient les taux de protéines SOD1 mutée les plus importants développaient la maladie le plus précocement (Wong et al., 1995). Cependant, les mécanismes cellulaires précis du rôle des agrégats protéiques dans la dégénérescence neuronale restent à être élucidés.

Bien que les patients atteints de SLA et les souris transgéniques SOD1-G93A développent des agrégats SOD1 ubiquitinés insolubles dans les MNs, les modèles actuels impliquent des protéines SOD1 solubles mal repliées comme espèce toxique, de manière similaire à l'amyloïde- β dans la maladie d'Alzheimer. La SOD1 soluble mal repliée peut former des structures oligomériques formant des pores et ainsi exercer de nombreux effets délétères au sein de la cellule (Allen et al., 2012; Elam et al., 2003). La protéine toxique est capable d'induire un stress du RE qui altère la capacité de la cellule à fournir une clairance normale des protéines cytoplasmiques et ce jusqu'à conduire à l'apoptose de la cellule (Rabizadeh et al., 1995; Tan et al., 2013; Vehvilainen et al., 2014). Le mutant SOD1 s'accumule également de manière aberrante au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial, altérant ainsi la fonction mitochondriale (Carri and Cozzolino, 2011; Tan et al., 2013; Vehvilainen et al., 2014; Vijayvergiya et al., 2005). Comme la mutation réduit la liaison aux ions métalliques, la protéine SOD1 mutante perturbe également l'homéostasie calcique, ce qui augmente la susceptibilité au stress cellulaire (Mondola et al., 2004). Des travaux plus récents suggèrent que les cellules sont également capables de sécréter des protéines SOD1 mal repliées qui vont ensuite augmenter l'agrégation de la protéine SOD1 (mutante et native de type sauvage) dans les cellules voisines *via* un processus *prion-like* (Grad and Cashman, 2014; Rotunno and Bosco, 2013), fournissant un mécanisme possible pour la propagation de la maladie. Par conséquent, le mutant SOD1 pourrait induire des mécanismes intracellulaires menant à la mort des MNs et également favoriser la propagation de la maladie *via* des voies de communications intercellulaires. Contrairement à SOD1, la toxicité du mutant TDP-43 est due à la fois à une perte de fonction et à un gain de fonction toxique (Buratti and Baralle, 2008; Janssens and Van Broeckhoven, 2013). Les mécanismes exacts de la toxicité du mutant TDP-43 restent à être élucidés cependant le mutant TDP-43 cytoplasmique mal replié semble également capable d'augmenter le mauvais repliement du TDP-43 endogène de la même manière que le mutant SOD1.

2.3.2.2 Autophagie

L'autophagie est une voie de dégradation par laquelle les composants intracellulaires, comprenant les protéines et organites, sont enveloppés et dégradés par fusion avec les lysosomes. Les différents types d'inclusions protéiques retrouvées dans la SLA suggèrent un rôle de l'autophagie dans le processus de la pathologie. De nombreuses études ont mis en évidence des défauts d'autophagie dans les tissus de patients et chez les modèles animaux de SLA. De nombreuses molécules de signalisation interviennent au cours des différentes étapes de l'autophagie. Parmi elles, la signalisation de la PI3K lors de la formation de l'autophagosome ainsi que l'association du complexe p62/SQSTM1 aux protéines et des structures ciblées pour la dégradation, figurent parmi les mieux caractérisées (Bjorkoy et al., 2005; Zavodszky et al., 2013). L'autophagie est cruciale pour l'élimination des protéines mal repliées ou agrégées et est activée par le signal *unfolded protein response* (UPR). Les protéines cibles de l'autophagie semblent être des protéines à durée de vie relativement longue, ce qui inclut les protéines de liaison à l'ARN, contrairement au système ubiquitine/protéasome, qui est plutôt spécifique des protéines à vie courte (Schreiber and Peter, 2014). La clairance autophagique des protéines et des organites est particulièrement importante pour l'homéostasie et la survie neuronale. En effet, les neurones ont des besoins métaboliques considérables et sont extrêmement sensibles à la présence de protéines mal repliées ou agrégées. Les patients SLA présentent une accumulation d'inclusions p62 positives dans les MNs et les cellules gliales (Blokhuis et al., 2013) suggérant une clairance insuffisante des protéines mal repliées et agrégées. De plus, l'identification de mutations dans des gènes codant pour des protéines associées à l'autophagie, telles que l'optineurine (OPN) et la *valosin-containing protein* (VCP), en tant que facteurs causaux dans des cas de fSLA a renforcé le rôle proposé de l'autophagie dans l'homéostasie du MN (Johnson et al., 2010; Maruyama et al., 2010). Il a également été montré que l'activation de l'autophagie réduit l'agrégation de TDP-43 et améliore les déficits moteurs chez des modèles transgéniques murins et chez la drosophile (Cheng et al., 2015) suggérant que l'équilibre autophagique est un facteur déterminant pour la survie des MNs dans la SLA. Ces résultats montrent que l'activation de l'autophagie est une cible thérapeutique potentielle pour la SLA. Cependant, une étude a montré que l'activation de l'autophagie chez des souris SOD1-G93A accélérerait la dégénérescence des MNs, démontrant la nécessité d'une certaine prudence dans le ciblage de l'autophagie en tant que thérapie (Zhang et al., 2011).

2.3.2.3 Stress du réticulum endoplasmique

Le RE fait partie intégrante de la synthèse, du repliement, de la modification et du transport des protéines par la voie de sécrétion. La perturbation de la fonction normale du RE, et en particulier, l'accumulation de protéines non ou mal repliées provoque un stress du RE, ce qui déclenche le signal UPR. Les composants clés de l'UPR incluent une diminution générale des taux de synthèse des protéines, une augmentation de l'expression des protéines chaperonnes associées au RE, ainsi que l'activation de la voie de dégradation des protéines associées au RE (ERAD) et l'autophagie induite par le RE (Gardner et al., 2013; Sano and Reed, 2013). ERAD initie la translocation des protéines mal repliées dans le cytoplasme pour leur marquage polyubiquitine et leur dégradation par le protéasome. Le RE constitue également un important réservoir de Ca^{2+} intracellulaire et contient de nombreux canaux et senseurs calciques. Lorsque l'UPR et l'ERAD sont insuffisants pour restaurer l'homéostasie du RE, les protéines membranaires du RE ainsi que la signalisation calcique peuvent induire une apoptose cellulaire (Hoyer-Hansen and Jaattela, 2007; Sano and Reed, 2013).

De plus en plus de résultats suggèrent que l'altération de l'UPR et un stress excessif du RE contribuent à la vulnérabilité des MNs dans la SLA. Les anomalies du RE sont fréquentes dans les MNs des patients sSLA, avec des irrégularités dans la structure du RE, une chromatolyse et un détachement ribosomal évidents de la membrane du RE (Kanekura et al., 2009). Les MNs spinaux des patients sSLA présentent plusieurs signes de stress du RE, notamment une phosphorylation accrue des protéines membranaires du RE et une surexpression des protéines chaperones du RE (Ilieva et al., 2007). Les MNs les plus vulnérables sont systématiquement plus sensibles à l'apparition d'un stress du RE et montrent une surexpression des marqueurs de l'UPR comparés aux MNs résistants, malgré une accumulation de protéines cytosoliques ubiquitinées comparable (Saxena et al., 2009). Des inclusions cytoplasmiques SOD1 chez les souris SOD1-G93A sont également positives aux protéines chaperones résidentes du RE, suggérant que la SOD1 mal repliée s'accumule dans le RE et active l'UPR entraînant la mort cellulaire par apoptose (Wate et al., 2005). De même, une réduction pharmacologique du stress du RE préserve la fonction neuromusculaire et augmente la survie des souris transgéniques SOD1 (Oh et al., 2008). Récemment, une accumulation d'agrégats de la protéine SOD1 sauvage provoquée par un stress du RE a été retrouvée dans des cas de sSLA (Medinas et al., 2018). Le maintien de l'homéostasie du RE est dépendant de l'équilibre de multiple senseurs et voies de signalisation, associé avec d'autres processus comme la dégradation protéosomique et

autophagique, qui vont déterminer si l'activation de l'UPR est bénéfique ou néfaste pour la survie des MNs dans la SLA.

2.3.2.4 Stress oxydatif

Le stress oxydatif se produit lorsqu'il existe un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur élimination, ou lorsque la cellule est incapable de réparer ou d'éliminer les dommages causés par ce stress. Diverses études suggèrent que le stress oxydatif est impliqué dans la pathogenèse de la SLA. L'accumulation progressive de la protéine mutante SOD1 mal repliée, combinée à l'action d'autres facteurs de stress, tels que le vieillissement, induit une réponse au stress cellulaire (Robberecht and Philips, 2013). De plus, il a été démontré que le stress oxydatif conduisait au repliement et à l'agrégation de la protéine SOD1 de type sauvage, comme cela se produit avec la protéine mutante (Ezzi et al., 2007; Marat et al., 2011). Ces résultats suggèrent que la protéine SOD1 pourrait également jouer un rôle dans les formes sporadiques de SLA, contribuant à la pathogenèse de la maladie une fois que le stress cellulaire est établi par d'autres mécanismes. Des échantillons de sang, d'urine et de LCR prélevés chez des patients atteints de sSLA ont révélé une augmentation des dommages causés par les radicaux libres (Mitsumoto et al., 2008; Smith et al., 1998). Des études d'autopsie chez des patients sSLA et fSLA ont également confirmé la présence d'altérations de protéines, de lipides et d'ADN causées par des radicaux libres consécutifs à des mutations SOD1 (Fitzmaurice et al., 1996; Shaw et al., 1995b; Shibata et al., 2001). Des études expérimentales menées sur des modèles murins SOD1 mutants ont montré une augmentation des taux d'oxydation de différents ARNm aux stades présymptomatiques de la maladie, avec une corrélation entre cette oxydation et une diminution de l'expression de la protéine SOD1. L'hypothèse la plus largement acceptée à l'heure actuelle est qu'en plus des dommages qu'il cause directement, le stress oxydatif favorise d'autres mécanismes pathogènes qui contribuent aux altérations neuronales, notamment l'excitotoxicité, l'agrégation des protéines, la réponse au stress du RE, le dysfonctionnement mitochondrial, et affecte également l'interaction entre les MNs et le microenvironnement neuronal.

2.3.2.5 Altérations mitochondriales

Les mitochondries jouent un rôle central dans la survie et le métabolisme des cellules. En plus de leur rôle bien connu en tant que producteurs d'ATP *via* la phosphorylation oxydative, les mitochondries participent à la biogenèse des phospholipides, l'homéostasie du Ca^{2+} et à l'apoptose. Les mitochondries sont particulièrement nombreuses et cruciales dans les neurones qui ont des besoins métaboliques élevés comme les MNs (Engl and Attwell, 2015; Nicholls and Budd, 2000). Ce sont de plus des organites tampon du Ca^{2+} qui modulent la dynamique locale de Ca^{2+} , permettant par exemple de moduler la libération de NT dans les neurones (Rizzuto et al., 2012). Ces derniers sont des cellules à vie longue qui persistent tout au long de la vie de l'individu et sont donc plus susceptibles aux dommages accumulés résultant d'un dysfonctionnement mitochondrial (Payne and Chinnery, 2015). Il est couramment admis que le dysfonctionnement mitochondrial est lié à certaines maladies neurodégénératives (Balazs and Leon, 1994; Beal, 1998; Dupuis et al., 2004; Lezi and Swerdlow, 2012; Schapira et al., 1989). Dans les MNs, le rôle des mitochondries est d'autant plus essentiel qu'ils ne possèdent pas, comme la plupart des autres neurones, de protéines fixatrices du Ca^{2+} telles que la parvalbumine, la calmoduline ou la calbindine. La régulation des taux de Ca^{2+} intracellulaire dans les MNs passe donc entièrement par le métabolisme mitochondrial. L'activité motoneuronale nécessite, de plus, la consommation de grandes quantités d'énergie (sous forme d'ATP) afin notamment de maintenir leur potentiel membranaire de repos, d'assurer le transport axonal, la libération synaptique de NT ou de maintenir l'homéostasie des gradients ioniques (Harris et al., 2012; Le Masson et al., 2014; Rangaraju et al., 2014).

Bon nombre des gènes identifiés à l'origine de la SLA ont un rôle dans les fonctions associées aux mitochondries et des dysfonctionnements au niveau de ces organites sont retrouvés de manière importante dans des modèles *in vitro* et *in vivo* ainsi que chez les patients. Les dysfonctions mitochondriales retrouvées dans la SLA se présentent sous de nombreuses formes, incluant une phosphorylation oxydative défectueuse, une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une altération de la capacité à tamponner le Ca^{2+} et une dynamique mitochondriale défectueuse.

De plus, le dysfonctionnement mitochondrial semble être directement ou indirectement lié à d'autres mécanismes de toxicité associés à la SLA tels que l'excitotoxicité, la dérégulation de l'homéostasie protéique et les dysfonctions du transport axonal. Chez les souris SOD, des altérations de l'homéostasie calcique mitochondriale ont été reportées dès les phases

présymptomatiques (Kawamata and Manfredi, 2010; Kong and Xu, 1998; Mattiazzi et al., 2002), et il semblerait que le repliement anormal de la protéine SOD1 altère la chaîne respiratoire mitochondriale (Bowling et al., 1993; Dupuis et al., 2004) uniquement dans les neurones de la ME (Liu et al., 2004). Il a de plus été montré que les mitochondries chez les souris SOD1-G93A présentent une vacuolisation importante suivie d'une dégénérescence mitochondriale (Dal Canto and Gurney, 1994; Higgins et al., 2003; Jaarsma et al., 2000; Jaarsma et al., 2001; Wong et al., 1995). Les souris FUS et TDP-43, quant à elles, possèdent des mitochondries non fonctionnelles (Magrane et al., 2014; Shan et al., 2010; Xu et al., 2011).

2.3.2.6 Altération du transport axonal

L'activité synaptique est énergiquement exigeante et nécessite un large éventail de réactions biochimiques, la participation d'organelles cellulaires et de nombreuses molécules pour fonctionner. Le transport axonal antérograde, qui est dépendant de l'ATP, facilite ces processus en transportant des protéines, des ARNm, des organelles, des vésicules et d'autres molécules de signalisation vers le terminal axonal (Millecamps and Julien, 2013). L'axone sert également de moyen de transport rétrograde des protéines mal repliées, des organites endommagés, des vésicules et des molécules de signalisation de l'axone vers le soma de la cellule. Ces fonctions sont accomplies par des complexes moteurs moléculaires protéiques en conjonction avec le cytosquelette axonal. La machinerie du transport axonal comprend principalement les microtubules et les protéines motrices, les kinésines et les dynéines, associées aux microtubules (Robberecht and Philips, 2013). Les neurofilaments, protéines du cytosquelette de la famille des filaments intermédiaires présents dans les axones, ont un rôle de régulateurs du transport axonal. Les axones des MNs, pouvant atteindre 1 m de long, sont particulièrement vulnérables aux altérations du transport axonal et aux anomalies de la structure cytosquelettique. La longueur remarquable des axones des MNs ainsi que la nécessité de l'intégrité du transport axonal pour la fonction synaptique, font de celui-ci un facteur de susceptibilité non négligeable dans la dégénérescence des MNs.

Dans de multiples maladies neurodégénératives dont la SLA, des dysfonctionnements du transport axonal ont été reportées (De Vos et al., 2008; Morfini et al., 2009; Sau et al., 2011). L'agrégation et l'accumulation pathologique de protéines de filaments intermédiaires du cytosquelette sont couramment retrouvées chez les patients SLA aussi bien des formes familiales et sporadiques et chez les souris SOD1 au niveau des neurones moteurs, perturbant ainsi le transport intracellulaire (He and Hays, 2004; Kondo et al., 1986; Xiao et al., 2006). Les

déficits du transport axonal ont traditionnellement été considérés comme secondaires à de multiples altérations dans la SLA, notamment suite à un dysfonctionnement mitochondrial, entraînant une production insuffisante d'ATP, ou à une perturbation de la fonction de la kinésine et à une agrégation de protéines (Ackerley et al., 2000; Kiaei et al., 2007; Miller and Sheetz, 2004). Ces dernières années, des altérations au niveau des gènes codants pour des protéines directement impliquées dans le transport axonal ont également été identifiées chez des patients SLA, plus particulièrement au niveau des gènes de la chaîne lourde et légère du neurofilament (Bergeron et al., 1994; Figlewicz et al., 1994; Tomkins et al., 1998). De plus, des altérations du transport antérograde et rétrograde ont été reportées dans plusieurs études chez les souris SOD1-G93A avant même l'apparition des symptômes (De Vos et al., 2007; Miller and Sheetz, 2004; Vinsant et al., 2013a, b). Des travaux récents ont montré que TDP-43 s'associait également à des ARNm dans le cytoplasme et été transporté *via* le transport axonal lent. Dans les cas de fSLA, TDP-43 mutant réduit le mouvement des granules d'ARNm et modifie l'équilibre du transport axonal dans la direction rétrograde (Alami et al., 2014). Ainsi, une anomalie du cytosquelette et du transport axonal sont des facteurs de susceptibilité à la dégénérescence des MNs dans diverses formes de SLA, et les défauts du transport axonal sont systématiquement un événement précoce observé dans les modèles de SLA.

2.3.2.7 Excitotoxicité glutamatergique

Le glutamate est le principal NT excitateur du SNC. Au niveau de la ME, il joue notamment un rôle déterminant dans le déclenchement et la modulation de l'activité locomotrice. Cependant, bien que la transmission glutamatergique soit nécessaire dans de nombreuses fonctions, celle-ci doit rester dans des gammes de concentrations physiologiques. Pour ce faire, une fois que le glutamate est libéré, il interagit avec les récepteurs postsynaptiques puis les stimuli excitateurs disparaissent avec l'élimination du NT de la fente synaptique par les transporteurs de la recapture du glutamate. Le transporteur 2 d'acides aminés excitateurs (*excitatory amino acid transporter 2*) est le plus abondant de ces transporteurs. Dans le cas d'une stimulation excessive des récepteurs ionotropiques glutamatergiques, liée à une augmentation des niveaux synaptiques du NT ou d'une plus grande sensibilité au glutamate au niveau du terminal post-synaptique (Van Damme et al., 2005b), l'entrée massive de Ca^{2+} dans le neurone entraîne une cascade intracellulaire pouvant conduire à la genèse de stress oxydatif et à l'altération des organites cellulaires (Ankarcrona et al., 1995; Danbolt, 2001). L'ensemble de ces phénomènes va fragiliser les neurones et aboutir dans certains cas à leur mort suite à l'activation de mécanismes apoptotiques (Ferraiuolo et al., 2011). Ces mécanismes, qualifiés d'excitotoxicité

liée au glutamate seraient impliqués dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Olney, 1969). Les récepteurs AMPA constituent l'un des plus importants médiateurs de la neurotransmission glutamatergique dans le SNC. La perméabilité de ces récepteurs au Ca^{2+} est en grande partie déterminée par la présence de la sous-unité GluA2, les récepteurs dépourvus de GluA2 étant plus perméables aux ions Ca^{2+} . Les MNs sont particulièrement sensibles à l'excitotoxicité due à l'activation du récepteur AMPA, étant donné la faible expression de GluA2 et des protéines tampons du Ca^{2+} dans ces cellules (Carriedo et al., 1996; Williams et al., 1997).

Plusieurs études ont suggéré un rôle de l'excitotoxicité dans la pathogénèse de la SLA. Certains patients présentent des taux élevés de glutamate dans le LCR et une diminution de l'expression du transporteur 2 d'acides aminés excitateurs dans les zones touchées du SNC (Rothstein et al., 1992; Shaw et al., 1995a). D'autres études ont montré une hyperexcitabilité corticale dès les stades présymptomatiques de la maladie ainsi qu'une perméabilité anormale au Ca^{2+} des récepteurs AMPA (Kwak et al., 2010; Vucic et al., 2008). Il a été montré que les souris SOD1, comme les patients SLA, présentaient des variations de l'affinité des transporteurs glutamatergiques, ainsi que de l'expression des récepteurs et des protéines impliquées dans la recapture et la synthèse du glutamate (Bos et al., 2006; Lin et al., 1998; Plaitakis and Constantakakis, 1993; Rothstein et al., 1992; Spalloni et al., 2013; Trotti et al., 1999; Van Damme et al., 2005a). Ces modifications de la machinerie glutamatergique, favorisent une accumulation du glutamate dans l'espace extracellulaire. Bien que l'on ne sache pas si les dommages excitotoxiques sont un mécanisme pathogène primaire ou la conséquence d'une modification de l'homéostasie neuronale, il semble clair qu'une fois les symptômes établis, les altérations de l'homéostasie glutamatergiques contribuent à la progression de la maladie.

Malgré son efficacité limitée, à l'heure actuelle, un des seuls traitements médicamenteux administrés aux patients atteints de SLA reste le riluzole, agissant sur le système glutamatergique. Comme nous l'avons vu plus haut, le mécanisme d'action thérapeutique du riluzole n'est pas clair, et il semblerait, en plus de ces effets inhibiteurs sur la libération de glutamate, avoir un effet sur les canaux sodiques et les canaux potassiques activés par le Ca^{2+} (Dimitriadi et al., 2013).

2.3.2.8 Modification de l'excitabilité neuronale

De nombreuses études ont montré que l'excitabilité des MNs était également impliquée dans leur dégénérescence sélective lors d'une SLA, bien que ce sujet reste encore mal compris du fait des divergences en fonction du modèle d'étude utilisé.

Des modifications de l'excitabilité des MNs spinaux ont été reportées à des stades asymptomatiques chez des souris SOD1 (Amendola et al., 2004; Pambo-Pambo et al., 2009; Saxena et al., 2013), dans des MNs dérivés d'iPSC (Vucic et al., 2008; Wainger et al., 2014) ainsi que chez des patients sSLA et fSLA (Devlin et al., 2015; Vucic and Kiernan, 2010). Une altération des propriétés fonctionnelles intrinsèques des MNs serait à l'origine de ces modifications de l'excitabilité (van Zundert et al., 2012). La majorité des enregistrements électrophysiologiques réalisée dans ces études provient de cultures primaires de MNs embryonnaires ou de tranches de ME issues de souris âgées de 4 à 10 jours. Les résultats obtenus à partir de ces modèles sont parfois contradictoires puisqu'il existe à la fois des évidences en faveur d'une hyperexcitabilité des MNs et d'autres en faveur d'une hypoexcitabilité. Des analyses menées sur des MNs de souris SOD1 aux stades embryonnaires montrent une hyperexcitabilité des MNs (Kuo et al., 2005; Martin et al., 2013; Pieri et al., 2003) associée à une augmentation de l'amplitude du courant sodique persistant entrant (Kuo et al., 2005; Pieri et al., 2003) et une arborisation dendritique moins développée des MNs (Martin et al., 2013). Des enregistrements réalisés à partir d'animaux nouveau-nés SOD1 mettent à l'inverse en évidence une hypoexcitabilité des MNs chez le modèle SOD1-G85R (Bories et al., 2007a) et une hyperexcitabilité associée à une augmentation exacerbée de l'amplitude du courant sodique persistant entrant, accompagnée d'une augmentation de la conductance d'entrée, sans changement des propriétés passives des MNs, chez le modèle SOD1-G93A (Quinlan et al., 2011; van Zundert et al., 2008). De manière intéressante, l'application de riluzole réduit l'excitabilité des MNs en diminuant l'amplitude du courant sodique persistant entrant (Kuo et al., 2006). Récemment, une hyperexcitabilité spécifique des MNs de type S, résistants à la dégénérescence, a été mise en évidence chez les souris nouveau-nés (Leroy et al., 2014), remettant en question le caractère délétère de l'hyperexcitabilité précoce des MNs.

Par la suite, plusieurs études ont été menées sur les différentes sous-populations motoneuronales chez la souris adulte à différents stades de la maladie et ont permis de mieux comprendre les processus liés à l'excitabilité des MNs dans la SLA. Delestree et ses collaborateurs ont démontré qu'une partie des MNs se comporte de la même manière que des

MNs juvéniles, maintenant une excitabilité nette pseudo-normale malgré l'augmentation de la conductance d'entrée. De façon plus inattendue, l'autre partie des MNs devient hypoexcitable durant la période qui précède la dénervation des unités motrices de type FF, perdant alors leur capacité à décharger de façon répétitive lors d'une stimulation soutenue (Delestree et al., 2014). Dans une autre étude, des enregistrements *in vivo* chez des souris SOD1-G93A et FUS ont montré que cette hypoexcitabilité concernait d'abord les MNs FF puis, à un stade plus avancé de la maladie, les MNs FR (Martinez-Silva et al., 2018). En effet, durant la phase qui précède leur dégénérescence, les MNs FF et FR ont perdu leur capacité à décharger de façon répétitive. Récemment, une méthode basée sur l'enregistrement de la fréquence de décharge d'une unité motrice pendant son recrutement/dérecrutement a été développée chez les patients SLA pour étudier la capacité des MN à décharger de manière auto-entretenu et montre une hypoexcitabilité des MN qui augmente avec la progression de la maladie (Marchand-Pauvert et al., 2019).

D'autres travaux se sont intéressés aux modifications de la taille du soma des MNs au cours de la SLA (Dukkipati et al., 2018), taille qui est étroitement liée à leur conductance d'entrée et donc à leur excitabilité. Plusieurs travaux ont montré une augmentation de la conductance d'entrée des MNs chez des souris SOD1-G93A, traduisant sans doute une augmentation de leur taille (Delestree et al., 2014; Quinlan et al., 2011). Une autre étude a montré que dans les phases précoces de SLA, seuls les MNs FF lombaires voient leur soma augmenter de taille, ce qui peut diminuer leur excitabilité, cependant ce phénomène est observé uniquement chez les mâles (Dukkipati et al., 2018). Avec l'évolution de la maladie, la tendance s'inverse et la taille des somas des MNs F et S est diminuée. Il existe ainsi une dynamique dans l'évolution de la taille du soma des MNs qui diffère en fonction du genre des souris, du sous-type de MN et du stade de la maladie. Ces modifications peuvent être en partie responsables des changements d'excitabilité relevés par les différentes équipes de recherche.

Ces différentes études ont montré qu'une modification de l'excitabilité des MNs se produit de manière très précoce durant la SLA. Dès le stade embryonnaire, les MNs sont hyperexcitables puis lors du développement, les MNs FF, qui sont les plus vulnérables, changent de morphologie devenant ainsi hypoexcitables, les rendant alors incapables de décharger de manière répétitive, avant de dégénérer. Avec l'évolution de la maladie, cette perte d'excitabilité progressive touche ensuite les populations de MNs plus résistants, FR puis S. Ce phénomène est également retrouvé sur des MNs issus d'iPSC de patients dû à une diminution du courant persistant entrant et à un déséquilibre d'expression des canaux ioniques potassiques et sodiques

(Devlin et al., 2015; Naujock et al., 2016). Du fait du changement constant de taille des MNs au cours de la SLA, et donc de conductance, faisant pencher la balance du côté de l'hyper ou de l'hypoexcitabilité, il est probable que des mécanismes compensatoires mis en place par la cellule aient lieu afin de revenir à un état homéostatique, ce qui expliquerait la divergence sur la capacité des niveaux d'excitabilité des MNs à leur être délétère ou bénéfique (Naujock et al., 2016; Noto et al., 2016; Saxena et al., 2013; Wang and Zhang, 2005).

2.3.2.9 L'hypothèse *dying back*

Le site d'initiation de la maladie, qu'elle soit rétrograde ou antérograde depuis la JNM, reste aujourd'hui encore un sujet de débat intense dans la communauté scientifique travaillant sur la SLA (Geevasinga et al., 2016). Bien qu'une origine nerveuse ait été proposée en premier lieu par Charcot (Charcot, 1869) puis plus tardivement dans l'hypothèse du *dying forward* (Eisen et al., 1992) avec les évidences fournies par les études cliniques, neurophysiologiques et moléculaires, deux autres hypothèses se sont opposées à la primauté d'une dysfonction nerveuse.

Plusieurs études ont montré des altérations au niveau des JNMs, à des stades précoces de la maladie, chez les patients SLA et les modèles animaux (Blijham et al., 2007; Brooks et al., 2004; Conforti et al., 2007; Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Krakora et al., 2012; Vinsant et al., 2013a; Wishart et al., 2006). Ces données ont conduit à émettre l'hypothèse d'une dégénérescence rétrograde de l'axone des MNs, appelée *dying back* (ou dégénérescence valérienne), qui suggère que les agents pathogènes seraient transportés de manière rétrograde de la JNM au corps cellulaire et au SNC où ils exerceraient des effets délétères. Les preuves supportant le processus de *dying back* ont été principalement obtenues sur des modèles de souris transgéniques présentant des anomalies du transport axonal précoces et antérieures à la dégénérescence neuronale (Gould et al., 2006; Pagani et al., 2006; Pun et al., 2006; Williamson and Cleveland, 1999). En effet, les altérations de la JNM ne feraient pas que précéder la mort des MNs mais seraient à l'origine même de leur dégénérescence (Krakora et al., 2012; Rocha et al., 2013). Plusieurs facteurs cellulaires pourraient être à l'origine de cette dégénérescence axonale : des modifications du transport axonal (Williamson and Cleveland, 1999; Zhang et al., 1997), de l'expression de protéines de guidance axonale (Dadon-Nachum et al., 2011; Dupuis et al., 2002; Jokic et al., 2005; LaMonte et al., 2002; Pradat et al., 2007), de la balance calcique et/ou de la fonction mitochondriale au sein des JNMs et également une activation de l'inflammation *via* les macrophages périphériques et les cellules gliales au niveau de la JNM

(Van Dyke et al., 2016). De plus, des études ont montré que l'injection de facteurs de croissance dans le muscle avait un effet bénéfique sur la survie des MNs chez les modèles SOD1-G93A (Acsadi et al., 2002; Azzouz et al., 2004; Gould and Oppenheim, 2011; Hedlund et al., 2007; Kaspar et al., 2003; Krakora et al., 2013; Pun et al., 2006; Suzuki et al., 2008). Cette hypothèse est aujourd'hui un peu en retrait dans le champ de la SLA en raison de l'absence d'éléments pathogènes identifiables et du fait que la perte généralisée des MNs au sein de la ME reste difficile à concilier avec une origine musculaire (Turner et al., 2009).

Une autre hypothèse de dégénérescence indépendante suggère que les neurones moteurs corticaux et les MNs spinaux dégénèrent de manière indépendante et stochastique (Gowers, 1888). Des études neuropathologiques documentant une absence de corrélation entre les dysfonctionnements des neurones moteurs corticaux et les MNs dans la SLA ont appuyé cette hypothèse (Kiernan and Hudson, 1991; Pamphlett et al., 1995). Cependant ces études corrélatives étaient potentiellement limitées par la complexité anatomique et fonctionnelle du système corticomotoneuronal (Eisen and Weber, 2001; Flament et al., 1993). Plus récemment, des études cliniques ont fourni des preuves supplémentaires en documentant une absence de corrélation entre les signes de dégénérescence des neurones moteurs corticaux et des MNs (Ravits et al., 2007). Ces observations cliniques n'étant pas accompagnées d'évaluations neurophysiologiques, il est possible que le dysfonctionnement des neurones moteurs corticaux ou des MNs n'ait pas été détecté. De futures études combinant des techniques cliniques, physiologiques, moléculaires et d'imagerie pourraient aider à une meilleure compréhension de ces différentes hypothèses.

2.3.2.10 Neuroinflammation

Bien que les cellules gliales et immunitaires, constituant l'environnement des neurones n'aient pas un rôle direct dans la transmission de l'information locomotrice aux muscles, ces cellules jouent un rôle de support, de protection et de soutien dans les réseaux neuronaux moteurs (Hewett, 2009; Ji et al., 2013). La neuroinflammation, qui est caractérisée par une activation microgliale et astrocytaire, une infiltration des lymphocytes T (LT) et une surproduction de cytokines inflammatoires, est associée avec la dégénérescence des MNs à la fois dans les modèles animaux et les patients SLA, et ceci même durant la phase présymptomatique de la maladie (Komine and Yamanaka, 2015). De nombreux travaux précliniques ont mis en évidence l'effet opposé des cellules immunitaires sur la survie des MNs, qui peut être soit délétère soit bénéfique, en fonction de la phase de progression de la maladie.

2.3.2.10.1 Rôle des astrocytes

Les gènes modifiés impliqués dans la SLA ne sont pas seulement exprimés dans les MNs, mais également dans les astrocytes (Bruijn et al., 1997; Forsberg et al., 2011; Nagai et al., 2007; Zhang et al., 2008). Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que les astrocytes exprimant mSOD1 étaient toxiques à la fois pour les MNs sauvages et les MNs dérivés de cellules souches embryonnaires (ESC) portant le gène mSOD1 (Di Giorgio et al., 2008; Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007). Le blocage de ce gène dans les astrocytes, ou la transplantation d'astrocytes sains atténuent la toxicité médiée par les astrocytes et ainsi limitent la perte de MNs, retardent la progression de la maladie et prolongent la durée de vie des souris mSOD1 (Haidet-Phillips et al., 2011; Lepore et al., 2008; Wang et al., 2011; Yamanaka et al., 2008). Des astrocytes reprogrammés à partir de fibroblastes de patients vivants atteints de SLA (induits en progéniteurs neuronaux puis différenciés en astrocytes) altèrent la survie des MNs (Meyer et al., 2014; Qian et al., 2017). Ainsi, l'expression de protéines mutantes associées à la SLA dans les astrocytes contribue à la toxicité autonome non-cellulaire. Qian et al. ont récemment montré que les MNs ainsi que d'autres neurones non moteurs dégénéraient dans la ME de souris transplantée avec des astrocytes SLA dérivés de progéniteurs neuronaux spinaux provenant d'iPSC de patients sSLA (Qian et al., 2017). De manière intéressante, ils ont observé que les neurones non-MNs dégénéraient plus tôt que les MNs, ce qui suggère que la toxicité des astrocytes n'est pas spécifique aux MNs.

Les astrocytes semblent jouer un rôle important dans la SLA, cependant, on ignore encore comment les protéines mutantes associées à la SLA modifient leur fonctionnement et comment les astrocytes altérés exercent une toxicité autonome non-cellulaire vis-à-vis des MNs. En condition physiologique, les astrocytes éliminent le glutamate en excès dans la fente synaptique grâce à des transporteurs du glutamate EAAT2/GLT-1. Chez les patients SLA sporadiques et familiaux ainsi que chez les souris mSOD1, la perte de ce transporteur conduit à une recapture moins efficace du glutamate par les astrocytes et à une dégénérescence exacerbée des MNs (Dunlop et al., 2003; Howland et al., 2002; Papadeas et al., 2011; Pardo et al., 2006). Des études ont montré que la présence d'anomalies mitochondriales dans les astrocytes mSOD1 étaient toxiques pour les MNs (Cassina et al., 2008), et que cette toxicité était en partie contrecarrée par des antioxydants et des inhibiteurs de NO (Cassina et al., 2008; Marchetto et al., 2008). Les astrocytes provenant de tissus post mortem de patients SLA et de souris SOD1-G93A exercent des effets toxiques sur les MNs en sécrétant des médiateurs inflammatoires tels que la prostaglandine E2, la leucotriène B4, le NO et NOX2 (Haidet-Phillips et al., 2011; Hensley et

al., 2006; Marchetto et al., 2008). Plus récemment, il a été démontré que les astrocytes provoquent la mort des MNs en activant une forme de mort cellulaire programmée indépendante des caspases appelée nécroptose, conduisant à la perte de la membrane plasmique des neurones chez la souris mSOD1, et qu'une immunomodulation des lymphocytes T *natural killer* (NKT) entraînait une diminution de la perte de MNs, retardait l'apparition de la maladie et prolongeait la durée de vie des souris mSOD1 (Finkelstein et al., 2011).

2.3.2.10.2 Rôle de la microglie

Les cellules microgliales constituent la première ligne de défense immunitaire dans le cerveau et la ME. Ces cellules surveillent l'environnement et répondent aux signaux de danger des tissus endommagés. Une fois activées, la microglie présente des phénotypes distincts et plastiques, avec une fonction neurotoxique ou neuroprotectrice, en fonction de leur état d'activation et du stade de la maladie. Au début de la phase de progression lente de la SLA, la microglie présente un phénotype anti-inflammatoire avec une expression augmentée des marqueurs M2 CD206 et Yml et libère des cytokines anti-inflammatoires telles qu'IL-10 et TGF- β (phénotype M2). Elle est également capable de libérer des facteurs de croissance comme l'IGF-I, le FGF et le CSF-1 ainsi que des facteurs neurotrophiques tels que le NGF ou le BDNF (Colonna and Butovsky, 2017). A ce stade, elle favorise la réparation et la régénération des tissus et il est supposé qu'elle communique avec les neurones *via* des signaux protecteurs neurotrophiques tels que le CD200 et la fractalkine (Appel et al., 2011; Blasco et al., 2013). Au fur et à mesure que la maladie progresse, les MNs altérés libèrent des signaux de danger incitant la microglie à acquérir un phénotype M1 pro-inflammatoire. La microglie M1 exprime la NADPH oxydase et sécrète de manière accrue NOX2, des ROS et des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β et IL-6 ainsi que des chimiokines CCL2 et CCL5 amplifiant la réponse inflammatoire et favorisant la dégénérescence accrue des neurones (Beers et al., 2011; Colonna and Butovsky, 2017; Liao et al., 2012; Norden et al., 2016). Des études *in vitro* de co-cultures ont également démontré que la microglie au stade précoce de la SLA augmentait la survie des MNs, alors que la microglie au stade final était toxique pour les MNs (Liao et al., 2012). Les altérations des MNs causées par des facteurs pro-inflammatoires libérés par la microglie activée sont considérées comme l'un des mécanismes pathogènes les plus critiques de la SLA.

Dans la SLA, il a été rapporté que les MNs et les astrocytes endommagés libéraient des protéines mal repliées telles que mSOD1, qui activeraient la microglie *via* le CD14, le *toll-like receptor* (TLR) 2, le TLR4 et les voies dépendantes du *scavenger receptor* (Roberts et al., 2013;

Zhao et al., 2013). Une activation microgliale étendue est présente dans le cerveau des patients SLA et des souris SOD1-G93A (Corcia et al., 2012; Gargiulo et al., 2016; Turner et al., 2004), avec une corrélation significative entre l'intensité de l'activation microgliale dans le cortex moteur et la gravité des déficits cliniques (Turner et al., 2004). Des études sur des souris transgéniques mSOD1 ont également révélé que le remplacement de la microglie mSOD1 par une microglie de type sauvage, ainsi que la réduction de l'expression de mSOD1 dans la microglie, retardait la dégénérescence des MNs et prolongeait la durée de vie des animaux (Beers et al., 2006; Boillee et al., 2006b). Récemment, il a été démontré que l'expression de C9orf72 était élevée dans les cellules myéloïdes et que la perte de la fonction de C9orf72 chez la souris entraînait des défauts de trafic lysosomal, une diminution de la capacité de la microglie à éliminer les protéines agrégées, ainsi que des réponses microgliales altérées et une neuroinflammation. Des résultats similaires ont été observés dans les macrophages. L'haplo-efficacité de C9orf72 semble contribuer à la modification des réponses inflammatoires des macrophages (O'Rourke et al., 2016). Ces résultats suggèrent que C9orf72 pourrait avoir un effet double sur les neurones et les cellules myéloïdes.

2.3.2.10.3 Rôle des cellules périphériques

Si de nombreuses études ont révélé le rôle de la microglie activée dans le SNC et des cellules T altérées dans le SNP des patients atteints de SLA et de souris transgéniques mSOD1, le rôle des macrophages et des monocytes périphériques dans la dégénérescence des MNs est beaucoup moins bien connu.

Plusieurs études ont signalé l'activation de monocytes dans le sang périphérique de patients SLA (Mantovani et al., 2009), ainsi que l'invasion accrue de monocytes périphériques dans la ME chez les patients et les souris SLA (Butovsky et al., 2012; Zondler et al., 2016). Les monocytes activés de patients SLA présentent une phagocytose ralentie, une adhérence altérée, et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dysfonctionnelle (Zondler et al., 2017; Zondler et al., 2016). Une étude récente a révélé un profil d'expression génique lié à l'inflammation dans les monocytes circulants de patients SLA, comprenant IL-1 β , IL-8, FOSB, CXCL1 et CXCL2 (Zhao et al., 2017). Ceci suggère que les monocytes dans la circulation périphérique sont également dans un état pro-inflammatoire, ce qui pourrait favoriser une évolution rapide de la SLA (Zhao et al., 2017).

2.3.2.11 Rôle de la signalisation purinergique

Plusieurs études ont montré une implication de la signalisation purinergique dans la physiopathologie de la SLA (Cieslak et al., 2019; Volonte et al., 2016). Les purines permettent, entre autres, aux neurones de dialoguer avec les cellules gliales et les cellules immunitaires environnantes. Comme décrit précédemment, en plus de son rôle dans la communication neuro-gliale en condition physiologique, l'ATP libérée en masse dans le milieu extracellulaire en conditions physiopathologiques peut devenir un signal de danger activant des processus neurotoxiques. L'ATP extracellulaire libéré par les neurones en fin de vie active la microglie *via* les récepteurs purinergiques ionotropiques P2X et métabotropiques P2Y, et déclenche des réactions inflammatoires (Volonte et al., 2016). Un rôle prédominant des récepteurs P2X4 et P2X7 exprimés à la surface des MNs et/ou de la microglie a été reporté dans la SLA (Cieslak et al., 2019; Volonte et al., 2016). L'adénosine serait également impliquée dans la progression de la SLA puisque des antagonistes du récepteur A2A ralentissent la mort des MNs (Mojsilovic-Petrovic et al., 2006).

Le récepteur P2X7 est exprimé de manière prédominante au niveau de la microglie et des oligodendrocytes et, dans une moindre mesure, au niveau des astrocytes (Sim et al., 2004). L'activation du récepteur P2X7 induit la libération de cytokines de la famille IL-1, notamment IL-1 α , IL-1 β et IL-18 qui entraînent la surexpression de protéines contribuant aux processus inflammatoires comme COX-2, la NO synthase (NOS), TNF- α , la pro-caspase 1 et la métalloprotéinase matricielle-9 (MMP-9) et le récepteur aux cannabinoïdes 2 (CB2) (He et al., 2017). De manière intéressante, une augmentation du niveau d'expression du récepteur P2X7 a été reportée dans la microglie activée dans la ME des patients SLA (Yiangou et al., 2006), ainsi que chez les souris SOD1-G93A (Casanovas et al., 2008; Pompl et al., 2003; Volonte et al., 2016; Yiangou et al., 2006). En outre, il a été observé que la surexpression des récepteurs P2X4, P2X7 et P2Y6 dans la microglie mSOD1 était associée à une réduction de l'hydrolyse de l'ATP dans cette dernière, ce qui entraînait une production accrue de TNF- α et de cyclooxygénase-2 (COX-2) avec une toxicité importante pour les cellules neuronales (D'Ambrosi et al., 2009). Cette toxicité dépendante de l'activation de P2X7 a également été retrouvée dans les astrocytes mSOD1 (Gandelman et al., 2010). Il a récemment été montré que l'ablation génétique du récepteur P2X7 ou l'utilisation d'antagonistes spécifiques de ce récepteur permettraient de prévenir les effets délétères de la microglie durant la progression de la SLA (Apolloni et al., 2013b; Volonte et al., 2016; Yiangou et al., 2006). Cependant, des travaux ultérieurs ont montré le rôle complexe du récepteur P2X7 dans la pathogenèse de la SLA. En

effet, Apolloni et al. ont découvert que la suppression constitutive du récepteur aggravait la progression de la maladie, exacerbait l'astroglie, la microglie et la perte de MNs et activait la voie des MAPK. De plus, l'inactivation du gène codant pour P2X7 augmente la libération de marqueurs proinflammatoires tels que NOX2 ainsi que la synthèse inductible du NO dans la ME lombaire des souris SOD1-G93A au stade terminal (Apolloni et al., 2013a). Seule l'administration de l'antagoniste du récepteur P2X7 (Brilliant Blue G), à partir du stade présymptomatique tardif (à 100 jours), permet d'augmenter significativement la survie des MNs dans la ME lombaire en réduisant la microglie et en modulant l'expression des marqueurs inflammatoires et retarde l'apparition des symptômes (Apolloni et al., 2014). Ces résultats mettent en lumière des effets opposés suite à l'activation des récepteurs P2X7 et l'existence d'une fenêtre temporelle pendant laquelle une action bénéfique dans la SLA est observée. L'ablation précoce du récepteur est délétère et son blocage pharmacologique au début de la phase présymptomatique ou après l'apparition de la maladie peut s'avérer inefficace. Les actions antagonistes du récepteur P2X7 au cours de la progression de la SLA pourraient correspondre au passage de la microglie du stade M2 protecteur au phénotype M1 délétère.

De manière intéressante, une forte immunoréactivité dirigée contre le récepteur P2X4 est associée à la dégénérescence des MNs dans la corne ventrale de la ME de rats et de souris mSOD1-G93A aux stades tardifs de la maladie (Casanovas et al., 2008). Cette immunoréactivité pour le récepteur P2X4 a été associée à la dégénérescence d'autres populations neuronales, telles que les neurones noradrénergiques dans le *locus coeruleus*, les cellules de Purkinje dans le cervelet et les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé (Casanovas et al., 2008). De manière surprenante, les mêmes auteurs ont ensuite découvert que les anticorps anti-P2X4 utilisés dans cette étude, dirigés contre le domaine C-terminal intracellulaire de la sous-unité P2X4, étaient capables de reconnaître les formes neurotoxiques de la protéine SOD1-G93A mal repliées dans les MNs mais pas dans les cellules gliales. Il a été suggéré que les conformères neuronaux SOD1-G93A immunoréactifs au P2X4 pourraient jouer un rôle pathogène et induire de la neuroinflammation en activant la microglie et l'astroglie lors de leur injection intracérébrale chez des animaux normaux (Hernandez et al., 2010).

Une augmentation de l'expression de P2X4, tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique, a également été reportée dans la microglie chez la souris SOD1-G93A (D'Ambrosi et al., 2009). Plus récemment, Volonté et ses collègues ont démontré pour la première fois l'augmentation de l'expression des protéines P2X4 et P2X7 dans le système nerveux périphérique des souris SOD1-G93A, notamment dans les nerfs sciatiques, et ont proposé ces récepteurs P2X comme

des biomarqueurs diagnostiques potentiels de la SLA au niveau périphérique (Volonte et al., 2016).

Enfin, de la même manière que le récepteur P2X7, l'activation du récepteur P2X4 exerce elle aussi des effets antagonistes en fonction des concentrations d'ATP. Andries et ses collaborateurs ont montré que la préincubation des MNs avec une faible concentration d'ATP et des modulateurs allostériques du récepteur P2X4 tels que l'IVM et le bleu de Cibacron 3G-A (CB) protégeait les cellules contre l'excitotoxicité induite par le kaïnate *in vitro* (Andries et al., 2007). Les auteurs en ont déduit que l'IVM potentialisait l'effet protecteur du récepteur P2X4 sur les MNs à de faibles concentrations d'ATP, probablement en augmentant la fonction et/ou le nombre des récepteurs P2X4 à la surface des cellules (Silberberg et al., 2007; Toulme et al., 2006). La même expérience réalisée en présence de fortes concentrations d'ATP et d'IVM a mis en évidence des effets délétères pour les MNs (Andries et al., 2007). Dans cette même étude, un traitement des souris à l'IVM dans l'eau de boisson à partir de P50 prolongeait la durée de vie des souris de 10% (Andries et al., 2007). Ces résultats montrent une réelle implication du récepteur P2X4 dans la progression de la maladie bien que son mécanisme d'action reste complexe, pouvant avoir des effets opposés en fonction des concentrations d'ATP.

Problématique & Objectifs

Le récepteur P2X₄ est présent dans de nombreux types cellulaires de l'organisme et en particulier dans les neurones et les cellules gliales du SNC où il contribue à la modulation de l'activité synaptique et à la communication neuro-gliale. Si en conditions basales, leur contribution semble mineure du fait que les récepteurs P2X₄ sont peu présents à la surface des neurones et cellules gliales, dans de nombreuses pathologies comme les douleurs chroniques, l'épilepsie et les maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer et la SLA, il a été observé une forte augmentation de l'expression des récepteurs P2X₄ et une augmentation de la densité des récepteurs de surface dont la fonction reste à élucider.

Le seul outil génétique disponible pour analyser la contribution de P2X₄ étant une souris P2X₄ KO, mon premier objectif fut de valider et de caractériser de nouveaux outils génétiques provoquant une augmentation des récepteurs P2X₄ à la surface de populations cellulaires spécifiques. L'équipe où j'ai effectué ma thèse venait de créer un modèle murin transgénique *knockin* (KI) conditionnel permettant d'exprimer un mutant non-internalisé du récepteur P2X₄ appelé « Floxed P2X₄mcherryIN » permettant l'augmentation du nombre de récepteurs P2X₄ à la surface d'une population définie de cellules grâce au système Cre/Lox. Cette stratégie consiste en la substitution conditionnelle du motif d'internalisation Y³⁷⁸XXGL présent au sein du domaine C-terminal du récepteur P2X₄ par la séquence de la protéine fluorescente mCherry dans une population de cellules spécifiques exprimant la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur spécifique.

J'ai tout d'abord contribué significativement à la validation de deux modèles de souris KI exprimant P2X₄mCherryIN non-internalisé, soit dans toutes les cellules exprimant nativement le récepteur P2X₄ (CMV-Cre), soit principalement dans les neurones excitateurs du cerveau antérieur (CaMK2-Cre) et à la caractérisation de l'impact de l'augmentation du nombre de récepteurs P2X₄ sur le comportement des souris et leur performances mnésiques.

Comme nous l'avons détaillé plus haut, plusieurs travaux montrent une implication du récepteur P2X₄ dans la SLA. Les résultats nous ont conduit à émettre l'hypothèse que la ressemblance des protéines SOD1G93A mutées mal conformées provoquerait une altération de l'internalisation du récepteur P2X₄ qui pourrait participer au développement de la SLA.

Le deuxième objectif de ma thèse fut d'étudier le rôle du récepteur P2X4 dans la pathogenèse de la SLA du modèle murin SOD1G93A soit ne présentant pas de P2X4 (souris SOD1/P2X4 KO), soit exprimant le P2X4 non-internalisé (souris SOD1/P2X4 KI). Nous avons également réexaminé l'expression du récepteur P2X4 à l'aide de nouveaux anticorps spécifiques et décrypter les mécanismes cellulaires de l'augmentation en surface du récepteur P2X4 (Bertin et al., 2020a).

ARTICLES

Résumé article I

La surexpression à la membrane du récepteur P2X4 régule l'anxiété et la mémoire chez un modèle de souris *knock-in* défectueux pour l'internalisation du récepteur P2X4

Eléonore Bertin*, Thomas Deluc*, Kjara S. Pilch*, Audrey Martinez, Johan-Till Pougnet, Evelyne Doudnikoff, Anne-Emilie Allain, Philine Bergmann, Marion Russeau, Estelle Toulmé, Erwan Bezar, Friedrich Koch-Nolte, Philippe Séguéla, Sabine Lévi, Bruno Bontempi, François Georges, Sandrine S. Bertrand, Olivier Nicole et Eric Boué-Grabot

* co-premiers auteurs

La libération d'ATP dans le milieu extracellulaire *via* l'activation des récepteurs purinergiques métabotropiques P2Y et ionotropiques P2X membranaires présents à la surface des cellules, est l'une des voies de signalisation majeure de l'organisme permettant aux cellules de communiquer entre elles. Dans le SNC, l'ATP est co-libéré par des neurones avec d'autres NT ou par les cellules gliales en tant que gliotransmetteur, modulant ainsi la fonction des synapses et permettant la communication neurogliale. Le récepteur P2X4, parmi les 7 sous-types de récepteurs-canaux P2X à l'ATP, présente une haute perméabilité au Ca^{2+} et est l'un des sous-types les plus exprimés au sein du SNC, au niveau de la glie et des neurones. Bien que présent dans la majorité des structures du SNC, l'expression du récepteur P2X4 est faible et sa contribution dans la neuromodulation reste débattue. En conditions basales le récepteur P2X4 est constitutivement internalisé dans des compartiments endolysosomiaux et est peu présent à la surface des cellules. De plus en plus d'études suggèrent que la surexpression du récepteur P2X4 membranaire joue un rôle important dans de nombreuses pathologies du SNC au niveau des neurones et/ou de la glie. Cependant, les fonctions des récepteurs P2X4 exprimés au niveau de types cellulaires spécifiques dans des contextes pathologiques restent incomprises.

Afin d'élucider les fonctions de l'augmentation en surface du récepteur P2X4 de manière cellule-spécifique, l'équipe où j'ai effectué ma thèse a créé une lignée de souris transgéniques conditionnelle *knock-in* floxées pour le gène *p2rx4* appelée floxed P2X4mCherryIN. La construction utilisée pour la création de cette lignée permet la substitution du motif d'internalisation Y₃₇₈XXGL présent dans la partie C-terminale du récepteur P2X4, qui interagit normalement avec la protéine adaptatrice AP2, par la séquence de la protéine fluorescente mCherry, de manière dépendante de l'activité de la Cre recombinase, afin de prévenir

l'endocytose constitutive du récepteur P2X4 et donc d'augmenter le nombre de récepteurs P2X4 à la surface des cellules. La combinaison d'approches moléculaires, cellulaires, électrophysiologiques et comportementales a permis de caractériser et valider deux lignées de souris P2X4KI obtenues par croisement de la lignée floxed P2X4mcherryIN avec soit la lignée CaMK2-Cre soit la lignée CMV-Cre afin de substituer l'expression de P2X4WT par le mutant d'internalisation P2X4mCherryIN respectivement soit dans les neurones excitateurs du cerveau antérieur sous l'influence d'un promoteur spécifique CaMK2, soit dans toutes les cellules qui expriment nativement le récepteur P2X4 sous l'influence d'un promoteur ubiquitaire CMV.

J'ai contribué à la validation de ces modèles transgéniques générés au début de ma thèse, principalement en étudiant l'expression et le changement de trafic de surface des récepteurs P2X4mCherryIN par des techniques de biochimie (Figure 3 d-f) et d'immunohistofluorescence dans le cerveau et les macrophages (Figure 3 a-c). J'ai également contribué à l'étude de l'impact de P2X4mCherryIN sur le comportement et plus particulièrement à l'étude du rôle de P2X4mCherryIN dans l'anxiété et les performances mnésiques des différentes lignées de souris générées (Figure 5 g-p).

Nos résultats montrent que, comme attendu, la substitution génétique du récepteur P2X4 sauvage (WT) par le mutant non internalisé P2X4mCherryIN, dans les deux types de modèles KI générés, n'altère pas la distribution des récepteurs P2X4 dans le SNC ni leur adressage subcellulaire des récepteurs P2X4, mais augmente le nombre de récepteurs P2X4 fonctionnels à la surface des cellules exprimant nativement ce récepteur. Chez la souris CMV-P2X4mCherryIN, les immunomarquages montrent l'expression de P2X4mCherryIN au niveau du bulbe olfactif et plus faiblement au niveau de l'hippocampe, du cortex, du cervelet et de la ME dans le SNC. La fluorescence endogène de la protéine de fusion mCherry est directement visible lorsque le récepteur mutant P2X4mCherryIN est fortement exprimé comme dans les macrophages péritonéaux. Dans le cerveau, nous observons directement la fluorescence de P2X4 fusionné à la mCherry uniquement dans la microglie activée après injection intracérébrale de LPS chez les souris CMV induisant l'inflammation et provoquant une expression *de novo* de P2X4. De manière intéressante, aucune expression du récepteur P2X4mCherryIN n'a été retrouvée au niveau des astrocytes même après induction de l'inflammation par le LPS. Nous avons néanmoins observé son expression par immunomarquage dans les astrocytes GFAP positifs présents dans des cultures primaires de cellules hippocampiques issues des souris CMV-P2X4mCherryIN. L'expression du mutant P2X4mCherryIN chez les souris CaMK2 est restreinte aux régions hippocampiques et corticales majoritairement, en accord avec la

sélectivité du promoteur CaMK2. Les images obtenues par microscopie électronique révèlent que le récepteur P2X4mCherryIN est présent comme attendu au niveau pré- et postsynaptique de synapses excitatrices de l'hippocampe et du cortex des deux types de souris KI. Nos résultats montrent que l'augmentation du trafic à la surface des récepteurs P2X4 dans l'hippocampe des souris P2X4KI altère les phénomènes de plasticité LTP et LTD, impliqués dans l'apprentissage et la mémoire, au niveau des synapses CA1 sans affecter la transmission glutamatergique basale excitatrice. De manière surprenante, l'altération de la plasticité est plus marquée chez les souris CaMK2 qui présentent un déficit dans l'induction de la LTP et de la LTD, alors que les souris CMV présentent principalement une altération du maintien de ces phénomènes plastiques. Au niveau comportemental, les deux lignées de souris qui expriment P2X4mCherryIN sont hypo-anxieuses et des déficits de la mémoire spatiale significatifs ont été observés chez les souris CaMK2.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la densité de récepteur P2X4 à la surface membranaire des neurones contribue à des déficits synaptiques et des altérations fonctionnelles de l'anxiété, de l'apprentissage et de la mémoire ce qui est cohérent avec l'implication du récepteur P2X4 dans les maladies du SNC. La fluorescence endogène du récepteur mutant P2X4mCherryIN représente un outil unique pour suivre directement l'augmentation de l'expression du récepteur dans des modèles de pathologies comme la douleur chronique, la maladie d'Alzheimer, la SLA, la prise d'alcool, l'inflammation, l'ischémie, l'épilepsie ou les traumatismes crâniens. De plus, ces souris KI conditionnelles vont permettre d'explorer le rôle des récepteurs P2X4 de manière spécifique dans un type cellulaire donné et dans de nombreux contextes physiologiques ou physiopathologiques. Le rôle de la surexpression du récepteur P2X4 pourra être appréhendé non seulement dans le SNC mais également dans le reste de l'organisme comme par exemple dans les phénomènes inflammatoires périphériques, les infections ou bien les fonctions cardiaques, hépatiques et pulmonaires.

Article I

Article

Increased surface P2X4 receptor regulates anxiety and memory in P2X4 internalization-defective knock-in mice

Eléonore Bertin^{1,2,8}, Thomas Deluc^{1,2,3,8}, Kjara S. Pilch^{1,2,8}, Audrey Martinez^{1,2}, Johan-Till Pougnet^{1,2}, Evelyne Doudnikoff^{1,2}, Anne-Emilie Allain^{4,5}, Philine Bergmann⁶, Marion Russeau⁷, Estelle Toulmé^{1,2}, Erwan Bezard^{1,2}, Friedrich Koch-Nolte⁶, Philippe Séguéla³, Sabine Lévi⁷, Bruno Bontempi^{1,2}, François Georges^{1,2}, Sandrine S. Bertrand^{4,5}, Olivier Nicole^{1,2} and Eric Boué-Grabot^{1,2*}

¹ Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

² CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

³ Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, Alan Edwards Centre for Research on Pain, McGill University, Montreal, Quebec H3A 2B4, Canada

⁴ Univ. de Bordeaux, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, UMR5287, F-33000 Bordeaux, France

⁵ CNRS, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, UMR5287, F-33000 Bordeaux, France

⁶ Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg, Germany

⁷ INSERM UMR-S 1270, Sorbonne Université, Institut du Fer à Moulin, 75005, Paris, France

⁸: These authors should be considered as co-first authors.

*: Corresponding author: Eric Boué-Grabot (EB-G) Institut des Maladies Neurodégénératives (IMN) CNRS UMR 5293, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France; phone: 33 (0)5 33 51 47 95; email: eric.boue-grabot@u-bordeaux.fr

Short/running title: Increased surface P2X4 alters plasticity and behavior

Abstract

ATP signaling and surface P2X4 receptors are upregulated selectively in neurons and/or glia in various CNS disorders including anxiety, chronic pain, epilepsy, ischemia and neurodegenerative diseases. However, the cell-specific functions of P2X4 in pathological contexts remain elusive. To elucidate P2X4 functions, we created a conditional transgenic knock-in P2X4 mouse line (Floxed P2X4mCherryIN) allowing the Cre activity-dependent genetic swapping of the internalization motif of P2X4 by the fluorescent mCherry protein to prevent constitutive endocytosis of P2X4. By combining molecular, cellular, electrophysiological and behavioral approaches, we characterized two distinct knock-in mouse lines expressing non-internalized P2X4mCherryIN either exclusively in excitatory forebrain neurons or in all cells natively expressing P2X4. The genetic substitution of wild-type P2X4 by non-internalized P2X4mCherryIN in both knock-in mouse models did not alter the sparse distribution and subcellular localization of P2X4 but increased the number of P2X4 receptors at the surface of the targeted cells mimicking the pathological increased surface P2X4 state. Increased surface P2X4 density in the hippocampus of knock-in mice altered LTP and LTD plasticity phenomena at CA1 synapses without affecting basal excitatory transmission. Moreover, these cellular events translated into anxiolytic effects and deficits in spatial memory. Our results show that increased surface density of neuronal P2X4 contributes to synaptic deficits and alterations in anxiety and memory functions consistent with the implication of P2X4 in neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. Furthermore, these conditional P2X4mCherryIN knock-in mice will allow exploring the cell-specific roles of P2X4 in various physiological and pathological contexts.

Introduction

The release and extracellular action of ATP are a widespread mechanism for cell-to-cell communication in living organisms through activation of P2X and P2Y receptors expressed at the cell surface of most tissues, including the nervous system¹. Several P2X receptors (P2X) are expressed in the central nervous system (CNS) with varying distributions in neurons as well as in glia²⁻⁴. P2X receptors are ATP-gated cation channels and their activation by ATP, co-released by neurons with other neurotransmitters^{5, 6} or released as a gliotransmitter by astrocytes⁷⁻⁹, has profound modulatory actions at synapses^{1, 10, 11}. Among the seven P2X subunits, P2X4 displays high calcium permeability^{12, 13} and a widespread distribution in CNS neurons and glial cells as well as in peripheral tissues¹⁴⁻¹⁶. Nevertheless P2X4 expression in the brain is sparse¹⁵ and its contribution to the synaptic modulation in normal conditions remains debated^{17, 18}. A growing body of evidence suggests that upregulated P2X4 expression plays important roles in various CNS disorders including chronic pain and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) or amyotrophic lateral sclerosis (ALS)¹⁹⁻²⁶. In the healthy organism, P2X4 is constitutively internalized by the interaction between the adaptor protein 2 (AP2) and a non-canonical endocytosis motif in the C-tail of P2X4 subunit^{27, 28}. As a result, P2X4 is found preferentially in intracellular compartments ensuring a low surface expression not only in neurons, but also in microglia and macrophages²⁹⁻³². Intracellular P2X4 may promote vesicle fusion of endosomes or lysosomes^{32, 33}. Importantly, intracellular P2X4 pools can be mobilized and trafficked to the cell surface^{31, 34}, consistent with the critical role of increased P2X4 surface expression in pathological states^{19, 21, 24-26, 35-37}. The specific increase in P2X4 expression and surface trafficking in spinal microglia is critical for the pathogenesis of chronic pain^{24, 38-41}. Increased P2X4 expression and surface density in neurons has been observed in the hippocampus or in the spinal cord of AD or ALS mouse models, respectively, suggesting that upregulated P2X4 may contribute to synaptic dysfunction and/or cell death in AD or ALS^{23, 25, 26, 35}. However, the extent of the upregulated surface P2X4 state and the cell-specific functions of P2X4 in the pathological context remain elusive.

Here we report the development of conditional knock-in (P2X4mCherryIN) mice mimicking a pathological increase of surface P2X4. We show that the increase of P2X4 at the surface of excitatory neurons decreases anxiety, impairs memory processing, and alters activity-dependent synaptic plasticity phenomena in the hippocampus suggesting that upregulation of neuronal P2X4 observed in AD²⁵ may have key roles in AD pathogenesis. Overall, we provide an innovative knock-in P2X4 model to study the functional contributions of upregulated P2X4 in specific cells of the nervous system but also in peripheral tissues throughout the body.

Materials and methods

Experimental model

The *P2rx4* conditional knock-in mouse line was established at the MCI/ICS (Mouse Clinical Institute, France). *Xenopus* oocytes were isolated as described^{42, 43}. Cultures of hippocampal neurons were prepared as described⁴⁴ with some modifications. Peritoneal cells were isolated as described⁴⁵ (see Supplementary information).

Ethics approval

All experimental procedures complied with official European guidelines for the care and use of laboratory animals (Directive 2010/63/UE).

Immunofluorescence and microscopy

Immunofluorescence studies of neurons, macrophages, brain immunohistochemistry and image acquisition are described in the Supplement and electron microscopy was performed as previously described⁴⁶ (see Supplementary information).

Biotinylation assays and immunoblotting

Surface biotinylation experiments were performed as described previously^{8, 43, 47} from injected

Xenopus oocytes, mouse peritoneal macrophages and hippocampal cell cultures (see Supplementary information).

Electrophysiology

Extracellular field recordings and induction of synaptic plasticity in hippocampal brain slices are described in the Supplement. Two-electrode voltage-clamp recordings from *Xenopus* oocyte were performed as previously described (see Supplementary information).

Mouse behavior

Open field procedure, novel object recognition test^{48, 49}, elevated plus maze⁵⁰, the Y-maze two-trial procedure⁵¹ and spatial memory testing conducted in an 8-arm radial maze are described in the Supplementary information.

Quantification and statistical analysis

The number of independent experiments or animals (n), the statistical test used for comparison and the statistical significance (p values) are specified for each Figure panel in the corresponding figure legend. Data are presented as mean \pm s.e.m. Data were analyzed and graphs were generated using GraphPad Prism.

Results

Substitution of the internalization motif of P2X4 by mCherry protein increases surface density of functional P2X4 receptors

Mutation or ablation of the endocytosis motif of P2X4 (Y³⁷⁸xxGL) was previously shown to increase the surface trafficking of P2X4 without altering its functional properties^{28, 43}. We generated a P2X4mCherryIN construct in which the endocytosis motif of mouse wild-type (WT) P2X4 was suppressed by swapping the last 11 amino acids in the C-tail of P2X4 with the sequence coding for the red fluorescent protein mCherry (Fig. 1a). ATP-evoked currents recorded from P2X4WT or P2X4mCherryIN expressing *Xenopus* oocytes (Fig. 1b) showed that P2X4mCherryIN response amplitudes were significantly larger than those recorded from P2X4WT (Fig. 1b). We next examined the surface level of P2X4WT and P2X4mCherryIN by biotinylation assays and western blotting from oocytes (Fig. 1c,d). Anti-P2X4 antibodies allowed the detection of P2X4WT (70 kDa) but not P2X4mCherryIN (the anti-P2X4 epitope (amino acids 370-388) is deleted in P2X4mCherryIN constructs). P2X4mCherryIN was detected using anti-RFP antibodies showing a band at 100 kDa in agreement with the fusion of mCherry (30 kDa) to P2X4 (Fig. 1c). Surface/total protein ratio showed that P2X4mCherryIN is more effectively translocated to the surface than P2X4WT in *Xenopus* oocytes (Fig. 1d, $p < 0.05$).

We next transfected hippocampal neurons and Cos cells (Fig. 1e-h and supplementary Fig. S1a-d) with extracellularly tagged HA-P2X4WT and HA-P2X4mCherryIN to visualize surface P2X4 on living cells using anti-HA antibodies. Total HA-P2X4 was revealed after cell permeabilization using anti-P2X4 antibodies while the endogenous fluorescence of mCherry fused to P2X4 allowed for direct visualization. HA-P2X4WT is weakly expressed at the surface and is found mainly in intracellular puncta restricted to the soma and proximal dendrites of neurons²⁷. In contrast, HA-P2X4mCherryIN was ~10 times more expressed at the surface of neurons. Surface P2X4mCherryIN puncta are uniformly distributed at the surface including distal dendrites. Co-staining with the post-synaptic marker Homer-1c-GFP revealed that

surface P2X4mCherryIN are equally distributed in small extrasynaptic clusters and in larger clusters juxtaposed to synapses (Fig. 1g,h and supplementary Fig. S1d). Finally, we confirmed the predominant intracellular localization of untagged P2X4WT in mouse transfected hippocampal neurons using Nodu-246, a rat monoclonal antibody recognizing the native extracellular domain of mouse P2X4⁵², whereas P2X4mCherryIN is highly and uniformly distributed at the cell surface (Fig. 1i).

Generation of knock-in mice with non-internalized P2X4mCherryIN and expression in the brain

We generated the conditional floxed P2X4mCherryIN knock-in mice (Floxed) by homologous recombination using a targeting vector (see Fig. 2a) designed to flox the last 4 exons (exons 9 to 12) of *P2rx4* allele (P2X4 internalization motif being located on exons 11 and 12) and followed by the insertion of a DNA fragment corresponding to the fusion of exons 9, 10 and partially 11 with mCherry cDNA. We next generated CMVCre⁺-P2X4mCherryIN^{F/F} (namely CMV) mice and CaMK2Cre⁺-P2X4mCherryIN^{F/F} (CaMK2) mice by breeding Floxed mice with mice either expressing the Cre recombinase under the cytomegalovirus (CMV-Cre) or the calmodulin kinase 2 (CaMK2-Cre) promoter (supplementary Fig. S2). Cre-dependent excision of floxed P2X4mCherryIN allele would lead to the replacement of P2X4WT by non-internalized P2X4mCherryIN. It is important to note that excised *p2rx4* gene remains under the control of its own promoter, thus P2X4mCherryIN will replace P2X4WT only in cells expressing natively P2X4 without altering its distribution pattern or its expression level. In CMV mice, where a Cre-dependent excision occurs in all cells, P2X4mCherryIN would replace P2X4WT in all cells natively expressing P2X4 throughout the body. In CaMK2 mice, substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN is expected to be restricted to excitatory forebrain neurons natively expressing P2X4, while other P2X4 expressing cells such as glial cells and other neuronal types express P2X4WT. Homozygous Floxed, CMV and CaMK2 mice were used in all the

following experiments and were viable, normal in size or weight reproduced normally and displayed no obvious physical or behavioral abnormalities (see Supplementary information).

Reverse transcription (RT)-PCR in different brain regions from the different mice showed that Floxed mice solely expressed P2X4WT mRNA while CMV mice only expressed P2X4mCherryIN mRNA (Fig. 2c). As expected, CaMK2 mice expressed both wild-type and knock-in mRNAs since only a subset of P2X4 expressing cells (forebrain excitatory neurons) replace P2X4WT by P2X4mCherryIN. Next, we tested P2X4mCherryIN expression in the brain on a protein level (Fig. 2d-f). The sparse expression of P2X4 throughout the brain observed in previous works^{3, 53} was recently confirmed using tdTomato *p2xr4* reporter mice in which the detection of cytosolic tdTomato-expressing cells required the use of anti-tdTomato antibodies¹⁵. Not surprisingly, endogenous fluorescence of mCherry fused to P2X4 was not directly visible on brain slices of the different knock-in mice but could be visualized using anti-RFP antibodies. P2X4mCherryIN was detected in the pyramidal neuron layer of the hippocampus and in the soma of neurons throughout the cortex^{3, 15} in both CMV and CaMK2, but not in Floxed or P2X4 knockout (P2X4KO) mice (Fig. 2d). In addition, we confirmed the abundant expression of P2X4mCherryIN in the epithelial glomerular layer of the olfactory bulb^{15, 54} as well as a moderate presence in cerebellar Purkinje cells^{3, 15} of CMV mice but not of CaMK2 mice, as expected. These results showed that P2X4mCherryIN distribution in CMV mice is similar to that of P2X4 in wild-type mice¹⁵ and the restricted detection of P2X4mCherryIN in forebrain neurons in CaMK2 mice confirmed the specificity of Cre-dependent excision. (supplementary Fig. S3a-b). The detection of a 100 kDa band with anti-RFP antibodies in western blots of total proteins from different brain regions confirmed the substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN in CMV mice (Fig. 2e). The absence of detection of P2X4mCherryIN in CaMK2 mice indicated that the replacement of P2X4WT by P2X4mCherryIN is more widespread in the CMV than in CaMK2 mice, as expected. Moreover, the absence of detection of P2X4WT in Floxed or CaMK2 mice with anti-P2X4 confirmed the sparse P2X4 expression in the brain tissues (Fig. 2e).

Electron microscopy (E.M.) of anti-RFP labeling in hippocampal CA1 region or cortex revealed that P2X4mCherryIN was present at postsynaptic sites of excitatory synapses, preferentially at the edge of the postsynaptic density (Fig. 2f). At some asymmetric excitatory synapses, P2X4mCherryIN was located at both pre- and post-synaptic sites (Fig. 2f) and also found intracellularly in association with the endoplasmic reticulum membranes or occasionally with mitochondria (supplementary Fig. S3c). This suggests that replacement of P2X4WT by P2X4mCherryIN does not alter its subcellular distribution³. The identification of symmetric synapses on morphological criteria being difficult, the presence of P2X4 at GABAergic synapses was not confirmed in CMV mice. In contrast, E.M. analysis revealed the presence of P2X4mCherryIN in astrocytes of CMV mice in the astrocyte end-feet encircling endothelial cells (Supplementary Fig. S3d).

Endogenous P2X4mCherryIN fluorescence is directly observable in macrophages or after LPS-induced *de novo* expression in microglia of CMV mice

In mice, *de novo* P2X4 expression was observed in spinal microglia after nerve injury or in the brain after intracerebral lipopolysaccharide (LPS) injection in tdTomato *P2xr4* reporter mice^{15, 38, 39, 41, 55}. We performed *in vivo* LPS microinjections into the hippocampus of CMV, CaMK2, Floxed and P2X4KO mice and examined P2X4mCherryIN fluorescence (Fig. 3 and supplementary Fig. S4). In control saline-injected mice, no endogenous mCherry fluorescence was visible in the hippocampus of all mouse genotypes and only a faint staining was revealed for the microglial marker Iba1 (Fig. 3a). In contrast, a strong increase in Iba1 staining was detected in all LPS-injected mouse lines attesting the microglial activation (Fig. 3a,b and supplementary Fig. S4). Remarkably, endogenous fluorescence of P2X4mCherryIN was directly visible and colocalized with Iba1 in CMV mice, but not in Floxed or CaMK2 mice. Anti-RFP confirmed the abundant and specific P2X4mCherryIN expression in Iba1-positive cells solely in LPS-treated CMV mice. Notably, using Beno-271, a camelid nanobody recognizing

the extracellular domain of mouse P2X4⁵², we showed increased P2X4 surface expression in microglia of CMV, CaMK2 and Floxed but not of P2X4KO mice (Fig. 3b and supplementary Fig. S4). These results validate the cellular specificity of the Cre-mediated excision in both knock-in mice and show that *de novo* expression of P2X4 induced by LPS can be directly monitored by the visualization of the fluorescence of mCherry fused to P2X4.

P2X4 has been shown to be highly expressed in macrophages⁴¹. Endogenous mCherry fluorescence was directly visualized in freshly isolated peritoneal macrophages from CMV mice (Fig. 3c), the only knock-in line expressing P2X4mCherryIN receptors in macrophages as confirmed by western blots of macrophages isolated from CMV, CaMK2, Floxed and P2X4KO mice (Fig. 3d). To assess surface/total ratio of P2X4 and P2X4mCherryIN by western blot analysis, biotinylation assays were performed using macrophages in suspension. Our results showed that the number of surface P2X4mCherryIN is significantly higher in CMV (Fig. 3e,f) than in Floxed mice expressing P2X4WT, demonstrating that the substitution of P2X4 by P2X4mCherryIN leads to an increase in surface P2X4 density in macrophages from CMV mice.

P2X4mCherryIN is differentially upregulated at the surface of neurons and glia in CMV and CaMK2 mice

To demonstrate surface upregulation of P2X4mCherryIN in the CNS, we performed immunofluorescence experiments using hippocampal cultures from pups of both CMV, CaMK2 Floxed or P2X4KO mice. We showed the distribution of surface *versus* intracellular P2X4 using antibodies targeting either the native extracellular domain of P2X4 (Nodu-246), or against the intracellular C-tail of either P2X4WT (anti-P2X4) or P2X4mCherryIN (anti-RFP, Fig. 4). In the Floxed mice, most P2X4WT was detected intracellularly (Fig. 4a) as described previously^{27, 28, 34}. In contrast, in both CMV and CaMK2 cells, a strong surface staining was detected using Nodu-246, as well as the presence of RFP labeling, indicating the high density of P2X4mCherryIN on the surface of these hippocampal cells (Fig. 4a). In cells from P2X4KO

mice, no P2X4 was detected on the cell surface or intracellular (Fig. 4a). Anti-MAP2 antibodies revealed the specific expression of P2X4mCherryIN in neurons in both CMV and CaMK2 transgenic lines (Fig. 4b and supplementary Fig. S5a). Using antibodies against astrocytic GFAP and microglial Iba1 markers combined with Nodu-246 and anti-RFP, revealed the presence of surface P2X4mCherryIN in microglia and astrocytes from CMV, but not CaMK2 mice (Fig. 4c-d and supplementary Fig. S5b). Consistently, Western blotting of proteins extracted from hippocampal cultures of the different knock-in lines allowed the identification of P2X4mCherryIN proteins in the CMV and CaMK2 exclusively, whereas P2X4WT was detected in Floxed and CaMK2 hippocampal cells (Fig. 4e). Next, we examined surface and total P2X4 levels using either anti-P2X4 or anti-RFP antibodies by biotinylation assays and western blotting of hippocampal cells from the different transgenic mice. Quantification of immunoblots (Fig. 4f) clearly indicates that P2X4WT in Floxed and CaMK2 mice is mainly intracellular (Fig. 4g), while the amount of P2X4mCherryIN on the cell surface is significantly higher in both CMV and CaMK2 cells (Fig. 4a-d). Altogether, these results confirm that substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN is restricted to excitatory neurons of CaMK2 mice while in CMV mice, the substitution occurs in all cells endogenously expressing P2X4 in CMV mice. In addition, our results demonstrate that P2X4mCherryIN expression leads to a stronger surface localization of P2X4mCherryIN in both CMV and CaMK2 mice (Fig. 4g).

Increased surface density of P2X4 alters LTP and LTD at CA1 hippocampal synapses

We next examined the impact of non-internalized P2X4mCherryIN in hippocampal synaptic plasticity. Field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) were recorded in the hippocampal CA1 region after stimulation of presynaptic Schaffer collateral axons in acute brain slices from control Floxed and both CaMK2 or CMV mice (Fig. 5a-f). The input/output curves obtained by plotting fEPSP slopes against the amplitude of stimulation (Fig. 5b) showed no significant differences between slices from CMV or CaMK2 mice compared to control Floxed mice

indicating that increased P2X4 surface receptors do not disrupt basal excitatory transmission at CA1 synapses. LTP and LTD were then evaluated. Robust LTP was induced in slices from Floxed mice with persistent potentiation (Fig. 5c,d). High frequency stimulation failed to trigger a potentiation in CaMK2 slices, while in CMV slices a potentiation was induced, but evoked responses returned rapidly to baseline after the induction. At 40 min post-induction, LTP was absent in slices from both CMV and CaMK2 mice (Fig. 5c,d). Increased surface P2X4 appears to block LTD as well (Fig. 5e,f). LTD was induced in slices from Floxed, CMV and CaMK2 mice but a significant persistent synaptic depression was recorded solely in Floxed mice only (Fig. 5e,f). LTD from CMV and CaMK2 slices was not significantly different from baseline. Altogether, these results demonstrate that increased surface P2X4 blocks LTP and alters LTD at hippocampal CA1 synapses. Moreover, the effects are more pronounced when surface P2X4 is increased exclusively in forebrain excitatory neurons.

Increased surface density of P2X4 in forebrain neurons alters anxiety and memory functions

Next, the impact of non-internalized P2X4mCherryIN expression on the behavior of the different transgenic mice was then examined using a battery of tests (Fig. 5g-p and Supplementary Fig. S6). First, potential changes in their general activity were assessed during open field exploration (Fig. 5g-i). Floxed, CaMK2 and CMV mice showed similar velocity and total distance traveled in the arena, indicating that increased surface P2X4 does not modulate basal locomotor activity (Fig. 5g,h and Supplementary Fig. S6b). Interestingly, CaMK2 mice spent significantly more times in the central zone (red area) compared to the other groups of mice (Fig. 5i), suggesting that increased surface P2X4 density may reduce anxiety-like behavior. Neophobia-related anxiety was additionally examined by placing a novel object in the center of the arena (Fig. 5j-l; ⁵⁶). The latency to first exploring the novel object was slightly lower for CaMK2 than for CMV and Floxed mice but this difference failed to reach significance (Fig. 5k). However, CaMK2 mice spent significantly more time exploring the object than Floxed

or CMV mice (Fig. 5l), suggesting that anxiety is lower in these mice. To corroborate these findings, the three mouse lines were tested in the elevated plus maze (Fig. 5m). Compared to CMV and Floxed mice, CaMK2 mice spent a greater proportion of time in the open arms of the maze, confirming their anxiolytic phenotype. These results indicate that neuronal P2X4 is involved in the regulation of anxiety-like behavior, with an increased number of P2X4 on neuronal surfaces resulting in reduced anxiety.

Spatial recognition memory was then evaluated using a modified version of the Y-maze two-trial arm discrimination task (Fig. 5n and Supplementary fig. S6; ⁵⁷). After a single encoding phase of 10 min with only two accessible arms, an inter-trial interval of 4 h resulted in a robust and similar preference for the unexplored, previously inaccessible, arm during the test phase in CMV, CaMK2 and Floxed mice. Thus, mice from all genotypes were capable of processing visuo-spatial information and forming short-term spatial recognition memory.

We next asked whether impairments in learning and memory underlie the observed synaptic plasticity deficits. We examined spatial memory in a more cognitively-challenging situation by submitting CMV, CaMK2 and Floxed mice to spatial discrimination tests in the 8-arm radial maze. Mice were required to locate the 3 constantly baited arms of the maze (Fig. 5o). To provide a rigorous control over the time course of neuronal events induced by spatial learning, we trained the mice over one single day. Reference memory training consisted of four equivalent blocks of six trials separated by a 1 h interval. Each trial started with all 8 arms opened and terminated when the mouse entered the third baited arm and returned to the central platform of the maze. While the number of reference memory errors (i.e., entries into unbaited arms) decreased significantly over the four training blocks in all three mouse lines (Fig. 5o), CaMK2 mice made significantly more errors than CMV and Floxed mice (Fig. 5k, $p=0.0094$). Poorer performance of CaMK2 was particularly apparent in training blocks 2 and 4 compared to Floxed and CMV mice. Subsequently recent and long-term memory were evaluated by submitting mice to retrieval testing 1 and 14 days after training completion (Fig. 5p). As expected, Floxed mice exhibited memory decay over time with an increased

number of reference memory errors at day 14. A similar decay was observed in CMV mice, indicating that forgetting was unaffected in this mouse line. In contrast, the poorer performance of CaMK2 mice achieved upon training remained stable across delays and was not further exacerbated by the passage of time. At Day 14, the number of reference memory errors was elevated but similar for all three genotypes. Thus, selective expression of non-internalized P2X4mCherryIN in excitatory forebrain neurons translated into impaired spatial memory processing.

Discussion

To address pathologically increased surface P2X4 functions, we created a floxed knock-in P2X4mCherryIN mouse line and generated two distinct conditional P2X4mCherryIN lines, expressing non-internalized P2X4mCherryIN either in all cells natively expressing P2X4 (CMV mice) or in excitatory forebrain neurons (CaMK2 mice), respectively. Both CMV and CaMK2 P2X4mCherryIN knock-in mice were viable, reproduced normally and displayed no manifest phenotypic issues. The key finding of this study is that the increased surface density of P2X4 in forebrain excitatory neurons is a major regulator of hippocampal synaptic plasticity, learning and memory and anxiety functions indicating that increased neuronal P2X4 observed in AD models may have key role in the pathogenesis of AD²⁵.

Importantly, analysis of P2X4mCherryIN expression showed that substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN occurred in the expected brain regions in both strains. In CMV mice, the expression pattern of P2X4mCherryIN is consistent with what was described for wild-type P2X4 in the CNS, *i.e.* high expression in the olfactory epithelium and a sparse expression in the hippocampus, cortex, cerebellum and spinal cord^{3, 15, 53}. In addition, and in line with other findings^{41, 58}, P2X4mCherryIN was also found expressed in peritoneal macrophages of CMV mice. In CaMK2 mice, P2X4mCherryIN expression was mainly restricted to hippocampal and cortical regions, in line with previous reports of CaMK2 promoter selectivity⁵⁹. The *in vitro* expression of P2X4mCherryIN construct revealed that the substitution of the last 11 amino

acids of the C-tail of mouse P2X4 by the red fluorescent protein mCherry increases surface trafficking without altering P2X4 function and subcellular targeting^{3, 27, 28, 30, 42, 43}. Indeed, in both CMV and CaMK2 knock-in mice, electron microscopy confirmed that P2X4mCherryIN are localized at both pre- and post-synaptic specializations in hippocampal or cortical excitatory neurons, as expected^{2, 3, 15}. Inhibitory symmetric synapses are difficult to identify based on morphology criteria, thus the presence of P2X4mCherryIN at the GABAergic synapse, where P2X4 was reported to be present, remains to be shown by including specific markers^{9, 10, 42}. Surface and intracellular staining on hippocampal cultures as well as biotinylation experiments from the different knock-in mice demonstrate that substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN induced a significant increase in surface P2X4 in both CaMK2 and CMV neurons. Additionally, P2X4mCherryIN was found to be present and upregulated at the surface of hippocampal microglia and astrocytes as well as macrophages of CMV mice. P2X4 expression in astrocytes has been previously observed, but was debated⁶⁰. Notably, P2X4mCherryIN was detected in hippocampal astrocytes *in vitro*, but was detected on brain slices by E.M. only.

In contrast to transfected cells over-expressing P2X4mCherryIN, direct fluorescence of P2X4mCherryIN was undetectable from brain slices and hippocampal cultures of both knock-in mice, preventing the direct identification and functional characterization of P2X4mCherryIN-expressing cells. Fluorescence of P2X4mCherryIN was directly visible solely in isolated peritoneal macrophages of CMV mice in agreement with its high basal expression in macrophages⁴¹. Interestingly, following LPS injection in the hippocampus to induce microglial activation and increase *de novo* P2X4 expression¹⁵, endogenous fluorescence of P2X4mCherryIN was revealed in Iba1-positive microglia exclusively in CMV mice. These results indicate that the P2X4mCherryIN fluorescence may represent a unique tool to directly monitor increased P2X4 expression in pathological models such as chronic pain, AD, ALS, alcohol intake, inflammation, epilepsy, ischemia or brain trauma^{14, 19, 22, 23, 25, 26, 35-38, 55, 61}.

LTP and LTD phenomena are widely recognized as crucial molecular mechanisms underlying cognitive functions such as learning and memory⁶². Although activation of P2X receptors by

glial ATP was recently shown to directly modulate glutamatergic synaptic strength¹⁰, P2X receptors exert modulatory actions exclusively during activity-dependent plasticity at central synapses and do not influence basal synaptic transmission^{17, 18, 63}. Previous studies have shown P2X4 modulating hippocampal LTP via N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), however these findings remained controversial. The first work using P2X4KO mice revealed that LTP in CA1 neurons was slightly reduced compared to wild-type mice and that potentiation of P2X4 by ivermectin enhanced LTP only in wild-type mice¹⁷. Results suggested that P2X4 may enhance the content of NR2B subunits in synaptic NMDARs⁶³. In contrast, an other study showed that the pharmacological blockade of P2X4 facilitated the induction of NMDAR-dependent LTP indicating an inhibitory impact of P2X4^{18, 64}. Furthermore, increased P2X4 expression was reported in AD models²⁵ suggesting that P2X4 might also contribute to synaptic dysfunction and memory deficits. Field potential recordings show that P2X4mCherryIN expression does not change the basal excitatory transmission at CA1 synapses but causes impairments in both LTP and LTD in agreement with a negative impact of P2X4 on synaptic plasticity. Surprisingly, but in full agreement with our behavioral results, these deficits were stronger in CaMK2 than in CMV mice. Impaired LTP observed in CaMK2 mice occurred immediately suggesting a deficit of LTP induction. In contrast, in CMV mice, LTP was induced but progressively returned to baseline, rather indicating a deficit in LTP maintenance. Since basal excitation mediated by α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) is unchanged, and LTD or LTP in hippocampal CA1 neurons are mainly initiated post-synaptically by NMDAR⁶², our results suggest that increased P2X4 in CA1 neurons might alter NMDAR function. P2X4 are highly permeable to calcium and can mediate a strong calcium influx at the resting membrane potential that may induce NMDAR inactivation⁶⁴. P2X4 interacts also dynamically with various other ligand-gated ion channels such as GABA_A^{10, 42, 65} and may lead to NMDAR inhibition by similar crosstalk. Behavioral phenotyping of the CMV mice did not reveal any overt alterations. In contrast, CaMK2 mice exhibited a significant decrease in anxiety-like behaviors and impaired spatial

learning and memory functions. No change in locomotor, anxiety-like or cognitive functions were previously observed in P2X4KO mice ⁶⁶. Together, these results suggest that, in contrast to the basal state, increased surface P2X4 density observed in neurons in pathological situations such as in AD ²⁵ might play essential roles in the regulation of synaptic plasticity and behavior such as anxiety and learning and memory.

The absence of a phenotype of the CMV mice, although in agreement with the weaker effects on the synaptic plasticity of CMV compared to CaMK2 mice, is intriguing since substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN in all cells natively expressing P2X4 was expected to have more pronounced effects than specific P2X4mCherryIN expression solely in forebrain excitatory neurons. However, this could be explained by temporal differences between CMV and CaMK2 promoter activation. CMV is a ubiquitous early-gene promoter leading to the genetic excision of Floxed P2X4mCherryIN in the germ-line and consequently from the beginning of the embryonic development while the CaMK2 promoter is considered as an adult promoter with postnatal activity reaching its maximum around the third postnatal week ⁶⁷. Expression of P2X4mCherryIN in all cells natively expressing P2X4 during the developmental period and thereafter may have deleterious effects leading to developmental compensations. Another possibility is that the expression of P2X4mCherryIN in CMV mice in other types of neurons along with expression in glial cells may counterbalance the effect of its increased surface density specifically in excitatory neurons. Indeed, increased P2X4 expression in spinal cord microglia during neuropathic conditions triggers the release of BDNF by microglia resulting in neuronal hyperexcitability ^{39,40}. In addition, microglia and BDNF have been shown to influence synaptic plasticity and learning in the brain ⁶⁸. These results suggest that increased surface P2X4 in microglia of CMV mice may promote synaptic plasticity and counterbalance the negative impact of an increase of surface P2X4 specifically in excitatory neurons of CaMK2 mice.

P2X4 is present in multiple cell types in the peripheral or central nervous system and in various epithelial, endothelial or immune cells. After injury and during inflammation and cell damage,

high levels of ATP are released and P2X4 are strongly upregulated on cell surfaces. This upregulation seems to orchestrate key events during neurodegenerative diseases, neuropathic and inflammatory pain, ischemia-induced inflammation, alcohol intake, airways inflammation in asthma, rheumatoid arthritis or postsurgical liver regeneration (see for review¹⁴).

These novel conditional knock-in mice defective for P2X4 internalization provide a valuable tool which will allow to further decipher the role of upregulated P2X4 state not only in the context of neurological diseases, but also of peripheral inflammation, infection as well as in lung, cardiac or liver functions⁶⁹⁻⁷³.

Acknowledgements

We thank G. Dabee for the production of all transgenic mice at the animal facility, H. Orignac for help with *Xenopus* facilities and E. Normand for stereotaxic injection. We thank the Mouse Clinical Institute (Institut Clinique de la Souris, MCI/ICS) in the Genetic Engineering and Model Validation Department who established the mouse mutant floxed P2X4mCherryIN line. We also thank the biochemistry facility of Bordeaux Neurocampus. Electron microscopy was performed at the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University. This work was supported by CNRS, University of Bordeaux, a grant LabEx BRAIN ANR-10-LABX-43 to EB-G and EB, a grant from Inserm for the generation of the mouse line to EB-G, the Louise and Alan Edwards Foundation, an awarded grant from Quebec Pain Research Network (QPRN) to TD, International Ph. D program of the IdEx of Bordeaux to EB-G and PS and DFG grant SFB1328-Z02 to FK-N.

Author contributions

EB, TD, KSP, AM, J-TP, ED, A-EA, ET, MR, FG, ON performed the experiments and analyzed the data. PS, BB, SL, FG, SB, ON and EB-G designed the experiments and analyzed the data. PB, EB, FK-N contributed with key reagents. EB-G conceived the knock-in mice and the study. KSP, ON, and EB-G wrote the manuscript. All authors commented the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare they have no conflict of interest.

Supplementary information is available at MP's website

References

1. Khakh BS, North RA. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 2012; **76**(1): 51-69.
2. Rodrigues RJ, Almeida T, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA. Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci* 2005; **25**(27): 6286-6295.
3. Rubio ME, Soto F. Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 2001; **21**(2): 641-653.
4. Kaczmarek-Hajek K, Zhang J, Kopp R, Grosche A, Rissiek B, Saul A *et al.* Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *Elife* 2018; **7**.
5. Jo YH, Schlichter R. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* 1999; **2**(3): 241-245.
6. Mori M, Heuss C, Gahwiler BH, Gerber U. Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol* 2001; **535**(Pt 1): 115-123.
7. Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, Bains JS. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci* 2005; **8**(8): 1078-1086.
8. Pougnet JT, Toulme E, Martinez A, Choquet D, Hosy E, Boue-Grabot E. ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron* 2014; **83**(2): 417-430.
9. Lalo U, Palygin O, Rasooli-Nejad S, Andrew J, Haydon PG, Pankratov Y. Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol* 2014; **12**(1): e1001747.
10. Boué-Grabot E, Pankratov Y. Modulation of Central Synapses by Astrocyte-Released ATP and Postsynaptic P2X Receptors. *Neural Plast.*, vol. 20172017, p 9454275.
11. Illes P, Verkhratsky A. Purinergic neurone-glia signalling in cognitive-related pathologies. *Neuropharmacology* 2016; **104**: 62-75.
12. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 2009; **460**(7255): 592-598.
13. Egan TM, Khakh BS. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci* 2004; **24**(13): 3413-3420.
14. Suurväli J, Boudinot P, Kanellopoulos J, Rützel Boudinot S. P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor. *Biomedical Journal*, vol. 40. Elsevier2017, pp 245-256.
15. Xu J, Bernstein AM, Wong A, Lu XH, Khoja S, Yang XW *et al.* P2X4 Receptor Reporter Mice: Sparse Brain Expression and Feeding-Related Presynaptic Facilitation in the Arcuate Nucleus. *J Neurosci* 2016; **36**(34): 8902-8920.
16. Yeung D, Kharidia R, Brown SC, Gorecki DC. Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiol Dis* 2004; **15**(2): 212-220.

17. Sim JA, Chaumont S, Jo J, Ulmann L, Young MT, Cho K *et al.* Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. *J Neurosci* 2006; **26**(35): 9006-9009.
18. Pankratov Y, Lalo U, Krishtal OA, Verkhratsky A. P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 2008.
19. Cavaliere F, Florenzano F, Amadio S, Fusco FR, Viscomi MT, D'Ambrosi N *et al.* Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience* 2003; **120**(1): 85-98.
20. Franke H, Illes P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther* 2006; **109**(3): 297-324.
21. Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 2008; **7**(7): 575-590.
22. Apolloni S, Montilli C, Finocchi P, Amadio S. Membrane compartments and purinergic signalling: P2X receptors in neurodegenerative and neuroinflammatory events. *Febs J* 2009; **276**(2): 354-364.
23. Volonte C, Apolloni S, Parisi C, Amadio S. Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology* 2016; **104**: 180-193.
24. Beggs S, Trang T, Salter MW. P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nat Neurosci* 2012; **15**(8): 1068-1073.
25. Varma R, Chai Y, Troncoso J, Gu J, Xing H, Stojilkovic SS *et al.* Amyloid-beta induces a caspase-mediated cleavage of P2X4 to promote purinotoxicity. *Neuromolecular Med* 2009; **11**(2): 63-75.
26. Casanovas A, Hernandez S, Tarabal O, Rossello J, Esquerda JE. Strong P2X4 purinergic receptor-like immunoreactivity is selectively associated with degenerating neurons in transgenic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* 2008; **506**(1): 75-92.
27. Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD. P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* 2002; **22**(12): 4814-4824.
28. Royle SJ, Bobanovic LK, Murrell-Lagnado RD. Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *J Biol Chem* 2002; **277**(38): 35378-35385.
29. Qureshi OS, Paramasivam A, Yu JC, Murrell-Lagnado RD. Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J Cell Sci* 2007; **120**(Pt 21): 3838-3849.
30. Royle SJ, Qureshi OS, Bobanovic LK, Evans PR, Owen DJ, Murrell-Lagnado RD. Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *J Cell Sci* 2005; **118**(Pt 14): 3073-3080.
31. Toulme E, Garcia A, Samways D, Egan TM, Carson MJ, Khakh BS. P2X4 receptors in activated C8-B4 cells of cerebellar microglial origin. *J Gen Physiol* 2010; **135**(4): 333-353.
32. Cao Q, Zhong XZ, Zou Y, Murrell-Lagnado R, Zhu MX, Dong XP. Calcium release through P2X4 activates calmodulin to promote endolysosomal membrane fusion. *J Cell Biol* 2015; **209**(6): 879-894.
33. Huang P, Zou Y, Zhong XZ, Cao Q, Zhao K, Zhu MX *et al.* P2X4 forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH. *J Biol Chem* 2014; **289**(25): 17658-17667.

34. Robinson LE, Murrell-Lagnado RD. The trafficking and targeting of P2X receptors. *Front Cell Neurosci* 2013; **7**: 233.
35. Andries M, Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L. Ivermectin inhibits AMPA receptor-mediated excitotoxicity in cultured motor neurons and extends the life span of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2007; **25**(1): 8-16.
36. Khoja S, Huynh N, Asatryan L, Jakowec MW, Davies DL. Reduced expression of purinergic P2X4 receptors increases voluntary ethanol intake in C57BL/6J mice. *Alcohol* 2018; **68**: 63-70.
37. Wyatt LR, Finn DA, Khoja S, Yardley MM, Asatryan L, Alkana RL *et al.* Contribution of P2X4 receptors to ethanol intake in male C57BL/6 mice. *Neurochemical research* 2014; **39**(6): 1127-1139.
38. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW *et al.* P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, vol. 4242003, pp 778-783.
39. Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F *et al.* Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci* 2008; **28**(44): 11263-11268.
40. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K *et al.* BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 2005; **438**(7070): 1017-1021.
41. Ulmann L, Hirbec H, Rassendren F. P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J*, vol. 292010, pp 2290-2300.
42. Jo YH, Donier E, Martinez A, Garret M, Toulme E, Boue-Grabot E. Cross-talk between P2X4 and gamma-aminobutyric acid, type A receptors determines synaptic efficacy at a central synapse. *J Biol Chem* 2011; **286**(22): 19993-20004.
43. Toulme E, Soto F, Garret M, Boue-Grabot E. Functional properties of internalization-deficient P2X4 receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin. *Mol Pharmacol* 2006; **69**(2): 576-587.
44. Chamma I, Heubl M, Chevy Q, Renner M, Moutkine I, Eugene E *et al.* Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2013; **33**(39): 15488-15503.
45. Ray A, Dittel BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2010; (35).
46. Berthet A, Porras G, Doudnikoff E, Stark H, Cador M, Bezard E *et al.* Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 2009; **29**(15): 4829-4835.
47. Bertin E, Martinez A, Boue-Grabot E. P2X Electrophysiology and Surface Trafficking in *Xenopus* Oocytes. *Methods Mol Biol* 2020; **2041**: 243-259.
48. Belzung C. Hippocampal mossy fibres: implication in novelty reactions or in anxiety behaviours? *Behav Brain Res* 1992; **51**(2): 149-155.
49. Renner MJ, Bennett AJ, White JC. Age and sex as factors influencing spontaneous exploration and object investigation by preadult rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 1992; **106**(3): 217-227.

50. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1986; **24**(3): 525-529.
51. Delli F, Contarino A, Simon H, Koob GF, Gold LH. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem* 2000; **73**(1): 31-48.
52. Bergmann P, Garcia de Paco A, Rissiek B, Menzel S, Dubberke G, Hua J *et al.* Generation and characterization of specific monoclonal antibodies and Nanobodies directed against the ATP-gated channel P2X4. *Frontiers in Cellular Neuroscience* in press.
53. Lê KT, Villeneuve P, Ramjaun AR, McPherson PS, Beaudet A, Seguela P. Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience*, vol. 831998, pp 177-190.
54. Buell G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A. An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *The EMBO journal* 1996; **15**(1): 55-62.
55. Ulmann L, Levavasseur F, Avignone E, Peyroutou R, Hirbec H, Audinat E *et al.* Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus. *Glia* 2013; **61**(8): 1306-1319.
56. Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA. Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci* 1999; **19**(21): 9550-9556.
57. Nicole O, Hadzibegovic S, Gajda J, Bontempi B, Bem T, Meyrand P. Soluble amyloid beta oligomers block the learning-induced increase in hippocampal sharp wave-ripple rate and impair spatial memory formation. *Sci Rep* 2016; **6**: 22728.
58. Layhadi JA, Turner J, Crossman D, Fountain SJ. ATP Evokes Ca(2+) Responses and CXCL5 Secretion via P2X4 Receptor Activation in Human Monocyte-Derived Macrophages. *J Immunol* 2018; **200**(3): 1159-1168.
59. Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ *et al.* Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 1996; **87**(7): 1317-1326.
60. Stokes L, Layhadi JA, Bibic L, Dhuna K, Fountain SJ. P2X4 Receptor Function in the Nervous System and Current Breakthroughs in Pharmacology. *Front Pharmacol* 2017; **8**: 291.
61. Franklin KM, Asatryan L, Jakowec MW, Trudell JR, Bell RL, Davies DL. P2X4 receptors (P2X4Rs) represent a novel target for the development of drugs to prevent and/or treat alcohol use disorders. *Front Neurosci* 2014; **8**: 176.
62. Huganir RL, Nicoll RA. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* 2013; **80**(3): 704-717.
63. Baxter AW, Choi SJ, Sim JA, North RA. Role of P2X4 receptors in synaptic strengthening in mouse CA1 hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 2011; **34**(2): 213-220.
64. Pankratov YV, Lalo UV, Krishtal OA. Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J Neurosci* 2002; **22**(19): 8363-8369.
65. Jo YH, Boue-Grabot E. Interplay between ionotropic receptors modulates inhibitory synaptic strength. *Commun Integr Biol* 2011; **4**(6): 706-709.
66. Wyatt LR, Godar SC, Khoja S, Jakowec MW, Alkana RL, Bortolato M *et al.* Sociocommunicative and Sensorimotor Impairments in Male P2X4-Deficient Mice. *Neuropsychopharmacology*, vol. 38. Nature Publishing Group 2013, pp 1993-2002.

67. Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 1996; **274**(5293): 1678-1683.
68. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 2013; **155**(7): 1596-1609.
69. Hafner S, Wagner K, Weber S, Groger M, Wepler M, McCook O *et al.* Role of the Purinergic Receptor P2XR4 After Blunt Chest Trauma in Cigarette Smoke-Exposed Mice. *Shock* 2017; **47**(2): 193-199.
70. Chen H, Xia Q, Feng X, Cao F, Yu H, Song Y *et al.* Effect of P2X4R on airway inflammation and airway remodeling in allergic airway challenge in mice. *Mol Med Rep* 2016; **13**(1): 697-704.
71. Yang T, Shen JB, Yang R, Redden J, Dodge-Kafka K, Grady J *et al.* Novel protective role of endogenous cardiac myocyte P2X4 receptors in heart failure. *Circ Heart Fail* 2014; **7**(3): 510-518.
72. Pettengill MA, Marques-da-Silva C, Avila ML, d'Arc dos Santos Oliveira S, Lam VW, Ollawa I *et al.* Reversible inhibition of *Chlamydia trachomatis* infection in epithelial cells due to stimulation of P2X(4) receptors. *Infect Immun* 2012; **80**(12): 4232-4238.
73. Gonzales E, Julien B, Serriere-Lanneau V, Nicou A, Doignon I, Lagoudakis L *et al.* ATP release after partial hepatectomy regulates liver regeneration in the rat. *J Hepatol* 2010; **52**(1): 54-62.

Figures and legends

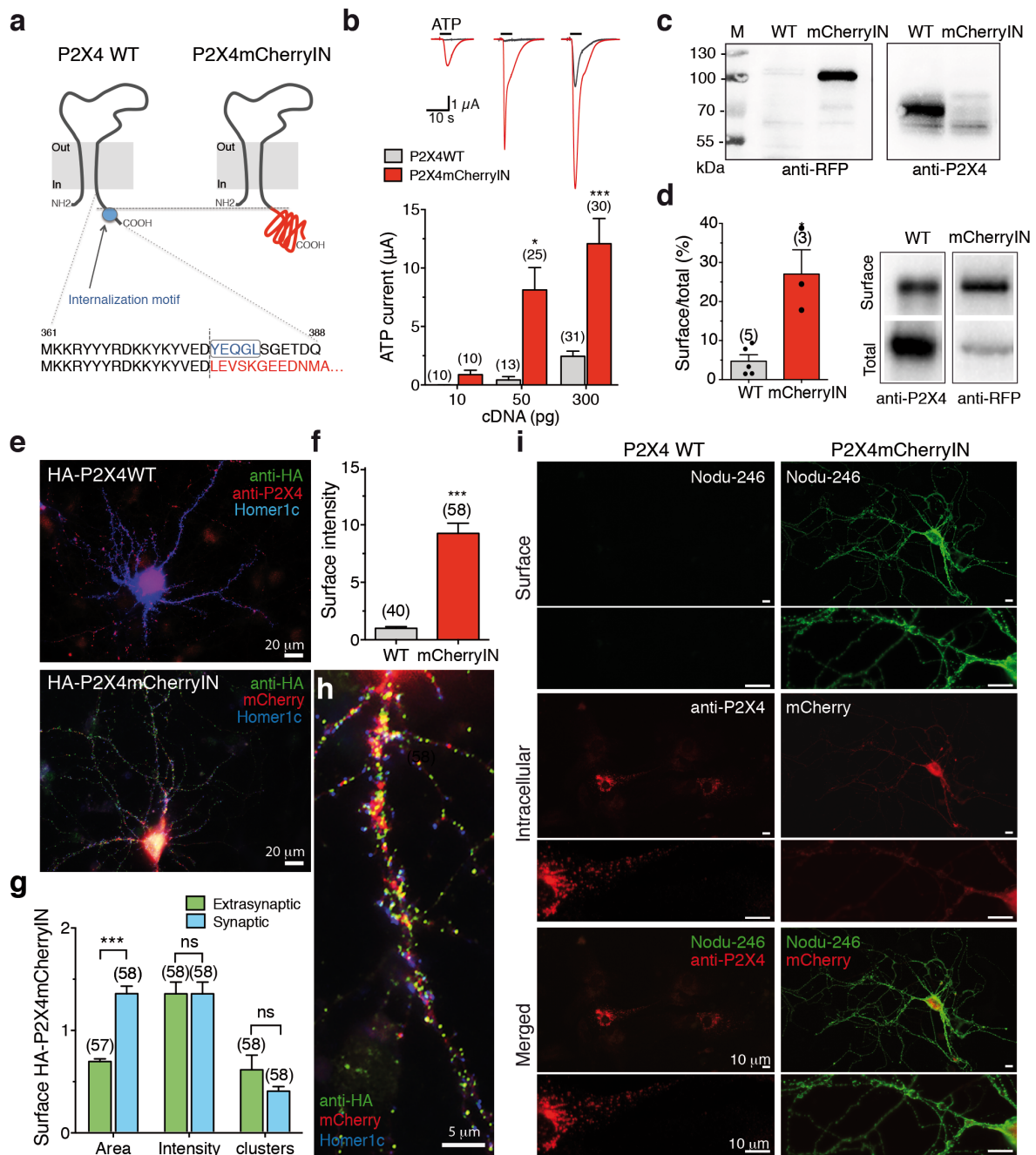


Fig. 1 Substitution of the internalization motif of P2X4 by mCherry increases ATP current density and surface expression of P2X4 receptors. **a** Schematic representation of the mouse P2X4 subunit topology and C-terminal sequence of wild-type P2X4 (WT) and P2X4mCherryIN subunits. The AP2 binding site (blue circle) within the C-terminal sequence of mouse P2X4WT was exchanged for the red fluorescent protein mCherry sequence (P2X4) preventing clathrin-dependent internalization. **b** Representative superimposed currents evoked by applications of ATP (100 μ M, 5 s) from oocytes expressing wild-type P2X4 (WT) (black traces) or P2X4mCherryIN receptors (red traces). Bar graphs of the mean amplitude of

ATP current recorded from oocytes expressing P2X4WT or P2X4mCherryIN as a function of the quantity of injected cDNAs. Recordings were performed the same day (2 or 3 days) post nuclear injection. Error bars represent s.e.m., number of cells is indicated in parentheses, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA and Tuckey's post hoc test. Blockade of P2X4 internalization induced a ~7-fold increase in ATP current amplitudes. **c** Specific detection by Western blots of total proteins from oocytes expressing P2X4WT (70 kDa) or P2X4mCherryIN (100 kDa) with anti-P2X4 or anti-RFP antibodies, respectively. **d** Representative immunoblots of total and surface biotinylated proteins from oocytes expressing P2X4WT (WT) or P2X4mCherryIN (mCherryIN) using anti-P2X4 or anti-RFP antibodies. Bars represent mean \pm s.e.m. of the surface/total ratio of P2X4WT (grey bars, $4.73 \pm 1.64\%$, $n = 5$) and P2X4mCherryIN (red bars, $27.05 \pm 6.2\%$, $n = 3$). The number of independent experiments is indicated in parentheses, * $p < 0.05$, unpaired t-test. **e** Confocal overlay images of hippocampal neurons transfected with extracellular HA-tagged P2X4WT or HA-P2X4mCherryIN revealed a strong increase in surface P2X4 in neurons expressing P2X4mCherryIN vs P2X4 WT. Surface P2X4 was revealed by labeling living cells with anti-HA antibodies (green). Total P2X4 was detected after fixation, permeabilization and staining with anti-P2X4 antibody (red) in P2X4 WT cells or by mCherry fluorescence (red) in P2X4mCherryIN cells. Scale bars, 20 μm . **f** Mean fluorescence intensity of surface HA-P2X4WT and HA-P2X4mCherryIN illustrated in E and in supplementary Fig. S1. Error bars, s.e.m., number of cells is indicated in parentheses, *** $p < 0.001$, unpaired Mann-Whitney test. **g,h** Enlarged image of a dendrite, showing surface clustering of HA-P2X4mCherryIN. Postsynaptic regions are indicated by detection of Homer 1c (blue). Scale bar, 5 μm . 42% of clusters are localized in the vicinity of excitatory glutamatergic synapses. **g** Quantification of the size, fluorescence intensity and density of clusters at extrasynaptic site and in the vicinity of glutamatergic synapses showing P2X4 form larger clusters near synapses. Error bars: s.e.m., two-way ANOVA and Tuckey's post hoc test, interaction $F(2, 341) = 11.38$; *** $p < 0.001$. **i** Epifluorescence images of hippocampal neurons transfected with P2X4WT or P2X4mCherryIN revealed the strong increase of surface P2X4mCherryIN compared to P2X4WT. Surface P2X4WT and P2X4mCherryIN were revealed on living cells with Nodu-246 antibody (green) recognizing the native extracellular domain of P2X4. Total P2X4WT or P2X4mCherryIN were detected after fixation and permeabilization with anti-P2X4 antibodies (red) or directly by the red fluorescence of mCherry protein, respectively. Scale bar, 10 μm .

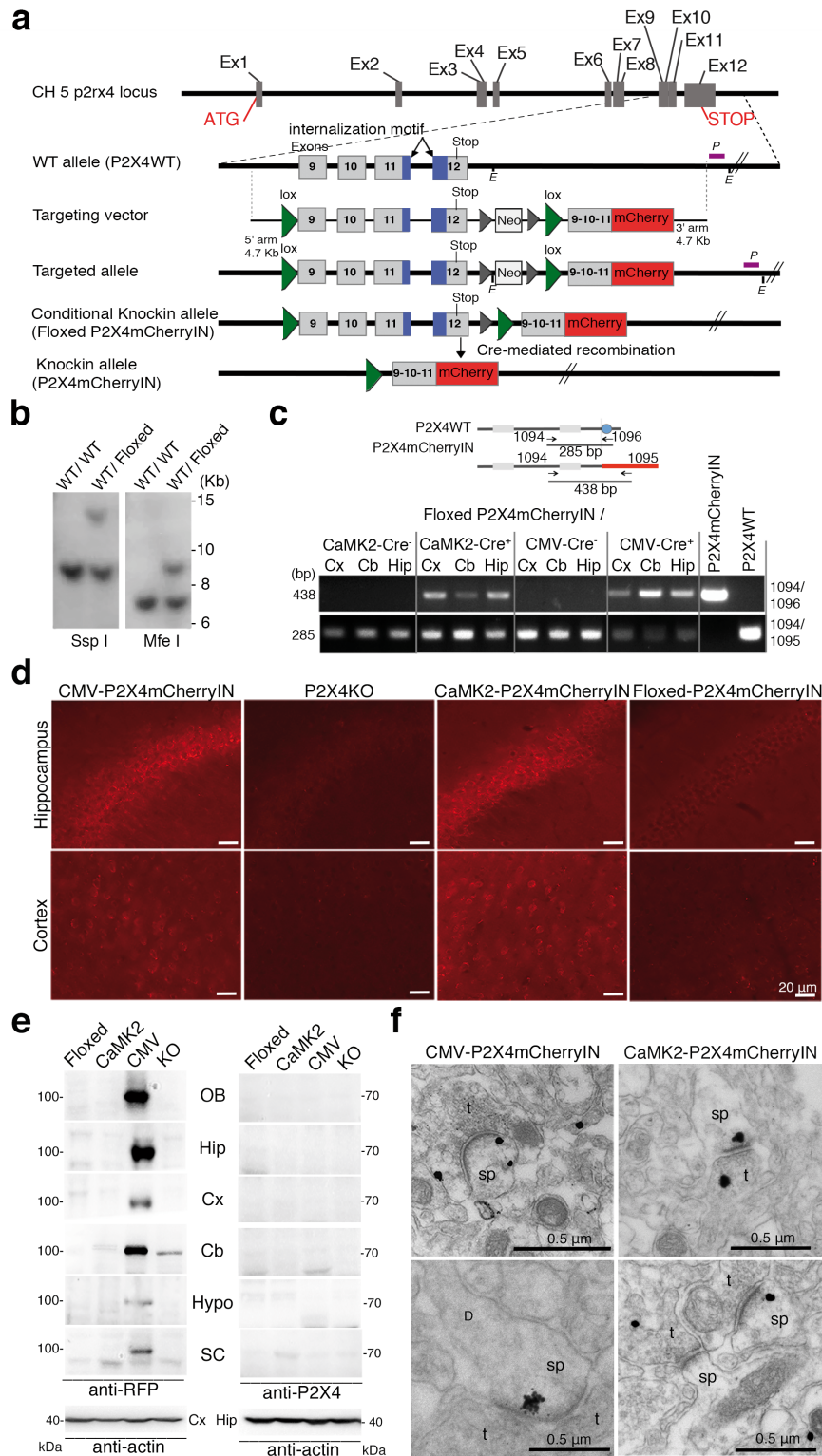


Fig. 2 Generation of conditional P2X4mCherryIN knock-in mice and P2X4 expression in CMV-Cre or CaMK2-Cre P2X4mCherryIN knock-in mice. **a** Schematic diagram of the mouse P2xr4 gene and targeting vector strategy used to generate floxed P2X4mCherryIN knock-in mice by homologous recombination (Floxed). By breeding floxed P2X4mCherryIN with CMV-Cre mice or CaMK2-Cre mice, we generated constitutive CMVCre-P2X4mCherryIN (CMV) and CaMK2Cre-P2X4mCherryIN (CaMK2) to obtain a gain-of-function of P2X4 in all cells or in excitatory forebrain neurons natively expressing P2X4, respectively. **b** Southern blot of

genomic DNA of WT and targeted allele (Floxed) using external probe (P) after digestion by Mfe I or Ssp I enzyme (E) indicated in a. **c** Expression of P2X4WT and P2X4mCherryIN mRNAs by RT-PCR in cortex (Cx), cerebellum (Cb) and hippocampus (Hip) brain regions from Floxed P2X4mCherryIN, CMVCre+/Floxed P2X4mCherryIN (CMV) and CaMK2Cre+/Floxed P2X4mCherryIN (CaMK2) mice. **d-f** Protein expression of P2X4mCherryIN in the mouse brain revealed using anti-RFP antibodies recognizing mCherry protein. **d** Brain sections immunostained with anti-RFP antibodies show P2X4mCherryIN expression in the hippocampus and cortex of CMVCre-P2X4mCherryIN and CaMK2Cre-P2X4mCherryIN while no signal is visible in Floxed P2X4mCherryIN and P2X4 Knockout (KO) mice (see also supplementary Fig. S3). Scale bar, 20 μ m. **e** Western blotting of total proteins extracted from distinct CNS regions isolated from CMV-P2X4mCherryIN (CMV), CaMK2-P2X4mCherryIN (CaMK2), Floxed P2X4mCherryIN and P2X4KO mice revealed with anti-RFP or anti-P2X4 antibodies. Anti-Tubulin antibody was used as a loading control. OB, olfactory bulb; Hip, hippocampus; Cx, cortex; Cb, cerebellum; Hypo, hypothalamus; SC, spinal cord. **f** Electron microscopy images showing pre-embedding anti-RFP immunostaining in CA1 region of the hippocampus or cortex from CMV-P2X4mCherryIN and CaMK2-P2X4mCherryIN mice (see also supplementary Fig. S3). Staining is close to the plasma membrane of pre- and post-synaptic specializations of excitatory asymmetric synapses (top). Examples of spines where P2X4mCherryIN is detected only at the postsynapse, mainly located at the edge of the postsynaptic density. t, presynaptic; sp, spine. Scale bar, 0.5 μ m.

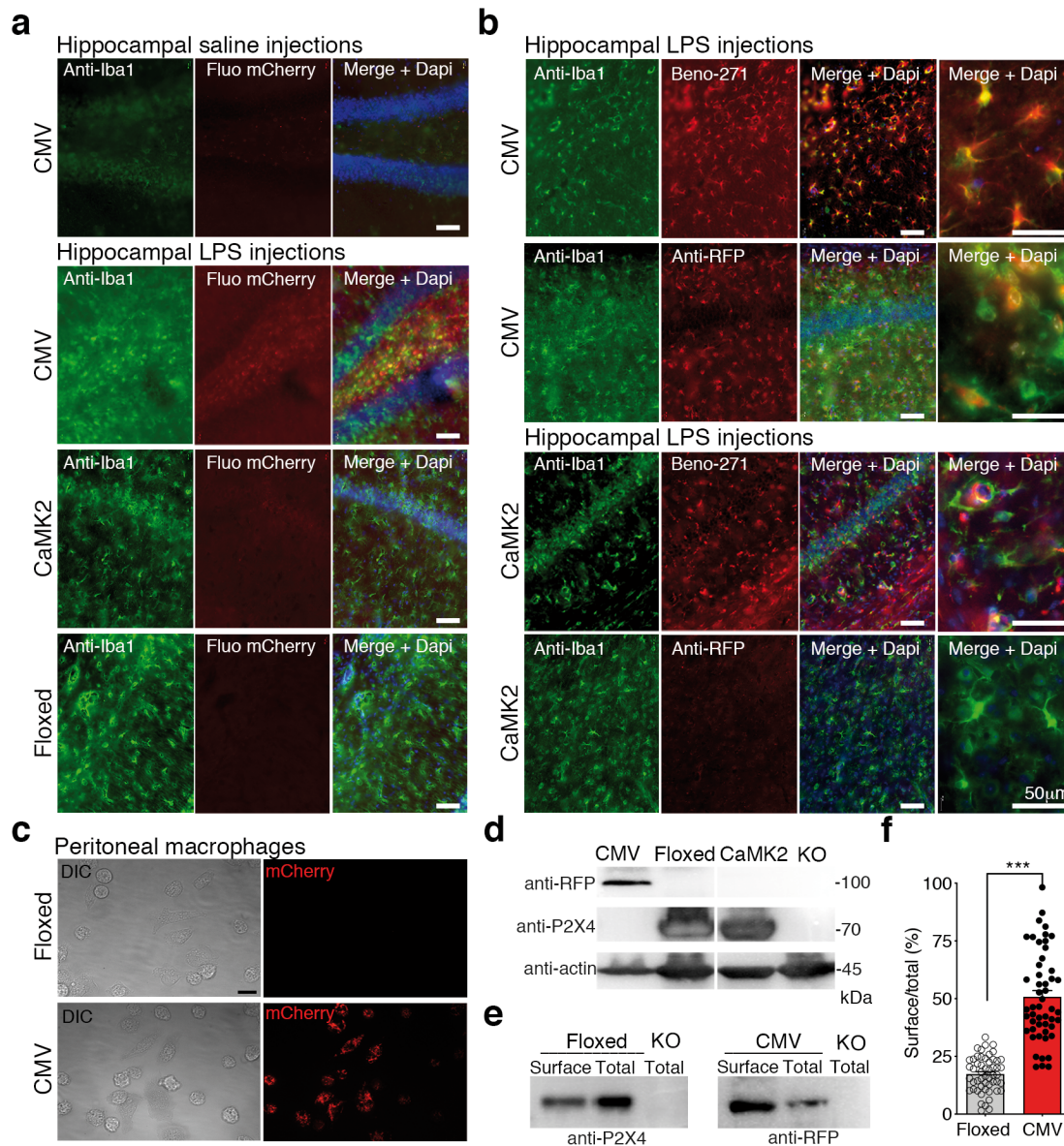


Fig. 3 Endogenous P2X4mCherryIN fluorescence in hippocampal microglia after LPS-induced de novo P2X4 expression and in peritoneal macrophages from CMV-P2X4mCherryIN mice. **a** Representative immunohistochemistry images of Iba1 and endogenous fluorescence of P2X4 mCherryIN (top, left) from the hippocampal region of the different mice injected with saline or 4 μ g LPS on each side (see also supplementary Fig. S4). The mCherry fluorescence increased in Iba1-positive cells after LPS specifically in CMV mice. **b** Immunodetection of P2X4mCherryIN using Benzo-271 antibodies (a Camelid nanobody directed against the extracellular domain of native P2X4) and anti-RFP antibodies from CMV or CaMK2 mice after LPS injections. An enlarged overlay reveals that the increase of P2X4mCherryIN is detected in Iba1-positive microglia cells by both antibodies in CMV mice while such increase is observed only with Benzo-271 in CaMK2 mice. Scale Bar, 50 μ m. **c** Endogenous P2X4mCherryIN fluorescence of macrophages isolated from the peritoneal cavity of Floxed and CMV mice. Differential interference contrast (DIC) and red fluorescence images reveal the P2X4mCherryIN exclusively in CMV mice. Scale bar, 20 μ m. **d** Western blotting of total proteins from macrophages of CMV, CaMK2, Floxed and P2X4KO mice using anti-RFP and anti-P2X4 revealed that P2X4WT is substituted by P2X4mCherryIN in macrophages of CMV mice only. P2X4mCherryIN is not detected by anti-P2X4 directed against the C-terminal of P2X4. Anti-actin antibody was used as loading control. **e,f** Surface P2X4 expression is

increased in CMV mouse peritoneal macrophages. Representative immunoblots of total and biotinylated surface proteins from peritoneal macrophages isolated from Floxed and CMV mice revealed with anti-P2X4 and anti-RFP antibodies, respectively. As in d, total proteins of P2X4KO macrophages were used as a negative control. **f** Quantification of surface/total expression of P2X4WT and P2X4mCherryIN in macrophages shown representatively in e. Bars represent mean \pm s.e.m. of the surface/total ratio of P2X4WT (Grey bar, $17.36 \pm 1.03\%$, $n = 53$) in floxed mice and P2X4mCherryIN in CMV mice (red bar, $50.79 \pm 2.71\%$, $n = 51$) and show that P2X4 surface expression is strongly increased in cells expressing P2X4mCherryIN mice compared to those expressing P2X4WT. The number of independent experiments is indicated by clear and black circles. *** $P < 0.001$, unpaired t-test.

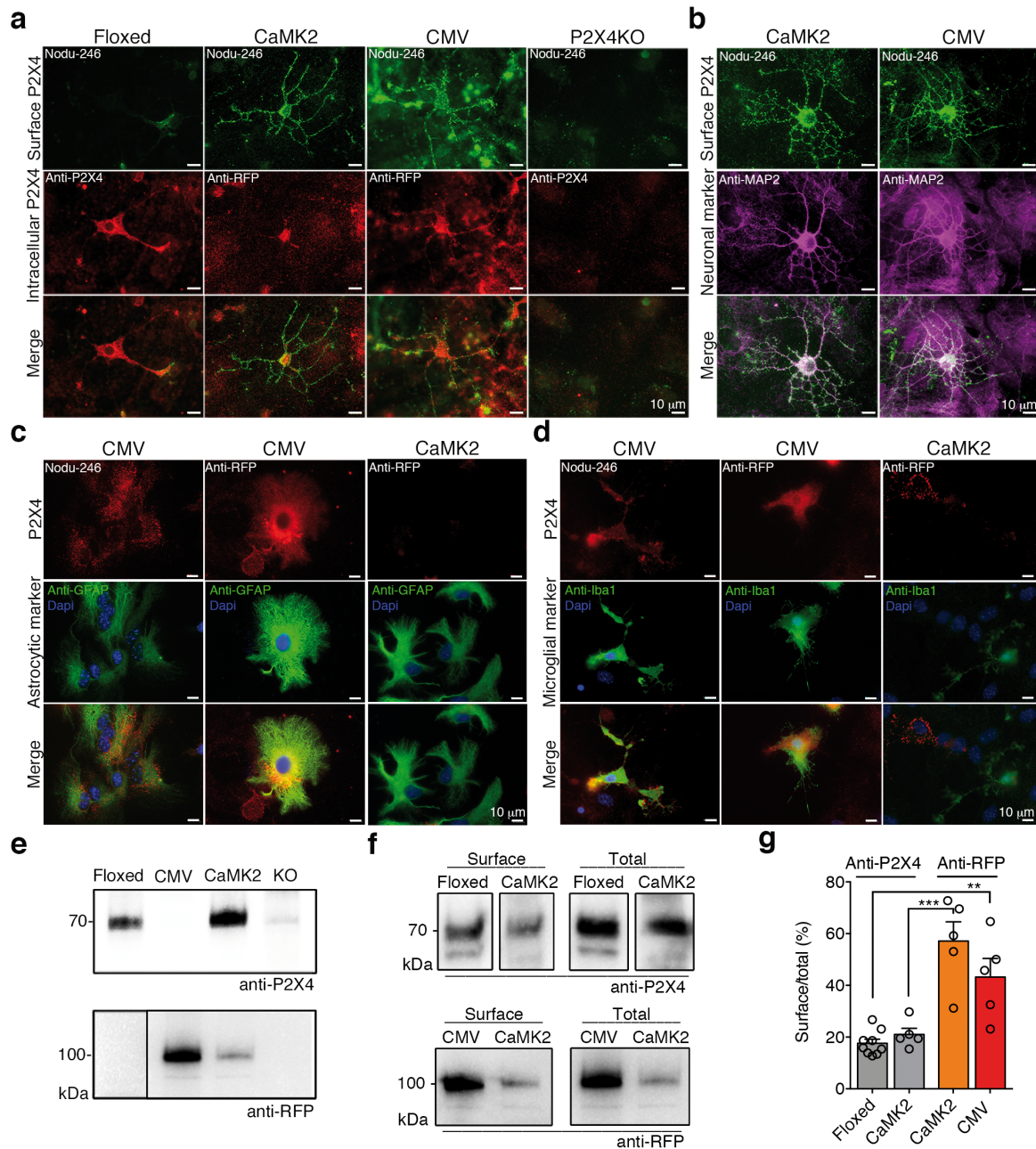


Fig. 4 Surface P2X4mCherryIN expression is increased in hippocampal neurons of CaMK2 or CMV mice as well as in glial cells of CMV mice. **a** Representative images of surface and total P2X4WT and/or P2X4mCherryIN in Floxed, CMV and CaMK2 primary hippocampal cell cultures reveal that surface P2X4mCherryIN is strongly increased compared to P2X4WT. Extracellular surface P2X4 and P2X4mCherryIN are visualized using Nodu-246 (green) antibodies. Intracellular P2X4WT is revealed by anti-P2X4 antibodies (red) in Floxed and P2X4KO mice while intracellular P2X4mCherryIN is revealed using anti-RFP antibodies (red) from CaMK2 and CMV mice. Staining was performed at 21 div. Scale bars, 10 μ m. **b** High density of surface P2X4mCherryIN using Nodu-246 (green) is detected in CaMK2 and CMV neurons identified using neuronal MAP2 marker (magenta). Surface P2X4WT is almost absent in floxed mice and not detected in P2X4KO neurons (see supplementary Fig. S5). **c,d** P2X4mCherryIN is expressed only in astrocytes and microglia of CMV mice solely. **c** Surface

and total P2X4mCherryIN revealed using Nodu-246 and anti-RFP antibodies (red) respectively, in GFAP-positive astrocytes (green) from 7 div primary hippocampal CMV cells. Nuclear marker DAPI is shown in blue. **d** Surface and total P2X4mCherryIN using Nodu-246 or anti-RFP antibodies (red), respectively, in microglia stained using anti-Iba1 antibodies (green) from 21 div primary hippocampal cells from CMV mice. Nuclear marker DAPI is shown in blue. **e** Western blotting of total proteins from primary hippocampal cells from Floxed, CMV, CaMK2, and P2X4KO mice using anti-RFP and anti-P2X4 antibodies reveal P2X4mCherryIN specifically in CMV and CaMK2 mice while P2X4WT is detected in CaMK2 and Floxed mice. **f** Representative immunoblots of total and biotinylated surface proteins from primary hippocampal cells isolated from Floxed, CMV and CaMK2 mice revealed with either anti-P2X4, anti-RFP or both antibodies, respectively. As in E, total proteins of P2X4KO macrophages were used as a negative control. **g** Quantification of surface/total P2X4WT and P2X4mCherryIN in hippocampal cells. Bars represent mean \pm s.e.m. of the surface/total ratio of P2X4WT (grey bar) in Floxed and CaMK2 mice and P2X4mCherryIN in CaMK2 (orange bar) or CMV mice (red bar) and show that P2X4 surface expression is strongly increased in cells expressing P2X4mCherryIN mice compared to those expressing P2X4WT. The number of independent experiments is indicated by circles. one-way ANOVA, and Bonferroni's post hoc test, $F(3, 20) = 17.2$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

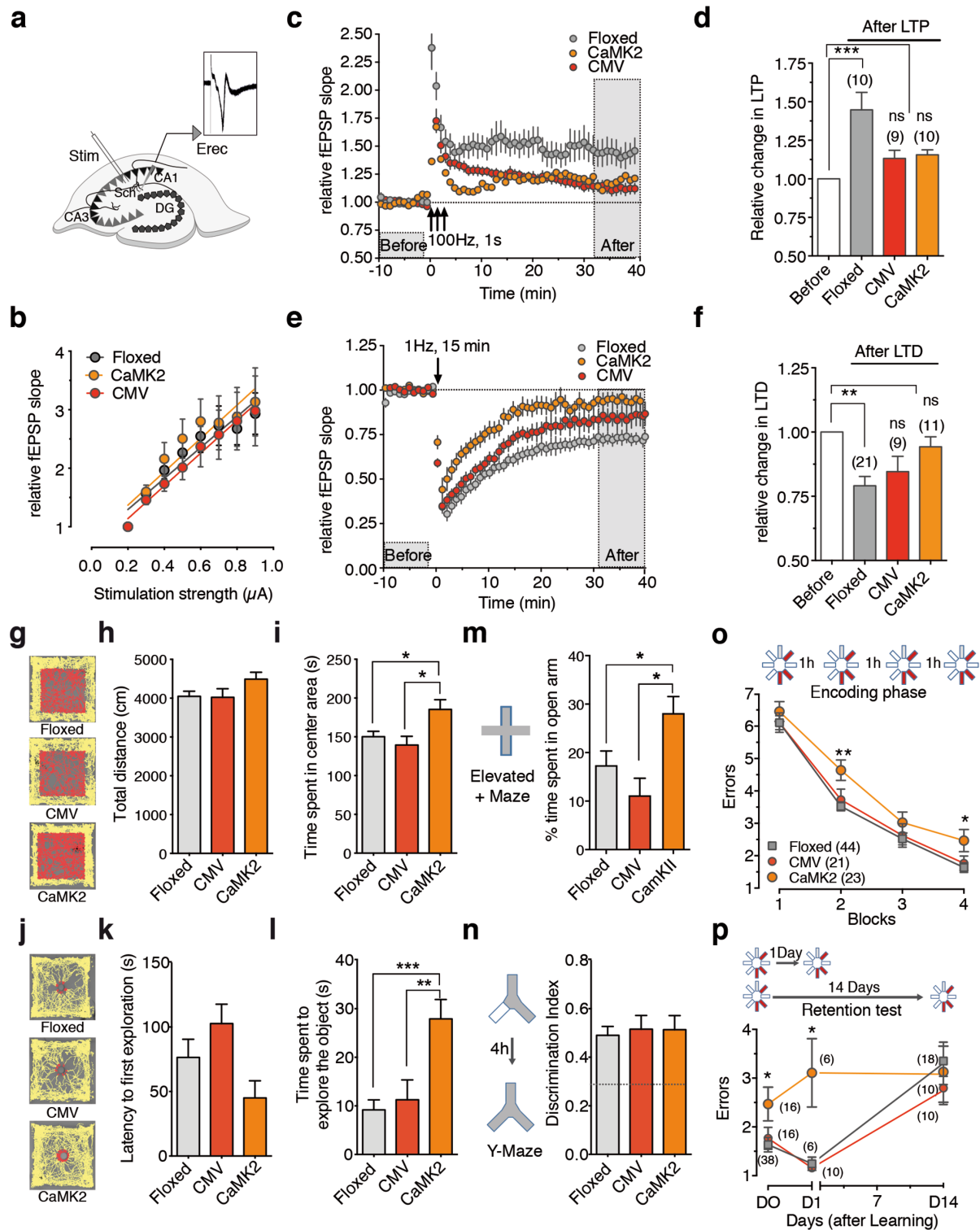


Fig. 5 Surface increase of neuronal P2X4 impairs LTP and LTD at CA1 hippocampal synapses and alters anxiety, spatial learning and memory. **a** Schematic drawing of the experimental protocol and example of a fEPSP recorded from the hippocampal CA1 region (Erec). fEPSP were induced by the electrical stimulation (stim) of the Schaffer collaterals (Sch) in the CA3 area and recorded in the stratum radiatum layer in brain slices of Floxed, CaMK2 and CMV P2X4mCherryIN mice. DG: dentate gyrus. **b** The relative field slope is plotted against stimulation intensity. The input/output curves for neurons in hippocampal slices from Floxed (gray circles, $n = 7$), CaMK2 (orange circles, $n = 7$) and CMV P2X4mCherryIN (red circles, n

= 6) mice show similar linear regression (mean \pm s.e.m., one-way ANOVA, $F(2,18) = 0.15$; $p = 0.85$) indicating that basal synaptic transmission is not affected by the increase of surface P2X4 expression. **c,d** Surface P2X4 increase impairs LTP. **c** Plots of normalized fEPSP slopes recorded in CA1 over time before and after the induction of LTP. LTP was induced by 3 tetanic trains (100Hz, 1s) with a 20 sec interval) in control Floxed ($n = 10$), CaMK2 ($n = 10$) or CMV mice ($n = 9$). **d** Bar graph summary showing the relative change of fEPSP slope 30-40 min after the induction of LTP in Floxed ($144.7 \pm 11.3\%$ of baseline, $n = 10$), CMV mice ($113.2 \pm 5.27\%$ of baseline, $n = 9$) or CaMK2 ($115.6 \pm 3.25\%$ of baseline, $n = 10$), one-way ANOVA and tuckey's post hoc test; $F(3,25) = 9.41$; $p = 0.002$, $***p < 0.001$; Error bars: s.e.m.; number of mice is indicated in parentheses. **e,f** Increased surface P2X4 impairs LTD. **e** Plots of normalized fEPSP slopes recorded in CA1 over the time before and after the induction of LTD with a 1 Hz, 15 min train Floxed ($n = 21$), CaMK2 ($n = 11$) and CMV mice ($n = 9$). **f** Bar graph summary showing the relative change of fEPSP slope 30-40 min after the induction of LTD in Floxed ($79.09 \pm 3.63\%$ of the baseline, $n = 22$, $p < 0.001$), CMV ($84.58 \pm 5.97\%$ of baseline, $n = 8$, $p > 0.05$) and CaMK2 mice ($94.24 \pm 3.89\%$ of baseline, $n = 9$, $p > 0.05$). one-way ANOVA and tuckey's post hoc test; $F(3,44) = 5.44$; $p = 0.0028$, $**p < 0.01$; Error bars: s.e.m.; Number of mice is indicated in parentheses. **g-i** Open field assessments of control (Floxed mice, $n = 24$) and CaMK2 ($n = 13$) or CMV ($n = 12$) P2X4mCherryIN mice. **g** Examples of exploration trajectories (top view) in the empty arena for each type of mice. Peripheral and central activities are indicated by yellow and red traces, respectively. **h** Similar total travel distance by each mouse line in the empty arena during 10 min was similar. **i** CaMK2 mice spent more time in the central arena compared to Floxed and CMV mice, one-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test; $F(2,46) = 5.139$; $p = 0.0097$, $**p < 0.01$. **j-l** One object exploration test in control (Floxed mice, $n = 24$) and CaMK2 ($n = 13$) or CMV ($n = 12$) P2X4mCherryIN mice. **j** Examples of exploration trajectories (top view) for each type of mice. Activities far away or at proximity of the object are indicated in yellow or red, respectively. **k** Latency to first interaction with the novel object is shown for each type of mouse. One-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test, $F(2,46) = 2.868$; $p = 0.067$. **l** CaMK2 mice spent more time exploring the novel object than Floxed and CMV mice. One-way ANOVA, $F(2,46) = 10.27$; $p = 0.0002$; $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. **m** Mean percent of time spent in the open arms of the elevated plus maze for Floxed mice ($n = 22$), CaMK2 ($n = 14$) and CMV ($n = 11$) mice. CaMK2 spent more time in the open arms, indicating reduced anxiety compared to the other mouse lines. One-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test, $F(2,44) = 5.186$; $p = 0.0095$; $*p < 0.05$. **n** Spatial recognition memory evaluated in the Y-maze. Floxed ($n = 24$), CaMK2 ($n = 13$) or CMV ($n = 12$) mice were able to recognize the novel arm of the maze that was rendered accessible 4 h after encoding (one-way ANOVA, $F(2,46) = 0.097$; $p = 0.907$). **o,p** Spatial learning and memory assessment using the 8-radial maze in Floxed mice (gray), CaMK2 (orange) and CMV (red) mice. The number of mice in each group is indicated in parentheses. **o** Learning occurred over one single day and consisted of 4 blocks of six trials separated by a 1 h interval. The location of the 3 constantly baited arms of the maze is indicated in red. CaMK2 mice committed more reference memory errors (visits to unbaited arms) compared to Floxed and CMV mice. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. Paired two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test, Time effect, $F(3,255) = 205.3$, $p < 0.0001$. Paired two-way ANOVA, genotype effect, $F(2,85) = 4.927$, $p = 0.0094$. **p** Retrieval testing 1 (recent) or 14 (long-term) days after initial training in the 8-arm radial maze for all three mouse lines. Performance achieved on the fourth training block (D0) is shown for comparison. The poorer performance exhibited by CaMK2 mice (higher number of errors) was not exacerbated by the passage of time. $*p < 0.05$, paired two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test, delay effect, $F(1,35) = 11.70$; $p = 0.0016$. All data are presented as mean \pm s.e.m.

Supplementary information

Supplementary Materials and Methods

Supplementary Figures and Legends

Supplementary Fig. S1

Supplementary Fig. S2

Supplementary Fig. S3

Supplementary Fig. S4

Supplementary Fig. S5

Supplementary Fig. S6

Supplementary Materials and Methods

Animal and cell models

Generation of Floxed knock-in P2X4mCherryIN mice

The *P2rx4* conditional knock-in mouse line was established at the MCI/ICS (Mouse Clinical Institute, Illkirch, France; <http://www-mci.u-strasbg.fr>). The targeting vector was constructed as follows. A 1328 bps fragment encompassing exon 9 (ENSMUSE00000189186) to the beginning of exon 12 (ENSMUSE00000688677) was amplified by PCR (from BAC genomic DNA RP23-31J24) and subcloned in an MCI proprietary vector. This vector contains a LoxP site, a 3X SV40 polyA sequence followed by a flipped Neomycin resistance cassette and another LoxP site. A 4681 kb fragment corresponding to the fusion of exons 9, 10 and partial 11 with the mCherry cDNA and the 3' homology arm (containing the 3'UTR and 3' region of the *P2rx4* gene) was amplified by PCR and subcloned in the plasmid. Finally, a 4780 bps genomic fragment corresponding to the 5' genomic region was subcloned to generate the final targeting construct. The linearized construct was electroporated into C57BL/6N mouse embryonic stem (ES) cells. After selection, targeted clones were identified by PCR using external primers and further confirmed by Southern blot with a Neomycin probe (5' and 3' digests) as well as a 3' external probe. Two positive ES clones were micro-injected into BALB/cN blastocysts. Resulting male chimeras were bred with Flp deleter females and germline transmission of the conditional allele was obtained. Before analysis, the Flp transgene was segregated. Floxed P2X4mCherryIN knock-in mice were backcrossed with C57BL/6N mice.

Generation of knock-in CMVCre⁺-P2X4mCherryIN and CaMK2Cre⁺-P2X4mCherryIN

Homozygous CMVCre^{+/wt}-P2X4mCherryIN^{F/F} (CMV) and CaMK2Cre^{+/wt}-P2X4mCherryIN^{F/F} (CaMK2) were generated by breeding floxed P2X4mCherryIN^{F/F} mice (Floxed) with either CMV-Cre^{+/wt} mice or CaMK2-Cre^{+/wt} mice (see Fig.S2). All mice used in this report were maintained on a pure C57BL/6 background. Only homozygous males were used for immunohistochemistry, electrophysiology and behavior studies.

Xenopus laevis oocytes

Oocytes were surgically removed from anesthetized *Xenopus laevis* and isolated as previously described^{42, 43}. After nuclear injection of indicated amounts of cDNAs encoding mouse P2X4WT or P2X4mCherryIN, oocytes were incubated in Barth's solution containing 1.8 mM

CaCl₂ and gentamycin (10 mg/ml) at 19°C for 1-3 days before electrophysiological recordings and/or biochemistry experiments.

Antibodies

Nodu-A246 rat monoclonal against native extracellular domain of mouse P2X4 antibody, this paper and⁵²; Beno-271 Camelid nanobody against native extracellular domain of mouse P2X4 fused to rabbit Fc fragment This paper and⁵²; Rabbit anti-P2X4 Alomone Cat# APR-002; Rabbit anti-RFP MBL Cat#PM005; Mouse anti-MAP2 Chemicon Cat#MAB3418; Chicken anti-GFAP Abcam Cat# ab4674; Goat Anti-Iba1 Abcam Cat#ab5076; Mouse Anti-NeuN Merk Cat#MAB377; rabbit anti-HA Cell Signaling Cat#C29F4; Mouse anti-HA Genscript Cat#A01244; Anti-actin Sigma Aldrich Cat#A5441; Goat anti-IgGs rabbit conjugated to ultrasmall gold particles 0.8nm Aurion Cat#25100; Anti-rat AlexaFluor488TM Life technologies Cat # A11006; Anti-rabbit AlexaFluor568TM Life technologies Cat # A11011/ Cat # A10042; Anti-mouse AlexaFluor488TM Life technologies Cat # A11001; Anti-chicken AlexaFluor488TM Life technologies Cat # A11001; Alexa647-conjugated affini-pure donkey anti-rabbit Jackson Immunoresearch cat #711-605-152; horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies Jackson Immunoresearch; Anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies Jackson Immunoresearch cat #111035144; Anti-Mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies Jackson Immunoresearch cat #115035062; Anti-chicken horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies Jackson Immunoresearch Cat # 703-035-155.

Reagents

microtoxin, Sigma aldrich, p1675, cas 124-87-8; formalin solution neutral buffered 10%, 4% pfa, Sigma-aldrich; EZ-link sulfo-nhs-ss-biotin, fisher- 11811205; High cap neutravidin aga resin, Fisher- 10742135; x10 pageruler plus pres prot lad, Fisher- 11852124; clarity ECL substrate, Biorad- 1705061; pierce™ bca protein assay kit, Fisher-23225; resin durcupan acm, Fluka; Silver enhancement kit, nanoprobe, Yaphank; transfectin, Biorad; revertaid premium reverse transcriptase, Fermentas; tissue dissociation kit, Miltenyi biotec.

Primary rat hippocampal neuron cultures for transfection

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared as previously described⁴⁴ with some modifications. Briefly, hippocampi were dissected from embryonic day 18 or 19 Sprague-Dawley rats of either sex. Tissue was then trypsinized (0.25% v/v), and mechanically dissociated in Hanks Buffered Salt Solution (HBSS) containing 10 mM HEPES. Neurons were plated at a density of 120×10^3 cells/ml onto 18-mm diameter glass coverslips pre-coated with

50 µg/mL poly-DL-ornithine in plating medium composed of Minimum Essential Medium supplemented with horse serum (10% v/v), L-glutamine (2 mM) and Na⁺ pyruvate (1 mM). After attachment for 3-4 h, cells were incubated in culture medium consisting of Neurobasal medium supplemented with B27, L-glutamine (2 mM), and antibiotics (penicillin 200 units/ml, streptomycin, 200 µg/ml), and kept for up to 3 weeks at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. Each week, one fifth of the culture medium volume was renewed.

Primary hippocampal neuron cultures from mice

Primary hippocampal neurons were prepared from P0 or P1 pups from CaMK2, CMV, Floxed and P2X4KO mice of either sex. Hippocampi were dissected in ice-cold Ca²⁺/Mg²⁺-free Earle's Buffered Salt Solution containing HEPES and antibiotics (penicillin 200 units/ml, streptomycin, 200 µg/ml) and hippocampal tissues dissociated using neural tissue dissociation kit. Subsequently, cells were plated at the concentration of 150 x 10³ cells/ml onto 18 mm diameter glass coverslips for immunocytochemistry experiments and at the concentration of 400 x 10³ cells/ml for biochemistry experiments on coverslips precoated with 50 µg/ml poly-L-lysine in plating medium composed of MEM, 20% v/v glucose, horse serum and antibiotics (penicillin 200 units/ml, streptomycin, 200 µg/ml). After 24 h, medium was changed to serum-free culture medium containing neurobasal medium supplemented with B27 and antibiotics (penicillin 200 units/ml, streptomycin, 200 µg/ml) and cells were kept at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator.

Isolation of mouse peritoneal macrophages

Mice were deeply anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) and peritoneal cells were collected by washing the peritoneal cavity with 2 ml of phosphate buffer saline (PBS) as described⁴⁵. The suspension of peritoneal cells was centrifuged for 8 min at 2000 rpm at 4°C and then immediately used either for biotinylation experiments or plated for fluorescence microscopy.

Ethics approval

All experimental procedures complied with official European guidelines for the care and use of laboratory animals (Directive 2010/63/UE) and were approved by the ethical committee of Bordeaux. All animals were treated humanely and with regard for alleviation of suffering.

Constructs and RT-PCR from tissues

Mouse P2X4WT were available from previous work⁴³. The Homer1c-GFP construct was kindly provided by D. Choquet (IINS, Bordeaux). Mouse P2X4mCherryIN and extracellular HA-

tagged P2X4WT or P2X4mCherryIN constructs were generated by PCR with the wild-type plasmid as a DNA template using Pfu polymerase to minimize artefactual mutations. Non-internalized P2X4mCherryIN was generated by 2 PCRs. A C-terminal truncated mouse P2X4 (corresponding to amino-acid 1 to 377) followed by an in-frame *XhoI* site was obtained by PCR. Similarly, the mCherry sequence was also amplified by PCR to replace its natural ATG codon by an in-frame *XhoI*. Both PCR products were subcloned into pcDNA3. The HA sequence (YPTDVPDYA) was inserted after position Q78 of mouse P2X4WT or P2X4mCherryIN using the Quickchange site-directed mutagenesis method. All constructs were sequenced.

Brain tissue samples were homogenized in TRIzol reagent and RNA was isolated using a standard chloroform/isopropanol protocol. cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using RevertAid Premium Reverse Transcriptase with oligo-dT primers and random primers. Expression of P2X4WT and/or P2X4mCherryIN mRNAs was assessed by RT-PCR using specific primers 1094/1096 and 1094/1095, respectively.

Cell transfection

Transfections of rat hippocampal cultures were carried out at day in vitro (*div*) 14 using TransFectin according to the manufacturers' instructions (DNA:transFectin ratio of 1 µg:3 µl), with 1 µg of plasmid DNA per 20 mm well. The following ratios of plasmid DNA were used in co-transfection experiments: 0.3 µg: 1.0 µg for homer1c-GFP: HA-P2X4WT or homer1c-GFP: HA-P2X4mCherryIN. Experiments were performed 7-9 days post-transfection. Transfections of mouse hippocampal cultures and Cos cells were carried out using Lipofectamine or Effecten respectively, according to the manufacturer's instructions (DNA:Lipofectamine 2000 ratio of 1 µg:2 µL) with 0.5-1 µg of DNA per well for neurons and (DNA:Effecten ratio of 1 µg:2 µL) with 0.3 µg of DNA per well for Cos cells. Experiments were performed 2-3 days post-transfection.

Immunofluorescence of transfected neurons

HA-P2X4 surface labeling was assessed with live cell staining. Neurons expressing HA-P2X4WT or HA-P2X4mCherryIN were washed in imaging medium and incubated for 20 min at 4°C with rabbit primary antibody against HA (1:200) in imaging medium. After further washes, cells were fixed for 15 min at room temperature (RT) in paraformaldehyde (PFA; 4% w/v) and sucrose (20% w/v) solution in PBS. Cells were washed in PBS and blocked for 30 min at RT in goat serum (GS; 20% v/v) in PBS. Neurons were then incubated for 45 min at RT with Alexa Fluor 647-conjugated affinity-purified donkey anti-rabbit antibodies (1:400) in PBS-GS blocking solution, washed, and mounted on slides. Sets of neurons compared for quantification were labeled simultaneously.

For P2X4 detection in cells expressing HA-P2X4WT, cells were fixed for 15 min at RT in PFA solution (as above), washed in PBS, and permeabilized with a solution containing Triton X-100 (0.25% w/v) diluted in PBS. After washes, cells were incubated for 30 min at RT in PBS-GS blocking solution and incubated for 1 h with a rabbit antibody against P2X4 (1:400, Alomone) in PBS-GS solution. After washes, cells were incubated for 45 min at RT with Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-rabbit antibodies (1:400) in PBS-GS solution, washed, and mounted on slides using Mowiol 4-88 (48 mg/mL).

Fluorescence image acquisition and analysis

Image acquisition was performed using a 63x objective (NA 1.40) on a Leica (Nussloch, Germany) DM6000 upright epifluorescence microscope with a 12-bit cooled CCD camera (Micromax, Roper Scientific) driven by MetaMorph software (Roper Scientific, Evry, France). Quantification was performed using MetaMorph software (Roper Scientific). Exposure time was determined on bright cells to obtain the best fluorescence to noise ratio and to avoid pixel saturation. All images from a given culture were then acquired with the same exposure time and acquisition parameters.

For quantifications of surface HA labeling, a well-focused dendrite was chosen for each neuron and the mean fluorescence intensity per pixel was determined. HA-P2X4mCherryIN pixel intensity values were normalized to the HA-P2X4WT values obtained in the same culture. Three different cultures were analyzed with a total of 40 and 58 neurons expressing HA-P2X4WT or HA-P2X4mCherryIN, respectively. For quantifications of P2X4 labeling, the mean fluorescence intensity per pixel was measured on the soma and dendrites of non-transfected cells and HA-P2X4WT expressing cells. The ratio of HA-P2X4WT/endogenous P2X4 pixel intensity was calculated on two different cultures by measuring 27 non-transfected cells and 34 HA-P2X4WT expressing cells. For quantifications of P2X4 clusters at excitatory synapses versus extrasynaptic sites, images were first flattened and background filtered (kernel size, 3 X 3 X 2) to enhance cluster outlines, and a user defined intensity threshold was applied to select clusters and avoid their coalescence. Clusters were outlined and the corresponding regions were transferred onto raw images to determine the mean cluster number, area and fluorescence intensity. For quantification of P2X4 synaptic clusters, receptor clusters comprising at least 3 pixels and colocalized on at least 1 pixel with homer1c-GFP clusters were considered. The dendritic length of the region of interest was measured to determine the number of clusters per 10 μm .

Immunofluorescence of primary hippocampal cultures from mice

For the staining of surface P2X₄, live hippocampal neurons of 14 or 21 *div* were incubated at 4°C for 1 h with anti-extracellular rat monoclonal Nodu-246 antibodies (1:200). Next, cells were fixed in 4% PFA, 4% sucrose for 20 minutes at RT, washed thrice in PBS, 0.3% bovine serum albumin (BSA) and incubated for 10 minutes in PBS, 0.3% BSA, 1 M NH₄Cl to quench autofluorescence. Subsequently, neurons were permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS, 0.3% BSA for 1 min then saturated in PBS/1% BSA for 1 h at RT. Anti-intracellular P2X₄, anti-RFP, anti-MAP2, anti-GFAP and anti-Iba1 primary antibodies (1:500) were applied for 1 h at RT. After washing with PBS containing 1% BSA, cells were incubated for 1 h with respective AlexaFluor fluorescent secondary antibodies (1:500) and nuclear marker 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Sections were then washed in PBS and mounted in VectaShield antifade mounting medium for image acquisition. Cells were imaged with a 63x oil-immersion objective mounted on a Zeiss Imager M2 fluorescence microscope and image analysis was performed using ImageJ.

Hippocampal lipopolysaccharide (LPS) injections

Mice were anesthetized with isoflurane (induction at 5%, maintenance at 1-2.5% v/v). Once anesthesia was induced, mice were placed into a stereotaxic frame under continuous isoflurane maintenance and applied ventilation (Kopf). Before surgery, buprenorphine was administered subcutaneously. Craniotomies of 2-3 mm diameter were performed above the left parietal cortex. 1 µl injections of 4 µg/µL LPS (or saline solution) were delivered over a period of 2 min into each hippocampus. Stereotaxic coordinates were 2 mm posterior to bregma, 1.5 mm lateral to midline, and 1.6 mm from the pial surface. After surgery, buprenorphine was administered twice per day. Three days after injection, mice were transcardially perfused.

Immunohistochemistry

Mice were perfused transcardially with 0.9% NaCl and fixed with 2% PFA in 0.2 M phosphate buffer. Brains were dissected, post-fixed overnight in 2% PFA in 0.2 M phosphate buffer, washed and then transferred into 20% v/v glucose in PBS for 2 days. Brains were then frozen in isopentane cooled to -70°C. Coronal brain (50 µm) floating cryosections were incubated in a blocking solution containing PBS, 0.05% Tween, 5% normal goat serum (NGS) for 45 min and then incubated with primary antibodies diluted in PBS 1% NGS overnight at RT. Sections were then washed with PBS and primary antibodies revealed by incubation of brain slices in respective Alexa Fluor conjugated secondary antibodies for 1.5 h at RT. Sections were then washed with PBS and mounted in mounting medium containing DAPI. Images were taken

using Zeiss Imager M2 fluorescence microscope, Hamamatsu digital camera and ExploraNova MorphoStrider software with identical camera settings. Contrast and luminosity were adjusted using Image J software.

Expansion microscopy

After Immunostaining, protein retention expansion microscopy (proExM) of several specimen was performed using a procedure previously described⁷⁴. Briefly, samples were first incubated in Acryloyl X–SE 1:100 (0.1 mg/mL) in PBS for overnight at RT. Then samples were washed twice for 15 min each before proceeding to gelation. Gelling solution was obtained by mixing on ice, monomer solution 1.06x containing sodium acrylate 8.6%, acrylamide 2.5%, N,N'-methylene bisacrylamide 0.15%, sodium chloride 11.7% in PBS, TEMED 0.2%, APS 0.2% and 4-hydroxy-TEMPO final concentration 0.01%. Samples were incubated in gelling solution for 10 min at 4°C. and afterwards placed into a drop of fresh gelling solution between a microscopy slide and coverslip and incubated for 2 h at 37°C in a humid chamber. Samples were then digested overnight at RT in a solution containing proteinase K 8U/ml, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM, TritonX-100 0.5%, guanidine HCl 0.8M. Afterwards, samples were washed for 10 min and incubated 5 times in ultrapure water for expansion. Expanded samples were imaged using a Zeiss Axio Imager M2 equipped with a 20 x objective sCMOS camera (Hamamatsu) Images were deconvolved using fluo D3 (Explora Nova La Rochelle France).

Electronic microscopy

Mice were deeply anesthetized with a mixture of pentobarbital (300 mg/kg) and lidocaine (30 mg/kg) and then transcardially perfused with a mixture of 2% PFA and 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. Brains were quickly removed and left overnight in 2% PFA at 4°C. Coronal brain sections of 50 µm were cut on a vibrating microtome, collected in PBS, cryoprotected, freeze-thawed, and stored in PBS with 0.03% sodium azide until use.

Hippocampal and cortical P2X4mCherryIN was detected by pre-embedding immunogold technique as previously described⁴⁶. Sections were incubated in 4% NGS for 45 min and then in anti-RFP (1:300) antibodies supplemented with 1% NGS overnight at RT. After washing in PBS-0.2% BSAc (Aurion), sections were incubated overnight at 4°C in goat anti-IgGs rabbit conjugated to ultrasmall gold particles (0.8 nm; Aurion) diluted 1:100 in PBS, 0.2% BSAc. The sections were washed and post-fixed in 1% glutaraldehyde in PBS for 10 min. After washing, the immunogold signal was intensified using a silver enhancement kit (HQ silver) for 10 min at RT in the dark. Sections were then processed for electron microscopy by post-fixation of the sections in 0.5% osmium tetroxide, dehydration in ascending series of ethanol dilutions including 70% ethanol containing 1% uranyl acetate and finally sections were included into

epoxy resin. Serial ultrathin sections were cut with a Reichert Ultracut S, contrasted with lead citrate and imaged with a Hitachi H-7650 microscope.

Biotinylation assays and immunoblotting

Surface biotinylation experiments were performed as described previously^{8, 43, 75} from injected *Xenopus* oocytes, mouse peritoneal macrophages and hippocampal cell cultures. Briefly, cells were incubated in an ice-cold Ringer (for oocytes) or PBS with calcium and magnesium containing 1 mg/ml sulfo-NHS-SS-biotin and incubated at 4°C for 4 h (or overnight) under gentle agitation. Excess sulfo-NHS-SS-biotin was removed by washes with buffer and quenched by washes with ice-cold quenching buffer containing 100 mM of glycine. Biotinylated cells or brain tissues were lysed by sonication in homogenization buffer (10 mM HEPES, 0.3 M sucrose, pH 7.4) containing protease inhibitors. Then proteins were solubilized with 1% Triton X-100 under agitation at 4°C for 2 h. After centrifugation at 10,000 g for 15 min, the supernatant containing the total proteins was quantified using the bicinchoninic acid (BCA) method. For biotinylation experiments, a fraction of the supernatant was kept to assess total receptor fraction (Vt). The remaining supernatant (Vs) was incubated overnight at 4°C with Immunopure Immobilized Neutravidin to precipitate surface proteins. Beads (20 µl) were washed with homogenization buffer and eluted with one volume of SDS sample buffer. Total and surface proteins were separated on SDS-PAGE and revealed using either anti-P2X4 (1:1000) or anti-RFP antibodies (1:1000) or anti-actin (1:10,000) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1:5000). Western blots quantification was performed using Image J software. The surface/total ratio from each experiments was determined using

the following equation:
$$\frac{\text{Signal S} \times \left(\frac{Vt+Vs}{Vs}\right)}{\text{Signal S} \times \left(\frac{Vt+Vs}{Vs}\right) + \text{Signal T} \times \left(\frac{Vt+Vs}{Vt}\right)}$$

Extracellular field recordings and induction of synaptic plasticity in hippocampus

Acute hippocampal slices were obtained from 5-12 weeks old CMV, CaMK2 and Floxed mice. Animals were anesthetized with ketamine/xylazine and transcardially perfused with ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing in mM: 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 25 Glucose, 2 CaCl₂ and 2.5 KCl, 1.25 NaHPO₄, 1.3 MgCl₂. Brains were quickly removed and sectioned in 350 µm thick parasagittal slices with a vibrating blade microtome (VT1000 vibratome, Leica, 0.16 mm speed, cut amplitude 2.75 mm). Hippocampal slices were equilibrated in oxygenated ACSF for 45 min at 33 °C and afterwards at RT for at least 2 h. Single slices were then transferred to a recording chamber under continuous perfusion with oxygenated ACSF (95% O₂, 5% CO₂ at 2.5 ml/min) containing 100 µM of the GABA_A antagonist picrotoxin. For fEPSP recordings, a concentric bipolar stimulation electrode was applied to Schaffer collaterals in the

hippocampal CA3 area and fEPSPs were recorded in the stratum radiatum of the CA1 area with a glass micropipette, 3-9 M Ω . fEPSPs were evoked by 0.1 Hz initial stimulations, followed by a stepwise increase in the stimulation intensity to establish the input/output relationship and to determine the maximal response. After 10 min of stable baseline with fEPSP evoked by adjusting the stimulus intensity to elicit 75% (LTD) or 50% (LTP) of the maximum response, LTP or LTD was induced. To induce LTP, a high frequency stimulation (HFS) consisting of three 1 s trains of 100 Hz (100 stimulations of 100 μ s every 20 s) was applied. LTD was induced using a low frequency stimulation (LFS) protocol, consisting of 1 Hz stimulation (1 stimulation of 100 μ s every second), applied for 15 min. Thereafter, fEPSP recordings lasted 40 min. Voltage recordings were amplified with a Multiclamp 700B (Axon instruments) and acquired with Axograph software. Field plots were prepared by measuring fEPSP slopes, considering the baseline as 100%.

***Xenopus* oocyte electrophysiology**

Two-electrode voltage-clamp recordings were performed as previously described⁷⁵. Briefly, recordings were carried out at RT using glass pipettes (1–2 M Ω) filled with 3 M KCl solution to ensure reliable holding potentials. Oocytes were voltage-clamped at -60 mV, and membrane currents were recorded with an OC-725B amplifier (Warner Instruments) and digitized at 1 kHz on a Power PC Macintosh G4 using Axograph X. Oocytes were perfused at a flow rate of 10-12 ml/min with Ringer solution, pH 7.4 containing in mM: 115 NaCl, 3 NaOH, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, and 10 HEPES. 100 μ M ATP was applied using a computer-driven valve system (Ala Scientific).

Mouse behavioral tests

Mice were housed in plastic cages with a 12 hr/12 hr light/dark cycle (lights on at 7:00 AM), with water and food available *ad libitum*. Behavioral tests were performed on 12-16 weeks old males. They were isolated 2 weeks before the behavioral procedures and were regularly handled for habituation one week prior to behavioral testing. Animals were transferred to the experimental rooms 30 min before the behavioral procedures. The equipment was cleaned with 70% ethanol between subjects. Two cohorts of animal were used: one for open field, Y-maze and 8-arm radial maze testing and one for elevated plus maze and 8-arm radial maze testing. An interval of 2 days was provided between open field and Y-maze tasks, while an interval of one or two weeks was given before testing in the 8-arm radial maze.

Open field procedure

The open field was a rectangular cage (40x40x40 cm) with a clear Plexiglas front panel that was placed in a brightly-lit room (~200 lx). All animals were subjected to the open field test only once. The tests were conducted during the light phase of the illumination cycle. All tests took place between 8:30 am and 5:30 pm. Animals were placed in a particular corner of the arena and continuously video tracked for 10 min. The arena was divided into the center area (30 cm × 30 cm square) and the 'thigmotaxis' area, which corresponded to the peripheral region of the arena (less than 5 cm away from the walls). Locomotor activity and time spent in the different areas of the arena were recorded automatically using the EthoVision XT9 video-tracking system (Noldus, Wageningen, The Netherlands).

Novel object recognition test

The novel object test, a free exploration paradigm that exposes the animals to a novel stimulus in a familiar arena and inflicts an approach-avoidance conflict^{48, 49}, was performed one day after the open field exploration in the same experimental room and in the same arena. The novel object was a heavy black and white porcelain object (5×5.5 cm) stuck to the floor and positioned vertically in the center of the arena. Animals were placed in a particular corner of the arena and after 5 s of brief habituation, mice were continuously observed for 10 min. Latency to first object exploration and total duration of object exploration were recorded automatically using the EthoVision XT9 tracking system (Noldus, Wageningen, The Netherlands). Floor and object were wiped with ethanol 30% in between sessions, but not rinsed.

Elevated plus maze

Elevated plus maze is an established animal paradigm for the assessment of anxiety-like behavior in rodents⁵⁰ which is based on the strong aversion of these animals to open areas and on the other hand on their high motivation to explore. The test was performed under a general room light intensity of 10 lx in a grey Plexiglas plus maze (50 cm L × 10 cm W) that was elevated 60 cm above the floor. At the start of the test, the mice were placed in the center of the elevated plus maze facing one of the open arms. Subsequently, behavioral parameters were recorded and calculated by the EthoVision XT9 tracking system for a total trial duration of 300 s. Time spent in open and close arms was measured. An entry was registered only when all four paws of the animal were placed in the arm. To remove any confounding olfactory cues, the maze was wiped clean with an ethanol-soaked cotton swab after each test.

Spatial recognition memory

The Y-maze two-trial procedure is routinely used to examine spatial recognition memory and takes advantage of the innate tendency of rodents to explore novel environments⁵¹. To increase its spatial cognitive demand, we adapted it to the 8-arm radial maze (Imetronic, France) in which only three arms were used to form a Y-shape (90°-135°-135° between the arms)⁵⁷. Each arm is 62 cm long and 12 cm wide and radiates from a central platform (32 cm in diameter). The procedure was composed of the exploration (encoding) phase and the recognition phase, which were separated by 4 h inter-trial intervals (ITIs). During the encoding trial, one of the three available arms was closed. The mouse was positioned on the central platform of the maze and was allowed to explore the two available arms during 10 min. During the recognition trial, the animal could explore all three arms during a 5 min period. The time spent by the animal in each of the three arms of the maze was automatically recorded during the encoding and the test phase, with the entrance into an arm being scored when the first half of the animal's body was inside that arm. Thus, the total time spent in all three arms corresponds to total exploration time. Mice normally tend to explore the previously blocked arm (novel arm) of the maze more often than the previously accessible (familiar) ones. Because this behavioral paradigm relies on novelty seeking, animals were used only once. Discriminating the novel arm from the two familiar arms is thus considered as an index of spatial recognition memory. Memory performance was expressed as the percentage of time spent in novel arm calculated as follows:
$$\frac{\text{time in novel arm}}{\text{total time spent in all 3 arms}} \times 100.$$

The time spent on the central platform of the maze was excluded from the calculation of performance. Chance level was set at 33% of the exploration time. Animals that were not exploring one of the two arms during the habituation phase or one of the three arms during the test phase were excluded from analysis.

One day learning

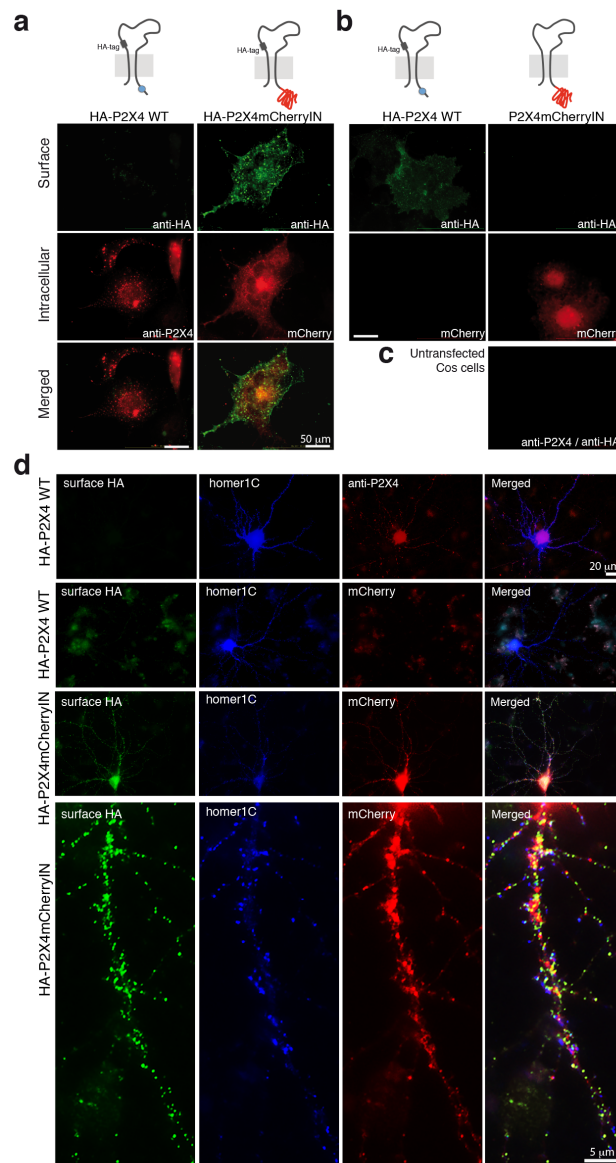
Spatial memory testing was conducted in an 8-arm radial maze. Each arm was 62 cm long and 12 cm wide and radiated from a central platform (32 cm in diameter). The mice were tracked by using the Imetronic video system (Pessac, France). One week before testing, mice were handled daily and their free feeding weights were taken over 3 consecutive days. Mice were food-restricted until they reached 85-90% of their free feeding weights. Weights were then stabilized by adjusting the daily amount of food given to each mouse after completion of testing. Sweet milk pellets were used as rewards during testing in the maze. Mice underwent two daily sessions of habituation during which they could freely explore the maze. On the first habituation day, each of the 8 arms of the maze was baited with a sweet milk pellet placed at

the end of each arm and also in the middle to encourage exploration. All doors of the maze were open and the mouse could freely explore the maze. After visiting each arm, doors closed to prevent the mice from visiting an arm twice. During the second habituation day, rewards were placed only at the end of each arm and were not visible from the central platform. Doors stayed open during the whole trial, so repeated visits (repetition) of an arm were possible. The trial ended when the mouse visited all 8 arms. After these 2 days of habituation, food-restricted mice were tested for reference memory. The same 3 arms out of 8 were always baited with the milk pellets. Each mouse had a different set of baited arms, but the positions of the baited arms was always 45°-90°-225° (for instance arms: 1-2-4, 2-3-5, 3-4-6, etc.). Mice had 4 blocks of 6 consecutive trials separated by 1 h. Each trial was terminated when the mouse collected the pellets from the three baited arms and a delay of one minute was applied to start another trial. Visit to a non-baited arm was scored as a reference memory error. Animals were then tested for retention either 1 or 14 days after acquisition and submitted to a single retention trial to prevent retrieval from being contaminated by reacquisition processes.

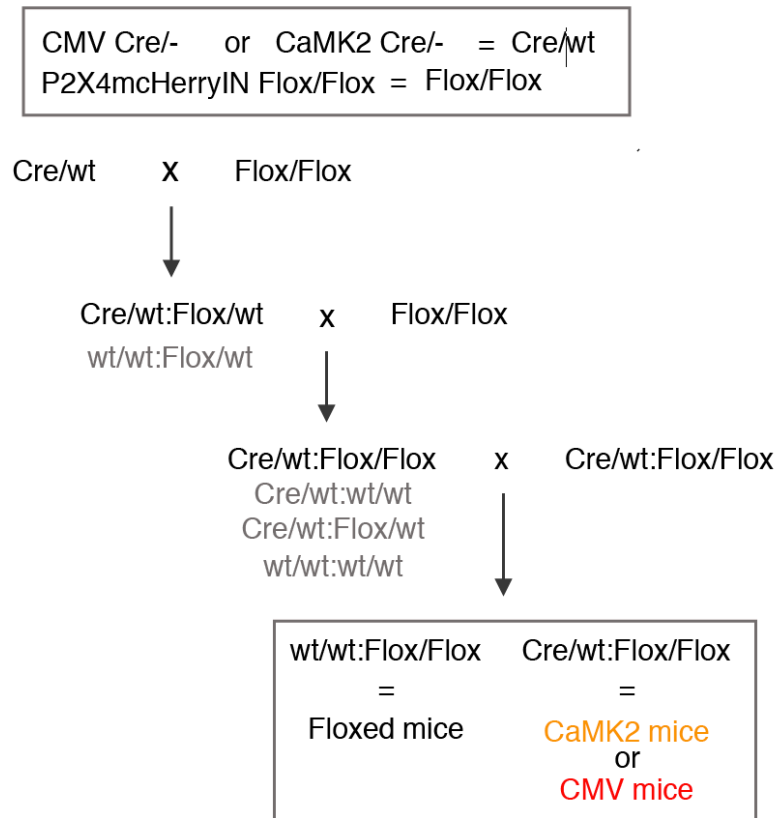
Quantification and statistical analysis

The number of independent experiments or animals (*n*), the statistical test used for comparison and the statistical significance (*p* values) are specified for each Figure panel in the corresponding Figure legend. Data are presented as mean ± s.e.m. Data were analyzed and graphs were generated using GraphPad Prism.

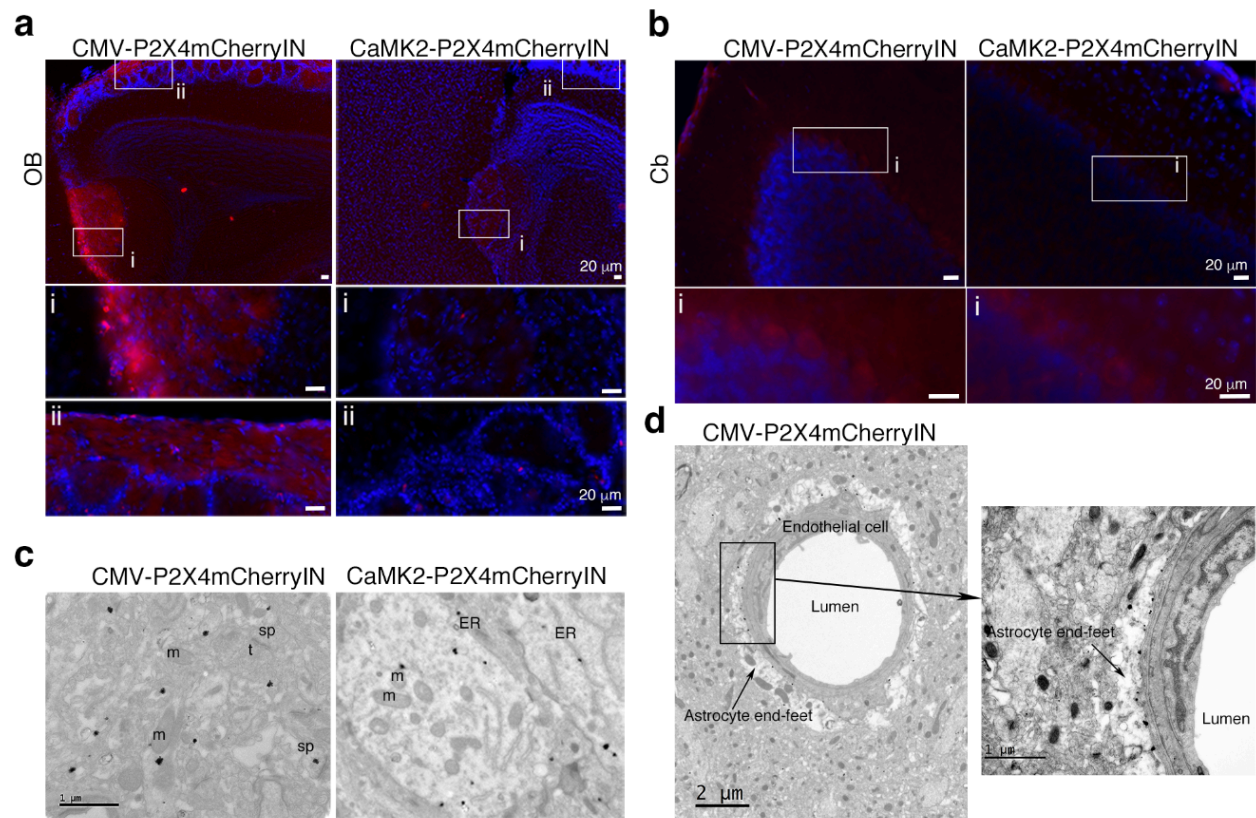
Supplementary Figures and Legends



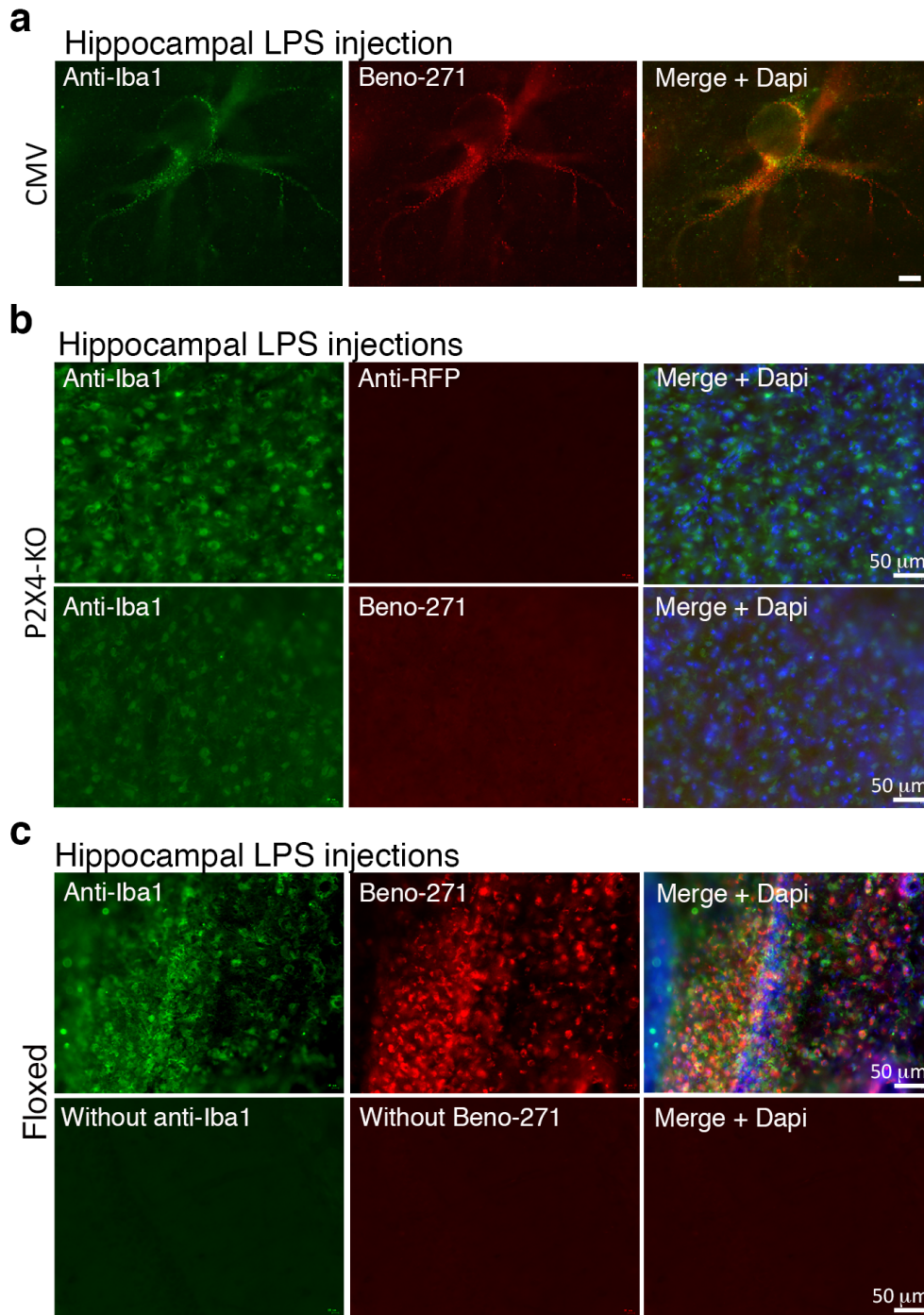
Supplementary Fig. S1. **a** Surface and total P2X4 labeling of Cos cells transfected with HA-P2X4WT or HA-P2X4mCherryIN. These experiments show that P2X4 surface expression was strongly increased in cells expressing P2X4mCherryIN mice compared to those expressing P2X4WT. Extracellular HA-tagged P2X4 WT or P2X4mCherryIN was revealed using anti-HA on living cells and intracellular P2X4 with anti-P2X4 for HA-P2X4WT and by direct fluorescence of mCherry fused to P2X4. Scale bar, 50 μm . **b** Control experiments of Cos cells transfected with HA-P2X4WT revealed with anti-HA (in green) in absence of anti-P2X4 antibodies. No red fluorescence is visible. Cos cells transfected with untagged P2X4mCherryIN revealed with Anti-HA antibodies. Only mCherry fluorescence is visible, no surface staining is detected. Scale bar, 50 μm . **c** No signal is visible in non-transfected cells with anti-P2X4 and anti-HA antibodies. **d** Images of rat hippocampal neurons transfected with extracellular HA-tagged P2X4 WT or HA-P2X4mCherryIN revealed with anti-HA and either anti-P2X4 or by native mCherry fluorescence. Postsynaptic regions are indicated by detection of Homer 1c-GFP (blue). Scale bars, 20 μm and 5 μm .



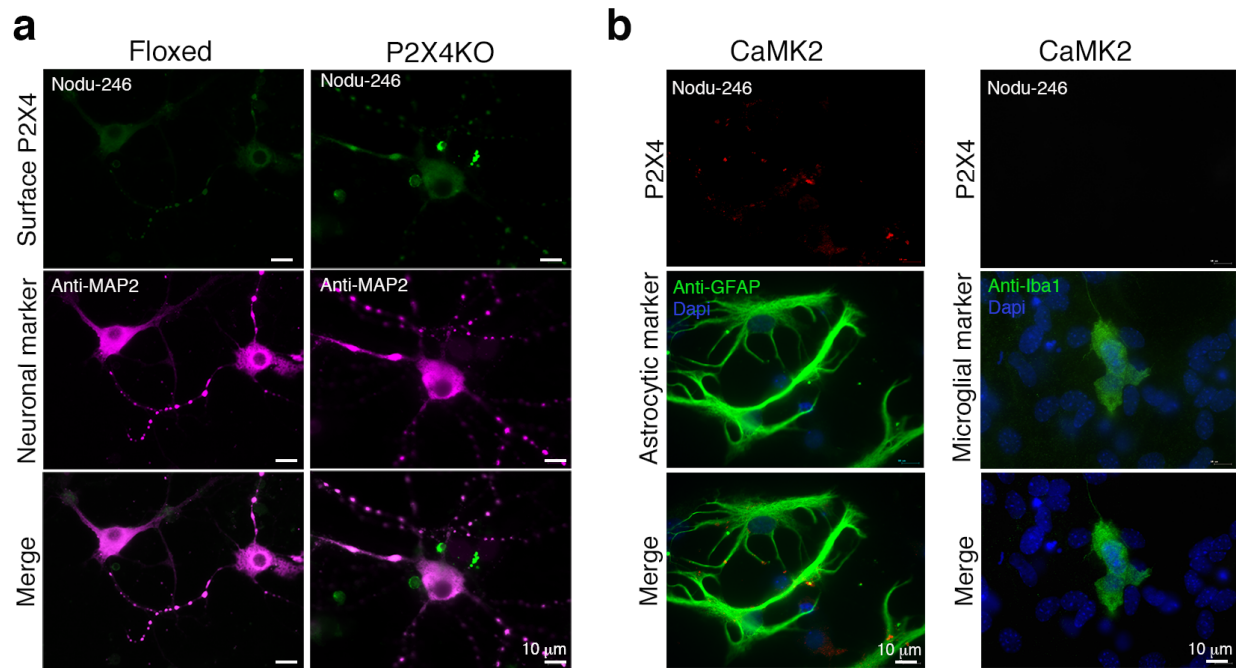
Supplementary Fig. S2. a,b Breeding scheme of the generation of homozygous CMVCre^{+^{WT}}:P2X4mCherryIN^{F/F} mice and CaMK2Cre^{+^{WT}}:P2X4mCherryIN^{F/F} mice by breeding homozygous P2X4mCherryIN^{F/F} (Floxed) mice with either mice expressing the Cre recombinase under the cytomegalovirus (CMV-Cre^{+^{wt}}) or the calmodulin kinase 2 (CaMK2-Cre^{+^{wt}}). Homozygous males CaMK2Cre^{+^{WT}}:P2X4mCherryIN^{F/F} (namely CaMK2), CMVCre^{+^{WT}}:P2X4mCherryIN^{F/F} (namely CMV) indicated in the grey frame were used in this study and compared to control Floxed mice P2X4mCherryIN^{F/F} i.e. CaMK2Cre^{WT/WT}:P2X4mCherryIN^{F/F} or CMVCre^{WT/WT}:P2X4mCherryIN^{F/F} (namely Floxed) mice.



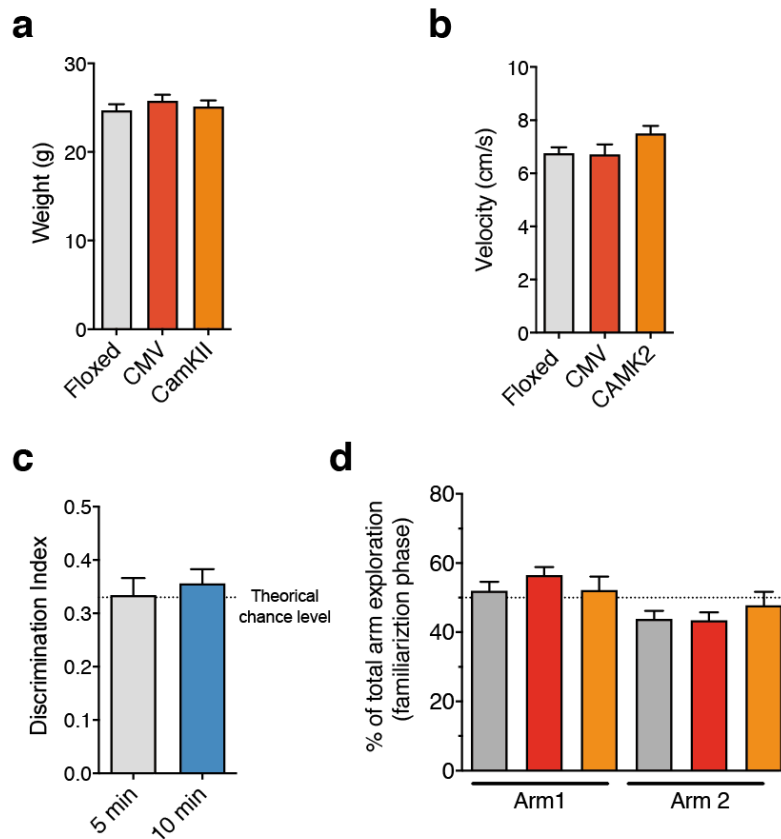
Supplementary Fig. S3. **a,b** Brain sections immunostained with anti-RFP antibodies show a higher P2X4mCherryIN localization in olfactory bulb (OB) and in the cerebellum (Cb) of CMV than in CaMK2 mice. Scale bars, 20 μm. **a** Enlarged images (i and ii) of the glomerular layer of the OB and **b** of the Purkinje layer (i) within the Cb. **c,d** Representative electron microscopy images showing pre-embedding anti-RFP immunostaining. **c** Detection of P2X4mCherryIN in intracellular compartments such as endoplasmic reticulum (ER) and close to mitochondria (m) of hippocampal or cortical cells from CMV-P2X4mCherryIN and CaMK2-P2X4mCherryIN mice. **d** Detection of P2X4mCherryIN in astrocyte end-feet at the vicinity of the plasma membrane apposed to endothelial cell in hippocampus of CMV-P2X4mCherryIN mice. Scale bar is indicated.



Supplementary Fig. S4. **a** Immunostaining of Iba1 and P2X4mCherryIN using Beno-271 from CMV mice imaged with a x20 objective after expansion microscopy technique. **b** Control IHC experiments showing the Iba1 labeling and the absence of staining with Beno-271 and anti-RFP antibodies from P2X4KO mice after LPS injections. **c** Immunodetection of Iba1 and P2X4WT using Beno-271 in Floxed mice. No staining is observed by omitting primary antibodies. Scale Bar, 50 μ m.



Supplementary Fig. S5. a Representative images showing the absence of surface P2X4WT detection with Nodu-246 antibody in MAP-2 positive neurons from Floxed or P2X4KO primary hippocampal cell cultures. **b** Surface P2X4WT is not detected with Nodu-246 in hippocampal astrocytes (GFAP-positive cells) and microglia (Iba1-positive cells) from CaMK2 mice respectively. The nuclear marker DAPI is shown in blue. Scale bars, 10 μ m.



Supplementary Fig. S6. **a** The body weight of each group of adult mice (3-4 months old) was measured just before to start the behavioral experiment and no significant difference was observed between these three mouse lines (one-way ANOVA, $F(2,40)=0.5758$, $P=0.56$; $n = 20$ Floxed, $n = 12$ CMV, $n = 11$ CaMK2). **b** Comparative analysis of average velocity for three groups of mice during the open field experiment shows not significant difference (one-way ANOVA, $F(2, 46) = 2.147$, $p=0.1284$; $n = 24$ Floxed, $n = 12$ CMV, $n = 13$ CaMK2). **c** The profile of exploration time of each open arm during the familiarization phase was similar between these three mouse lines (Arm 1; One way ANOVA, ($F(2, 44) = 0.5868$, $p= 0.5604$; Arm 2; One way ANOVA, $F(2, 44) = 0.5922$, $p= 0.5574$; $n = 9$ for each group). **d** As illustrated in the graph, without familiarization phase, the discrimination index for the arm used as a new arm for 5 min (0.033 ± 0.031) or for 10 min (0.35 ± 0.02) exploration time in the Y-maze, is closed to theoretical chance level (0.33), indicating a similar prevalence for all three arms ($n = 24$ Floxed, $n = 11$ CMV, $n = 12$ CaMK2).

Résumé article II

La protéine mutante SOD1 altère le trafic à la surface des cellules du récepteur P2X4 qui contribue à la physiopathologie de la SLA des souris SOD1-G93A

Eléonore Bertin, Audrey Martinez, Anne Fayoux, Pierre-Olivier Fernagut, Friedrich Koch-Nolte, Sandrine S. Bertrand and Eric Boué-Grabot

La SLA, maladie neurodégénérative sélective des neurones corticaux moteurs et des motoneurones spinaux (MNs), est caractérisée par la formation de protéines mal repliées et d'agrégats protéiques accompagnée par une activation microgliale et une astrogliose. Ces phénomènes entraînent une dégénérescence sélective des MNs conduisant à une paralysie progressive, une atrophie musculaire et le décès des patients dans les 2 à 5 ans qui suivent le diagnostic. L'étiologie de la SLA est complexe avec une majorité des cas d'origine sporadique et 10% d'origine génétique dont 20% liés à des mutations au niveau de la protéine SOD1. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement efficace contre cette maladie dévastatrice et les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la vulnérabilité sélective des neurones moteurs restent encore largement inconnus. Comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette thèse, plusieurs études ont mentionné une altération de la signalisation purinergique et une surexpression des récepteurs-canaux P2X à l'ATP, avec un rôle clé du récepteur P2X4, dans de nombreuses pathologies du SNC. Le récepteur P2X4 est le sous-type de récepteur P2X le plus exprimé dans le SNC, où on le retrouve au niveau des neurones et de la glie. Contrairement aux autres sous-types, il présente la particularité d'être constitutivement internalisé en conditions basales *via* l'interaction de la protéine adaptatrice AP2 avec son motif d'endocytose atypique présent dans sa partie C-terminale. Une augmentation de l'expression *de novo* et/ou de la densité en surface des récepteurs P2X4 a été observée au niveau des neurones et/ou de la microglie dans divers états pathologiques. Dans le contexte de la SLA, une augmentation de l'expression du récepteur P2X4 a été reportée dans les MNs de souris SOD1-G93A juste avant leur dégénérescence. Nous avons de plus déjà mentionné le fait que l'ATP en fonction de sa concentration pouvait avoir des effets antagonistes sur la survie des MNs et qu'une augmentation de la durée de vie des souris SOD1 était induite par l'IVM, un modulateur positif du récepteur P2X4.

Afin de mieux comprendre l'implication du récepteur P2X4 dans la physiopathologie de la SLA, une grande partie de mon travail de thèse a consisté à analyser l'impact de l'ablation ou de l'augmentation en surface du récepteur P2X4 sur la SLA des souris SOD1. Pour cela, nous avons généré deux lignées de souris doubles transgéniques modélisant la SLA et mutées pour le récepteur P2X4. Des souris surexprimant la protéine mutée hSOD1-G93A (SOD1) ont été croisées soit avec des souris n'exprimant pas le récepteur P2X4 (P2X4KO), soit avec le nouveau modèle de souris CMV exprimant un mutant d'internalisation du récepteur P2X4 dans toutes les cellules exprimant nativement le récepteur endogène (appelé ici P2X4KI) précédemment caractérisé. L'étude de ces modifications d'expression de P2X4 a été réalisée grâce à des approches comportementales, immunohistochimiques et biochimiques. Les effets sur le trafic en surface du récepteur P2X4 dans les modèles SOD1 et son mécanisme ont été également examinés *in situ* et *in vitro* par des approches électrophysiologiques, cellulaires et biochimiques. Suite à l'étude montrant que les mauvais repliements de la protéine SOD1 mutante été également détectée par l'anticorps contre la protéine P2X4, l'hypothèse que nous avons testée était qu'une compétition entre la protéine SOD mal repliée et la protéine adaptatrice AP2 pour le site d'internalisation de P2X4 induisait une surexpression à la membrane de ce récepteur.

Mes travaux ont montré de manière intéressante que l'ablation de même que l'augmentation de la densité de récepteurs P2X4 en surface avait un impact positif sur les performances motrices et augmentait significativement la durée de vie des souris SOD1 suggérant un rôle actif, bien que complexe du récepteur P2X4 dans la pathogenèse de la SLA. La détection de l'expression du récepteur P2X4 dans la ME des souris SOD1 à l'aide d'anticorps spécifiques reconnaissant la partie extracellulaire du récepteur natif (P2X4WT) ou la protéine mCherry (P2X4KI), montre de manière intéressante un changement d'expression du récepteur durant la progression de la maladie avec une faible expression restreinte aux MN en phase présymptomatique qui augmente drastiquement au niveau de la microglie au stade symptomatique. Nos résultats montrent également des changements d'expression des marqueurs d'inflammation dans la ME des souris SOD1 au cours de la progression de la maladie. L'étude de l'impact du récepteur P2X4 sur l'expression de ces marqueurs d'inflammation a révélé que l'ablation du récepteur diminuait leur expression durant la progression de la SLA et que l'augmentation du trafic de surface au stade présymptomatique uniquement avait les mêmes effets. De manière opposée, au stade symptomatique l'augmentation du récepteur P2X4 en surface augmente l'expression des marqueurs d'inflammation. Le résultat majeur apporté par cette étude a été d'observer, en

plus de l'augmentation de l'expression *de novo* du récepteur P2X4 dans la microglie activée au niveau de la ME au cours de la SLA, une augmentation significative de la densité de récepteur P2X4 à la surface des macrophages périphériques des souris SOD1, et ce dès le stade présymptomatique. La co-expression du récepteur mP2X4WT et de différentes protéines hSOD1 mutantes *in vitro* dans des ovocytes de Xénope montre une potentialisation de la fonction du récepteur P2X4 en présence de chacune des protéines SOD1 mutantes due à une augmentation de la densité du nombre de récepteur à la surface des ovocytes. Enfin, nos résultats de co-immunoprécipitation et de *pull-down* réalisés à partir de ME et de cortex d'animaux WT et SOD1 à différents stades de la maladie, ont mis en évidence une augmentation croissante de l'interaction entre la protéine SOD1 mutée avec la protéine AP2 au cours de la progression de la maladie chez les souris SOD1, et parallèlement une diminution progressive de l'interaction entre le domaine C-terminal du récepteur et la protéine AP2.

Dans l'ensemble ces travaux mettent en lumière un rôle déterminant du récepteur P2X4 dans la progression de la SLA, faisant du récepteur P2X4 une potentielle cible thérapeutique pour ralentir les symptômes de la SLA, bien que son rôle complexe reste à être élucidé. De manière très intéressante, l'augmentation significative du nombre de récepteurs P2X4 en surface au niveau des macrophages périphériques dès les stades présymptomatiques, place le récepteur P2X4 comme un potentiel marqueur précoce de la SLA. Le mécanisme sous-jacent à ce phénomène confirme l'hypothèse de départ témoignant d'une interférence de la protéine SOD1 mutée avec l'internalisation constitutive du récepteur pouvant ainsi contribuer à la neuroinflammation associée à la SLA et à la mort des MN.

Article II

Manuscript in preparation

Increased surface P2X4 receptors by mutant SOD1 proteins contribute to pathogenesis of ALS in SOD1-G93A mice

Eléonore Bertin^{1,2}, Audrey Martinez^{1,2}, Anne Fayoux^{3,4}, Pierre-Olivier Fernagut^{1,2}, Friedrich Koch-Nolte⁵, Sandrine S. Bertrand^{3,4,#} and Eric Boué-Grabot^{1,2,#,*}

¹ Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

² CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

³ Univ. de Bordeaux, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, UMR5287, F-33000 Bordeaux, France

⁴ CNRS, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, UMR5287, F-33000 Bordeaux, France

⁵ Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg, Germany

#: SSB and EB-G should be considered are co-lead authors

*: Corresponding author: Eric Boué-Grabot (EB-G) Institut des Maladies Neurodégénératives (IMN) CNRS UMR 5293, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France; phone: 33 (0)5 33 51 47 95; email: eric.boue-grabot@u-bordeaux.fr

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal motoneuron (MN) disease characterized by protein misfolding and aggregation leading to cellular degeneration. To date neither biomarker, nor effective treatment have been found. ATP signaling and P2X4 ATP-gated receptor channels are upregulated in various neurological disorders and neurodegenerative diseases such as ALS. To unravel the implication of P2X4 in ALS pathogenesis, we generated double transgenic mice carrying the human SOD1-G93A mutation and either lacking the P2X4 gene (SOD1/P2X4KO) or expressing internalization-defective P2X4mCherryIN knocking gene (SOD1/P2X4KI) that increased the number of surface P2X4. Comparison of ALS-like disease in the different transgenic mice shows that the modulation of surface P2X4 expression have a significant and positive impact on motor performances and animal survival indicating that P2X4 is a key and complex player in murine ALS. We show that P2X4 expression in the spinal cord is initially restricted to MN and increased in microglia during the progression of ALS. Notably, surface P2X4 is also higher at the surface of peritoneal macrophages of SOD1 mice compared to WT mice and thus before the symptoms suggesting that surface P2X4 in peripheral cells may represent an early marker of ALS. In addition, we demonstrate that misfolded SOD1 proteins alters P2X4 endocytosis machinery leading to increased surface P2X4 that may contribute to MN death and/or associated-neuroinflammation to the disease.

Introduction

ALS is the most common form of motor neuron (MN) disease and is characterized by a selective loss of both spinal MNs and neurons from motor cortex causing progressive paralysis, muscular wasting, and death within 3-5 years after diagnosis. The etiology of ALS is unknown, however the disease can be divided in two categories: 90% of ALS cases occur sporadically (SALS) and approximately 10% are inherited or familial (FALS)(Cleveland and Rothstein, 2001). FALS have been shown to be associated with mutations in genes encoding Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) and more recently with TAR-DNA binding protein 43 (TDP-43)(Sreedharan et al., 2008), fused in sarcoma (FUS)(Kwiatkowski et al., 2009) and predominantly C9ORF72 (Renton et al., 2011). The majority of data on ALS has been obtained from transgenic animal models that overexpress human mutant SOD1 proteins, the SOD1 mice (Cleveland and Rothstein, 2001; Grad et al., 2015). SOD1 toxicity did not correlate with mutant SOD1 dismutase activity but on protein conformational changes leading to the aggregation of misfolded proteins (Cleveland and Rothstein, 2001). A pathological hallmark of ALS is the accumulation of proteinaceous inclusions in MNs and surrounding glial cells. Protein inclusions are primarily composed of mutant SOD1 itself in FALS where a SOD1 mutation is identified. In sporadic cases, the presence of misfolded SOD1-containing inclusions as well (Grad and Cashman, 2014; Pokrishevsky et al., 2012) was revealed, although a more agreed observation is that TDP-43 is a primary component of inclusion in SALS (Neumann et al., 2006). ALS is thus considered a protein misfolding disorder, and as such is classified as a proteinopathy accompanied by microglia activation and astrogliosis that accelerate MN cell death and disease progression (Cleveland and Rothstein, 2001; Hooten et al., 2015). Nevertheless, to date neither biomarker, key cellular targets, nor an effective treatment against ALS have been found. Purinergic signaling has been demonstrated to be potentially fruitful on neurodegenerative diseases and recent data suggest that ATP and P2X4 receptors could be attractive novel targets for understanding and fighting ALS disease (Burnstock, 2008, 2016,

2017a; Canas et al., 2009; Carvalho et al., 2019; Cunha, 2008; Erb et al., 2019; Morato et al., 2017; Toth et al., 2019; Volonte et al., 2003; Volonte et al., 2011; Volonte et al., 2016).

ATP is a signaling molecule in the central nervous system (CNS) released by neurons and glial cells. ATP participates in the neuromodulation and neuroglial communication via P2 receptors including ionotropic P2X (Boue-Grabot and Pankratov, 2017; Khakh and North, 2012; Pougnet et al., 2016; Pougnet et al., 2014). Alterations of purinergic signals are associated with major CNS disorders including chronic pain, brain trauma, ischemia, epilepsy, neurodegenerative diseases such as the Alzheimer disease (AD) or ALS associated with neuro-inflammation (Apolloni et al., 2009; Burnstock, 2008; Casanovas et al., 2008; Cavaliere et al., 2003; Franke and Illes, 2006; Volonte et al., 2003; Volonte et al., 2011; Volonte et al., 2016) with a pivotal role for P2X4 receptors the main subtype expressed in neurons and glial cells within the CNS as well as in peripheral macrophages (Abbracchio et al., 2009; Boué-Grabot and Pankratov, 2017; Khakh and North, 2012; Pougnet et al., 2016; Pougnet et al., 2014; Ulmann et al., 2010b). P2X4 is an ATP-gated cation channel highly permeable to calcium inducing a depolarization and large calcium influx into the cell (Egan and Khakh, 2004). In contrast to other P2X, P2X4 is constitutively and highly internalized and as a result, is found mainly in intracellular compartments ensuring low surface expression of these receptors in basal states. Intracellular P2X4 may promote vesicle fusion endosomes or lysosomes (Cao et al., 2015; Huang et al., 2014b) and can be rapidly mobilized and trafficked to the cell surface (Robinson and Murrell-Lagnado, 2013; Toulme et al., 2010). In various pathological states, such as trauma, ischemia, chronic pain and neurodegenerative processes including ALS or AD, *de novo* P2X4 expression and/or increased surface P2X4 density was observed in microglia and/or in neurons (Andries et al., 2007; Beggs et al., 2012; Burnstock, 2008; Casanovas et al., 2008; Cavaliere et al., 2003; Varma et al., 2009; Volonte et al., 2011). The specific increase of P2X4 in the spinal dorsal horn microglia (P2X4R⁺ state) is critical for the pathogenesis of pain hypersensitivity caused by nerve injury (Beggs et al., 2012; Tsuda et al., 2003b; Ulmann et al., 2010b). Using a conditional internalization-defective P2X4mCherryIN

knock-in mice we lately showed that the increase of P2X4 at the surface of excitatory neurons decreases anxiety, impairs memory processing, and alters the synaptic plasticity in the hippocampus (Bertin et al., 2020a). In the context of ALS, P2X4 have been shown to be upregulated in MNs of the mutant SOD1-G93A (SOD1) mice before their death (Casanovas et al., 2008) and to exert a dual effect on MN depending on the ATP concentration. In addition, ivermectin, a positive P2X4 modulator, has been shown to induce a significant life span extension of the mutant SOD1 mice (Andries et al., 2007). Later work then reported that, parallel to neuronal degeneration, misfolded form of the mutant SOD1 protein was also detected by the antibody against the P2X4 protein suggesting a more composite route for neurodegeneration behind P2X4 activation (Hernandez et al., 2010).

Here we report that P2X4 in the spinal cord is instrumental for ALS progression and survival in SOD1 mice using innovative double transgenic SOD1-G93A (SOD1) mice lacking P2X4 gene (P2X4KO) or expressing noninternalized P2X4mcherryIN mice (CMV-Cre P2X4mCherryIN mice namely P2X4KI)(Bertin et al., 2020a). We show that P2X4 expression, restricted to MNs of WT or SOD1 mice at presymptomatic stages, increases in microglia within the spinal cord as well as in peripheral macrophages of SOD1 mice during ALS progression. Finally, we demonstrate that misfolded mutant SOD1 proteins interfere with P2X4 internalization by competing for AP2 interaction leading to the increase of surface P2X4 density that may contribute to the neuroinflammation-associated to the ALS and to MN death.

Results

P2X4 is instrumental for ALS pathogenesis of SOD1 mice

To determine whether P2X4 contribute to ALS onset and progression, we generated SOD1 transgenic mice expressing modulated surface levels of P2X4 by breeding SOD1^{G93A}-B6SJL (namely SOD1) with C57Bl6 P2X4KO^{-/-} (namely P2X4KO) and P2X4mCherryIN^{Exc/Exc} (namely P2X4KI) mice. Only homozygous mice for P2X4KO or P2X4KI were used. We also crossed SOD1-G93A-B6SJL with wild-type C57Bl6 to obtain SOD1 mice with a genetic background similar to double mutant mice (Figure 1 and Supplemental Figure 1).

In a first step, the occurrence of motor symptoms was monitored and compared in the different mouse lines created. In the SOD1-G93A mouse model, motor weakness is first detectable in the hind limbs. As adult mice swim exclusively with their hind legs (Adencreutz and Hau, 2004), swimming appears as a discriminatory test to evaluate the locomotor performances of the different mouse models. We therefore tested the time spent by mice to swim from one side of a corridor to a platform. In both SOD1:WT and SOD1:P2X4KO mice, we observed a progressive increase in the time to reach the platform with age with values reaching a significant difference from the baseline in 110 day-old mice (P110) animals (Figure 1A1). This time was however significantly higher in SOD1 compared to SOD1:P2X4KO mice (Figure 1A1). In P120 animals, the time to reach the platform appeared similar for both lines but we found that only 33% of the SOD1 cohort were able to swim at that stage instead of 66% of age-matched SOD1:P2X4KO mice (Figure 1A2). While the ablation of the P2X4 gene leads to a reduced body weight in SOD1:P2X4KO mice compared to controls (Figure 1B), the weight loss observed during the disease progression was similar between SOD1 and SOD1:P2X4KO mice (Figure 1B). To further evaluate the progression of the disease, we developed a motor scoring based on Fernagut and collaborators (Fernagut et al., 2002) to assess disease onset, progression and end point for the different mouse lines. The motor score of SOD1 and SOD1:P2X4KO mice were similar (Figure 1C) however, we observed that the P2X4KO

genotype significantly extends survival in mice as shown by the survival curves presented in Figure 1D.

Surprisingly, increased surface P2X4 density in SOD1:P2X4KI mice recapitulated the data obtained with SOD1:P2X4KO animals. The time to reach the platform appeared significantly higher for SOD1 compared to SOD1:P2X4KI mice at P110 (Figure 1E1) and a strong discrepancy in the number of mice still able to swim at P120 was observed between the two cohorts (Figure 1E2). Both body weight loss (Figure 1F) and motor score (Figure 1G) were similar in the two tested mouse strains. However, as described for SOD1:P2X4KO mice, SOD1:P2X4KI mice exhibited an increased survival time compared to SOD1 animals (Figure 1H).

P2X4 expression switch from motoneurons to microglia within the spinal cord of SOD1 mice and parallels changes in astrocytic and microglial markers

Since anti-P2X4 antibodies directed against the C-tail of P2X4 subunits (Alomone labs) were showed to recognize also misfolded SOD1 proteins (Hernandez et al., 2010), we re-examined P2X4 localization in the spinal cord of WT and SOD1 mice using a rat monoclonal antibody Nodu-246 and a nanobody Beno-271 both recognizing specifically the extracellular domain of mouse P2X4 in its native conformation (Bertin et al., 2020a; Hua J, In press). P2X4 was also detected using anti-RFP antibodies directed against the red fluorescent protein mCherry fused to P2X4 in spinal cords of P2X4KI and SOD1:P2X4KI mice (Figure 2). Double immunostaining using Nodu-246, Beno-271 or anti-RFP antibodies with neuronal (NeuN) marker, showed that P2X4 expression is faint and restricted to large neuronal cell body in the ventral horn of WT or P2X4KI mice in agreement with using tdTomato *p2xr4* reporter mice expressing d-Tomato under the control of P2X4 promoter (Figure 2. A,B and (Xu et al., 2016)). Neuronal P2X4 expression was also observed in SOD1 or SOD1:P2X4KI mice at P75 before the onset of ALS symptoms (Figure 2A,B). At later stage (P100) where MNs were dying, P2X4 staining increases in small cellular processes within the grey matter and fibers in the white matter of

the spinal cord of SOD1 or SOD1:P2X4KI mice and parallels changes in astrocytic (GFAP) and microglial (Iba-1) markers (Figure 2B,C and Supplemental Figure 2). P2X4 staining is localized in Iba1-positive and GFAP-negative cells suggesting that P2X4 expression increases mainly in microglia during the symptomatic phase of both SOD1 and SOD1:P2X4KI mice (Figure 2).

Our results indicated also that GFAP and Iba1 staining changed during the progression of ALS symptoms in SOD1, SOD1:P2X4KI or SOD1:P2X4KO mice. GFAP-positive astrocytes mainly localized in the white matter of the SC of WT mice (Fig 2.C and Supplementary Figure 2) increased drastically in the grey matter of the SC at P100 of SOD1 mice. Similarly, Iba1-positive microglia increased over the time of the progression of the disease and invaded the grey matter of SOD1 mice (Figure 2B) consistent with the gliosis accompanying ALS progression (Bataveljic et al., 2011; Corcia et al., 2012; Lewis et al., 2014; Liu and Wang, 2017; Philips and Robberecht, 2011; Thompson and Turner, 2019; Turner et al., 2004; Vargas and Johnson, 2010; Weydt and Moller, 2005; Zurcher et al., 2015). Microglia changes seem to be more pronounced in SOD1:P2X4KI or P2X4:P2X4KO than in SOD1 mice. Our results showing the expression of GFAP or Iba1 markers from P2X4KO and KI suggest also that P2X4 expression may contribute to the astrogliosis observed during ALS progression. We thus performed western blot experiments to measure changes in Iba1 and GFAP markers from SC protein extracts of the different transgenic mice at different stages (Figure 3). Protein level of GFAP and Iba1 measured from by western blots increase over the time course of the ALS disease in SOD1 mice expressing P2X4WT (Figure 3. A,B) confirming the changes observed by immunohistofluorescence and previously described (Alexianu et al., 2001; Hall et al., 1998; Komine and Yamanaka, 2015). To determine the impact of either the absence of P2X4 or the increase of surface P2X4 on astro- or micro-gliosis within the spinal cord we determined by western blot the changes of GFAP and Iba1 signals in SOD1 compared to WT, SOD1:P2X4KO compared to P2X4KO and SOD1:P2X4KI compared to P2X4KI at four different time points. These experiments are still ongoing but results showed that the increase of GFAP over the

progression of the disease in SOD1 is higher in P2X4KI mice during the symptomatic phase and show a tendency toward an inhibition of GFAP increase at the presymptomatic phase. In contrast, results with P2X4KO mice suggested that absence of P2X4 alters increase of GFAP of SOD1 mice over the time. For Iba1, results are still unclear and should be pursued. However, the absence or increase of P2X4 do not seem to alter Iba1 increase observed in SOD1 mice.

P2X4 expression initially restricted to MNs in the ventral horn of the SC increased in microglia during the symptomatic phase. Interestingly, the increased P2X4 surface expression seems to reduce the astrogliosis at early stage (up to P75) but accelerates the astrogliosis after suggesting a duality of P2X4 functions on ALS progression.

Surface P2X4 density is higher in macrophages of SOD1 compared to WT mice

P2X4 is highly expressed in macrophages (Layhadi and Fountain, 2017; Ulmann et al., 2010b). We lately showed by biotinylation assays and western blot that the surface/total P2X4 ratio was significantly higher in peritoneal macrophages isolated from P2X4KI than in WT mice demonstrating that surface P2X4 density is significantly increased in non-internalized P2X4KI knock-In mice (Bertin et al., 2020a) (Figure 4. A, B; *** $p < 0.001$).

Importantly, P2X4 surface/total ratio measured from peritoneal macrophages isolated from WT and SOD1 mice at all stages is significantly higher in SOD1 mice compared to WT mice independently of the age of the mice (Figure 4. B). As shown in Figure 4. C,D, macrophages isolated from WT and SOD1 mice aged from P40, P75 and P100 showed that surface P2X4 density is significantly higher in macrophages of SOD1 mice compared to WT mice at both presymptomatic (P75) and symptomatic ages (P100) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). The high P2X4 surface density measured for P2X4KI mice is not significantly modified (Figure 4B) in SOD1:P2X4KI mice and thus, at all stages (P40, P75, P100). The increase of the number of P2X4 at the surface of peripheral macrophages of SOD1 mice at early stages, before the onset of the symptoms, revealed that P2X4 mediated signaling initiated in microglia and macrophages may contribute to neuroinflammation and ALS pathogenesis. In addition, since

P2X4 is expressed in human macrophages and monocytes (Layhadi and Fountain, 2017) these results suggest that P2X4 may represent an early marker of ALS.

P2X4 are highly and constitutively internalized by a clathrin-dependent endocytosis that involves an interaction between the endocytic adaptor protein-2 (AP2) and a non-classical binding motif (YxxGL) present exclusively in the C-tail of the P2X4 subunit (Bobanovic et al., 2002; Royle et al., 2002; Royle et al., 2005). Since misfolded mutant SOD1-G93A proteins looks like the C-tail of P2X4 (Hernandez et al., 2010), our working hypothesis was that mutated SOD1 proteins may interfere with constitutive internalization of P2X4 protein leading to the increase of surface P2X4.

We first investigated the potential impact of human SOD1-G93A protein on P2X4 function using voltage-clamp recordings of ATP-evoked currents from *Xenopus* oocytes co-expressing mP2X4 and either wild-type human SOD1 (hSOD1-WT) or mutant human SOD1-G93A (hSOD1-G93A) protein. Our results showed that P2X4 current amplitude evoked by 100 μ M of ATP are significantly higher in cells expressing hSOD1-G93A compared to oocytes co-expressing hSOD1-WT. Several quantities of cDNA to reach similar level of total expression of P2X4 WT and each hSOD1 constructs were tested (Supplementary Figure S3. A) and verified after recordings by western blotting using anti-SOD1 antibodies (Figure 5B). Determination of the surface/total ratio of P2X4 from biotinylated oocytes by western blot using anti-P2X4 revealed a significant increase of surface P2X4 in presence of hSOD1-G93A compared to hSOD1-WT (Figure 5. D,E) indicating that SOD1-G93A alters P2X4 surface trafficking. P2X4 current recordings were reproduced in presence of distinct mutants of human SOD1 involved in ALS such as G85R and G37R and results showed a significant increase of ATP currents (Figure 5A,C) indicating that misfolded SOD1 proteins alter P2X4 trafficking leading to the increase of the number of surface P2X4 and consequently to the increased P2X4 function.

Mutant SOD1 proteins alter P2X4 internalization leading to increased number and function

We next sought to determine whether SOD1-G93A proteins interact directly with AP2 acting as a negative competitor for the interaction between AP2 and P2X4 responsible for P2X4 internalization. We thus performed immunoprecipitation (IP) experiments from spinal cord protein extracts from WT or SOD1 mice at different time points of the ALS disease (P40, P75, P100 and P120) using anti-AP2 antibodies (Figure 6. A,B). Western blot analysis using anti-SOD1 antibodies revealed after IP a band corresponding to hSOD1G93A indicating that SOD1-G93A co-immunoprecipitated with AP2 proteins. In addition, the signals of hSOD1-G93A immunoprecipitated increases significantly ($p < 0.05$, one-way ANOVA) over the time suggesting that the interaction between SOD1-G93A and AP2 increased during ALS pathogenesis (Figure 6). To ascertain the specificity of the interaction between mutant hSOD1-G93A and AP2 these experiments were reproduced with higher quantities of total proteins from spinal cords of WT than SOD1 mice to reach similar amount of endogenous mouse SOD1WT and hSOD1-G93A used for the IP (Figure 6C,D). In such conditions, solely SOD1-G93A co-immunoprecipitated significantly with AP2 while negligible signal was obtained for SOD1WT (Figure 6. C,D).

Conversely, to determine whether interaction between SOD1-G93A and AP2 compete with the interaction between P2X4 and AP2, we conducted pull-down assay from spinal cord protein extracts from SOD1-G93A mice at different time points of the ALS disease (P10, P40, P100) using as a bait an immobilized peptide corresponding to the C-terminal domain of mP2X4 (CT-X4)(Jo et al., 2011). A control peptide (CT-3A) in which the internalization motif ($Y^{378}xxGL$) was substituted by alanines (AxxAA) was used as negative control (Supplemental Figure 3. B). Western blot using anti-AP2 antibodies showed that the C-terminal domain of P2X4 subunit interacts specifically with AP2 proteins while no interaction was detected with CT-3A peptide as bait (Figure 6.E-F and Supplemental Figure 3.B). Interestingly, quantification of AP2 signals after pull-down compared to input showed that the interaction between P2X4 and AP2

decreases only in SOD1 over the time. These experiments will be repeated at different time points to demonstrate that increased interaction between misfolded SOD1 proteins and AP2 parallels the decrease of the interaction between AP2 and P2X4 leading to the surface increase of P2X4 observed *in vitro* as well as in spinal cord microglia and macrophages.

Discussion

The etiology of ALS is complex and remains poorly understood. To date, neither biomarker, nor effective treatment have been found against this devastating disease. Several studies have highlighted a potential involvement of P2X4 in ALS but its role remains elusive (Andries et al., 2007; Casanovas et al., 2008; D'Ambrosi et al., 2009; Hernandez et al., 2010). In the present study, we showed using innovating double transgenic mice that both the ablation of the P2X4 gene and expression of non-internalized P2X4 partly alleviate the degradation of motor performances in SOD1 mutant mice and significantly increase animal survival. Previous work reported that P2X4 activation exert a dual role on MNs depending on ATP concentration. Indeed, Andries and collaborators demonstrated that preincubation of MNs with low ATP concentrations in combination with ivermectin, a specific positive allosteric modulator of P2X4, protects cells from kainate induced excitotoxicity. In addition, ivermectin administration started at presymptomatic stage slightly extends (from 10%) the lifespan of mice (Andries et al., 2007). In contrast, high ATP concentrations have deleterious effect on MNs (Andries et al., 2007). The authors proposed that ivermectin potentiates the protective effect of low ATP concentrations probably through an increase in P2X4 function and/or number in surface (Silberberg et al., 2007; Toulme et al., 2006). This duality of P2X4 action linked to the ATP concentration *in vitro* could be transposed *in vivo*. Indeed, when the pathology begins low ATP concentration is present at presymptomatic stage, but as the disease progresses, ATP is massively released by dying cells and acts as a danger signal at symptomatic stage (Rodrigues et al., 2015). Similarly, a dual role of P2X7, that is mainly microglial, has also been reported in SOD1 models (Apolloni et al., 2013a; Apolloni et al., 2014). Indeed, constitutive

ablation of P2X7 in SOD1 mice is deleterious (Apolloni et al., 2013a) whereas P2X7 antagonist administration only at symptomatic stage (P100) is beneficial (Apolloni et al., 2014). These results support the existence of a time window during which a beneficial action of P2X4 activation in ALS is observed. The change in both ATP concentration and P2X4 expression over the progression of the disease could partly explain why either P2X4 ablation or increased surface P2X4 density mitigate ALS progression in the present study. The ATP concentration and time window dependent antagonist actions of P2X4 previously reported (Andries et al., 2007; Apolloni et al., 2013a; Apolloni et al., 2014) could correspond to a microglia transition from the protective M2 phenotype to the deleterious M1 one observed in ALS (Appel et al., 2011; Beers et al., 2011; Liao et al., 2012). Indeed, our Immunohistochemistry results show that the expression of P2X4 increases in microglia with the disease progression. The switch of P2X4 expression from neurons to microglia observed during the disease may also contribute to the beneficial and detrimental effect of P2X4 on ALS symptoms. Substitution of P2X4^{WT} by non-internalized P2X4 receptors is constitutive in P2X4^{KI} mice leading to an increased surface P2X4 number in all cells natively expressing P2X4 in P2X4^{KI} as well as in SOD1:P2X4^{KI} mice. Upregulation of surface P2X4 in SOD1:P2X4^{KI} mice may have beneficial effect in the early stages of ALS as described for the potentiation of P2X4 function by ivermectin (Andries et al., 2007). We cannot rule out that developmental compensations in SOD1:P2X4^{KI} mice could have also occurred to offset deleterious effects of precocious ubiquitous P2X4 surface upregulation.

The polyclonal P2X4 antibodies used previously to detect P2X4 expression in the spinal cord of SOD1 mice (20), was directed against the intracellular C-terminal domain of P2X4 subunit. The authors showed later that this anti-P2X4 antibody was also recognizing the misfolded SOD1 mutant protein (Hernandez et al., 2010) as it resembles to the C-tail of P2X4. However, this intriguing result stressed the fact that the previously observed increase in expression of P2X4 may not be specific and may only reflect an increase in misfolded SOD1 proteins rather than an increase in P2X4 expression. We thus reexamined P2X4 expression in SOD1 mouse

spinal cord in parallel to P2X4mCherryIN expression in SOD1:P2X4KI mice using several novel specific monoclonal antibodies or nanobodies directed against extracellular domain of native mP2X4 (2refs hua et Toi) or against the mCherry protein. Immunostaining confirmed the low expression of P2X4 in spinal MNs of control P2X4WT and P2X4KI mice observed using the d-tomato p2rx4 reporter mice. It is important to note that conditions leading to *de novo* expression of P2X4WT lead to *de novo* expression of non-internalized P2X4 in P2X4KI mice since P2X4mCherryIN is a modification of endogenous p2rx4 gene remaining under the control of the native P2X4 gene promoter (Bertin et al., 2020a). Our results using specific antibodies recognizing the extracellular part of native P2X4 or the mCherry protein, revealed that P2X4 expression initially restricted to MNs (P75) in SO1, SOD1:KI as in control mice increased during the symptomatic phase of ALS (P100) but only in microglia within the spinal cord likely due to a *de novo* expression of P2X4 in activated microglia as described in several pathological conditions (Beggs et al., 2012; Ulmann et al., 2008; Xu et al., 2016). This apparent switch of P2X4 expression from neuron to microglia over the time likely due to the loss of MN rather than to a decrease in P2X4 expression in neurons. To go further in the understanding of the P2X4 physiopathological cell-specific function and dynamic, conditional cell-specific P2X4KI Cre inducible mouse lines expressing P2X4mCherryIN specifically in myeloid cells (macrophages and microglia), in neurons or MNs could be used. Thanks to Cre-promoter specific mice expressing the Cre recombinase under the control of either CD11b, synapsin or ChAT promoters, respectively, along with floxed P2X4KI mice. The use of inducible Cre mice could be also useful to define the specific period of beneficial versus deleterious of action of upregulated P2X4 during ALS pathogenesis.

Our spinal cord immunolabeling experiment among the different mouse lines at presymptomatic and symptomatic stages also reveal changes in astrocytic and microglial markers during the progression of the disease. GFAP-positive astrocytes increase drastically in the grey matter of SOD1, SOD1:P2X4KI and SOD1:P2X4KO mice at symptomatic stage (P100) as well as Iba1-positive microglia that invaded the ventral horn of all SOD1 mice at

P100 (Alexianu et al., 2001; Hall et al., 1998; Komine and Yamanaka, 2015). Preliminary results of western blot analysis of astrocytic marker from the different mouse lines at different ages show that GFAP expression increases over the time in SOD1 mice in agreement with previous work (Alexianu et al., 2001; Hall et al., 1998; Komine and Yamanaka, 2015). In addition, while GFAP expression is higher in SOD1:P2X4KI mice compared to SOD1 mice at P100, its expression seems to decrease in SOD1:P2X4KI mice compared to SOD1 mice at presymptomatic stages (P40-P75). The ablation of P2X4 in SOD1:P2X4KO mice alters the GFAP increase expression reported in SOD1 mice over the progression of the disease. Our results tend to a beneficial role of P2X4 when deleted and when upregulated at presymptomatic stage that become deleterious in the symptomatic phase in adequacy with the beneficial versus deleterious role of microglia in ALS (Geloso et al., 2017) and the dual role of P2X4 among ATP concentrations previously reported. Results concerning Iba1 expression are still unclear because of the lower number of samples and antibody detection that has to be improved by western blot. A distinct approach such as qPCR will be use to quantify changes in Iba1 and several markers of inflammation.

P2X4 is highly expressed in macrophages (Csoka et al., 2018; Layhadi and Fountain, 2017; Layhadi et al., 2018; Suurvali et al., 2017) that have recently been shown to be implicated in ALS pathogenesis (Graber et al., 2010; Liu et al., 2012; Mammana et al., 2018; Van Dyke et al., 2016) as well as peripheral monocytes (Butovsky et al., 2012; Zondler et al., 2016). To determine whether changes in P2X4 surface expression occur in SOD1 mice over the disease progression compare to WT mice, we measured surface/total P2X4 expression ratio by biotinylation assays and western blotting from peritoneal macrophages. The major finding of this study is that, besides *de novo* P2X4 expression increase in SOD1 mouse spinal cord over the progression of the disease, P2X4 surface density is significantly upregulated in SOD1 macrophages at pre-symptomatic stage (P75) as well as during the progression of the ALS. *De novo* expression of P2X4 observed in ALS is in agreement with P2X4 upregulation reported in several diseases (Beggs et al., 2012; Burnstock, 2008; Casanovas et al., 2008; Cavaliere

et al., 2003; Ulmann et al., 2010b; Varma et al., 2009). The significant increase of surface/total P2X4 ratio measured in SOD1 macrophages compared to wild-type mice was in agreement with our working hypothesis based on the fact that misfolded SOD1 protein resembling to the C-terminal domain of P2X4 receptors may alter the constitutive internalization of P2X4 leading to increased surface P2X4 density.

Moreover, we observed a potentiation of ATP-induced P2X4 currents as well as an increase in P2X4 surface/total ratio in cells heterologously co-expressing mP2X4 receptors and different ALS human mutant SOD1 proteins (SOD1-G93A, G85R and G37R) compared to cells expressing wild-type human SOD1 indicating that the presence of mutant SOD1 proteins causes P2X4 surface upregulation as observed in SOD1 mice. As previously stated the C-terminal domain of P2X4 subunit contains the motif responsible for its constitutive internalization mediated by AP2 interaction and clathrin dependent mechanism (Royle et al., 2005), we hypothesized that misfolded mutant SOD1 protein in ALS resembling to the C-tail of P2X4 may interfere with AP2-P2X4 interaction altering P2X4 constitutive endocytosis and consequently leading to P2X4 surface upregulation. Co-immunoprecipitation revealed that misfolded SOD1 proteins interacts specifically with AP2. Importantly, this interaction increases over the time of ALS progression in the spinal cord of SOD1 mice. Conversely, pull-down assay using as bait the C-terminal domain of P2X4 confirms that AP2 interacts with the C-terminal tail of P2X4 (Qureshi et al., 2007; Royle et al., 2005) but shows also that the interaction between AP2 and P2X4 C-tail decreases over the time in SOD1 mice confirming that misfolded SOD1 proteins are linked to the upregulation of surface P2X4 by alteration of its internalization.

This work has provided a better comprehension of P2X4 implication and trafficking dynamic during the pathogenesis of ALS in SOD1 models. It appears that P2X4 receptors, initially restricted to MNs increase in microglia during ALS progression and play a key role, although complex in ALS pathogenesis, which remains to be elucidated. Very interestingly, the early upregulation of surface P2X4 observed in peripheral macrophages of SOD1 mice may represent a unique biomarker to detect ALS before the symptom occurrence from human

peripheral cells. Moreover, we demonstrated that misfolded SOD1 proteins alters P2X4 endocytosis machinery leading to increased surface P2X4 that may contribute to MN death and/or associated-neuroinflammation to the disease (Figure 7).

Methods

Mice

To generate both double transgenic mice from SOD1^{G93A} mutant mice (background B6SJL) and either P2X4KO^{-/-} mice (SOD1:P2X4KO) or P2X4mCherryIN^{Exc/Exc} (C57BL/6J background) (SOD1:P2X4KI) as some heterozygous females from F1 generation being sterile, we designed a different strategy of breeding for SOD1:P2X4KI and SOD1:P2X4KO. P2X4KO^{-/-} female mice were bred with male SOD1^{G93A} mutant mice. The SOD1:P2X4KO^{-/+} offspring of the F1 generation were then bred with P2X4KO^{-/-} mice to generate SOD1:P2X4KO^{-/-} double mutant mice (F2 generation). P2X4mCherryIN^{Exc/Exc} female were bred with male SOD1^{G93A} mutant mice. Male SOD1^{+/exc} littermates from the F1 generation were then bred with P2X4mCherryIN^{Exc/Exc} females. Subsequent interbreeding of male F2 SOD1^{G93A} with P2X4mCherryIN^{Exc/Exc} females resulted in F3 littermates composed of only SOD1:P2X4KI^{Exc/Exc} (SOD1:P2X4KI) and WT:P2X4^{Exc/Exc} (P2X4KI) mice. SOD1 mice consisting of male F2 SOD1 or male F3 SOD1 mutant mice obtained from male SOD1 and females WT were used for comparison to SOD1:P2X4KO animals from F2 generation while SOD1:P2X4KI mice were compared to SOD1 mice both obtained in F3, respectively (Supplemental Figure 1).

Study approval

All experimental procedures complied with official European guidelines for the care and use of laboratory animals (Directive 2010/63/UE) and were approved by the ethical committee of Bordeaux. For SOD1 or double transgenic mice, clinical end stage was defined as the inability for the animal to right itself over a period of 20 s. For ethical reasons, animals are sacrificed at that point. Mice used in this study were between 5- and 15-weeks old males.

Swimming test

Mice were placed in a 100 cm long, 6 cm wide swimming corridor filled with warm water (37°C). The time to reach a platform placed at one extremity of the corridor was measured. Since physical activities can modify ALS progression, swimming test was conducted only every 10 days to avoid physical training.

Motor scoring

To follow motor impairment all along ALS progression in mice, a motor scale was established based on Fernagut et al. (Fernagut et al., 2002). More precisely, five parameters were observed and rate on a scale of 0-3: 1) the general motor activity (exploration, rearing and grooming), 2) the postural adjustments of hind limbs while mice were suspended by the tail to monitor clasping (hind limbs retracted and touching the abdomen), 3) the increase in hind limb space (hind limb dystonia) associated with postural deficiency, 4) the presence of kyphosis, a characteristic curvature of the spine causes by the loss of dorsal muscular tone and 5) a postural challenge: the capacity of the mouse to resist to be tipped on the side and to get back on its feet.

Immunohistofluorescence on mice spinal cord

Mice were perfused intracardially with 0,9% NaCl and fixed with 2% PFA in 0.2 M phosphate buffer. Spinal cords were dissected, post-fixed 2-4 hours in 2% PFA in 0.2 M phosphate buffer, washed and then transferred into 20% v/v glucose in PBS for 1 day. Mice spinal cord were then coated in cryogel and frozen in isopentane cooled to -70°C. Spinal cord floating cryosections (50 µm) were incubated in a blocking solution containing PBS, 0.05% Tween, 5% normal goat serum (NGS) for 45 min and then incubated with primary antibodies diluted in PBS 1% NGS overnight at RT. Sections were then washed with PBS and primary antibodies revealed by incubation of brain slices in respective Alexa Fluor conjugated secondary antibodies for 1.5 h at RT. Sections were then washed with PBS and mounted in mounting medium containing DAPI. Images were taken using 49 Zeiss Imager M2 fluorescence

microscope, Hamamatsu digital camera and Explora Nova MorphoStrider software with identical camera settings. Contrast and luminosity were adjusted using Image J software.

***Xenopus laevis* oocytes electrophysiology**

Oocytes were surgically removed from anesthetized *Xenopus laevis* and isolated as previously described (Jo et al., 2011; Toulme et al., 2006). After nuclear co-injection of cDNAs encoding mouse P2X4WT and wildtype (WT) or mutated human SOD1 (G93A, G85R or G37R), oocytes were incubated in Barth's solution containing 1.8 mM CaCl₂ and gentamycin (10 mg/ml) at 19°C for 1-3 days before electrophysiological recordings and/or biochemistry experiments.

Two-electrode voltage-clamp recordings were performed as previously described (Bertin et al., 2020b; Pougnet et al., 2016). Briefly, recordings were carried out at RT using glass pipettes (1–2 MΩ) filled with 3 M KCl solution to ensure reliable holding potentials. Oocytes were voltage clamped at -60 mV, and membrane currents were recorded with an OC-725B amplifier (Warner Instruments) and digitized at 1 kHz on a Power PC Macintosh G4 using Axograph X. Oocytes were perfused at a flow rate of 10-12 ml/min with Ringer solution, pH 7.4 containing in mM: 115 NaCl, 3 NaOH, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, and 10 HEPES. 100 μM of ATP was applied using a computer driven valve system (Ala Scientific).

Isolation of mouse peritoneal macrophages

Mice were deeply anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) and peritoneal cells were collected by washing the peritoneal cavity with 2 ml of phosphate buffer saline (PBS) as described (Ray and Dittel, 2010). The suspension of peritoneal cells was centrifuged for 8 min at 2000 rpm at 4°C and then immediately used either for biotinylation experiments.

Biotinylation assays

Surface biotinylation experiments were performed as described previously (Bertin et al., 2020b; Pougnet et al., 2014; Toulme et al., 2006) from injected *Xenopus* oocytes, mouse peritoneal macrophages and HEK 293 cells. Briefly, cells were incubated in an ice-cold Ringer (for oocytes) or PBS with calcium and magnesium containing 1 mg/ml sulfo-NHS-SS-biotin and incubated at 4°C for 4 h (or overnight) under gentle agitation. Excess sulfo-NHS-SS-biotin was removed by washes with buffer and quenched by washes with ice-cold quenching buffer containing 100 mM of glycine.

Co-IP and pull-down

For co-immunoprecipitation experiments, spinal cord proteins extracts (0.5 to 2 mg of proteins) were incubated (overnight at 4°C) in the presence or absence of primary anti-AP2 antibodies covalently immobilized to Antibody coupling resin (Co-IP kit, Pierce). Beads were washed four times and eluted with low pH buffer or SDS sample buffer and subjected to SDS-PAGE. Western blots were performed as described below with primary antibodies against SOD1 proteins.

For pull-down assay, biotinylated peptides were synthesized by GenScript (NJ). Peptide CT-X4 corresponds to the C-terminal sequence of the mouse wild type P2X4 subunit. As control peptides we used a mutated (CT-3A) peptide. In peptide 3A, AP2 binding domain residues YXXGL were replaced by three alanines. 100 µg of biotinylated peptides (10 µg/µL) are fixed on streptavidine resin during 3h at 4°C. After several washes in TBS 1X, binding 500 µg of total protein extract is performed overnight at 4°C. Resin were washed with TBS before elution with 40 µL of Laemili 2X with 12% of Betamercaptoethanol per sample. Half of elution is used for western blotting. Pull down assay is compared with 20 µg of total protein extract.

Immunoblotting

Biotinylated cells or spinal cord tissues were lysed by sonication in homogenization buffer (10 mM HEPES, 0.3 M sucrose, pH 7.4) containing protease inhibitors. Then proteins were

solubilized with 1% Triton X-100 under agitation at 4°C for 2 h. After centrifugation at 10,000 g for 15 min, the supernatant containing the total proteins were quantified using the BCA method. For biotinylation experiments, a fraction of the supernatant was kept to assess total receptor fraction (Vt). The remaining supernatant (Vs) was incubated overnight at 4°C with Immunopure Immobilized Neutravidin to precipitate surface proteins. Beads (20 µl) were washed with homogenization buffer and eluted with one volume of SDS sample buffer. Total and surface proteins were separated on SDS-PAGE and revealed using either anti-P2X4 (1:1000), anti-RFP antibodies (1:1000), anti-actin (1:10,000), anti-SOD1 (1:1000), anti-GFAP (1:10000) or anti-Iba1 (1:2000) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1:5000). Western blots quantification was performed using Image J software. The surface/total ratio from each experiments was determined using the following equation:

$$\frac{\text{Signal } s \times \frac{V_t+V_s}{V_s}}{\text{Signal } S \times \frac{V_t+V_s}{V_s} + \text{Signal } T \times \frac{V_t+V_s}{V_t}}$$

Statistics

The number of independent experiments or animals (n), the statistical test used for comparison and the statistical significance (p values) are specified for each Figure panel in the corresponding Figure legend. P values of less than or equal to 0.05 were considered significant. Data are presented as mean ± s.e.m. Data were analyzed and graphs were generated using GraphPad Prism.

Key resource list

	Reagent or resource	Source	Identifier
Primary Antibodies	Nodu-A246 rat monoclonal against native extracellular domain of mouse P2X4 antibody	Bertin et al. 2020a and Hua et al. in press	N/A
	Beno-271 Camelid nanobody against native extracellular domain of mouse P2X4 fused	Bertin et al. 2020a and Hua et al. in press	N/A
	Rabbit anti-P2X4	Alomone	Cat#APR-002
	Rabbit anti-RFP	MBL	Cat#PM005
	Chicken anti-GFAP	Abcam	Cat#ab4674
	Rabbit anti-Iba1	Wako	Cat#19-197441
	Mouse anti-NeuN	Merk	Cat#MAB377
	Mouse anti-actin	Sigma Aldrich	Cat#A5441
	Goat anti-SOD1	R&D Systems	Cat#AF3787
Fluorescent secondary antibodies	Anti-rat AlexaFluor568™	Life technologies	Cat#A-11077
	Anti-rabbit AlexaFluor568™	Life technologies	Cat#A11011/ Cat#A10042
	Anti-mouse AlexaFluor488™	Life technologies	Cat#A11001
	Anti-chicken AlexaFluor488™	Life technologies	Cat#A11001
	Anti-rabbit AlexaFluor488™	Life technologies	Cat#A32731
HRP-conjugated secondary antibodies	Anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibodies	Jackson Immunoresearch	Cat#111035144
	Anti-mouse HRP-conjugated secondary antibodies	Jackson Immunoresearch	Cat#115035062
	Anti-goat HRP-conjugated secondary antibodies	Santa Cruz	Cat#SC2020
	Anti-chicken HRP-conjugated secondary antibodies	Jackson Immunoresearch	Cat#703-035-155
Chemicals	Formalin solution neutral buffered 10%, 4% PFA	Sigma-Aldrich	Cat#HT501128
	EZ-LINK SULFO-NHS-SS-BIOTIN	Fisher	Cat#11811205
	HIGH CAP NEUTRAVIDIN AGA RESIN	Fisher	Cat#10742135
	X10 PAGERULER PLUS PRES PROT LAD	Fisher	Cat#11852124

	Clarity ECL substrate	Biorad	Cat#1705061
	Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Fisher	Cat#23225
	Vectashield with DAPI	Vectors Laboratories	H-1200
	Dynabeads™ Antibody Coupling kit	Invitrogen (ThermoFisher Scientific)	Cat#14321D
	Kit Pierce™ Pull-Down Biotinylated Protein:Protein Interaction	Pierce	Cat#2115
Organisms	Floxed knockin P2X4mCherryIN mice	Bertin et al. 2020a	N/A
	CMVCre+-P2X4mCherryIN mice	Bertin et al. 2020a	N/A
	B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J	Jackson Laboratory	Jax #006054
	P2X4KO mice	Sim et al, 2006 A gift of F. Rassendren IGF, Montpellier, France	N/A
	B6SJL SOD1-G93A	Jackson Laboratory	Cat#002726
	C57BL/6J mice	Jackson Laboratory	Jax #000664
	<i>xenopus laevis</i>	European Xenopus Resource Centre (EXRC), Porthmouth	N/A
Recombinant DNA	mP2X4WT-pcDNA3	Toulmé et al. 2006	N/A
	mP2X4mCherryIN-pcDNA3	Bertin et al. 2020a	N/A
	hSOD1WT-pcDNA3	This manuscript	N/A
	hSOD1G93A-pcDNA3	This manuscript	N/A
	hSOD1G85R-pcDNA3	This manuscript	N/A
	hSOD1G37R-pcDNA3	This manuscript	N/A
Software	ImageJ	National Institutes of Health, USA	https://imagej.nih.gov/ij/
	Prism	Graphpad	www.graphpad.com
	Axograph X	Axograph	https://axograph.com

Author contributions

EB, AM, and AF performed the experiments and analyzed the data. SB, P-OF and EB-G designed the experiments and analyzed the data. FK-N contributed with key reagents. EB-G and SSB conceived the study and EB-G, EB and SSB wrote the manuscript. All authors commented the manuscript.

Acknowledgements

We thank G. Dabee for the production of all transgenic mice at the animal facility, H. Orignac for help with Xenopus facilities. We also thank the biochemistry facility of Bordeaux Neurocampus. This work was supported by Grants from ARSLA, FRC and LabEx BRAIN ANR-10-LABX-43.

References

1. Cleveland DW, and Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(11):806-19.
2. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2008;319(5870):1668-72.
3. Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2009;323(5918):1205-8.
4. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron.* 2011;72(2):257-68.
5. Grad LI, Fernando SM, and Cashman NR. *Neurobiology of Disease.* Academic Press; 2015:257-65.
6. Grad LI, and Cashman NR. Prion-like activity of Cu/Zn superoxide dismutase: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Prion.* 2014;8(1):33-41.
7. Pokrishevsky E, Grad LI, Yousefi M, Wang J, Mackenzie IR, and Cashman NR. Aberrant localization of FUS and TDP43 is associated with misfolding of SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* 2012;7(4):e35050.
8. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2006;314(5796):130-3.
9. Hooten KG, Beers DR, Zhao W, and Appel SH. *Neurotherapeutics.* Springer; 2015:364-75.
10. Volonte C, Apolloni S, Parisi C, and Amadio S. Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology.* 2016;104:180-93.
11. Volonte C, Amadio S, Cavaliere F, D'Ambrosi N, Vacca F, and Bernardi G. Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2003;2(6):403-12.
12. Volonte C, Apolloni S, Carri MT, and D'Ambrosi N. ALS: focus on purinergic signalling. *Pharmacol Ther.* 2011;132(1):111-22.
13. Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(7):575-90.
14. Burnstock G. An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. *Neuropharmacology.* 2016;104:4-17.
15. Erb L, Woods LT, Khalafalla MG, and Weisman GA. Purinergic signaling in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* 2019;151:25-37.
16. Toth A, Antal Z, Bereczki D, and Sperlagh B. Purinergic Signalling in Parkinson's Disease: A Multi-target System to Combat Neurodegeneration. *Neurochem Res.* 2019;44(10):2413-22.
17. Burnstock G. Purinergic Signalling and Neurological Diseases: An Update. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2017;16(3):257-65.
18. Cunha RA. [Caffeine, adenosine receptors, memory and Alzheimer disease]. *Med Clin (Barc).* 2008;131(20):790-5.

19. Canas PM, Porciuncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, et al. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci*. 2009;29(47):14741-51.
20. Morato X, Lujan R, Lopez-Cano M, Gandia J, Stajlgjar I, Watanabe M, et al. The Parkinson's disease-associated GPR37 receptor interacts with striatal adenosine A2A receptor controlling its cell surface expression and function in vivo. *Sci Rep*. 2017;7(1):9452.
21. Carvalho K, Faivre E, Pietrowski MJ, Marques X, Gomez-Murcia V, Deleau A, et al. Exacerbation of C1q dysregulation, synaptic loss and memory deficits in tau pathology linked to neuronal adenosine A2A receptor. *Brain*. 2019.
22. Pougnet JT, Toulme E, Martinez A, Choquet D, Hosy E, and Boue-Grabot E. ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron*. 2014;83(2):417-30.
23. Khakh BS, and North RA. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*. 2012;76(1):51-69.
24. Pougnet JT, Compans B, Martinez A, Choquet D, Hosy E, and Boue-Grabot E. P2X-mediated AMPA receptor internalization and synaptic depression is controlled by two CaMKII phosphorylation sites on GluA1 in hippocampal neurons. *Sci Rep*. 2016;6:31836.
25. Boue-Grabot E, and Pankratov Y. Modulation of Central Synapses by Astrocyte-Released ATP and Postsynaptic P2X Receptors. *Neural Plast*. 2017;2017:9454275.
26. Cavaliere F, Florenzano F, Amadio S, Fusco FR, Viscomi MT, D'Ambrosi N, et al. Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience*. 2003;120(1):85-98.
27. Franke H, and Illes P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther*. 2006;109(3):297-324.
28. Casanovas A, Hernandez S, Tarabal O, Rossello J, and Esquerda JE. Strong P2X4 purinergic receptor-like immunoreactivity is selectively associated with degenerating neurons in transgenic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol*. 2008;506(1):75-92.
29. Apolloni S, Montilli C, Finocchi P, and Amadio S. Membrane compartments and purinergic signalling: P2X receptors in neurodegenerative and neuroinflammatory events. *Febs J*. 2009;276(2):354-64.
30. Ulmann L, Hirbec H, and Rassendren F. *EMBO J*. 2010;2290-300.
31. Boué-Grabot E, and Pankratov Y. *Neural Plast*. 2017:9454275.
32. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, and Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences*. 2009;32(1):19-29.
33. Egan TM, and Khakh BS. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci*. 2004;24(13):3413-20.
34. Cao Q, Zhong XZ, Zou Y, Murrell-Lagnado R, Zhu MX, and Dong XP. Calcium release through P2X4 activates calmodulin to promote endolysosomal membrane fusion. *J Cell Biol*. 2015;209(6):879-94.
35. Huang P, Zou Y, Zhong XZ, Cao Q, Zhao K, Zhu MX, et al. P2X4 forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH. *J Biol Chem*. 2014;289(25):17658-67.

36. Toulme E, Garcia A, Samways D, Egan TM, Carson MJ, and Khakh BS. P2X4 receptors in activated C8-B4 cells of cerebellar microglial origin. *J Gen Physiol.* 2010;135(4):333-53.
37. Robinson LE, and Murrell-Lagnado RD. The trafficking and targeting of P2X receptors. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:233.
38. Beggs S, Trang T, and Salter MW. P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nature neuroscience.* 2012;15(8):1068-73.
39. Varma R, Chai Y, Troncoso J, Gu J, Xing H, Stojilkovic SS, et al. Amyloid-beta induces a caspase-mediated cleavage of P2X4 to promote purinotoxicity. *Neuromolecular Med.* 2009;11(2):63-75.
40. Andries M, Van Damme P, Robberecht W, and Van Den Bosch L. Ivermectin inhibits AMPA receptor-mediated excitotoxicity in cultured motor neurons and extends the life span of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2007;25(1):8-16.
41. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, et al. *Nature.* 2003:778-83.
42. Bertin E, Deluc T, Pilch K, Martinez A, Pougnet JT, Doudnikoff E, et al. Increased surface P2X4 receptor expression regulates synaptic plasticity and behavior in P2X4 internalization-defective knock-in mice. *Molecular Psychiatry.* 2020
43. Hernandez S, Casanovas A, Piedrafita L, Tarabal O, and Esquerda JE. Neurotoxic species of misfolded SOD1G93A recognized by antibodies against the P2X4 subunit of the ATP receptor accumulate in damaged neurons of transgenic animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69(2):176-87.
44. Adencreutz M, and Hau J. Studies of neonatal and juvenile neuromuscular locomotor development of C57BL/6/Bkl, 129SvEv/Bkl and F1 hybrid mice in swim tests. *In Vivo.* 2004;18(6):733-7.
45. Fernagut PO, Diguët E, Stefanova N, Biran M, Wenning GK, Canioni P, et al. Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: behavioural and histopathological characterisation. *Neuroscience.* 2002;114(4):1005-17.
46. Hua J BP, Garcia de Paco A, Rassendren F, Koch-Nolte F, Ulmann L. . Characterization of new mouse P2X4 antibodies recognizing the native extracellular domain. . *Frontiers in Cellular Neuroscience.* In press.
47. Xu J, Bernstein AM, Wong A, Lu XH, Khoja S, Yang XW, et al. P2X4 Receptor Reporter Mice: Sparse Brain Expression and Feeding-Related Presynaptic Facilitation in the Arcuate Nucleus. *J Neurosci.* 2016;36(34):8902-20.
48. Bataveljic D, Stamenkovic S, Bacic G, and Andjus PR. Imaging cellular markers of neuroinflammation in the brain of the rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Physiol Hung.* 2011;98(1):27-31.
49. Corcia P, Tauber C, Vercoullie J, Arlicot N, Prunier C, Praline J, et al. Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* 2012;7(12):e52941.
50. Lewis KE, Rasmussen AL, Bennett W, King A, West AK, Chung RS, et al. Microglia and motor neurons during disease progression in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: changes in arginase1 and inducible nitric oxide synthase. *J Neuroinflammation.* 2014;11:55.
51. Liu J, and Wang F. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Immunol.* 2017;8:1005.

52. Philips T, and Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol.* 2011;10(3):253-63.
53. Thompson AG, and Turner MR. Untangling neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019.
54. Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, et al. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [¹¹C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis.* 2004;15(3):601-9.
55. Weydt P, and Moller T. Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport.* 2005;16(6):527-31.
56. Zurcher NR, Loggia ML, Lawson R, Chonde DB, Izquierdo-Garcia D, Yasek JE, et al. Increased in vivo glial activation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: assessed with [(11)C]-PBR28. *Neuroimage Clin.* 2015;7:409-14.
57. Vargas MR, and Johnson JA. Astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):471-81.
58. Komine O, and Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease. *Nagoya J Med Sci.* 2015;77(4):537-49.
59. Alexianu ME, Kozovska M, and Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology.* 2001;57(7):1282-9.
60. Hall ED, Oostveen JA, and Gurney ME. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia.* 1998;23(3):249-56.
61. Layhadi JA, and Fountain SJ. P2X4 Receptor-Dependent Ca(2+) Influx in Model Human Monocytes and Macrophages. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11).
62. Bobanovic LK, Royle SJ, and Murrell-Lagnado RD. P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci.* 2002;22(12):4814-24.
63. Royle SJ, Bobanovic LK, and Murrell-Lagnado RD. Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *J Biol Chem.* 2002;277(38):35378-85.
64. Royle SJ, Qureshi OS, Bobanovic LK, Evans PR, Owen DJ, and Murrell-Lagnado RD. Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 14):3073-80.
65. Jo YH, Donier E, Martinez A, Garret M, Toulme E, and Boue-Grabot E. Cross-talk between P2X4 and gamma-aminobutyric acid, type A receptors determines synaptic efficacy at a central synapse. *J Biol Chem.* 2011;286(22):19993-20004.
66. D'Ambrosi N, Finocchi P, Apolloni S, Cozzolino M, Ferri A, Padovano V, et al. The proinflammatory action of microglial P2 receptors is enhanced in SOD1 models for amyotrophic lateral sclerosis. *J Immunol.* 2009;183(7):4648-56.
67. Silberberg SD, Li M, and Swartz KJ. Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels. *Neuron.* 2007;54(2):263-74.
68. Toulme E, Soto F, Garret M, and Boue-Grabot E. Functional properties of internalization-deficient P2X4 receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin. *Mol Pharmacol.* 2006;69(2):576-87.
69. Rodrigues RJ, Tome AR, and Cunha RA. ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Front Neurosci.* 2015;9:148.

70. Apolloni S, Amadio S, Montilli C, Volonte C, and D'Ambrosi N. Ablation of P2X7 receptor exacerbates gliosis and motoneuron death in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2013;22(20):4102-16.
71. Apolloni S, Amadio S, Parisi C, Matteucci A, Potenza RL, Armida M, et al. Spinal cord pathology is ameliorated by P2X7 antagonism in a SOD1-mutant mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Dis Model Mech.* 2014;7(9):1101-9.
72. Appel SH, Zhao W, Beers DR, and Henkel JS. The microglial-motoneuron dialogue in ALS. *Acta Myol.* 2011;30(1):4-8.
73. Beers DR, Zhao W, Liao B, Kano O, Wang J, Huang A, et al. Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice. *Brain Behav Immun.* 2011;25(5):1025-35.
74. Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, and Appel SH. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol.* 2012;237(1):147-52.
75. Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, et al. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci.* 2008;28(44):11263-8.
76. Geloso MC, Corvino V, Marchese E, Serrano A, Michetti F, and D'Ambrosi N. The Dual Role of Microglia in ALS: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:242.
77. Layhadi JA, Turner J, Crossman D, and Fountain SJ. ATP Evokes Ca(2+) Responses and CXCL5 Secretion via P2X4 Receptor Activation in Human Monocyte-Derived Macrophages. *J Immunol.* 2018;200(3):1159-68.
78. Csoka B, Nemeth ZH, Szabo I, Davies DL, Varga ZV, Paloczi J, et al. Macrophage P2X4 receptors augment bacterial killing and protect against sepsis. *JCI Insight.* 2018;3(11).
79. Suurvali J, Boudinot P, Kanellopoulos J, and Ruutel Boudinot S. P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor. *Biomed J.* 2017;40(5):245-56.
80. Van Dyke JM, Smit-Oistad IM, Macrander C, Krakora D, Meyer MG, and Suzuki M. Macrophage-mediated inflammation and glial response in the skeletal muscle of a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Exp Neurol.* 2016;277:275-82.
81. Mammana S, Fagone P, Cavalli E, Basile MS, Petralia MC, Nicoletti F, et al. The Role of Macrophages in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Pathways of Alzheimer's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis: Pathogenetic Cellular Effectors and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
82. Graber DJ, Hickey WF, and Harris BT. Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2010;7:8.
83. Liu G, Fiala M, Mizwicki MT, Sayre J, Magpantay L, Siani A, et al. Neuronal phagocytosis by inflammatory macrophages in ALS spinal cord: inhibition of inflammation by resolvin D1. *Am J Neurodegener Dis.* 2012;1(1):60-74.
84. Butovsky O, Siddiqui S, Gabriely G, Lanser AJ, Dake B, Murugaiyan G, et al. Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3063-87.

85. Zondler L, Muller K, Khalaji S, Bliederauser C, Ruf WP, Grozdanov V, et al. Peripheral monocytes are functionally altered and invade the CNS in ALS patients. *Acta Neuropathol.* 2016;132(3):391-411.
86. Qureshi OS, Paramasivam A, Yu JC, and Murrell-Lagnado RD. Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 21):3838-49.
87. Bertin E, Martinez A, and Boue-Grabot E. P2X Electrophysiology and Surface Trafficking in *Xenopus* Oocytes. *Methods Mol Biol.* 2020;2041:243-59.
88. Ray A, and Dittel BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp.* 2010(35).
89. Bertin E, Deluc T, Pilch K, Martinez A, Pougnet JT, Doudnikoff E, et al. Increased surface P2X4 receptor expression regulates synaptic plasticity and behavior in P2X4 internalization-defective knock-in mice. *Molecular Psychiatry.* 2020.

Figures and legends

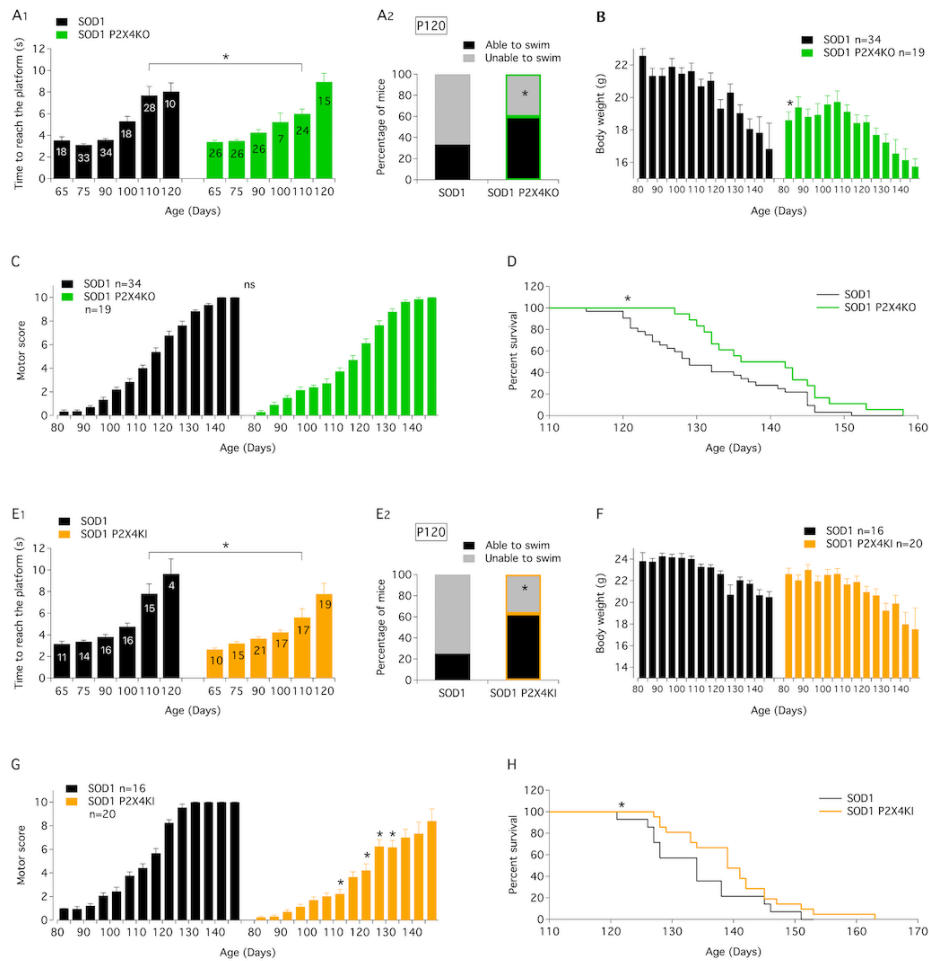


Figure 1. A. Bar chart of the time to swim to reach a platform placed at one extremity of a corridor as a function of age (in days) for SOD1 (black bars) and SOD1P2X4KO (SOD1:P2X4KO, green bars) mice (A1), (*: significantly different, $p < 0.05$; two-way ANOVA). Number of 120-day-old (P120) mice able or unable to swim in the two mouse lines tested (A2) (Chi-square, $p = 0.04$). **B-C.** Bar charts of body weight (B) and motor score (C) as a function of age (in days) for SOD1 (black bars) and SOD1:P2X4KO (green bars) mice (*: significantly different, $p < 0.05$; two-way ANOVA). **D.** Plot of percent survival for SOD1 (black line) and SOD1:P2X4KO (green line) mice (Gehan-Breslow-Wilcoxon test, $p = 0.01$). **E.** Bar chart of the time to swim to the platform as a function of age (in days) for SOD1 (SOD1, black bars) and SOD1:P2X4KI (SOD1 P2X4KI, orange bars) mice (E1), (*: significantly different, $p < 0.05$; two-way ANOVA). Number of P120 mice able or unable to swim in the two mouse lines tested (A2) (Chi-square, $p = 0.02$). **F-G.** Bar charts of body weight (F) and motor score (G) as a function of age (in days) for SOD1 (black bars) and SOD1:P2X4KI (orange bars) mice (*: significantly different, $p < 0.05$; two-way ANOVA). **H.** Plot of percent survival for the two lines of mice tested (Gehan-Breslow-Wilcoxon test, $p = 0.01$). Data are presented as mean \pm SEM. Numbers in bars indicate the number of animals tested.

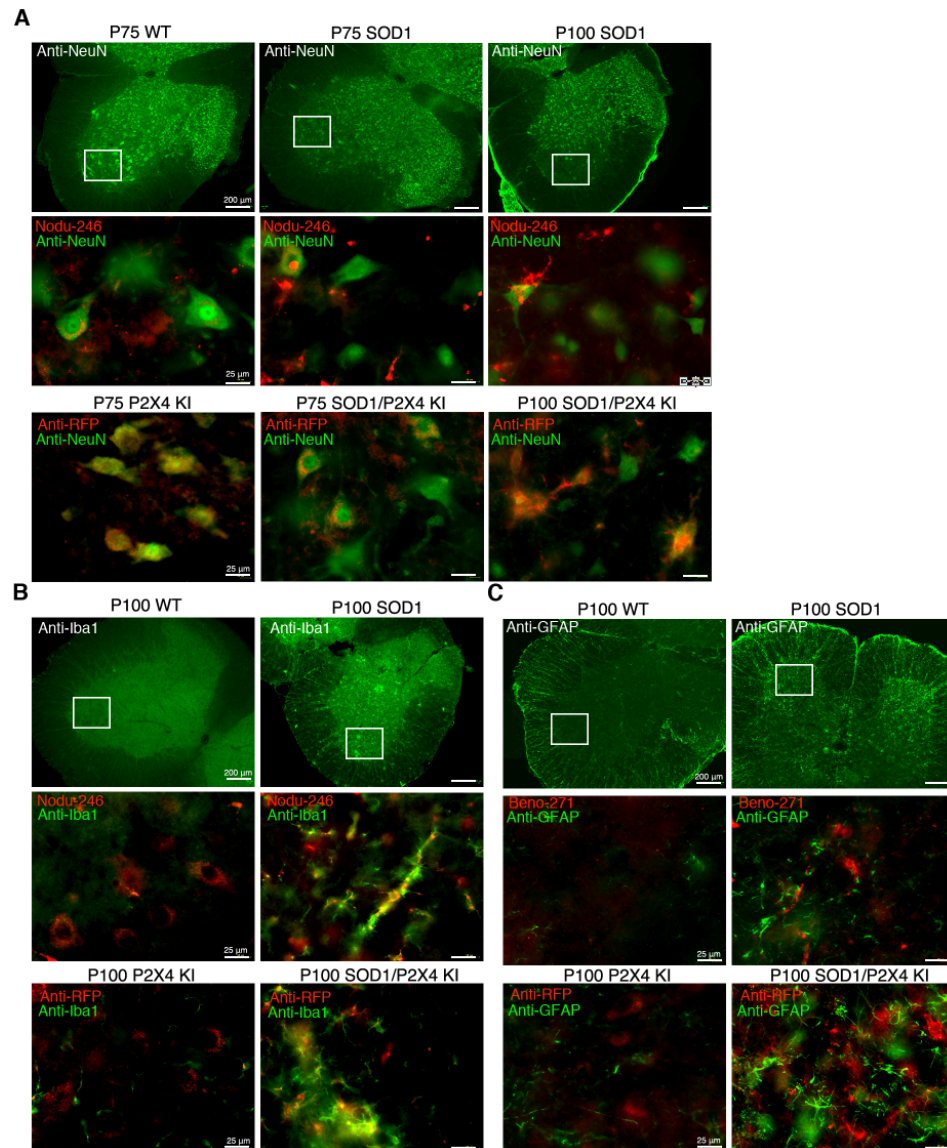


Figure 2. P2X4 immunoreactivity in lumbar spinal cord from WT, SOD1 and SOD1:P2X4KI mice at pre (P75) symptomatic (P100) phases of ALS. **A-C.** Expression of P2X4 in WT or SOD1 revealed with a rat monoclonal P2X4 antibodies (Nodu-246) and expression of P2X4KI revealed with anti-RFP in P2X4KI or SOD1:P2X4KI mice at P75 and P100 stages. Nodu-246, Beno-271 or anti-RFP were revealed with secondary antibodies coupled to Alexa-564 (red). Neurons (**A**), microglia (**B**) or astrocytes (**C**) were identified using primary antibodies against either NeuN, GFAP or Iba1 revealed with secondary coupled to Alexa-488 (green). White frames indicate magnified areas. **A.** P2X4 or P2X4KI are expressed in neurons of ventral horn of the spinal cord at P75 in SOD1 or SOD1:P2X4KI mice and at P100 solely in WT mice. **B,C.** At P100 in SOD1 or SOD1:P2X4KI mice, the increase of Iba1 and GFAP staining reveal the astro- and micro-gliosis within the spinal cord during the ALS progression. At P100, P2X4 staining is localized in Iba1-positive cells of SOD1 or SOD1:P2X4KI spinal cord indicating the increase of P2X4 expression mainly in microglia during the symptomatic phase.

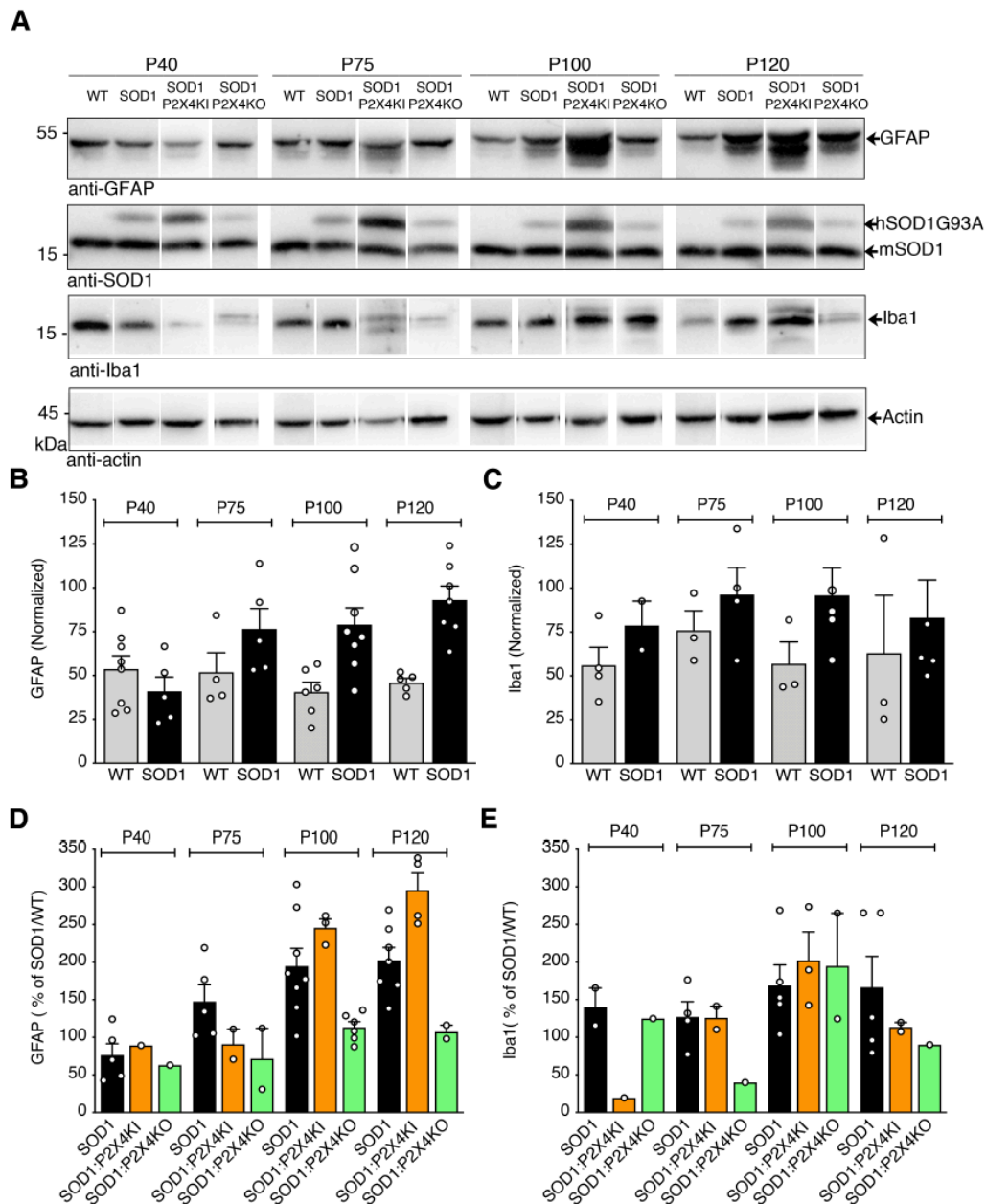


Figure 3. A. Western blotting of total proteins from spinal cord (SC) of WT and SOD1 mice expressing P2X4WT (SOD1), P2X4KI (SOD1:P2X4KI) or knockout for P2X4 (SOD1:P2X4KO) at the indicated stages. Detection of GFAP and Iba1 from SC proteins extracted from at P100. The anti-SOD1 antibody revealed 2 bands of different size corresponding to the endogenous mouse (m)SOD1 and the human (h)SOD1G93A protein confirming the genotype of the mice (WT or SOD1). Anti-Actin was used as a control loading and to normalize measurements. **B,C.** Graph bars showing the means \pm SEM of GFAP and IBA1 detection for WT and SOD1 mice over the time. **D,E.** Changes of GFAP and Iba1 for the different SOD1, SOD1:P2X4KI, and SOD1:P2X4KO mice compared to the level of their control mice (WT, P2X4KI and P2X4KO), respectively.

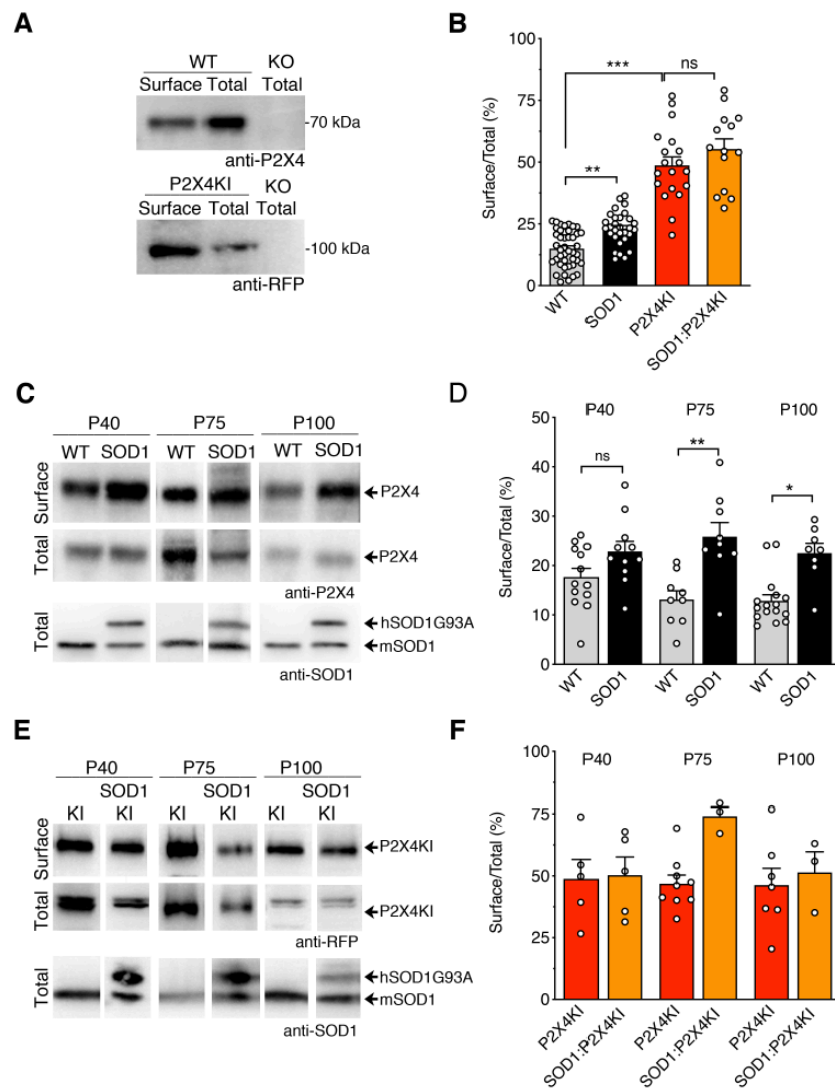


Figure 4. **A.** Western blotting of total and biotinylated surface proteins from peritoneal macrophages isolated from WT, P2X4KI or P2X4KO mice revealed using anti-RFP, anti-P2X4 antibodies. **B.** Surface/total ratio measured from all mice (P40, P75 and P100) show that increase the number of surface P2X4 receptor is higher in P2X4KI mice than in P2X4WT mice as previously showed (Bertin et al., 2020a). Importantly, the surface level of P2X4 in SOD1 mice is also higher than in P2X4WT. **C.** Western blotting of total and biotinylated surface proteins from peritoneal macrophages isolated from WT (WT) and SOD1-G93A:WT (SOD1) mice at four time points (P40, P75, P100 and P120). The anti-SOD1 antibody revealed 2 bands of different size corresponding to murine (m)SOD1 and human (h)SOD1-G93A confirming the genotype of the mouse. **D.** Surface/total ratio showed that the number of surface P2X4 is increased in SOD1 macrophages compared to wild-type at presymptomatic (P75) and symptomatic phase (P100). **E.** Similar experiments from peritoneal macrophages isolated from P2X4KI and SOD1: P2X4KI mice at the same 3 stages (P40, P75 and P100). **F.** Surface/total ratio showed that the high density of surface P2X4KI is similar in SOD1:P2X4KI macrophages.

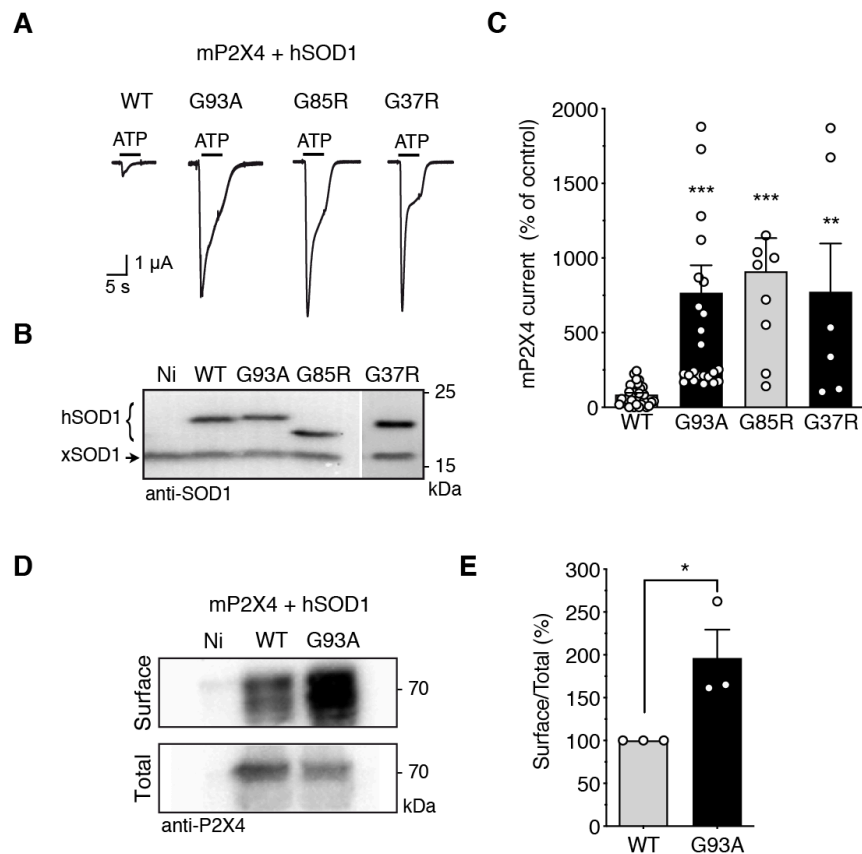


Figure 5. Representative currents evoked by application of 100 μ M ATP in *Xenopus* oocytes co-injected with cDNAs encoding mP2X4 and either human SOD1WT or a mutant hSOD1 (hSOD1-G93A, G85R or G37R). **B.** Western blot using anti-SOD1 antibodies confirmed the expression of the WT or mutated hSOD1 in addition to endogenous xenopus SOD1 (xSOD1) present also in non-injected oocytes (Ni). **C.** Mean of ATP current amplitudes computed for all tested oocytes. ATP evoked P2X4 current are strongly increased in cells expressing each mutant hSOD1 (G93A, G85R and G37R) compared to those expressing hSOD1WT (one-way ANOVA, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). **D.** Western blotting of surface and total proteins purified after protein surface biotinylation using anti-P2X4 antibodies from oocytes co-expressing mP2X4 and hSOD1WT or hSOD-G93A and non-injected oocytes (Ni). **E.** Normalized surface/total ratio shows that surface density of mP2X4 is increased in cells expressing SOD1G93A expression compared to those expressing hSOD1WT (* $p < 0.05$; unpaired t-test).

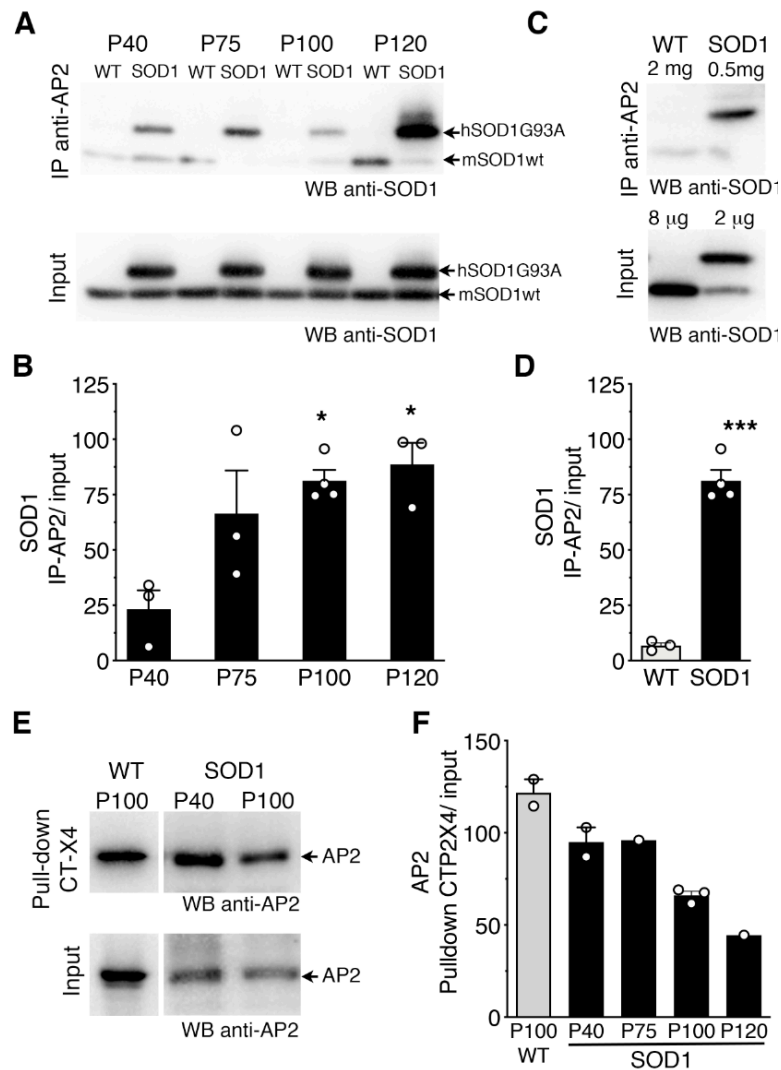


Figure 6. A. Western blot analysis using anti-SOD1 antibodies after immunoprecipitation (IP) using anti-AP2 antibodies from spinal cord protein extracts of WT and SOD1 mice at different stages (P40 to P120) revealed that SOD1-G93A co-immunoprecipitated with Adaptor protein 2 (AP2). Anti-SOD antibodies revealed in total proteins (input) one (mSOD1) or two bands (mSOD1 + hSOD1G93A) indicating the genotype of the mice **B.** The increase of SOD1 signals after IP over time suggests that the interaction between SOD1-G93A and AP2 increases during ALS pathogenesis (significant different from P40, * $p < 0.05$, one-way ANOVA). **C-D.** Co-IP control experiments performed with 4-fold more proteins extracted from spinal cord of WT than SOD1 mice to have similar amount of endogenous mSOD1WT and hSOD1G93A. **D.** SOD1 signals after IP with anti-AP2 show that solely SOD1G93A is co-immunoprecipitated with AP2 (** $p < 0.001$, unpaired t-test). **E-F.** Pull-down assay using an immobilized peptide coding for the C-terminal domain of mP2X4 from spinal cord protein extracts from SOD1 mice at P40, P75, P100 and P120. After pull-down assay, eluted proteins were separated on a SDS-PAGE gel and revealed by western blot using anti AP2 antibodies indicating that P2X4 interact with AP2. Interaction between AP2 and P2X4 decreases (1-3 experiments per age) over the time in SOD1 mice suggesting that increased interaction between misfolded SOD1 and AP2 decrease binding of AP2 with P2X4 over the time in SOD1 mice.

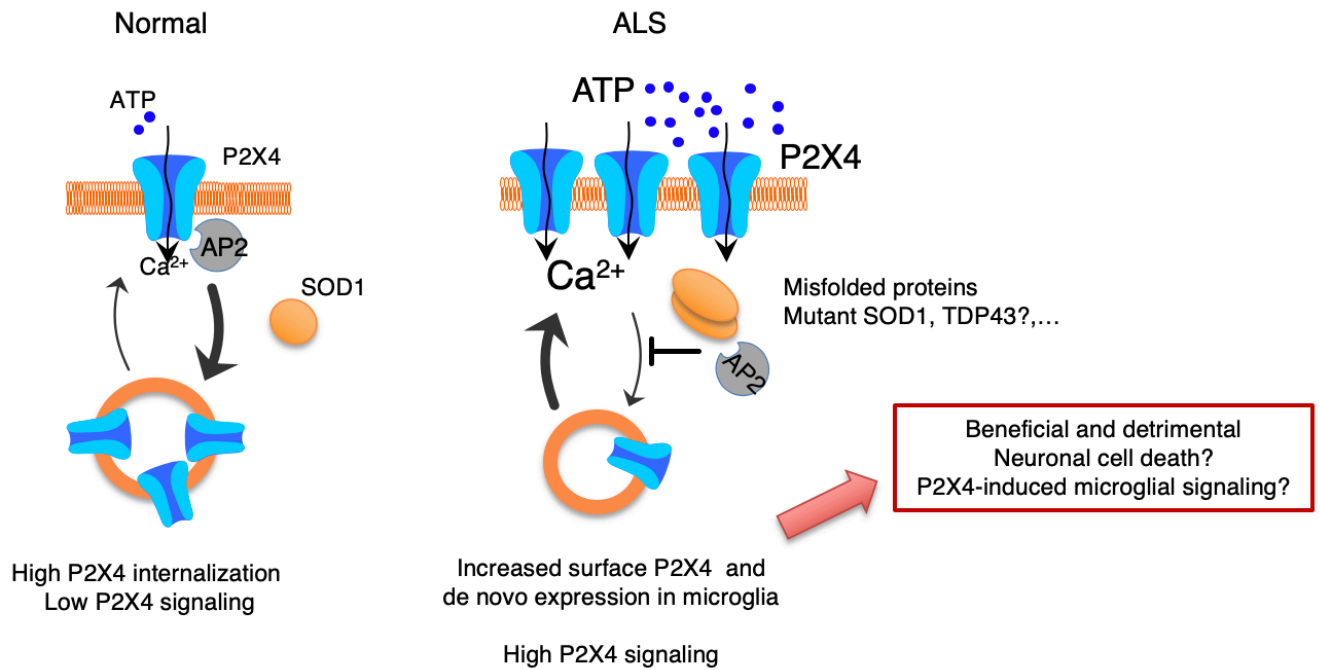
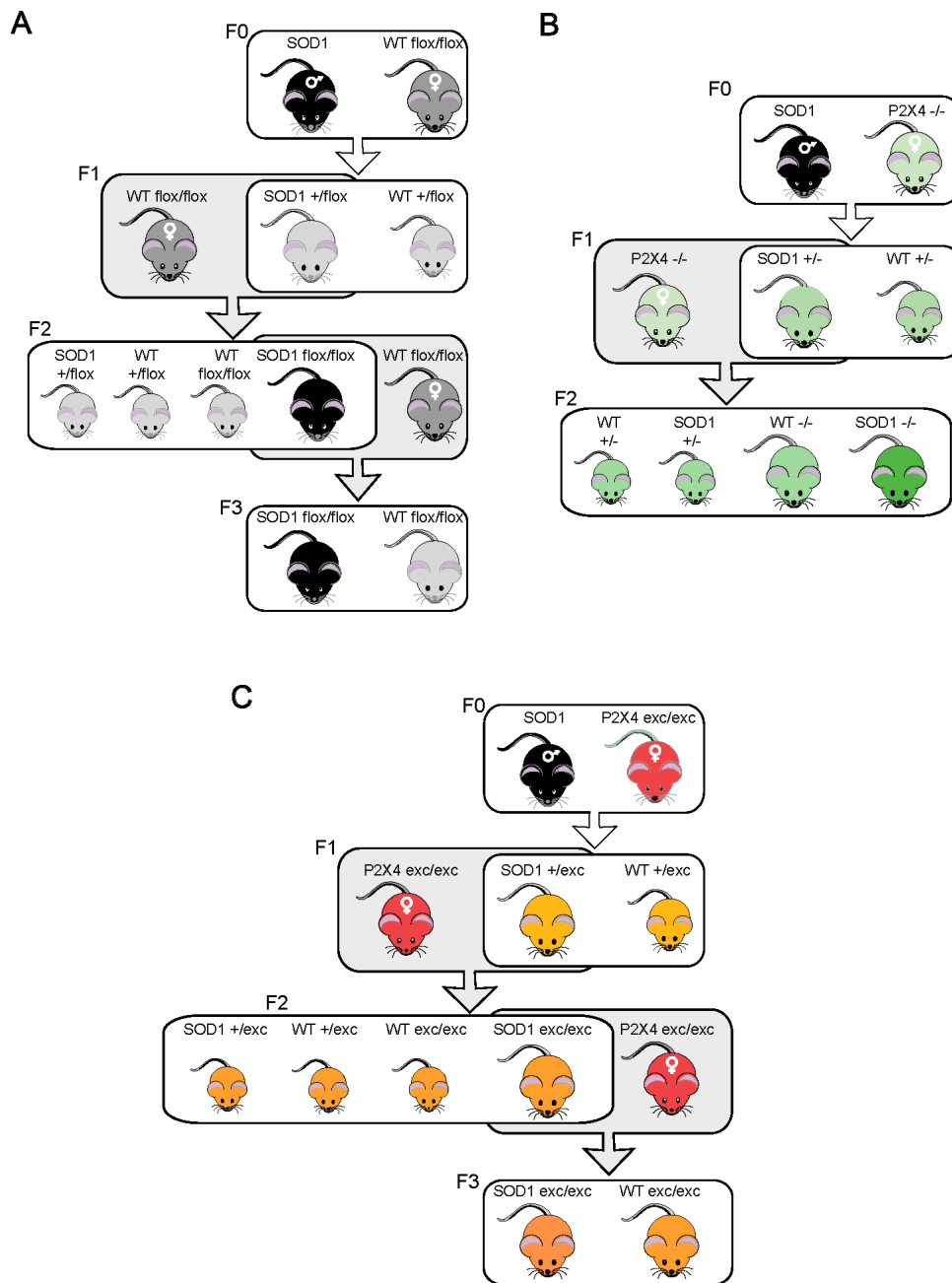
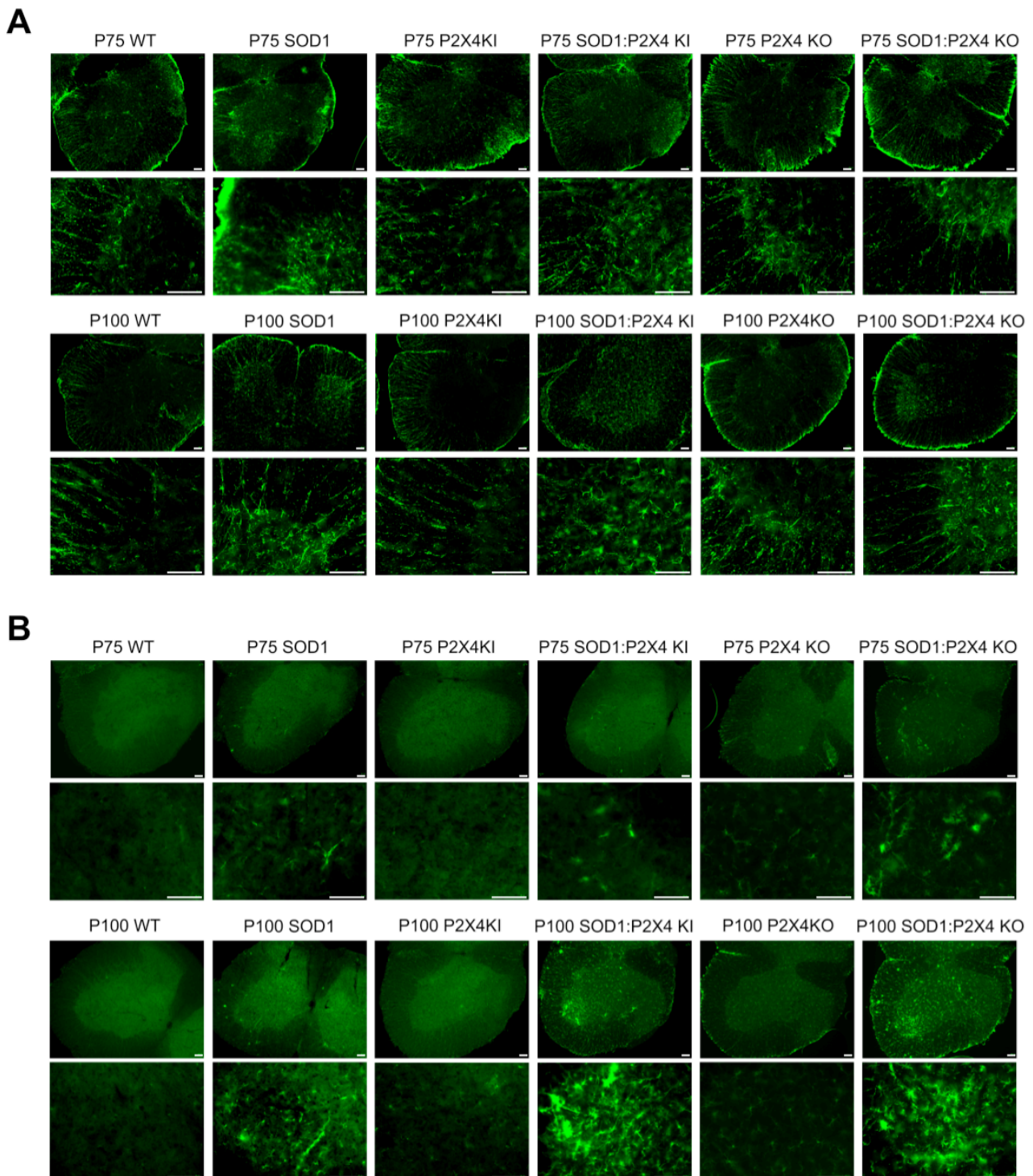


Figure 7. Graphical summary of the mechanism of P2X4 upregulation and consequences in ALS models. In normal conditions P2X4 is constitutively endocytosed by the binding of AP2 on its C-terminus internalization domain and its expression is low and restricted to MN within the spinal cord. During ALS progression, misfolded mutant proteins like SOD1, TDP-43 or FUS interfere with P2X4 internalization by competing for AP2 interaction leading to the increase of surface P2X4 density in several cell types in addition to *de novo* P2X4 expression in spinal activated microglia that may contribute to the neuroinflammation-associated to ALS and MN death.

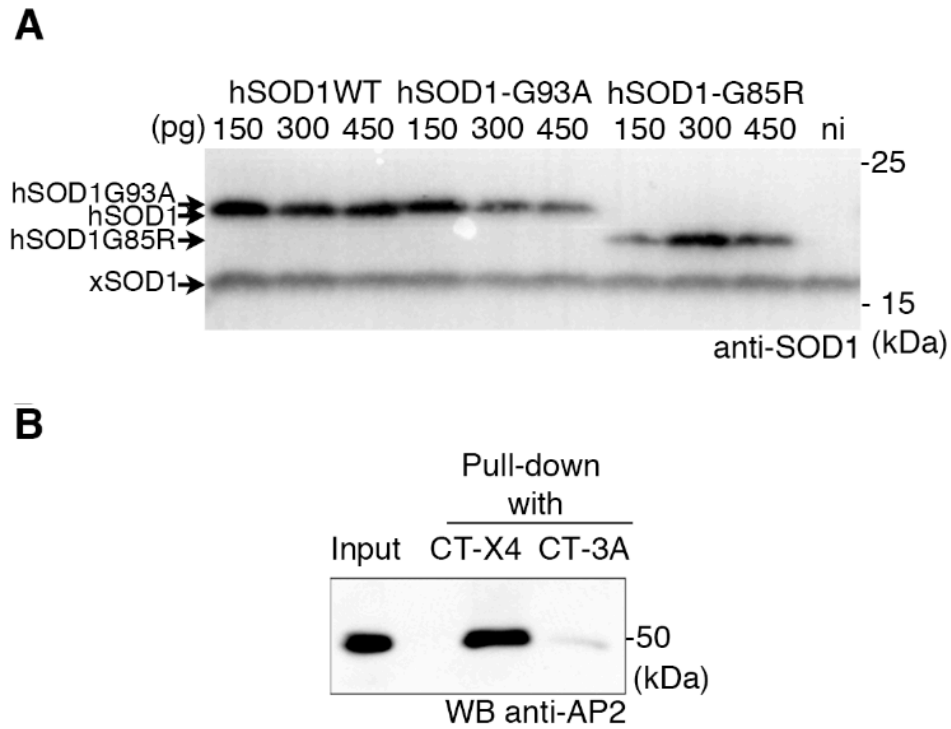
Supplemental Figures and Legend



Supplemental Figure 1: Breeding scheme. **A.** Breeding of SOD1 mice with WT floxed mice to obtain F3 SOD1 and control WT mice presenting the same genetic background. **B.** Breeding of SOD1 mice with P2X4KO mice to obtain F2 SOD1:P2X4KO and control P2X4KO mice presenting the same genetic background. SOD1 +/- females are sterile. **C.** Breeding of SOD1 mice with P2X4KI mice to obtain F3 SOD1:P2X4KI and control P2X4KI mice presenting the same genetic background. SOD1 exc/exc and SOD1-/exc females are sterile.



Supplemental Figure 2 A. Time course of GFAP immunodetection in the SC of the different mice as indicated. GFAP positive astrocytes are localized in the white matter in control mice and have invaded the grey matter of SOD1 mice. This change of expression is stronger in P100 mice. **B.** Time course of Iba1 immunodetection in the different mice as indicated. Iba1 positive microglia labeling begins to appear in P75 SOD1 mice and increase drastically in P100 SOD1 mice. Bar scale: 100 μ m.



Supplemental Figure 3 A. Western blotting of total proteins from oocytes injected with different quantities of cDNA coding for hSOD WT, G93A or G95R and non-injected oocytes (Ni). **B.** Pull-down assay using an immobilized peptide coding for the C-terminal domain of mP2X4 (CT-X4) and a control peptide CT-3A, corresponding to the same sequence with mutated AP2 binding domain residues (YXXGL were replaced by three alanines) from spinal cord protein extracts and revealed by western blot using anti AP2 antibodies. The C-tail of P2X4 retains specifically AP2 while no signal is observed with CT-3A.

DISCUSSION GENERALE

Au cours de ce travail de doctorat, j'ai participé à la caractérisation de deux nouvelles lignées de souris transgéniques KI exprimant un mutant d'internalisation du récepteur P2X4 (P2X4mCherryIN) permettant de prévenir l'endocytose constitutive du récepteur P2X4, soit dans toutes les cellules exprimant nativement le récepteur (souris CMV-P2X4mCherryIN), soit spécifiquement dans les neurones excitateurs (souris CaMK2-P2X4mCherryIN). Par des approches moléculaires, cellulaires, électrophysiologiques et comportementales, nous avons montré que l'augmentation du nombre de récepteurs P2X4 à la surface des neurones principalement excitateurs altère la plasticité synaptique dans l'hippocampe des souris qui présentent une altération des performances d'apprentissage et de mémoire ainsi qu'une diminution des comportements liés à l'anxiété. En parallèle, à l'aide de ce nouveau modèle de souris P2X4KI pan cellulaire mais aussi de souris P2X4KO nous avons étudié l'implication du récepteur P2X4 dans la pathogénèse de la SLA chez le modèle SOD1-G93A et mis en évidence le mécanisme responsable de l'augmentation du nombre de récepteur P2X4 à la surface des cellules durant cette pathologie.

1. Nouveau modèle de souris KI conditionnelle pour l'étude de l'augmentation en surface du récepteur P2X4

1.1. Création d'un mutant d'internalisation P2X4mCherryIN fonctionnel

Afin d'étudier la fonction de l'augmentation en surface du récepteur P2X4 qui a été mise en évidence dans de nombreuses pathologies du SNC (Andries et al., 2007; Apolloni et al., 2009; Beggs et al., 2012; Casanovas et al., 2008; Cavaliere et al., 2003; Tsuda et al., 2003a; Ulmann et al., 2013; Varma et al., 2009; Volonte et al., 2016), un mutant d'internalisation du récepteur P2X4 a été créé par le laboratoire. Comme attendu, l'expression *in vitro* du mutant P2X4mCherryIN a confirmé que la mutation induite augmentait le trafic en surface du récepteur par rapport au récepteur P2X4WT mais n'altérait pas sa fonction ou sa localisation subcellulaire, permettant ainsi de valider ce mutant d'internalisation. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études qui avaient montré que l'ablation ou la mutation du motif d'endocytose du récepteur P2X4 (Y³⁷⁸xxGL) augmentait le trafic du récepteur à la surface sans affecter ses propriétés fonctionnelles (Bobanovic et al., 2002; Jo et al., 2011; Royle et al., 2002; Royle et al., 2005; Rubio and Soto, 2001; Toulme et al., 2006).

1.2. Les souris KI comme outil valide pour l'étude de l'expression cellule-spécifique du mutant d'internalisation P2X4mCherryIN

Suite à la validation de P2X4mCherryIN *in vitro*, une souris conditionnelle floxée portant l'allèle mutant P2X4mCherryIN sur le gène *p2rx4* a été générée à la clinique de la souris de Strasbourg.

L'analyse de l'expression du récepteur mutant P2X4mCherryIN dans les souris CMV et CaMK2 indique que la substitution du récepteur P2X4WT endogène par le mutant d'internalisation P2X4mCherryIN s'effectue dans les régions attendues : au niveau du bulbe olfactif avec une expression diffuse dans l'hippocampe, le cortex, le cervelet et la ME dans le SNC et une forte expression au niveau des macrophages péritonéaux chez la souris CMV coïncidant avec ce qui a été rapporté pour le récepteur P2X4WT dans la littérature (Layhadi et al., 2018; Le et al., 1998; Rubio and Soto, 2001; Ulmann et al., 2010a; Xu et al., 2016), et majoritairement au niveau des neurones excitateurs de l'hippocampe et du cortex sans être présente en périphérie, chez la souris CaMK2, en adéquation avec la sélectivité du promoteur (Tsien et al., 1996). De plus, chez les deux lignées de souris transgéniques, une localisation pré- et postsynaptique du récepteur mutant P2X4mCherryIN dans l'hippocampe et le cortex, comme

précédemment décrit pour le récepteur P2X4 (Rodrigues et al., 2005; Rubio and Soto, 2001; Xu et al., 2016), a été confirmée. De manière intéressante, la substitution du récepteur P2X4WT par le récepteur mutant P2X4mCherryIN entraîne une augmentation de l'expression de surface du récepteur P2X4 dans différents types cellulaires en accord avec l'activité des promoteurs (Schwenk et al., 1995; Tsien et al., 1996) et l'expression du récepteur P2X4 endogène (Layhadi et al., 2018; Ulmann et al., 2010a; Xu et al., 2016) : dans les neurones pour les deux lignées, et au niveau de la microglie, des astrocytes et des macrophages uniquement chez la souris CMV. En ce qui concerne les astrocytes, l'expression du récepteur P2X4 a précédemment été reportée (Kukley et al., 2001) mais reste débattue (Stokes et al., 2017).

Notre étude a révélé que la fluorescence endogène du récepteur P2X4mCherryIN dans les cultures primaires d'hippocampe ainsi que dans les tranches de cerveau des différentes souris KI était indétectable, contrairement aux cellules transfectées qui surexpriment le récepteur muté, ce qui ne permet pas la détection directe et la caractérisation fonctionnelle des cellules qui expriment le récepteur P2X4mCherryIN. La fluorescence endogène du récepteur muté était visible uniquement dans les macrophages péritonéaux des souris CMV du fait de son expression basale élevée dans ces cellules, précédemment reportée (Ulmann et al., 2010a).

De manière intéressante, l'injection intra-hippocampique de LPS qui induit une activation microgliale ainsi qu'une augmentation de l'expression *de novo* du récepteur P2X4 au niveau de la zone d'injection, a permis la visualisation directe de la fluorescence endogène du récepteur P2X4mCherry exclusivement dans la microglie des souris CMV confirmant une nouvelle fois la spécificité d'expression du mutant dans les différentes lignées *in vivo* et indiquant que la fluorescence endogène du récepteur mutant P2X4mCherryIN peut représenter un outil unique permettant d'étudier de manière directe l'augmentation de l'expression du récepteur P2X4 dans des modèles de pathologies comme la douleur chronique, la maladie d'Alzheimer, la SLA, les pathologies liées à l'alcool, l'inflammation, l'épilepsie, l'ischémie ou encore les traumatismes crâniens. De plus, ces résultats montrent une absence de co-localisation du récepteur P2X4 avec les astrocytes GFAP positifs dans les tranches de cerveau des différentes lignées de souris, ce qui n'est pas en accord avec les résultats obtenus en culture primaires d'hippocampe, montrant que l'expression du récepteur P2X4 dans les astrocytes est évasive. Une des possibilités pouvant expliquer ce phénomène est la variabilité d'expression cellulaire du récepteur au fil du temps, étant donné que les cultures primaires sont élaborées à partir de souris nouveau-nés et les tranches de cerveaux sont effectuées à l'âge adulte (Kukley et al., 2001; Stokes et al., 2017; Verkhatsky et al., 2012).

1.3. Impact fonctionnel de l'expression du P2X4mCherryIN chez les souris KI : modulation de la plasticité synaptique et des fonctions mnésiques

L'analyse comportementale de l'impact de l'expression du mutant d'internalisation P2X4mCherryIN chez nos différentes souris a révélé que l'augmentation en surface du récepteur P2X4 chez les souris CMV et CaMK2 n'affectait pas l'activité locomotrice basale mais diminuait l'anxiété et altérait l'apprentissage et la mémoire spatiale de manière significative uniquement chez les souris CaMK2. En effet, de manière surprenante, aucune différence significative n'est retrouvée chez les souris CMV par rapport aux contrôles bien que l'expression du mutant d'internalisation P2X4mCherryIN soit plus étendue que chez la souris CaMK2.

Nous avons ensuite montré que des altérations de la LTP et de la LTD, mécanismes moléculaires cruciaux de plasticité synaptique impliqués dans les fonctions cognitives telles que l'apprentissage et la mémoire (Huganir and Nicoll, 2013), pouvaient expliquer les déficits de fonctions mnésiques observés chez les souris CaMK2. Ces résultats vont dans le sens des récentes études ayant montré que l'activation des récepteurs P2X, *via* la libération d'ATP modulait directement la plasticité synaptique glutamatergique (Boue-Grabot and Pankratov, 2017) sans influencer la transmission synaptique basale (Baxter et al., 2011; Pankratov et al., 2009; Sim et al., 2006). Du fait que l'activité basale médiée par les AMPAR reste inchangée chez les souris KI et que la LTP et la LTD sont principalement initiées par les NMDAR post-synaptiques dans les neurones CA1 de l'hippocampe (Huganir and Nicoll, 2013), nos résultats suggèrent que l'augmentation en surface du récepteur P2X4 au niveau des neurones CA1 chez les souris CaMK2 altère probablement la fonction des NMDAR et inhibe donc la LTP et LTD qui en dépendent, ce qui est cohérent avec l'implication du récepteur P2X4 dans la modulation de la LTP *via* les NMDAR précédemment reportée (Baxter et al., 2011; Boue-Grabot and Pankratov, 2017; Sim et al., 2006; Stokes et al., 2017). Des enregistrements électrophysiologiques de potentiels de champs synaptiques *in vivo* au niveau de la région CA1 de l'hippocampe pourraient permettre de compléter de manière plus intégrée les enregistrements sur tranche de cerveau pour l'étude de la modulation de la plasticité synaptique chez nos deux modèles de souris KI.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'augmentation du nombre de récepteurs P2X4 à la surface des neurones, qui est observée dans certaines maladies du SNC comme la maladie d'Alzheimer (Varma et al., 2009) caractérisée par des dysfonctions synaptiques et des déficits

de mémoire, peut jouer un rôle essentiel dans la régulation de la plasticité synaptique, et de ce fait, dans la modulation des fonctions mnésiques telles que l'apprentissage et la mémoire.

1.4. Limites du modèle KI pan cellulaire : phénomènes de compensation ?

Nos résultats soulèvent néanmoins un paradoxe puisque chez les souris CMV l'expression du mutant d'internalisation P2X4mCherryIN dans toutes les cellules qui expriment nativement le récepteur P2X4 a pour conséquence une absence de phénotype qui est corroborée par un moindre impact sur la plasticité synaptique comparé aux souris CaMK2. Ces dernières présentant une expression du récepteur mutant restreinte aux neurones excitateurs uniquement, ces résultats sont très surprenants puisque que l'on aurait pu s'attendre au contraire à des effets plus marqués chez les souris CMV.

Ce phénomène peut s'expliquer par la différence de temporalité d'activation des promoteurs CMV et CaMK2. Le promoteur CMV étant un promoteur ubiquitaire précoce, l'excision génétique de l'allèle floxé P2X4mCherryIN est très précoce et se produit dès le développement embryonnaire tandis que le promoteur CaMK2 a une activité post-natale atteignant son maximum à la troisième semaine post-natale (Mayford et al., 1996). D'ailleurs dans la lignée CMV, l'excision s'effectuant dans la lignée germinale, la modification s'est transmise aux générations suivantes et nous disposons ensuite d'une lignée exprimant constitutivement P2X4mCherryIN (appelée également CMV). De ce fait, chez les souris CMV l'expression du récepteur mutant P2X4mCherryIN dès les premières phases du développement embryonnaire où l'on sait que P2X4 est exprimé (Blanchard et al., 2019) pourrait avoir des effets néfastes menant à des compensations développementales.

En outre, l'expression du récepteur mutant dans d'autres neurones ou types cellulaires comme les cellules gliales peut contrebalancer les effets de l'augmentation en surface spécifiquement au niveau des neurones excitateurs. En effet, lors de la douleur neuropathique, l'augmentation du nombre de récepteurs P2X4 à la surface de la microglie dans la ME déclenche la libération de BDNF par la microglie provoquant l'hyperexcitabilité neuronale (Coull et al., 2005; Ulmann et al., 2008). De plus, la microglie ainsi que le BDNF dans le cerveau sont connus pour influencer la plasticité synaptique et l'apprentissage (Parkhurst et al., 2013). Ceci suggère que, chez la souris CMV, l'augmentation du récepteur P2X4 à la surface de la microglie peut contrebalancer l'effet négatif sur la plasticité synaptique de l'augmentation en surface du récepteur au niveau des neurones excitateurs.

1.5. Intérêt du nouveau modèle de souris KI conditionnelles et perspectives

Ce modèle de souris KI conditionnelles permet d'exprimer un mutant d'internalisation du récepteur P2X4 de manière spécifique à un type cellulaire grâce au système Cre-Lox rendant possible l'excision de l'allèle muté par la Cre recombinase sous la dépendance d'un promoteur spécifique choisi. Dans la continuité de cette étude, afin de mieux comprendre les actions de l'augmentation en surface du récepteur P2X4 spécifiquement dans la microglie et d'élucider les phénomènes de compensations éventuelles, des souris KI conditionnelles sous l'influence d'un promoteur spécifique des cellules myéloïdes, comme le CD11b ou CXCR3, pourraient être utilisées.

La génération de ce nouveau modèle de souris KI conditionnelles défectueuses pour l'internalisation du récepteur P2X4, constitue un outil précieux qui permettra de mieux comprendre le rôle du récepteur P2X4 dans son état surexprimé en surface, non seulement dans le contexte des maladies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer, la douleur chronique, la neuroinflammation, l'épilepsie ou la SLA (Andries et al., 2007; Apolloni et al., 2009; Beggs et al., 2012; Casanovas et al., 2008; Cavaliere et al., 2003; Tsuda et al., 2003a; Ulmann et al., 2013; Varma et al., 2009; Volonte et al., 2016), mais également au niveau périphérique. En effet, le récepteur P2X4 est exprimé par plusieurs types de cellules au niveau périphérique et les souris KI conditionnelles P2X4^{mCherryIN} seront certainement d'une utilité majeure pour caractériser la signalisation découlant de l'augmentation en surface du récepteur P2X4 dans le cas d'inflammations ou d'infections aussi bien que dans la compréhension de son implication dans les fonctions pulmonaires, cardiaques ou hépatiques où il joue un rôle clé (Chen et al., 2016; Gonzales et al., 2010; Hafner et al., 2017; Pettengill et al., 2012; Yang et al., 2014).

2. Le modèle de souris KI comme outil pour l'étude du rôle du récepteur P2X4 dans la physiopathologie de la SLA

2.1. Génération de modèles double-transgéniques à partir du modèle de souris KI

Durant ma thèse nous avons utilisé le nouveau modèle de souris KI conditionnelle pan cellulaire que nous avons caractérisé pour étudier l'implication du récepteur P2X4 dans la pathogénèse de la SLA qui reste à l'heure actuelle incompris (Andries et al., 2007; Casanovas et al., 2008; D'Ambrosi et al., 2009; Hernandez et al., 2010). Deux modèles de souris double-transgéniques innovants ont été générés en croisant des souris surexprimant la mutation humaine SOD1-G93A (SOD1) avec soit les souris KI (P2X4KI), soit des souris délétés pour le gène du récepteur P2X4 (P2X4KO) (Sim et al., 2006).

2.2. Dualité du rôle du récepteur P2X4 dans la SLA ?

De manière inattendue nous avons montré que l'ablation du récepteur P2X4 ainsi que l'augmentation du nombre de récepteurs à la surface avaient des effets bénéfiques sur les performances motrices et la survie des animaux démontrant clairement que le récepteur P2X4 est un acteur clé dans la physiopathologie de la SLA, bien que son rôle semble complexe.

De manière intéressante, des travaux antérieurs ont déjà reporté des effets opposés de l'activation du récepteur P2X4 sur des MNs en culture en fonction des concentrations d'ATP, avec un effet protecteur de la potentialisation par l'IVM du récepteur P2X4 en présence de faibles concentrations d'ATP alors que de fortes concentrations d'ATP étaient délétères (Andries et al., 2007). De plus, ces travaux ont montré que l'IVM augmentait sensiblement la durée de vie des souris SOD1 lorsqu'elle était administrée dès le stade présymptomatique (Andries et al., 2007) dû à la potentialisation fonctionnelle des récepteurs P2X4 (Silberberg et al., 2007; Toulme et al., 2006). Cette dualité d'action du récepteur P2X4 en fonction des concentrations d'ATP *in vitro* pourrait être transposée *in vivo* dans notre modèle SOD1:P2X4KI puisque dans la pathologie, les concentrations d'ATP extracellulaires augmentent au cours du temps, et la surexpression précoce du récepteur P2X4 en surface pourrait retarder la progression de la maladie de manière similaire à l'administration d'IVM présymptomatique. De la même manière, un rôle double du récepteur P2X7, majoritairement microglial, a été reporté dans les modèles SOD1 (Apolloni et al., 2013a; Apolloni et al., 2014). Effectivement, l'ablation constitutive et précoce du récepteur P2X7 chez la souris SOD1 est délétère (Apolloni et al.,

2013a) alors que l'inhibition pharmacologique du récepteur au stade symptomatique (P100) est bénéfique (Apolloni et al., 2014). Les actions opposées des récepteurs P2X4 suivant la fenêtre de temps (Andries et al., 2007; Apolloni et al., 2013a; Apolloni et al., 2014) pourraient correspondre à une augmentation progressive de la concentration d'ATP provoquée par la lyse neuronale et/ou par une augmentation de la libération d'ATP induite par la réactivité microgliale et l'astrogliose durant la SLA (Appel et al., 2011; Beers et al., 2011; Liao et al., 2012). Une interaction croisée entre la signalisation des récepteurs P2X4 et P2X7 au niveau de la microglie pourrait également être envisagée. En effet, dans les macrophages murins, une implication du récepteur P2X4 dans la régulation des fonctions inflammatoires médiées par le récepteur P2X7 a précédemment été démontrée (Kawano et al., 2012a).

Nos résultats d'immunohistochimie utilisant des anticorps spécifiques confirment l'augmentation d'expression du récepteur P2X4 au cours de la SLA précédemment reportée (Casanovas et al., 2008), cependant nos résultats montrent une augmentation d'expression au niveau de la microglie et non des MN dégénérés. Les mêmes auteurs ont découvert que l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale du récepteur P2X4 utilisé dans leur étude était également capable de reconnaître la protéine SOD1 mutée mal repliée qui ressemble au domaine C-terminal de P2X4 (Hernandez et al., 2010). Cela suggérerait également que les marquages obtenus pouvaient ne pas être spécifique de P2X4 et révéler non pas une augmentation de l'expression de P2X4 dans les MN mais uniquement une augmentation des formes mal conformées des protéines SOD1 mutées. Nos résultats suggèrent que la cinétique d'expression du récepteur P2X4 au cours de la progression de la SLA est importante, ce qui pourrait expliquer les effets bénéfiques inattendus de l'augmentation en surface pan cellulaire du récepteur P2X4 sur les performances motrices et la survie observées chez les souris SOD1:P2X4KI qui ne reproduisent pas la cinétique d'expression du récepteur. Afin de mieux comprendre les fonctions physiopathologiques cellule-spécifiques ainsi que la dynamique du récepteur P2X4 au cours de la SLA, des souris P2X4KI conditionnelles Cre-inductibles exprimant le mutant d'internalisation du récepteur uniquement dans les cellules myéloïdes, dans les neurones ou les MN grâce à l'expression de la Cre sous la dépendance d'un promoteur CD11b, Synapsin ou ChAT respectivement pourrait être créées. L'utilisation de souris Cre inductibles pourrait également être utile pour définir la période d'action bénéfique par rapport à la période d'action délétère du récepteur P2X4 augmenté en surface au cours de la pathogenèse de la SLA.

Nos résultats préliminaires visant à déterminer l'impact du récepteur P2X4 dans la neuroinflammation associée à la SLA ont montré que l'augmentation en surface du récepteur P2X4 chez les souris SOD1:P2X4KI diminue l'expression des marqueurs d'inflammation au stade présymptomatique par rapport aux souris SOD1 mais l'augmente à partir du stade symptomatique, et l'absence de récepteur P2X4 chez les souris SOD1:P2X4KO diminue l'expression des marqueurs d'inflammation à tous les stades de la maladie. Ces résultats tendent à confirmer le rôle bénéfique des récepteurs P2X4 lorsqu'ils sont inhibés ou surexprimés en surface au stade présymptomatique qui devient délétère à partir de la phase symptomatique, en adéquation avec le rôle bénéfique versus délétère de la microglie dans la SLA et le rôle double du récepteur P2X4 en fonction des concentrations d'ATP précédemment rapportées.

2.3. Phénomène de compensation dans le modèle SOD1:P2X4KI ?

Une autre possibilité pouvant expliquer les résultats surprenant retrouvés chez le modèle SOD1:P2X4KI est la mise en place de phénomènes de compensations dû à l'expression pan cellulaire du mutant d'internalisation du récepteur P2X4 précédemment décrits ici (1.4. Limites du modèle KI pan cellulaire : phénomène de compensation). En effet, le modèle CMV utilisé dans cette étude pour la génération du modèle double transgénique SOD1:P2X4KI n'avait pas reproduit les résultats obtenus avec la souris exprimant le mutant d'internalisation spécifiquement dans les neurones excitateurs (CaMK2) au niveau des fonctions synaptiques et mnésiques, certainement à cause de compensations développementales dues à l'activité précoce et ubiquitaire du promoteur CMV. Dans ce cas, des souris KI conditionnelles Cre-spécifiques comme décrit précédemment pourraient être utilisées.

2.4. Rôle intracellulaire du P2X4 altéré dans les modèles SOD1:P2X4KO et SOD1:P2X4KI ?

L'effet similaire surprenant retrouvé chez les modèles SOD1:P2X4KO et SOD1:P2X4KI au niveau des performances motrices et de la survie pourrait également s'expliquer par le fait que l'ablation ainsi que l'augmentation en surface du récepteur P2X4 diminue les stocks intracellulaires de récepteurs P2X4. En effet, de récents travaux ont montré que les récepteurs P2X4 intracellulaires peuvent être fonctionnels et avoir un rôle physiologique en contribuant à la fusion des vésicules endolysosomales (Cao et al., 2015; Murrell-Lagnado and Frick, 2019) (Fois et al., 2018; Miklavc et al., 2011; Thompson et al., 2013). La SLA est une maladie multifactorielle complexe qui peut impliquer des dysfonctions de l'autophagie et des voies endolysosomales (Sullivan et al., 2016) et une diminution du nombre de récepteur P2X4

intracellulaire jouant sur la fusion endolysosomale pourrait donc avoir un impact. Cependant cette hypothèse semble peu plausible car dans toutes nos expériences de validation des modèles P2X4KI, si l'on observe une augmentation significative du nombre de récepteurs P2X4mCherryIN, nous observons également qu'un très grand nombre de récepteurs sont encore intracellulaires indiquant que la modification de l'adressage de surface ne semble pas affecter significativement le nombre de récepteurs présents dans les compartiments intracellulaires. Toutefois, pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer les fractions de P2X4 et P2X4mCherryIN localisés dans les endosomes et lysosomes par immuno-marquages de P2X4 et des marqueurs de ces compartiments Lamp1 et Lamp2.

2.5. Augmentation en surface du récepteur P2X4 dans les modèles SOD1 et mécanisme impliqué

Un résultat important de cette étude a été d'observer, en plus de la surexpression du récepteur P2X4 dans la microglie, l'augmentation du récepteur en surface des macrophages péritonéaux chez les souris SOD1 au cours de la progression de la SLA, et ce dès le stade présymptomatique. Cette augmentation d'expression *de novo* et/ou en surface du récepteur a été reportée dans de nombreuses pathologies du SNC au niveau des neurones et/ou de la microglie (Beggs et al., 2012; Burnstock, 2008; Casanovas et al., 2008; Cavaliere et al., 2003; Ulmann et al., 2010a; Varma et al., 2009).

Les macrophages péritonéaux sont intéressants pour cette étude du fait que ce sont des cellules natives en suspension permettant d'isoler la fraction de protéines de surface par biotinylation et dans lesquelles une forte expression du récepteur P2X4 est présente même en conditions basales (Csoka et al., 2018; Layhadi et al., 2018; Suurvali et al., 2017), qui sont de plus impliqués dans la pathogénèse de la SLA (Graber et al., 2010; Liu et al., 2012; Mammana et al., 2018; Van Dyke et al., 2016). Il serait intéressant de compléter les résultats obtenus à partir des macrophages péritonéaux natifs en quantifiant l'expression de surface du récepteur P2X4 au sein de la microglie et/ou des MN de la ME des souris SOD1 de même qu'en étudiant sa fonction, afin de vérifier si l'augmentation en surface du récepteur dans les modèles SOD1 s'effectue également au niveau de ces cellules. Par exemple, des cultures primaires de microglie spinale, dans laquelle a été observée une forte augmentation de l'expression du récepteur P2X4 chez les souris SOD1, pourraient être réalisées pour procéder à la biotinylation et la quantification de l'expression du récepteur P2X4 de surface *versus* totale au cours de la maladie. Des expériences de *patch-clamp* ou d'imagerie calcique sont aussi réalisables à partir

de cultures primaires de microglie pour étudier la fonction du récepteur à différents stades de la maladie, cependant il est difficile d'isoler le récepteur P2X4 parmi les autres sous-types lors d'une stimulation avec un agoniste. La culture primaire de MN adultes est beaucoup plus difficile du fait de la fragilité des neurones en culture.

L'augmentation en surface du récepteur P2X4 a également été observée *in vitro* en parallèle de la potentialisation de sa fonction en présence de différentes protéines SOD1 mutées impliquées dans la SLA suggérant que ce phénomène pourrait être étendu à plusieurs types de SLA. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de tester l'impact de l'expression hétérologue des protéines mutées TDP-43 ou FUS, retrouvées dans la SLA, sur la fonction et le trafic du récepteur P2X4.

De manière intéressante, nos analyses de co-immunoprécipitation et de *pull-down* ont confirmé l'hypothèse de départ d'une interaction compétitive de la protéine SOD1 mal conformée ressemblant au domaine d'internalisation du récepteur P2X4 avec AP2, compromettant l'internalisation constitutive du récepteur P2X4, avec une exacerbation de ce phénomène au cours de la progression de la maladie, qui pourrait expliquer l'augmentation du trafic de surface du récepteur P2X4 au cours de la SLA. Par la suite il serait intéressant de tester ces interactions dans d'autres modèles de SLA comme TDP-43 ou FUS pour étendre le mécanisme.

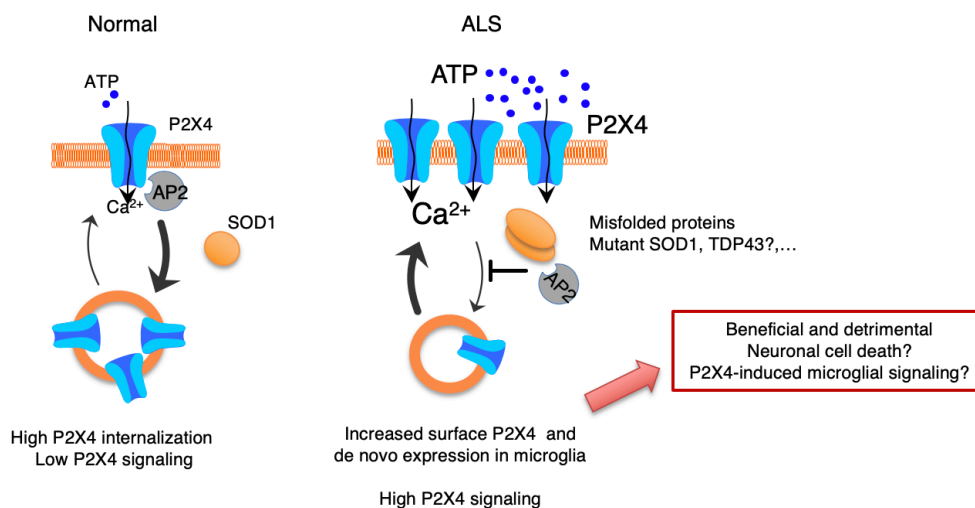


Figure 13: Résumé schématique du mécanisme de l'augmentation en surface du récepteur P2X4 et ses conséquences dans les modèles de SLA. Dans des conditions normales, P2X4 est constitutivement endocyté par la liaison d'AP2 sur son domaine d'internalisation C-terminal et son expression est faible et limitée au MN dans la ME. Au cours de la progression de la SLA, des protéines mutantes mal repliées comme SOD1, TDP-43 ou FUS interfèrent avec l'internalisation de P2X4 en faisant concurrence pour l'interaction d'AP2, ce qui entraîne une augmentation de la densité de récepteurs P2X4 en surface dans plusieurs types de cellules en plus de l'expression *de novo* de P2X4 dans la microglie spinale activée, contribuant à la neuroinflammation et à la mort des MN qui lui est associée.

2.6. Le récepteur P2X4 comme biomarqueur précoce et cible thérapeutique de la SLA ?

De manière très intéressante, l'augmentation du trafic en surface du récepteur P2X4 observée au niveau des macrophages péritonéaux dans des modèles SOD1 bien avant l'apparition des symptômes moteurs, suggère que le récepteur P2X4 dans les cellules périphériques peut représenter un biomarqueur précoce de la maladie. En effet, P2X4 étant exprimé dans les macrophages et monocytes humain (Layhadi and Fountain, 2017; Layhadi et al., 2018), à partir de prélèvements sanguins réalisés chez des patients et suite à l'isolation des monocytes qui sont les précurseurs des macrophages, la quantification du ratio de récepteurs P2X4 en surface *versus* total pourrait être effectuée par cytométrie en flux après marquage des récepteurs P2X4 de surface et intracellulaire. Il est important de prendre en charge les patients le plus précocement possible de manière à appréhender au mieux la maladie bien qu'aucun traitement curatif n'existe à ce jour. Trouver des biomarqueurs précoces de la SLA reste donc un des challenges dans le domaine de la SLA et l'évaluation de l'augmentation de la densité des récepteurs P2X4 en surface pourrait témoigner d'une SLA dès les stades précoces. L'altération de l'expression des microARN, qui sont des régulateurs traductionnels permettant d'éteindre l'expression d'un gène, peut témoigner d'une SLA (Hoye et al., 2017; Ricci et al., 2018; Taga and Maragakis, 2018) et à l'heure actuelle, un nouveau candidat miR-218, jouant un rôle crucial dans la différenciation des neurones moteurs, montrant une expression augmentée dans les modèles de SLA (Hoye et al., 2017) et détectable dans le plasma et le LCR de patients, est apparu récemment comme biomarqueur potentiel pour le diagnostic précoce de la SLA, mais reste encore à l'essai (Garcia et al., 2018). La présence de la NfL et la pNfH du neurofilament dans le sérum et le LCR sont également recherchés comme facteur pronostic de la maladie (Taga and Maragakis, 2018; Turner, 2018).

De plus, la preuve d'un rôle actif du récepteur P2X4 dans la progression de la SLA chez nos animaux témoigne que le récepteur P2X4 pourrait constituer une potentielle cible thérapeutique clé et son inhibition ou sa potentialisation ainsi que le blocage de son internalisation dans une fenêtre de temps propice pourrait améliorer les symptômes et la durée de vie des patients. Au niveau pharmacologique, deux antagonistes sélectifs du récepteur P2X4 humain ont récemment été développés (Ase et al., 2015; Hernandez-Olmos et al., 2012) et l'IVM permet de potentialiser de manière spécifique la fonction du récepteur P2X4 (Priel and Silberberg, 2004). Plus récemment, des *nanobodies*, qui sont des anticorps de lamés de petite taille capables de reconnaître des épitopes enfouis dans les protéines natives, ont été développés et ont permis

d'inhiber la fonction du récepteur P2X7 améliorant ainsi l'inflammation (Danquah et al., 2016). Dans cette étude des *nanobodies* potentialisant la fonction du récepteur P2X7 ont également été générés. Des *nanobodies* ont été développés contre la partie extracellulaire du récepteur P2X4 (Bertin et al., 2020a) cependant leur action sur la fonction du récepteur n'est pas encore déterminée. Il serait intéressant de développer de tels *nanobodies* impactant l'ouverture du canal comme pour le récepteur P2X7 ou un autre domaine inhibant ou potentialisant la fonction du récepteur P2X4.

3. Conclusion

La signalisation purinergique, mise en place très tôt dans l'évolution, représente la voie majeure de signalisation au sein de l'organisme et contrôle de multiples fonctions. Une altération de celle-ci a été reportée dans de nombreuses pathologies, avec une implication importante des récepteurs P2X à l'ATP. Cependant le rôle précis et le mécanisme d'action des récepteurs purinergiques dans ces pathologies restent à être approfondis. En effet, la pharmacologie des récepteurs P2X disponible à l'heure actuelle est peu spécifique et ne permet pas de discriminer aisément les différents sous-types entre eux. Jusqu'à lors, seuls des modèles de souris KO généraux ont été créés pour l'étude spécifique de l'impact des récepteurs P2X dans une fonction ou une pathologie (Bian et al., 2003; Cockayne et al., 2005; Cockayne et al., 2000; Inscho et al., 2004; Le Feuvre et al., 2003; Sim et al., 2006; Solle et al., 2001) mais aucun modèle ne permettait de potentialiser spécifiquement leur fonction.

La génération, validation et caractérisation d'un nouveau modèle de souris KI conditionnelle au sein du laboratoire mimant l'augmentation pathologique en surface du récepteur P2X4 de manière cellule-spécifique a servi à la génération de nouveaux modèles de souris double-transgéniques qui ont permis de mieux comprendre le rôle du récepteur P2X4 dans la physiopathologie multifactorielle de la SLA mis en évidence dans de précédentes études (Andries et al., 2007; Casanovas et al., 2008; D'Ambrosi et al., 2009; Hernandez et al., 2010). Ces souris KI représenteront un outil innovant permettant d'explorer les rôles du récepteur P2X4 dans différents types cellulaires de manière ciblée dans de nombreux autres contextes pathologiques qu'ils soient centraux ou périphériques.

BIBLIOGRAPHIE

A

Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., *et al.* (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26, 1276-1284.

Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., and Weisman, G.A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58, 281-341.

Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32, 19-29.

Abbracchio, M.P., and Ceruti, S. (2007). P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal* 3, 13-25.

Aby, F., Whitestone, S., Landry, M., Ulmann, L., and Fossat, P. (2018). Inflammatory-induced spinal dorsal horn neurons hyperexcitability is mediated by P2X4 receptors. *Pain Rep* 3, e660.

Acevedo-Arozena, A., Kalmar, B., Essa, S., Ricketts, T., Joyce, P., Kent, R., Rowe, C., Parker, A., Gray, A., Hafezparast, M., *et al.* (2011). A comprehensive assessment of the SOD1G93A low-copy transgenic mouse, which models human amyotrophic lateral sclerosis. *Dis Model Mech* 4, 686-700.

Ackerley, S., Grierson, A.J., Brownlees, J., Thornhill, P., Anderton, B.H., Leigh, P.N., Shaw, C.E., and Miller, C.C. (2000). Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *J Cell Biol* 150, 165-176.

Acsadi, G., Anguelov, R.A., Yang, H., Toth, G., Thomas, R., Jani, A., Wang, Y., Ianakova, E., Mohammad, S., Lewis, R.A., and Shy, M.E. (2002). Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Hum Gene Ther* 13, 1047-1059.

Acuna-Castillo, C., Morales, B., and Huidobro-Toro, J.P. (2000). Zinc and copper modulate differentially the P2X4 receptor. *J Neurochem* 74, 1529-1537.

Adencreutz, M., and Hau, J. (2004). Studies of neonatal and juvenile neuromuscular locomotor development of C57BL/6/Bkl, 129SvEv/Bkl and F1 hybrid mice in swim tests. *In Vivo* 18, 733-737.

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

BIBLIOGRAPHIE

- Agboh, K.C., Webb, T.E., Evans, R.J., and Ennion, S.J. (2004). Functional characterization of a P2X receptor from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 279, 41650-41657.
- Agresti, C., Meomartini, M.E., Amadio, S., Ambrosini, E., Volonte, C., Aloisi, F., and Visentin, S. (2005). ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 157-165.
- Alami, N.H., Smith, R.B., Carrasco, M.A., Williams, L.A., Winborn, C.S., Han, S.S.W., Kiskinis, E., Winborn, B., Freibaum, B.D., Kanagaraj, A., *et al.* (2014). Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* 81, 536-543.
- Albalawi, F., Lu, W., Beckel, J.M., Lim, J.C., McCaughey, S.A., and Mitchell, C.H. (2017). The P2X7 Receptor Primes IL-1beta and the NLRP3 Inflammasome in Astrocytes Exposed to Mechanical Strain. *Front Cell Neurosci* 11, 227.
- Alexander, G.M., Erwin, K.L., Byers, N., Deitch, J.S., Augelli, B.J., Blankenhorn, E.P., and Heiman-Patterson, T.D. (2004). Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Brain Res Mol Brain Res* 130, 7-15.
- Alexianu, M.E., Kozovska, M., and Appel, S.H. (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57, 1282-1289.
- Allen, M.J., Lacroix, J.J., Ramachandran, S., Capone, R., Whitlock, J.L., Ghadge, G.D., Arnsdorf, M.F., Roos, R.P., and Lal, R. (2012). Mutant SOD1 forms ion channel: implications for ALS pathophysiology. *Neurobiol Dis* 45, 831-838.
- Allsopp, R.C., and Evans, R.J. (2011). The intracellular amino terminus plays a dominant role in desensitization of ATP-gated P2X receptor ion channels. *J Biol Chem* 286, 44691-44701.
- Alonso, A., Logroscino, G., and Hernan, M.A. (2010). Smoking and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 1249-1252.
- Alsultan, A.A., Waller, R., Heath, P.R., and Kirby, J. (2016). The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* 6, 49-64.
- Alves, M., Beamer, E., and Engel, T. (2018). The Metabotropic Purinergic P2Y Receptor Family as Novel Drug Target in Epilepsy. *Front Pharmacol* 9, 193.
- Amadio, S., Montilli, C., Picconi, B., Calabresi, P., and Volonte, C. (2007). Mapping P2X and P2Y receptor proteins in striatum and substantia nigra: An immunohistological study. *Purinergic Signal* 3, 389-398.
- Amendola, J., and Durand, J. (2008). Morphological differences between wild-type and transgenic superoxide dismutase 1 lumbar motoneurons in postnatal mice. *J Comp Neurol* 511, 329-341.

BIBLIOGRAPHIE

Amendola, J., Verrier, B., Roubertoux, P., and Durand, J. (2004). Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20, 2822-2826.

Amores-Iniesta, J., Barbera-Cremades, M., Martinez, C.M., Pons, J.A., Revilla-Nuin, B., Martinez-Alarcon, L., Di Virgilio, F., Parrilla, P., Baroja-Mazo, A., and Pelegrin, P. (2017). Extracellular ATP Activates the NLRP3 Inflammasome and Is an Early Danger Signal of Skin Allograft Rejection. *Cell Rep* 21, 3414-3426.

Andersen, P.M., and Al-Chalabi, A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 7, 603-615.

Andersson, K.E. (2015). Mechanisms of ATP release--future therapeutic targets? *BJU Int* 115, 850-851.

Andries, M., Van Damme, P., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2007). Ivermectin inhibits AMPA receptor-mediated excitotoxicity in cultured motor neurons and extends the life span of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 25, 8-16.

Andrus, P.K., Fleck, T.J., Gurney, M.E., and Hall, E.D. (1998). Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 71, 2041-2048.

Anggono, V., and Huganir, R.L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 22, 461-469.

Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., and Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15, 961-973.

Antonio, L.S., Stewart, A.P., Varanda, W.A., and Edwardson, J.M. (2014). Identification of P2X2/P2X4/P2X6 heterotrimeric receptors using atomic force microscopy (AFM) imaging. *FEBS Lett* 588, 2125-2128.

Antonioli, L., Blandizzi, C., Fornai, M., Pacher, P., Lee, H.T., and Hasko, G. (2019). P2X4 receptors, immunity, and sepsis. *Curr Opin Pharmacol* 47, 65-74.

Apolloni, S., Amadio, S., Montilli, C., Volonte, C., and D'Ambrosi, N. (2013a). Ablation of P2X7 receptor exacerbates gliosis and motoneuron death in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 22, 4102-4116.

Apolloni, S., Amadio, S., Parisi, C., Matteucci, A., Potenza, R.L., Armida, M., Popoli, P., D'Ambrosi, N., and Volonte, C. (2014). Spinal cord pathology is ameliorated by P2X7 antagonism in a SOD1-mutant mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Dis Model Mech* 7, 1101-1109.

Apolloni, S., Montilli, C., Finocchi, P., and Amadio, S. (2009). Membrane compartments and purinergic signalling: P2X receptors in neurodegenerative and neuroinflammatory events. *FEBS J* 276, 354-364.

BIBLIOGRAPHIE

- Apolloni, S., Parisi, C., Pesaresi, M.G., Rossi, S., Carri, M.T., Cozzolino, M., Volonte, C., and D'Ambrosi, N. (2013b). The NADPH oxidase pathway is dysregulated by the P2X7 receptor in the SOD1-G93A microglia model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Immunol* 190, 5187-5195.
- Appel, S.H., Zhao, W., Beers, D.R., and Henkel, J.S. (2011). The microglial-motoneuron dialogue in ALS. *Acta Myol* 30, 4-8.
- Appel, V., Stewart, S.S., Smith, G., and Appel, S.H. (1987). A rating scale for amyotrophic lateral sclerosis: description and preliminary experience. *Ann Neurol* 22, 328-333.
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., and Oda, T. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 602-611.
- Asatryan, L., Nam, H.W., Lee, M.R., Thakkar, M.M., Saeed Dar, M., Davies, D.L., and Choi, D.S. (2011). Implication of the purinergic system in alcohol use disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 35, 584-594.
- Asatryan, L., Popova, M., Perkins, D., Trudell, J.R., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2010). Ivermectin antagonizes ethanol inhibition in purinergic P2X4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 334, 720-728.
- Asatryan, L., Popova, M., Woodward, J.J., King, B.F., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2008). Roles of ectodomain and transmembrane regions in ethanol and agonist action in purinergic P2X2 and P2X3 receptors. *Neuropharmacology* 55, 835-843.
- Aschrafi, A., Sadtler, S., Niculescu, C., Rettinger, J., and Schmalzing, G. (2004). Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J Mol Biol* 342, 333-343.
- Ase, A.R., Bernier, L.P., Blais, D., Pankratov, Y., and Seguela, P. (2010). Modulation of heteromeric P2X1/5 receptors by phosphoinositides in astrocytes depends on the P2X1 subunit. *J Neurochem* 113, 1676-1684.
- Ase, A.R., Honson, N.S., Zaghdane, H., Pfeifer, T.A., and Seguela, P. (2015). Identification and characterization of a selective allosteric antagonist of human P2X4 receptor channels. *Mol Pharmacol* 87, 606-616.
- Atanasio, A., Decman, V., White, D., Ramos, M., Ikiz, B., Lee, H.C., Siao, C.J., Brydges, S., LaRosa, E., Bai, Y., *et al.* (2016). C9orf72 ablation causes immune dysregulation characterized by leukocyte expansion, autoantibody production, and glomerulonephropathy in mice. *Sci Rep* 6, 23204.
- Ayna, G., Krysko, D.V., Kaczmarek, A., Petrovski, G., Vandenabeele, P., and Fesus, L. (2012). ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages. *PLoS One* 7, e40069.

Azzouz, M., Ralph, G.S., Storkebaum, E., Walmsley, L.E., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M., Carmeliet, P., and Mazarakis, N.D. (2004). VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429, 413-417.

B

Babin, P.J., Goizet, C., and Raldua, D. (2014). Zebrafish models of human motor neuron diseases: advantages and limitations. *Prog Neurobiol* 118, 36-58.

Balazs, L., and Leon, M. (1994). Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem Res* 19, 1131-1137.

Bankston, L.A., and Guidotti, G. (1996). Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *J Biol Chem* 271, 17132-17138.

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

Barrera, N.P., Henderson, R.M., Murrell-Lagnado, R.D., and Edwardson, J.M. (2007). The stoichiometry of P2X₂/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels. *Biophys J* 93, 505-512.

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

Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267-284.

Bataveljic, D., Stamenkovic, S., Bacic, G., and Andjus, P.R. (2011). Imaging cellular markers of neuroinflammation in the brain of the rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Physiol Hung* 98, 27-31.

Baude, A., Nusser, Z., Molnar, E., McIlhinney, R.A., and Somogyi, P. (1995). High-resolution immunogold localization of AMPA type glutamate receptor subunits at synaptic and non-synaptic sites in rat hippocampus. *Neuroscience* 69, 1031-1055.

Bavan, S., Straub, V.A., Blaxter, M.L., and Ennion, S.J. (2009). A P2X receptor from the tardigrade species *Hypsibius dujardini* with fast kinetics and sensitivity to zinc and copper. *BMC Evol Biol* 9, 17.

Baxter, A.W., Choi, S.J., Sim, J.A., and North, R.A. (2011). Role of P2X₄ receptors in synaptic strengthening in mouse CA1 hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 34, 213-220.

Beal, M.F. (1998). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1366, 211-223.

BIBLIOGRAPHIE

- Beamer, E., Goloncser, F., Horvath, G., Beko, K., Otrókocsi, L., Kovanyi, B., and Sperlagh, B. (2016). Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology* 104, 94-104.
- Bean, B.P. (1990). ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: concentration dependence and kinetics. *J Neurosci* 10, 1-10.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A.A., Siklos, L., McKercher, S.R., and Appel, S.H. (2006). Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16021-16026.
- Beers, D.R., Zhao, W., Liao, B., Kano, O., Wang, J., Huang, A., Appel, S.H., and Henkel, J.S. (2011). Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice. *Brain Behav Immun* 25, 1025-1035.
- Beggs, S., Trang, T., and Salter, M.W. (2012). P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nat Neurosci* 15, 1068-1073.
- Benatar, M. (2007). Lost in translation: treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. *Neurobiol Dis* 26, 1-13.
- Bendotti, C., Calvaresi, N., Chiveri, L., Prella, A., Moggio, M., Braga, M., Silani, V., and De Biasi, S. (2001). Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *J Neurol Sci* 191, 25-33.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 330, 585-591.
- Bergeron, C., Beric-Maskarel, K., Muntasser, S., Weyer, L., Somerville, M.J., and Percy, M.E. (1994). Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 221-230.
- Bernier, L.P., Ase, A.R., Chevallier, S., Blais, D., Zhao, Q., Boue-Grabot, E., Logothetis, D., and Seguela, P. (2008a). Phosphoinositides regulate P2X4 ATP-gated channels through direct interactions. *J Neurosci* 28, 12938-12945.
- Bernier, L.P., Ase, A.R., and Seguela, P. (2013). Post-translational regulation of P2X receptor channels: modulation by phospholipids. *Front Cell Neurosci* 7, 226.
- Bernier, L.P., Ase, A.R., and Seguela, P. (2018). P2X receptor channels in chronic pain pathways. *Br J Pharmacol* 175, 2219-2230.
- Bernier, L.P., Ase, A.R., Tong, X., Hamel, E., Blais, D., Zhao, Q., Logothetis, D.E., and Seguela, P. (2008b). Direct modulation of P2X1 receptor-channels by the lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Mol Pharmacol* 74, 785-792.
- Bernier, L.P., Blais, D., Boue-Grabot, E., and Seguela, P. (2012). A dual polybasic motif determines phosphoinositide binding and regulation in the P2X channel family. *PLoS One* 7, e40595.

BIBLIOGRAPHIE

- Bertin, E., Deluc, T., Pilch, K.S., Martinez, A., Pougnet, J.T., Doudnikoff, E., Allain, A.E., Bergmann, P., Russeau, M., Toulme, E., *et al.* (2020a). Increased surface P2X4 receptor regulates anxiety and memory in P2X4 internalization-defective knock-in mice. *Mol Psychiatry*.
- Bertin, E., Martinez, A., and Boue-Grabot, E. (2020b). P2X Electrophysiology and Surface Trafficking in *Xenopus* Oocytes. *Methods Mol Biol* 2041, 243-259.
- Besnard, A., Gautherot, J., Julien, B., Tebbi, A., Garcin, I., Doignon, I., Pean, N., Gonzales, E., Cassio, D., Grosse, B., *et al.* (2016). The P2X4 purinergic receptor impacts liver regeneration after partial hepatectomy in mice through the regulation of biliary homeostasis. *Hepatology* 64, 941-953.
- Bhattacharya, A., Lord, B., Grigoleit, J.S., He, Y., Fraser, I., Campbell, S.N., Taylor, N., Aluisio, L., O'Connor, J.C., Papp, M., *et al.* (2018). Neuropsychopharmacology of JNJ-55308942: evaluation of a clinical candidate targeting P2X7 ion channels in animal models of neuroinflammation and anhedonia. *Neuropsychopharmacology* 43, 2586-2596.
- Bhattacharya, S., Verrill, D.S., Carbone, K.M., Brown, S., Yule, D.I., and Giovannucci, D.R. (2012). Distinct contributions by ionotropic purinoceptor subtypes to ATP-evoked calcium signals in mouse parotid acinar cells. *J Physiol* 590, 2721-2737.
- Bian, X., Ren, J., DeVries, M., Schnegelsberg, B., Cockayne, D.A., Ford, A.P., and Galligan, J.J. (2003). Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit. *J Physiol* 551, 309-322.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171, 603-614.
- Blanchard, C., Boue-Grabot, E., and Masse, K. (2019). Comparative Embryonic Spatio-Temporal Expression Profile Map of the *Xenopus* P2X Receptor Family. *Front Cell Neurosci* 13, 340.
- Blasco, H., Corcia, P., Pradat, P.F., Bocca, C., Gordon, P.H., Veyrat-Durebex, C., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Moreau, C., Devos, D., *et al.* (2013). Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry. *J Proteome Res* 12, 3746-3754.
- Blasco, H., Guennoc, A.M., Veyrat-Durebex, C., Gordon, P.H., Andres, C.R., Camu, W., and Corcia, P. (2012). Amyotrophic lateral sclerosis: a hormonal condition? *Amyotroph Lateral Scler* 13, 585-588.
- Blijham, P.J., Schelhaas, H.J., Ter Laak, H.J., van Engelen, B.G., and Zwarts, M.J. (2007). Early diagnosis of ALS: the search for signs of denervation in clinically normal muscles. *J Neurol Sci* 263, 154-157.
- Blokhuis, A.M., Groen, E.J., Koppers, M., van den Berg, L.H., and Pasterkamp, R.J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 125, 777-794.

BIBLIOGRAPHIE

- Bo, X., Jiang, L.H., Wilson, H.L., Kim, M., Burnstock, G., Surprenant, A., and North, R.A. (2003). Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Mol Pharmacol* 63, 1407-1416.
- Bobanovic, L.K., Royle, S.J., and Murrell-Lagnado, R.D. (2002). P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* 22, 4814-4824.
- Boillee, S., Vande Velde, C., and Cleveland, D.W. (2006a). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52, 39-59.
- Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006b). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 1389-1392.
- Borchelt, D.R., Davis, J., Fischer, M., Lee, M.K., Slunt, H.H., Ratovitsky, T., Regard, J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., and Price, D.L. (1996). A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genet Anal* 13, 159-163.
- Bories, C., Amendola, J., Lamotte d'Incamps, B., and Durand, J. (2007a). Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 25, 451-459.
- Bories, C., Amendola, J.M.d.b.w.-t.a.t.s.d.l.m.i.p.m., Lamotte d'Incamps, B., and Durand, J. (2007b). Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 25, 451-459.
- Bortolato, M., Yardley, M.M., Khoja, S., Godar, S.C., Asatryan, L., Finn, D.A., Alkana, R.L., Louie, S.G., and Davies, D.L. (2013). Pharmacological insights into the role of P2X4 receptors in behavioural regulation: lessons from ivermectin. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 1059-1070.
- Bos, I.W., Hoogland, G., Meine Jansen, C.F., Willigen, G., Spierenburg, H.A., van den Berg, L.H., and de Graan, P.N. (2006). Increased glutamine synthetase but normal EAAT2 expression in platelets of ALS patients. *Neurochem Int* 48, 306-311.
- Bosco, D.A., Lemay, N., Ko, H.K., Zhou, H., Burke, C., Kwiatkowski, T.J., Jr., Sapp, P., McKenna-Yasek, D., Brown, R.H., Jr., and Hayward, L.J. (2010). Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum Mol Genet* 19, 4160-4175.
- Boue-Grabot, E., Archambault, V., and Seguela, P. (2000). A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J Biol Chem* 275, 10190-10195.
- Boue-Grabot, E., Barajas-Lopez, C., Chakfe, Y., Blais, D., Belanger, D., Emerit, M.B., and Seguela, P. (2003). Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *J Neurosci* 23, 1246-1253.

BIBLIOGRAPHIE

Boue-Grabot, E., Emerit, M.B., Toulme, E., Seguela, P., and Garret, M. (2004a). Cross-talk and co-trafficking between rho1/GABA receptors and ATP-gated channels. *J Biol Chem* 279, 6967-6975.

Boue-Grabot, E., and Pankratov, Y. (2017). Modulation of Central Synapses by Astrocyte-Released ATP and Postsynaptic P2X Receptors. *Neural Plast* 2017, 9454275.

Boué-Grabot, E., and Pankratov, Y. (2017). Modulation of Central Synapses by Astrocyte-Released ATP and Postsynaptic P2X Receptors. In *Neural Plast*, p. 9454275.

Boue-Grabot, E., Toulme, E., Emerit, M.B., and Garret, M. (2004b). Subunit-specific coupling between gamma-aminobutyric acid type A and P2X2 receptor channels. *J Biol Chem* 279, 52517-52525.

Boumechache, M., Masin, M., Edwardson, J.M., Gorecki, D.C., and Murrell-Lagnado, R. (2009). Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells. *J Biol Chem* 284, 13446-13454.

Bourke, S.C., Tomlinson, M., Williams, T.L., Bullock, R.E., Shaw, P.J., and Gibson, G.J. (2006). Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 5, 140-147.

Bowling, A.C., Schulz, J.B., Brown, R.H., Jr., and Beal, M.F. (1993). Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 61, 2322-2325.

Bowser, D.N., and Khakh, B.S. (2007). Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *J Gen Physiol* 129, 485-491.

Bozzoni, V., Pansarasa, O., Diamanti, L., Nosari, G., Cereda, C., and Ceroni, M. (2016). Amyotrophic lateral sclerosis and environmental factors. *Funct Neurol* 31, 7-19.

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

Bresch, S., Delmont, E., Soriani, M.H., and Desnuelle, C. (2014). [Electrodiagnostic criteria for early diagnosis of bulbar-onset ALS: a comparison of El Escorial, revised El Escorial and Awaji algorithm]. *Rev Neurol (Paris)* 170, 134-139.

Brone, B., Moechars, D., Marrannes, R., Mercken, M., and Meert, T. (2007). P2X currents in peritoneal macrophages of wild type and P2X4 $-/-$ mice. *Immunol Lett* 113, 83-89.

Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M., Munsat, T.L., and World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron, D. (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1, 293-299.

Brooks, K.J., Hill, M.D., Hockings, P.D., and Reid, D.G. (2004). MRI detects early hindlimb muscle atrophy in Gly93Ala superoxide dismutase-1 (G93A SOD1) transgenic mice, an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *NMR Biomed* 17, 28-32.

BIBLIOGRAPHIE

- Brown, D.A., and Yule, D.I. (2010). Protein kinase A regulation of P2X(4) receptors: requirement for a specific motif in the C-terminus. *Biochim Biophys Acta* 1803, 275-287.
- Brown, R.H., Jr., and Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 377, 1602.
- Brown, S.G., Townsend-Nicholson, A., Jacobson, K.A., Burnstock, G., and King, B.F. (2002). Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 673-680.
- Browne, L.E., Compan, V., Bragg, L., and North, R.A. (2013). P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *J Neurosci* 33, 3557-3566.
- Browne, L.E., Nunes, J.P., Sim, J.A., Chudasama, V., Bragg, L., Caddick, S., and North, R.A. (2014). Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 521-526.
- Brujin, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L., and Cleveland, D.W. (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18, 327-338.
- Brujin, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., and Cleveland, D.W. (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281, 1851-1854.
- Brujin, L.I., Miller, T.M., and Cleveland, D.W. (2004). Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27, 723-749.
- Buell, G., Lewis, C., Collo, G., North, R.A., and Surprenant, A. (1996). An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J* 15, 55-62.
- Buratti, E., and Baralle, F.E. (2008). Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front Biosci* 13, 867-878.
- Burberry, A., Suzuki, N., Wang, J.Y., Moccia, R., Mordes, D.A., Stewart, M.H., Suzuki-Uematsu, S., Ghosh, S., Singh, A., Merkle, F.T., *et al.* (2016). Loss-of-function mutations in the C9ORF72 mouse ortholog cause fatal autoimmune disease. *Sci Transl Med* 8, 347ra393.
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24, 509-581.
- Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptors (New York: Raven Press).
- Burnstock, G. (2006a). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27, 166-176.
- Burnstock, G. (2006b). Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S172-181.

BIBLIOGRAPHIE

- Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87, 659-797.
- Burnstock, G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7, 575-590.
- Burnstock, G. (2016). An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. *Neuropharmacology* 104, 4-17.
- Burnstock, G. (2017a). Purinergic Signalling and Neurological Diseases: An Update. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 16, 257-265.
- Burnstock, G. (2017b). Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol* 8, 661.
- Burnstock, G., and Di Virgilio, F. (2013). Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal* 9, 491-540.
- Burnstock, G., and Holman, M.E. (1962). Spontaneous potential at sympathetic nerve endings in smooth muscle. *J Physiol* 160, 446-460.
- Burnstock, G., and Verkhratsky, A. (2010). Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis* 1, e9.
- Butovsky, O., Siddiqui, S., Gabriely, G., Lanser, A.J., Dake, B., Murugaiyan, G., Doykan, C.E., Wu, P.M., Gali, R.R., Iyer, L.K., *et al.* (2012). Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *J Clin Invest* 122, 3063-3087.
- Butt, A.M. (2011). ATP: a ubiquitous gliotransmitter integrating neuron-glia networks. *Semin Cell Dev Biol* 22, 205-213.

C

- Camu, W., Khoris, J., Moulard, B., Salachas, F., Briolotti, V., Rouleau, G.A., and Meininger, V. (1999). Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. French ALS Research Group. *J Neurol Sci* 165 Suppl 1, S21-26.
- Canas, P.M., Porciuncula, L.O., Cunha, G.M., Silva, C.G., Machado, N.J., Oliveira, J.M., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2009). Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 29, 14741-14751.
- Cao, L., Broomhead, H.E., Young, M.T., and North, R.A. (2009). Polar residues in the second transmembrane domain of the rat P2X2 receptor that affect spontaneous gating, unitary conductance, and rectification. *J Neurosci* 29, 14257-14264.

BIBLIOGRAPHIE

- Cao, L., Young, M.T., Broomhead, H.E., Fountain, S.J., and North, R.A. (2007). Thr339-to-serine substitution in rat P2X2 receptor second transmembrane domain causes constitutive opening and indicates a gating role for Lys308. *J Neurosci* 27, 12916-12923.
- Cao, Q., Zhao, K., Zhong, X.Z., Zou, Y., Yu, H., Huang, P., Xu, T.L., and Dong, X.P. (2014). SLC17A9 protein functions as a lysosomal ATP transporter and regulates cell viability. *J Biol Chem* 289, 23189-23199.
- Cao, Q., Zhong, X.Z., Zou, Y., Murrell-Lagnado, R., Zhu, M.X., and Dong, X.P. (2015). Calcium release through P2X4 activates calmodulin to promote endolysosomal membrane fusion. *J Cell Biol* 209, 879-894.
- Carri, M.T., and Cozzolino, M. (2011). SOD1 and mitochondria in ALS: a dangerous liaison. *J Bioenerg Biomembr* 43, 593-599.
- Carriedo, S.G., Yin, H.Z., and Weiss, J.H. (1996). Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci* 16, 4069-4079.
- Carvalho, K., Faivre, E., Pietrowski, M.J., Marques, X., Gomez-Murcia, V., Deleau, A., Huin, V., Hansen, J.N., Kozlov, S., Danis, C., *et al.* (2019). Exacerbation of C1q dysregulation, synaptic loss and memory deficits in tau pathology linked to neuronal adenosine A2A receptor. *Brain*.
- Casanovas, A., Hernandez, S., Tarabal, O., Rossello, J., and Esquerda, J.E. (2008). Strong P2X4 purinergic receptor-like immunoreactivity is selectively associated with degenerating neurons in transgenic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* 506, 75-92.
- Casas-Pruneda, G., Reyes, J.P., Perez-Flores, G., Perez-Cornejo, P., and Arreola, J. (2009). Functional interactions between P2X4 and P2X7 receptors from mouse salivary epithelia. *J Physiol* 587, 2887-2901.
- Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de Leon, A., Robinson, K.M., Mason, R.P., Beckman, J.S., Barbeito, L., and Radi, R. (2008). Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci* 28, 4115-4122.
- Cavaliere, F., Florenzano, F., Amadio, S., Fusco, F.R., Viscomi, M.T., D'Ambrosi, N., Vacca, F., Sancesario, G., Bernardi, G., Molinari, M., and Volonte, C. (2003). Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience* 120, 85-98.
- Cekic, C., and Linden, J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 16, 177-192.
- Cham, J.L., Owens, N.C., Barden, J.A., Lawrence, A.J., and Badoer, E. (2006). P2X purinoceptor subtypes on paraventricular nucleus neurones projecting to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Exp Physiol* 91, 403-411.

BIBLIOGRAPHIE

Charcot, J.M., Joffroy, A. (1869). 'Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière'. *Archives de physiologie normale et pathologique*, 2, 744-760.

Chaumont, S., Compan, V., Toulme, E., Richler, E., Housley, G.D., Rassendren, F., and Khakh, B.S. (2008). Regulation of P2X2 receptors by the neuronal calcium sensor VILIP1. *Sci Signal* 1, ra8.

Chaumont, S., Jiang, L.H., Penna, A., North, R.A., and Rassendren, F. (2004). Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem* 279, 29628-29638.

Chekeni, F.B., Elliott, M.R., Sandilos, J.K., Walk, S.F., Kinchen, J.M., Lazarowski, E.R., Armstrong, A.J., Penuela, S., Laird, D.W., Salvesen, G.S., *et al.* (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467, 863-867.

Chen, H., Xia, Q., Feng, X., Cao, F., Yu, H., Song, Y., and Ni, X. (2016). Effect of P2X4R on airway inflammation and airway remodeling in allergic airway challenge in mice. *Mol Med Rep* 13, 697-704.

Cheng, C.W., Lin, M.J., and Shen, C.K. (2015). Rapamycin alleviates pathogenesis of a new *Drosophila* model of ALS-TDP. *J Neurogenet* 29, 59-68.

Chessell, I.P., Hatcher, J.P., Bountra, C., Michel, A.D., Hughes, J.P., Green, P., Egerton, J., Murfin, M., Richardson, J., Peck, W.L., *et al.* (2005). Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114, 386-396.

Chio, A., Logroscino, G., Traynor, B.J., Collins, J., Simeone, J.C., Goldstein, L.A., and White, L.A. (2013). Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology* 41, 118-130.

Chiu, A.Y., Zhai, P., Dal Canto, M.C., Peters, T.M., Kwon, Y.W., Prattis, S.M., and Gurney, M.E. (1995). Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 6, 349-362.

Choi, C.I., Lee, Y.D., Gwag, B.J., Cho, S.I., Kim, S.S., and Suh-Kim, H. (2008). Effects of estrogen on lifespan and motor functions in female hSOD1 G93A transgenic mice. *J Neurol Sci* 268, 40-47.

Cieslak, M., Roszek, K., and Wujak, M. (2019). Purinergic implication in amyotrophic lateral sclerosis-from pathological mechanisms to therapeutic perspectives. *Purinergic Signal* 15, 1-15.

Cleveland, D.W., and Rothstein, J.D. (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2, 806-819.

Clyne, J.D., Wang, L.F., and Hume, R.I. (2002). Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J Neurosci* 22, 3873-3880.

BIBLIOGRAPHIE

- Cockayne, D.A., Dunn, P.M., Zhong, Y., Rong, W., Hamilton, S.G., Knight, G.E., Ruan, H.Z., Ma, B., Yip, P., Nunn, P., *et al.* (2005). P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol* 567, 621-639.
- Cockayne, D.A., Hamilton, S.G., Zhu, Q.M., Dunn, P.M., Zhong, Y., Novakovic, S., Malmberg, A.B., Cain, G., Berson, A., Kassotakis, L., *et al.* (2000). Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407, 1011-1015.
- Coddou, C., Acuna-Castillo, C., Bull, P., and Huidobro-Toro, J.P. (2007). Dissecting the facilitator and inhibitor allosteric metal sites of the P2X4 receptor channel: critical roles of CYS132 for zinc potentiation and ASP138 for copper inhibition. *J Biol Chem* 282, 36879-36886.
- Coddou, C., Morales, B., Gonzalez, J., Grauso, M., Gordillo, F., Bull, P., Rassendren, F., and Huidobro-Toro, J.P. (2003). Histidine 140 plays a key role in the inhibitory modulation of the P2X4 nucleotide receptor by copper but not zinc. *J Biol Chem* 278, 36777-36785.
- Coddou, C., Stojilkovic, S.S., and Huidobro-Toro, J.P. (2011a). Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Rev Neurosci* 22, 335-354.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J.P., and Stojilkovic, S.S. (2011b). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* 63, 641-683.
- Colonna, M., and Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 35, 441-468.
- Comley, L.H., Nijssen, J., Frost-Nylen, J., and Hedlund, E. (2016). Cross-disease comparison of amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy reveals conservation of selective vulnerability but differential neuromuscular junction pathology. *J Comp Neurol* 524, 1424-1442.
- Compan, V., Ulmann, L., Stelmashenko, O., Chemin, J., Chaumont, S., and Rassendren, F. (2012). P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J Neurosci* 32, 4284-4296.
- Conforti, L., Adalbert, R., and Coleman, M.P. (2007). Neuronal death: where does the end begin? *Trends Neurosci* 30, 159-166.
- Cook, S.P., and McCleskey, E.W. (2002). Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain* 95, 41-47.
- Corcia, P., Tauber, C., Vercoullie, J., Arlicot, N., Prunier, C., Praline, J., Nicolas, G., Venel, Y., Hommet, C., Baulieu, J.L., *et al.* (2012). Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7, e52941.
- Coull, J.A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017-1021.

BIBLIOGRAPHIE

- Coutinho-Silva, R., Stahl, L., Raymond, M.N., Jungas, T., Verbeke, P., Burnstock, G., Darville, T., and Ojcius, D.M. (2003). Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity* 19, 403-412.
- Crews, F.T., Morrow, A.L., Criswell, H., and Breese, G. (1996). Effects of ethanol on ion channels. *Int Rev Neurobiol* 39, 283-367.
- Cronin, S., Hardiman, O., and Traynor, B.J. (2007). Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology* 68, 1002-1007.
- Csoka, B., Nemeth, Z.H., Szabo, I., Davies, D.L., Varga, Z.V., Paloczi, J., Falzoni, S., Di Virgilio, F., Muramatsu, R., Yamashita, T., *et al.* (2018). Macrophage P2X4 receptors augment bacterial killing and protect against sepsis. *JCI Insight* 3.
- Csoka, B., Nemeth, Z.H., Toro, G., Idzko, M., Zech, A., Koscsó, B., Spolarics, Z., Antonioli, L., Cseri, K., Erdelyi, K., *et al.* (2015). Extracellular ATP protects against sepsis through macrophage P2X7 purinergic receptors by enhancing intracellular bacterial killing. *FASEB J* 29, 3626-3637.
- Cunha, R.A. (2008). [Caffeine, adenosine receptors, memory and Alzheimer disease]. *Med Clin (Barc)* 131, 790-795.
- Cunha, R.A., Milusheva, E., Vizi, E.S., Ribeiro, J.A., and Sebastiao, A.M. (1994). Excitatory and inhibitory effects of A1 and A2A adenosine receptor activation on the electrically evoked [3H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. *J Neurochem* 63, 207-214.
- ## D
- D'Ambrosi, N., Finocchi, P., Apolloni, S., Cozzolino, M., Ferri, A., Padovano, V., Pietrini, G., Carri, M.T., and Volonte, C. (2009). The proinflammatory action of microglial P2 receptors is enhanced in SOD1 models for amyotrophic lateral sclerosis. *J Immunol* 183, 4648-4656.
- Dadon-Nachum, M., Melamed, E., and Offen, D. (2011). The "dying-back" phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci* 43, 470-477.
- Dal Canto, M.C., and Gurney, M.E. (1994). Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 145, 1271-1279.
- Dal Canto, M.C., and Gurney, M.E. (1997). A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 93, 537-550.
- Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.

BIBLIOGRAPHIE

- Danquah, W., Meyer-Schwesinger, C., Rissiek, B., Pinto, C., Serracant-Prat, A., Amadi, M., Iacenda, D., Knop, J.H., Hammel, A., Bergmann, P., *et al.* (2016). Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med* 8, 366ra162.
- Daoud, H., Valdmanis, P.N., Kabashi, E., Dion, P., Dupre, N., Camu, W., Meininger, V., and Rouleau, G.A. (2009). Contribution of TARDBP mutations to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Genet* 46, 112-114.
- Dare, E., Schulte, G., Karovic, O., Hammarberg, C., and Fredholm, B.B. (2007). Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol Behav* 92, 15-20.
- Daube, J.R. (2000). Electrodiagnostic studies in amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders. *Muscle Nerve* 23, 1488-1502.
- Davies, D.L., Kochegarov, A.A., Kuo, S.T., Kulkarni, A.A., Woodward, J.J., King, B.F., and Alkana, R.L. (2005). Ethanol differentially affects ATP-gated P2X(3) and P2X(4) receptor subtypes expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuropharmacology* 49, 243-253.
- Davies, D.L., Machu, T.K., Guo, Y., and Alkana, R.L. (2002). Ethanol sensitivity in ATP-gated P2X receptors is subunit dependent. *Alcohol Clin Exp Res* 26, 773-778.
- De Carvalho, M., Dengler, R., Eisen, A., England, J.D., Kaji, R., Kimura, J., Mills, K., Mitsumoto, H., Nodera, H., Shefner, J., and Swash, M. (2008). Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol* 119, 497-503.
- De Vos, K.J., Chapman, A.L., Tennant, M.E., Manser, C., Tudor, E.L., Lau, K.F., Brownlee, J., Ackerley, S., Shaw, P.J., McLoughlin, D.M., *et al.* (2007). Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet* 16, 2720-2728.
- De Vos, K.J., Grierson, A.J., Ackerley, S., and Miller, C.C. (2008). Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 31, 151-173.
- Deitch, J.S., Alexander, G.M., Bensinger, A., Yang, S., Jiang, J.T., and Heiman-Patterson, T.D. (2014). Phenotype of transgenic mice carrying a very low copy number of the mutant human G93A superoxide dismutase-1 gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 9, e99879.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., *et al.* (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245-256.
- Delestree, N., Manuel, M., Iglesias, C., Elbasiouny, S.M., Heckman, C.J., and Zytnicki, D. (2014). Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 592, 1687-1703.
- Delzor, A., Couratier, P., Boumediene, F., Nicol, M., Druet-Cabanac, M., Paraf, F., Mejean, A., Ploux, O., Leleu, J.P., Brient, L., *et al.* (2014). Searching for a link between the L-BMAA

BIBLIOGRAPHIE

neurotoxin and amyotrophic lateral sclerosis: a study protocol of the French BMAALS programme. *BMJ Open* 4, e005528.

Deng, H.X., Shi, Y., Furukawa, Y., Zhai, H., Fu, R., Liu, E., Gorrie, G.H., Khan, M.S., Hung, W.Y., Bigio, E.H., *et al.* (2006). Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7142-7147.

Denlinger, L.C., Fisette, P.L., Sommer, J.A., Watters, J.J., Prabhu, U., Dubyak, G.R., Proctor, R.A., and Bertics, P.J. (2001). Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 167, 1871-1876.

Denlinger, L.C., Sommer, J.A., Parker, K., Gudipaty, L., Fisette, P.L., Watters, J.W., Proctor, R.A., Dubyak, G.R., and Bertics, P.J. (2003). Mutation of a dibasic amino acid motif within the C terminus of the P2X7 nucleotide receptor results in trafficking defects and impaired function. *J Immunol* 171, 1304-1311.

Devlin, A.C., Burr, K., Borooh, S., Foster, J.D., Cleary, E.M., Geti, I., Vallier, L., Shaw, C.E., Chandran, S., and Miles, G.B. (2015). Human iPSC-derived motoneurons harbouring TARDBP or C9ORF72 ALS mutations are dysfunctional despite maintaining viability. *Nat Commun* 6, 5999.

Devoy, A., Kalmar, B., Stewart, M., Park, H., Burke, B., Noy, S.J., Redhead, Y., Humphrey, J., Lo, K., Jaeger, J., *et al.* (2017). Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in 'FUSDelta14' knockin mice. *Brain* 140, 2797-2805.

Di Giorgio, F.P., Boulting, G.L., Bobrowicz, S., and Eggan, K.C. (2008). Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell* 3, 637-648.

Di Giorgio, F.P., Carrasco, M.A., Siao, M.C., Maniatis, T., and Eggan, K. (2007). Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10, 608-614.

Di Virgilio, F., and Adinolfi, E. (2017). Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* 36, 293-303.

Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A.C., Giuliani, A.L., and Falzoni, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 47, 15-31.

Di Virgilio, F., and Sarti, A.C. (2018). Microglia P2X4 receptors as pharmacological targets for demyelinating diseases. *EMBO Mol Med* 10.

Di Virgilio, F., Schmalzing, G., and Markwardt, F. (2018). The Elusive P2X7 Macropore. *Trends Cell Biol* 28, 392-404.

Dickinson, M.E., Flenniken, A.M., Ji, X., Teboul, L., Wong, M.D., White, J.K., Meehan, T.F., Weninger, W.J., Westerberg, H., Adissu, H., *et al.* (2016). High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature* 537, 508-514.

BIBLIOGRAPHIE

- Dimitriadi, M., Kye, M.J., Kalloo, G., Yersak, J.M., Sahin, M., and Hart, A.C. (2013). The neuroprotective drug riluzole acts via small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels to ameliorate defects in spinal muscular atrophy models. *J Neurosci* 33, 6557-6562.
- Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., *et al.* (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-1221.
- Ding, S., and Sachs, F. (1999). Single channel properties of P2X₂ purinoceptors. *J Gen Physiol* 113, 695-720.
- Dixon, S.J., Yu, R., Panupinthu, N., and Wilson, J.X. (2004). Activation of P₂ nucleotide receptors stimulates acid efflux from astrocytes. *Glia* 47, 367-376.
- Doble, A. (1996). The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 47, S233-241.
- Domercq, M., and Matute, C. (2019). Targeting P2X₄ and P2X₇ receptors in multiple sclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 47, 119-125.
- Donnelly-Roberts, D., McGaraughty, S., Shieh, C.C., Honore, P., and Jarvis, M.F. (2008). Painful purinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 324, 409-415.
- Dosch, M., Gerber, J., Jebbawi, F., and Beldi, G. (2018). Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells. *Int J Mol Sci* 19.
- Dou, Y., Wu, H.J., Li, H.Q., Qin, S., Wang, Y.E., Li, J., Lou, H.F., Chen, Z., Li, X.M., Luo, Q.M., and Duan, S. (2012). Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Res* 22, 1022-1033.
- Dukkipati, S.S., Garrett, T.L., and Elbasiouny, S.M. (2018). The vulnerability of spinal motoneurons and soma size plasticity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 596, 1723-1745.
- Dunlop, J., Beal McIlvain, H., She, Y., and Howland, D.S. (2003). Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 23, 1688-1696.
- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.L., Oudart, H., de Tapia, M., Barbeito, L., and Loeffler, J.P. (2004). Mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis: a trigger and a target. *Neurodegener Dis* 1, 245-254.
- Dupuis, L., Rene, F., Di Scala, F., Gonzalez De Aguilar, J.L., De Tapia, M., and Loeffler, J.P. (2002). Denervation is not a primary cause of prion protein down-regulation occurring in the spinal cord of a transgenic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 973, 116-119.
- Durand, J., Amendola, J., Bories, C., and Lamotte d'Incamps, B. (2006). Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol Paris* 99, 211-220.

E

Ecke, D., Hanck, T., Tulapurkar, M.E., Schafer, R., Kassack, M., Stricker, R., and Reiser, G. (2008). Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor. *Biochem J* 409, 107-116.

Edwards, F.A., Gibb, A.J., and Colquhoun, D. (1992). ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359, 144-147.

Edwards, F.A., Robertson, S.J., and Gibb, A.J. (1997). Properties of ATP receptor-mediated synaptic transmission in the rat medial habenula. *Neuropharmacology* 36, 1253-1268.

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

Eickhorst, A.N., Berson, A., Cockayne, D., Lester, H.A., and Khakh, B.S. (2002). Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. *J Gen Physiol* 120, 119-131.

Eisen, A., Kim, S., and Pant, B. (1992). Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve* 15, 219-224.

Eisen, A., and Weber, M. (2001). The motor cortex and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 24, 564-573.

Elam, J.S., Taylor, A.B., Strange, R., Antonyuk, S., Doucette, P.A., Rodriguez, J.A., Hasnain, S.S., Hayward, L.J., Valentine, J.S., Yeates, T.O., and Hart, P.J. (2003). Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS. *Nat Struct Biol* 10, 461-467.

Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Tramont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., *et al.* (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461, 282-286.

Eltzschig, H.K., and Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* 17, 1391-1401.

Emerit, M.B., Baranowski, C., Diaz, J., Martinez, A., Areias, J., Alterio, J., Masson, J., Boue-Grabot, E., and Darmon, M. (2016). A New Mechanism of Receptor Targeting by Interaction between Two Classes of Ligand-Gated Ion Channels. *J Neurosci* 36, 1456-1470.

Engl, E., and Attwell, D. (2015). Non-signalling energy use in the brain. *J Physiol* 593, 3417-3429.

Ennion, S., Hagan, S., and Evans, R.J. (2000). The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *J Biol Chem* 275, 35656.

BIBLIOGRAPHIE

- Ennion, S.J., and Evans, R.J. (2001). Agonist-stimulated internalisation of the ligand-gated ion channel P2X(1) in rat vas deferens. *FEBS Lett* 489, 154-158.
- Ennion, S.J., and Evans, R.J. (2002a). Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol* 61, 303-311.
- Ennion, S.J., and Evans, R.J. (2002b). P2X(1) receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 611-616.
- Erb, L., Cao, C., Ajit, D., and Weisman, G.A. (2015). P2Y receptors in Alzheimer's disease. *Biol Cell* 107, 1-21.
- Erb, L., Liu, J., Ockerhausen, J., Kong, Q., Garrad, R.C., Griffin, K., Neal, C., Krugh, B., Santiago-Perez, L.I., Gonzalez, F.A., *et al.* (2001). An RGD sequence in the P2Y(2) receptor interacts with alpha(V)beta(3) integrins and is required for G(o)-mediated signal transduction. *J Cell Biol* 153, 491-501.
- Erb, L., Woods, L.T., Khalafalla, M.G., and Weisman, G.A. (2019). Purinergic signaling in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 151, 25-37.
- Estes, M.L., and McAllister, A.K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science* 353, 772-777.
- Evans, R.J., Derkach, V., and Surprenant, A. (1992). ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357, 503-505.
- Evans, R.J., Lewis, C., Virginio, C., Lundstrom, K., Buell, G., Surprenant, A., and North, R.A. (1996). Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol* 497 (Pt 2), 413-422.
- Ezzi, S.A., Urushitani, M., and Julien, J.P. (2007). Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J Neurochem* 102, 170-178.

F

- Fabbrizio, P., Amadio, S., Apolloni, S., and Volonte, C. (2017). P2X7 Receptor Activation Modulates Autophagy in SOD1-G93A Mouse Microglia. *Front Cell Neurosci* 11, 249.
- Fairbairn, I.P., Stober, C.B., Kumararatne, D.S., and Lammas, D.A. (2001). ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *J Immunol* 167, 3300-3307.
- Fan, J., Yu, L.H., Zhang, Y., Ni, X., Ma, B., and Burnstock, G. (2009). Estrogen altered visceromotor reflex and P2X(3) mRNA expression in a rat model of colitis. *Steroids* 74, 956-962.

BIBLIOGRAPHIE

- Farg, M.A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J.M., Yang, S., Atkinson, R.A., Levina, V., Halloran, M.A., Gleeson, P.A., Blair, I.P., Soo, K.Y., *et al.* (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet* 23, 3579-3595.
- Feiguin, F., Godena, V.K., Romano, G., D'Ambrogio, A., Klima, R., and Baralle, F.E. (2009). Depletion of TDP-43 affects *Drosophila* motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. *FEBS Lett* 583, 1586-1592.
- Fellin, T., Pascual, O., and Haydon, P.G. (2006). Astrocytes coordinate synaptic networks: balanced excitation and inhibition. *Physiology (Bethesda)* 21, 208-215.
- Fernagut, P.O., Diguët, E., Stefanova, N., Biran, M., Wenning, G.K., Canioni, P., Bioulac, B., and Tison, F. (2002). Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: behavioural and histopathological characterisation. *Neuroscience* 114, 1005-1017.
- Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A.J., Sendtner, M., and Shaw, P.J. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 7, 616-630.
- Ferrini, F., Trang, T., Mattioli, T.A., Laffray, S., Del'Guidice, T., Lorenzo, L.E., Castonguay, A., Doyon, N., Zhang, W., Godin, A.G., *et al.* (2013). Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl⁻ homeostasis. *Nat Neurosci* 16, 183-192.
- Fields, R.D., and Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7, 423-436.
- Figlewicz, D.A., Krizus, A., Martinoli, M.G., Meiningner, V., Dib, M., Rouleau, G.A., and Julien, J.P. (1994). Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 3, 1757-1761.
- Finkelstein, A., Kunis, G., Seksenyan, A., Ronen, A., Berkutzki, T., Azoulay, D., Koronyo-Hamaoui, M., and Schwartz, M. (2011). Abnormal changes in NKT cells, the IGF-1 axis, and liver pathology in an animal model of ALS. *PLoS One* 6, e22374.
- Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., and Glass, J.D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185, 232-240.
- Fischer, L.R., Li, Y., Asress, S.A., Jones, D.P., and Glass, J.D. (2012). Absence of SOD1 leads to oxidative stress in peripheral nerve and causes a progressive distal motor axonopathy. *Exp Neurol* 233, 163-171.
- Fischer, W., and Krugel, U. (2007). P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr Med Chem* 14, 2429-2455.
- Fischer, W., Zadori, Z., Kullnick, Y., Groger-Arndt, H., Franke, H., Wirkner, K., Illes, P., and Mager, P.P. (2007). Conserved lysin and arginin residues in the extracellular loop of P2X(3) receptors are involved in agonist binding. *Eur J Pharmacol* 576, 7-17.

BIBLIOGRAPHIE

- Fiske, C.H.S., Y. (1929). Phosphorus compounds of muscle and liver. *Science*.
- Fitzmaurice, P.S., Shaw, I.C., Kleiner, H.E., Miller, R.T., Monks, T.J., Lau, S.S., Mitchell, J.D., and Lynch, P.G. (1996). Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 19, 797-798.
- Flament, D., Goldsmith, P., Buckley, C.J., and Lemon, R.N. (1993). Task dependence of responses in first dorsal interosseous muscle to magnetic brain stimulation in man. *J Physiol* 464, 361-378.
- Flood, D.G., Reaume, A.G., Gruner, J.A., Hoffman, E.K., Hirsch, J.D., Lin, Y.G., Dorfman, K.S., and Scott, R.W. (1999). Hindlimb motor neurons require Cu/Zn superoxide dismutase for maintenance of neuromuscular junctions. *Am J Pathol* 155, 663-672.
- Fois, G., Winkelmann, V.E., Bareis, L., Staudenmaier, L., Hecht, E., Ziller, C., Ehinger, K., Schymeinsky, J., Kranz, C., and Frick, M. (2018). ATP is stored in lamellar bodies to activate vesicular P2X4 in an autocrine fashion upon exocytosis. *J Gen Physiol* 150, 277-291.
- Forsberg, K., Andersen, P.M., Marklund, S.L., and Brannstrom, T. (2011). Glial nuclear aggregates of superoxide dismutase-1 are regularly present in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 121, 623-634.
- Franke, H., and Illes, P. (2006). Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther* 109, 297-324.
- Franke, H., Krugel, U., Grosche, J., Heine, C., Hartig, W., Allgaier, C., and Illes, P. (2004). P2Y receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 127, 431-441.
- Franklin, K.M., Asatryan, L., Jakowec, M.W., Trudell, J.R., Bell, R.L., and Davies, D.L. (2014). P2X4 receptors (P2X4Rs) represent a novel target for the development of drugs to prevent and/or treat alcohol use disorders. *Front Neurosci* 8, 176.
- Franklin, K.M., Hauser, S.R., Lasek, A.W., Bell, R.L., and McBride, W.J. (2015). Involvement of Purinergic P2X4 Receptors in Alcohol Intake of High-Alcohol-Drinking (HAD) Rats. *Alcohol Clin Exp Res* 39, 2022-2031.
- Fredholm, B.B., Chern, Y., Franco, R., and Sitkovsky, M. (2007). Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog Neurobiol* 83, 263-276.
- Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., and Caroni, P. (2000). Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 20, 2534-2542.
- Fryatt, A.G., Dayl, S., Cullis, P.M., Schmid, R., and Evans, R.J. (2016). Mechanistic insights from resolving ligand-dependent kinetics of conformational changes at ATP-gated P2X1R ion channels. *Sci Rep* 6, 32918.
- Fujiwara, Y., Keceli, B., Nakajo, K., and Kubo, Y. (2009). Voltage- and [ATP]-dependent gating of the P2X(2) ATP receptor channel. *J Gen Physiol* 133, 93-109.

BIBLIOGRAPHIE

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

Fumagalli, M., Brambilla, R., D'Ambrosi, N., Volonte, C., Matteoli, M., Verderio, C., and Abbracchio, M.P. (2003). Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43, 218-203.

G

Gajdusek, D.C., and Salazar, A.M. (1982). Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonian syndromes in high incidence among the Auyu and Jakai people of West New Guinea. *Neurology* 32, 107-126.

Gandelman, M., Peluffo, H., Beckman, J.S., Cassina, P., and Barbeito, L. (2010). Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 7, 33.

Gao, C., Yu, Q., Xu, H., Zhang, L., Liu, J., Jie, Y., Ma, W., Samways, D.S., and Li, Z. (2015). Roles of the lateral fenestration residues of the P2X(4) receptor that contribute to the channel function and the deactivation effect of ivermectin. *Purinergic Signal* 11, 229-238.

Garcia, S.D., Costaguta, G., Taylor, A., Rodriguez, M., Pfaff, S.L., Hornstein, E., and Ravits, J. (2018). MiR-218 as a candidate of biomarker for early diagnosis of ALS. (P1.333). *Neurology* 90, P1.333.

Gardner, B.M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C.M., and Walter, P. (2013). Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a013169.

Gargiulo, S., Anzilotti, S., Coda, A.R., Gramanzini, M., Greco, A., Panico, M., Vinciguerra, A., Zannetti, A., Vicidomini, C., Dolle, F., *et al.* (2016). Imaging of brain TSPO expression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis with (18)F-DPA-714 and micro-PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 43, 1348-1359.

Garre, J.M., Retamal, M.A., Cassina, P., Barbeito, L., Bukauskas, F.F., Saez, J.C., Bennett, M.V., and Abudara, V. (2010). FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22659-22664.

Garruto, R.M., Yanagihara, R., and Gajdusek, D.C. (1985). Disappearance of high-incidence amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam. *Neurology* 35, 193-198.

Geevasinga, N., Menon, P., Ozdinler, P.H., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2016). Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat Rev Neurol* 12, 651-661.

Geloso, M.C., Corvino, V., Marchese, E., Serrano, A., Michetti, F., and D'Ambrosi, N. (2017). The Dual Role of Microglia in ALS: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front Aging Neurosci* 9, 242.

BIBLIOGRAPHIE

- George, J., Cunha, R.A., Mulle, C., and Amedee, T. (2016). Microglia-derived purines modulate mossy fibre synaptic transmission and plasticity through P2X4 and A1 receptors. *Eur J Neurosci* 43, 1366-1378.
- Gerber, Y.N., Sabourin, J.C., Hugnot, J.P., and Perrin, F.E. (2012). Unlike physical exercise, modified environment increases the lifespan of SOD1G93A mice however both conditions induce cellular changes. *PLoS One* 7, e45503.
- Gerevich, Z., and Illes, P. (2004). P2Y receptors and pain transmission. *Purinergic Signal* 1, 3-10.
- Gitcho, M.A., Baloh, R.H., Chakraverty, S., Mayo, K., Norton, J.B., Levitch, D., Hatanpaa, K.J., White, C.L., 3rd, Bigio, E.H., Caselli, R., *et al.* (2008). TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann Neurol* 63, 535-538.
- Gitler, A.D., and Tsuiji, H. (2016). There has been an awakening: Emerging mechanisms of C9orf72 mutations in FTD/ALS. *Brain Res* 1647, 19-29.
- Gomez-Tortosa, E., Gallego, J., Guerrero-Lopez, R., Marcos, A., Gil-Neciga, E., Sainz, M.J., Diaz, A., Franco-Macias, E., Trujillo-Tiebas, M.J., Ayuso, C., and Perez-Perez, J. (2013). C9ORF72 hexanucleotide expansions of 20-22 repeats are associated with frontotemporal deterioration. *Neurology* 80, 366-370.
- Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J., and Miras-Portugal, M.T. (2001). Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem* 77, 84-93.
- Gonzales, E., Julien, B., Serriere-Lanneau, V., Nicou, A., Doignon, I., Lagoudakis, L., Garcin, I., Azoulay, D., Duclos-Vallee, J.C., Castaing, D., *et al.* (2010). ATP release after partial hepatectomy regulates liver regeneration in the rat. *J Hepatol* 52, 54-62.
- Gordon, G.R., Baimoukhametova, D.V., Hewitt, S.A., Rajapaksha, W.R., Fisher, T.E., and Bains, J.S. (2005). Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci* 8, 1078-1086.
- Gordon, G.R., Iremonger, K.J., Kantevari, S., Ellis-Davies, G.C., MacVicar, B.A., and Bains, J.S. (2009). Astrocyte-mediated distributed plasticity at hypothalamic glutamate synapses. *Neuron* 64, 391-403.
- Gordon, P.H. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs* 25, 1-15.
- Gould, T.W., Buss, R.R., Vinsant, S., Prevette, D., Sun, W., Knudson, C.M., Milligan, C.E., and Oppenheim, R.W. (2006). Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26, 8774-8786.
- Gould, T.W., and Oppenheim, R.W. (2011). Motor neuron trophic factors: therapeutic use in ALS? *Brain Res Rev* 67, 1-39.

BIBLIOGRAPHIE

- Gourine, A.V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M.F., Lane, S., Teschemacher, A.G., Spyer, K.M., Deisseroth, K., and Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329, 571-575.
- Gowers, W. (1888). *A Manual of Diseases of the Nervous System: Spinal Cord and Nerves*. Churchill: London,UK,, pp. 356–338.
- Graber, D.J., Hickey, W.F., and Harris, B.T. (2010). Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 7, 8.
- Grad, L.I., and Cashman, N.R. (2014). Prion-like activity of Cu/Zn superoxide dismutase: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Prion* 8, 33-41.
- Grad, L.I., Fernando, S.M., and Cashman, N.R. (2015). From molecule to molecule and cell to cell: Prion-like mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. In *Neurobiology of Disease* (Academic Press), pp. 257-265.
- Graziano, F., Desdoutis, M., Garzetti, L., Podini, P., Alfano, M., Rubartelli, A., Furlan, R., Benaroch, P., and Poli, G. (2015). Extracellular ATP induces the rapid release of HIV-1 from virus containing compartments of human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E3265-3273.
- Gu, B.J., Zhang, W.Y., Bendall, L.J., Chessell, I.P., Buell, G.N., and Wiley, J.S. (2000). Expression of P2X(7) purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X(7) receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C1189-1197.
- Gu, J.G., and MacDermott, A.B. (1997). Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* 389, 749-753.
- Gudipaty, L., Humphreys, B.D., Buell, G., and Dubyak, G.R. (2001). Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C943-953.
- Guo, L.H., Trautmann, K., and Schluesener, H.J. (2005). Expression of P2X4 receptor by lesional activated microglia during formalin-induced inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 163, 120-127.
- Gurney, M.E. (1997). The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *J Neurol Sci* 152 Suppl 1, S67-73.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., and et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775.
- Guzman, S.J., and Gerevich, Z. (2016). P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. *Neural Plast* 2016, 1207393.

H

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

Haenggeli, C., and Kato, A.C. (2002). Differential vulnerability of cranial motoneurons in mouse models with motor neuron degeneration. *Neurosci Lett* 335, 39-43.

Hafner, S., Wagner, K., Weber, S., Groger, M., Wepler, M., McCook, O., Scheuerle, A., Stahl, B., Huber-Lang, M., Jung, B., *et al.* (2017). Role of the Purinergic Receptor P2XR4 After Blunt Chest Trauma in Cigarette Smoke-Exposed Mice. *Shock* 47, 193-199.

Haidet-Phillips, A.M., Hester, M.E., Miranda, C.J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M.J., Foust, K.D., *et al.* (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol* 29, 824-828.

Haines, W.R., Torres, G.E., Voigt, M.M., and Egan, T.M. (1999). Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms. *Mol Pharmacol* 56, 720-727.

Halassa, M.M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J.R., Lee, S.Y., Abel, T., Haydon, P.G., and Frank, M.G. (2009). Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 61, 213-219.

Hall, E.D., Oostveen, J.A., and Gurney, M.E. (1998). Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23, 249-256.

Hansen, G.H., Hosli, E., Belhage, B., Schousboe, A., and Hosli, L. (1991). Light and electron microscopic localization of GABAA-receptors on cultured cerebellar granule cells and astrocytes using immunohistochemical techniques. *Neurochem Res* 16, 341-346.

Hansen, M.R., Krabbe, S., and Novak, I. (2008). Purinergic receptors and calcium signalling in human pancreatic duct cell lines. *Cell Physiol Biochem* 22, 157-168.

Harkat, M., Peverini, L., Cerdan, A.H., Dunning, K., Beudez, J., Martz, A., Calimet, N., Specht, A., Cecchini, M., Chataigneau, T., and Grutter, T. (2017). On the permeation of large organic cations through the pore of ATP-gated P2X receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E3786-E3795.

Harris, J.J., Jolivet, R., and Attwell, D. (2012). Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75, 762-777.

Hasko, G., Linden, J., Cronstein, B., and Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7, 759-770.

BIBLIOGRAPHIE

- Hattori, M., and Gouaux, E. (2012). Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485, 207-212.
- Hausmann, R., Bodnar, M., Woltersdorf, R., Wang, H., Fuchs, M., Messemer, N., Qin, Y., Gunther, J., Riedel, T., Grohmann, M., *et al.* (2012). ATP binding site mutagenesis reveals different subunit stoichiometry of functional P2X_{2/3} and P2X_{2/6} receptors. *J Biol Chem* 287, 13930-13943.
- He, C.Z., and Hays, A.P. (2004). Expression of peripherin in ubiquitinated inclusions of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 217, 47-54.
- He, M.L., Gonzalez-Iglesias, A.E., and Stojilkovic, S.S. (2003). Role of nucleotide P2 receptors in calcium signaling and prolactin release in pituitary lactotrophs. *J Biol Chem* 278, 46270-46277.
- He, Y., Taylor, N., Fourgeaud, L., and Bhattacharya, A. (2017). The role of microglial P2X₇: modulation of cell death and cytokine release. *J Neuroinflammation* 14, 135.
- Hedlund, E., Hefferan, M.P., Marsala, M., and Isacson, O. (2007). Cell therapy and stem cells in animal models of motor neuron disorders. *Eur J Neurosci* 26, 1721-1737.
- Hedlund, E., Karlsson, M., Osborn, T., Ludwig, W., and Isacson, O. (2010). Global gene expression profiling of somatic motor neuron populations with different vulnerability identify molecules and pathways of degeneration and protection. *Brain* 133, 2313-2330.
- Hegedus, J., Putman, C.T., and Gordon, T. (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 28, 154-164.
- Heiman-Patterson, T.D., Deitch, J.S., Blankenhorn, E.P., Erwin, K.L., Perreault, M.J., Alexander, B.K., Byers, N., Toman, I., and Alexander, G.M. (2005). Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)_{1Gur} mouse model of ALS. *J Neurol Sci* 236, 1-7.
- Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Beique, J.C., Lounis, B., Rumbaugh, G., Hugarir, R.L., Cognet, L., and Choquet, D. (2008). Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 320, 201-205.
- Hensley, K., Abdel-Moaty, H., Hunter, J., Mhatre, M., Mou, S., Nguyen, K., Potapova, T., Pye, Q.N., Qi, M., Rice, H., *et al.* (2006). Primary glia expressing the G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation. *J Neuroinflammation* 3, 2.
- Hernandez, S., Casanovas, A., Piedrafita, L., Tarabal, O., and Esquerda, J.E. (2010). Neurotoxic species of misfolded SOD1G93A recognized by antibodies against the P2X₄ subunit of the ATP receptor accumulate in damaged neurons of transgenic animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 176-187.
- Hernandez-Olmos, V., Abdelrahman, A., El-Tayeb, A., Freudendahl, D., Weinhausen, S., and Muller, C.E. (2012). N-substituted phenoxazine and acridone derivatives: structure-activity relationships of potent P2X₄ receptor antagonists. *J Med Chem* 55, 9576-9588.

BIBLIOGRAPHIE

Hewett, J.A. (2009). Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J Neurochem* 110, 1717-1736.

Hickman, S.E., el Khoury, J., Greenberg, S., Schieren, I., and Silverstein, S.C. (1994). P2Z adenosine triphosphate receptor activity in cultured human monocyte-derived macrophages. *Blood* 84, 2452-2456.

Hicks, G.G., Singh, N., Nashabi, A., Mai, S., Bozek, G., Klewes, L., Arapovic, D., White, E.K., Koury, M.J., Oltz, E.M., *et al.* (2000). Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nat Genet* 24, 175-179.

Higgins, C.M., Jung, C., and Xu, Z. (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* 4, 16.

Hogaboom, G.K., O'Donnell, J.P., and Fedan, J.S. (1980). Purinergic receptors: photoaffinity analog of adenosine triphosphate is a specific adenosine triphosphate antagonist. *Science* 208, 1273-1276.

Holbird, D., Jensik, P., and Cox, T. (2001). Aldosterone upregulates purinergic responses in larval amphibian skin epithelium. *J Comp Physiol B* 171, 413-420.

Holton, P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145, 494-504.

Hooten, K.G., Beers, D.R., Zhao, W., and Appel, S.H. (2015). Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *Neurotherapeutics* (Springer), pp. 364-375.

Horvath, R.J., and DeLeo, J.A. (2009). Morphine enhances microglial migration through modulation of P2X4 receptor signaling. *J Neurosci* 29, 998-1005.

Horvath, R.J., Romero-Sandoval, E.A., and De Leo, J.A. (2010). Inhibition of microglial P2X4 receptors attenuates morphine tolerance, Iba1, GFAP and mu opioid receptor protein expression while enhancing perivascular microglial ED2. *Pain* 150, 401-413.

Housley, G.D., Morton-Jones, R., Vlajkovic, S.M., Telang, R.S., Paramanathasivam, V., Tadros, S.F., Wong, A.C., Froud, K.E., Cederholm, J.M., Sivakumaran, Y., *et al.* (2013). ATP-gated ion channels mediate adaptation to elevated sound levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7494-7499.

Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., *et al.* (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1604-1609.

Hoye, M.L., Koval, E.D., Wegener, A.J., Hyman, T.S., Yang, C., O'Brien, D.R., Miller, R.L., Cole, T., Schoch, K.M., Shen, T., *et al.* (2017). MicroRNA Profiling Reveals Marker of Motor Neuron Disease in ALS Models. *J Neurosci* 37, 5574-5586.

BIBLIOGRAPHIE

- Hoyer-Hansen, M., and Jaattela, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* 14, 1576-1582.
- Hu, X., Liou, A.K., Leak, R.K., Xu, M., An, C., Suenaga, J., Shi, Y., Gao, Y., Zheng, P., and Chen, J. (2014). Neurobiology of microglial action in CNS injuries: receptor-mediated signaling mechanisms and functional roles. *Prog Neurobiol* 119-120, 60-84.
- Hua J, B.P., Garcia de Paco A, Rassendren F, Koch-Nolte F, Ulmann L. (In press). Characterization of new mouse P2X4 antibodies recognizing the native extracellular domain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*.
- Huang, C., Zhou, H., Tong, J., Chen, H., Liu, Y.J., Wang, D., Wei, X., and Xia, X.G. (2011). FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *PLoS Genet* 7, e1002011.
- Huang, L.D., Fan, Y.Z., Tian, Y., Yang, Y., Liu, Y., Wang, J., Zhao, W.S., Zhou, W.C., Cheng, X.Y., Cao, P., *et al.* (2014a). Inherent dynamics of head domain correlates with ATP-recognition of P2X4 receptors: insights gained from molecular simulations. *PLoS One* 9, e97528.
- Huang, P., Zou, Y., Zhong, X.Z., Cao, Q., Zhao, K., Zhu, M.X., Murrell-Lagnado, R., and Dong, X.P. (2014b). P2X4 forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH. *J Biol Chem* 289, 17658-17667.
- Huganir, R.L., and Nicoll, R.A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* 80, 704-717.
- Huidobro-Toro, J.P., Lorca, R.A., and Coddou, C. (2008). Trace metals in the brain: allosteric modulators of ligand-gated receptor channels, the case of ATP-gated P2X receptors. *Eur Biophys J* 37, 301-314.
- Hung, S.C., Choi, C.H., Said-Sadier, N., Johnson, L., Atanasova, K.R., Sellami, H., Yilmaz, O., and Ojcius, D.M. (2013). P2X4 assembles with P2X7 and pannexin-1 in gingival epithelial cells and modulates ATP-induced reactive oxygen species production and inflammasome activation. *PLoS One* 8, e70210.
- I**
- Idzko, M., Ferrari, D., and Eltzschig, H.K. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509, 310-317.
- Igawa, T., Abe, Y., Tsuda, M., Inoue, K., and Ueda, T. (2015). Solution structure of the rat P2X4 receptor head domain involved in inhibitory metal binding. *FEBS Lett* 589, 680-686.
- Ilieva, E.V., Ayala, V., Jove, M., Dalfo, E., Cacabelos, D., Povedano, M., Bellmunt, M.J., Ferrer, I., Pamplona, R., and Portero-Otin, M. (2007). Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 130, 3111-3123.

BIBLIOGRAPHIE

Ilieva, H., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187, 761-772.

Illes, P., Messemer, N., & Rubini, P. (2012). P2Y receptors in neurogenesis. Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling.

Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Kasai, H., Moriishi, K., Moriyama, Y., and Koizumi, S. (2013). Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* 61, 1320-1330.

Inscho, E.W., Cook, A.K., Imig, J.D., Vial, C., and Evans, R.J. (2004). Renal autoregulation in P2X1 knockout mice. *Acta Physiol Scand* 181, 445-453.

Ito, K., Chihara, Y., Iwasaki, S., Komuta, Y., Sugawara, M., and Sahara, Y. (2010). Functional ligand-gated purinergic receptors (P2X) in rat vestibular ganglion neurons. *Hear Res* 267, 89-95.

Iyer, S.S., Pulskens, W.P., Sadler, J.J., Butter, L.M., Teske, G.J., Ulland, T.K., Eisenbarth, S.C., Florquin, S., Flavell, R.A., Leemans, J.C., and Sutterwala, F.S. (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20388-20393.

J

Jaarsma, D., Haasdijk, E.D., Grashorn, J.A., Hawkins, R., van Duijn, W., Verspaget, H.W., London, J., and Holstege, J.C. (2000). Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis* 7, 623-643.

Jaarsma, D., Rognoni, F., van Duijn, W., Verspaget, H.W., Haasdijk, E.D., and Holstege, J.C. (2001). CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol* 102, 293-305.

Jabs, R., Matthias, K., Grote, A., Grauer, M., Seifert, G., and Steinhauser, C. (2007). Lack of P2X receptor mediated currents in astrocytes and GluR type glial cells of the hippocampal CA1 region. *Glia* 55, 1648-1655.

Jacobson, K.A., and Muller, C.E. (2016). Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology* 104, 31-49.

Janssens, J., and Van Broeckhoven, C. (2013). Pathological mechanisms underlying TDP-43 driven neurodegeneration in FTL-ALS spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 22, R77-87.

Jehle, T., Bauer, J., Blauth, E., Hummel, A., Darstein, M., Freiman, T.M., and Feuerstein, T.J. (2000). Effects of riluzole on electrically evoked neurotransmitter release. *Br J Pharmacol* 130, 1227-1234.

BIBLIOGRAPHIE

- Jelinkova, I., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Zemkova, H.W., Zemkova, H., and Stojilkovic, S.S. (2008). Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Arch* 456, 939-950.
- Ji, K., Miyauchi, J., and Tsirka, S.E. (2013). Microglia: an active player in the regulation of synaptic activity. *Neural Plast* 2013, 627325.
- Jiang, J., Zhu, Q., Gendron, T.F., Saberi, S., McAlonis-Downes, M., Seelman, A., Stauffer, J.E., Jafar-Nejad, P., Drenner, K., Schulte, D., *et al.* (2016). Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron* 90, 535-550.
- Jiang, L.H., Kim, M., Spelta, V., Bo, X., Surprenant, A., and North, R.A. (2003). Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* 23, 8903-8910.
- Jiang, L.H., Rassendren, F., Spelta, V., Surprenant, A., and North, R.A. (2001). Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor. *J Biol Chem* 276, 14902-14908.
- Jiang, L.H., Rassendren, F., Surprenant, A., and North, R.A. (2000). Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem* 275, 34190-34196.
- Jiang, R., Lemoine, D., Martz, A., Taly, A., Gonin, S., Prado de Carvalho, L., Specht, A., and Grutter, T. (2011). Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9066-9071.
- Jiang, R., Taly, A., Lemoine, D., Martz, A., Cunrath, O., and Grutter, T. (2012). Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels. *EMBO J* 31, 2134-2143.
- Jo, Y.H., and Boue-Grabot, E. (2011). Interplay between ionotropic receptors modulates inhibitory synaptic strength. *Commun Integr Biol* 4, 706-709.
- Jo, Y.H., Donier, E., Martinez, A., Garret, M., Toulme, E., and Boue-Grabot, E. (2011). Cross-talk between P2X4 and gamma-aminobutyric acid, type A receptors determines synaptic efficacy at a central synapse. *J Biol Chem* 286, 19993-20004.
- Jo, Y.H., and Schlichter, R. (1999). Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* 2, 241-245.
- Joers, V., Tansey, M.G., Mulas, G., and Carta, A.R. (2017). Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Prog Neurobiol* 155, 57-75.
- Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., *et al.* (2010). Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68, 857-864.
- Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J.L., Pradat, P.F., Dupuis, L., Echaniz-Laguna, A., Muller, A., Dubourg, O., Seilhean, D., Hauw, J.J., Loeffler, J.P., and Meininger, V. (2005). Nogo

BIBLIOGRAPHIE

expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol* 57, 553-556.

Joseph, S.M., Buchakjian, M.R., and Dubyak, G.R. (2003). Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem* 278, 23331-23342.

Joyce, P.I., Fratta, P., Fisher, E.M., and Acevedo-Arozena, A. (2011). SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mamm Genome* 22, 420-448.

Juneja, T., Pericak-Vance, M.A., Laing, N.G., Dave, S., and Siddique, T. (1997). Prognosis in familial amyotrophic lateral sclerosis: progression and survival in patients with glu100gly and ala4val mutations in Cu,Zn superoxide dismutase. *Neurology* 48, 55-57.

Junger, W.G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 11, 201-212.

K

Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Vande Velde, C., Bouchard, J.P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., *et al.* (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40, 572-574.

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

Kaczmarek-Hajek, K., Zhang, J., Kopp, R., Grosche, A., Rissiek, B., Saul, A., Bruzzone, S., Engel, T., Jooss, T., Krautloher, A., *et al.* (2018). Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *Elife* 7.

Kanekura, K., Suzuki, H., Aiso, S., and Matsuoka, M. (2009). ER stress and unfolded protein response in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol* 39, 81-89.

Kanning, K.C., Kaplan, A., and Henderson, C.E. (2010). Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 33, 409-440.

Karasawa, A., Michalski, K., Mikhelzon, P., and Kawate, T. (2017). The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition. *Elife* 6.

Kaspar, B.K., Llado, J., Sherkat, N., Rothstein, J.D., and Gage, F.H. (2003). Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301, 839-842.

BIBLIOGRAPHIE

- Kasuya, G., Yamaura, T., Ma, X.B., Nakamura, R., Takemoto, M., Nagumo, H., Tanaka, E., Dohmae, N., Nakane, T., Yu, Y., *et al.* (2017). Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel. *Nat Commun* 8, 876.
- Kato, Y., Hiasa, M., Ichikawa, R., Hasuzawa, N., Kadowaki, A., Iwatsuki, K., Shima, K., Endo, Y., Kitahara, Y., Inoue, T., *et al.* (2017). Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Kawamata, H., and Manfredi, G. (2010). Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mech Ageing Dev* 131, 517-526.
- Kawano, A., Tsukimoto, M., Mori, D., Noguchi, T., Harada, H., Takenouchi, T., Kitani, H., and Kojima, S. (2012a). Regulation of P2X7-dependent inflammatory functions by P2X4 receptor in mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 420, 102-107.
- Kawano, A., Tsukimoto, M., Noguchi, T., Hotta, N., Harada, H., Takenouchi, T., Kitani, H., and Kojima, S. (2012b). Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 419, 374-380.
- Kawate, T., Michel, J.C., Birdsong, W.T., and Gouaux, E. (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460, 592-598.
- Keceli, B., and Kubo, Y. (2009). Functional and structural identification of amino acid residues of the P2X2 receptor channel critical for the voltage- and [ATP]-dependent gating. *J Physiol* 587, 5801-5818.
- Keceli, B., and Kubo, Y. (2014). Voltage- and ATP-dependent structural rearrangements of the P2X2 receptor associated with the gating of the pore. *J Physiol* 592, 4657-4676.
- Kennedy, C. (1990). P1- and P2-purinoceptor subtypes--an update. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 303, 30-50.
- Kennedy, C., and Burnstock, G. (1985). Evidence for two types of P2-purinoceptor in longitudinal muscle of the rabbit portal vein. *Eur J Pharmacol* 111, 49-56.
- Kessels, H.W., and Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61, 340-350.
- Khakh, B.S., Bao, X.R., Labarca, C., and Lester, H.A. (1999a). Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci* 2, 322-330.
- Khakh, B.S., and North, R.A. (2012). Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 76, 51-69.
- Khakh, B.S., Proctor, W.R., Dunwiddie, T.V., Labarca, C., and Lester, H.A. (1999b). Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *J Neurosci* 19, 7289-7299.

BIBLIOGRAPHIE

- Khoja, S., Shah, V., Garcia, D., Asatryan, L., Jakowec, M.W., and Davies, D.L. (2016). Role of purinergic P2X4 receptors in regulating striatal dopamine homeostasis and dependent behaviors. *J Neurochem* 139, 134-148.
- Kiaei, M., Kipiani, K., Calingasan, N.Y., Wille, E., Chen, J., Heissig, B., Rafii, S., Lorenzl, S., and Beal, M.F. (2007). Matrix metalloproteinase-9 regulates TNF-alpha and FasL expression in neuronal, glial cells and its absence extends life in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 205, 74-81.
- Kiernan, J.A., and Hudson, A.J. (1991). Changes in sizes of cortical and lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 114 (Pt 2), 843-853.
- Kim, M., Jiang, L.H., Wilson, H.L., North, R.A., and Surprenant, A. (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* 20, 6347-6358.
- Kimpel, M.W., Strother, W.N., McClintick, J.N., Carr, L.G., Liang, T., Edenberg, H.J., and McBride, W.J. (2007). Functional gene expression differences between inbred alcohol-preferring and -non-preferring rats in five brain regions. *Alcohol* 41, 95-132.
- King, A., Troakes, C., Smith, B., Nolan, M., Curran, O., Vance, C., Shaw, C.E., and Al-Sarraj, S. (2015). ALS-FUS pathology revisited: singleton FUS mutations and an unusual case with both a FUS and TARDBP mutation. *Acta Neuropathol Commun* 3, 62.
- King, B.F., Townsend-Nicholson, A., Wildman, S.S., Thomas, T., Spyer, K.M., and Burnstock, G. (2000). Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 20, 4871-4877.
- King, B.F., Wildman, S.S., Ziganshina, L.E., Pintor, J., and Burnstock, G. (1997). Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X2 receptor. *Br J Pharmacol* 121, 1445-1453.
- Kinnamon, S.C., and Finger, T.E. (2013). A taste for ATP: neurotransmission in taste buds. *Front Cell Neurosci* 7, 264.
- Kino, Y., Washizu, C., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Akagi, T., Hashikawa, T., Doi, H., Takumi, T., Hicks, G.G., *et al.* (2015). FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* 3, 24.
- Klepeis, V.E., Weinger, I., Kaczmarek, E., and Trinkaus-Randall, V. (2004). P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. *J Cell Biochem* 93, 1115-1133.
- Knowles, J.R. (1980). Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions. *Annu Rev Biochem* 49, 877-919.
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Dai, Y., Obata, K., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2005). Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Comp Neurol* 481, 377-390.

BIBLIOGRAPHIE

Komine, O., and Yamanaka, K. (2015). Neuroinflammation in motor neuron disease. *Nagoya J Med Sci* 77, 537-549.

Kondo, A., Iwaki, T., Tateishi, J., Kirimoto, K., Morimoto, T., and Oomura, I. (1986). Accumulation of neurofilaments in a sporadic case of amyotrophic lateral sclerosis. *Jpn J Psychiatry Neurol* 40, 677-684.

Kong, J., and Xu, Z. (1998). Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* 18, 3241-3250.

Koppers, M., Blokhuis, A.M., Westeneng, H.J., Terpstra, M.L., Zundel, C.A., Vieira de Sa, R., Schellevis, R.D., Waite, A.J., Blake, D.J., Veldink, J.H., *et al.* (2015). C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann Neurol* 78, 426-438.

Kotnis, S., Bingham, B., Vasilyev, D.V., Miller, S.W., Bai, Y., Yeola, S., Chanda, P.K., Bowlby, M.R., Kaftan, E.J., Samad, T.A., and Whiteside, G.T. (2010). Genetic and functional analysis of human P2X5 reveals a distinct pattern of exon 10 polymorphism with predominant expression of the nonfunctional receptor isoform. *Mol Pharmacol* 77, 953-960.

Kowalski, M., Hausmann, R., Schmid, J., Dopychai, A., Stephan, G., Tang, Y., Schmalzing, G., Illes, P., and Rubini, P. (2015). Flexible subunit stoichiometry of functional human P2X2/3 heteromeric receptors. *Neuropharmacology* 99, 115-130.

Krakora, D., Macrander, C., and Suzuki, M. (2012). Neuromuscular junction protection for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int* 2012, 379657.

Krakora, D., Mulcrone, P., Meyer, M., Lewis, C., Bernau, K., Gowing, G., Zimprich, C., Aebischer, P., Svendsen, C.N., and Suzuki, M. (2013). Synergistic effects of GDNF and VEGF on lifespan and disease progression in a familial ALS rat model. *Mol Ther* 21, 1602-1610.

Kukley, M., Barden, J.A., Steinhäuser, C., and Jabs, R. (2001). Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* 36, 11-21.

Kuo, J.J., Lee, R.H., Zhang, L., and Heckman, C.J. (2006). Essential role of the persistent sodium current in spike initiation during slowly rising inputs in mouse spinal neurones. *J Physiol* 574, 819-834.

Kuo, J.J., Siddique, T., Fu, R., and Heckman, C.J. (2005). Increased persistent Na⁽⁺⁾ current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J Physiol* 563, 843-854.

Kwak, S., Hideyama, T., Yamashita, T., and Aizawa, H. (2010). AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology* 30, 182-188.

Kwiatkowski, T.J., Jr., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., *et al.* (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205-1208.

BIBLIOGRAPHIE

Kwong, L.K., Neumann, M., Sampathu, D.M., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2007). TDP-43 proteinopathy: the neuropathology underlying major forms of sporadic and familial frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease. *Acta Neuropathol* 114, 63-70.

L

Lacorte, E., Ferrigno, L., Leoncini, E., Corbo, M., Boccia, S., and Vanacore, N. (2016). Physical activity, and physical activity related to sports, leisure and occupational activity as risk factors for ALS: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 66, 61-79.

Lagier-Tourenne, C., and Cleveland, D.W. (2009). Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell* 136, 1001-1004.

Lalisse, S., Hua, J., Lenoir, M., Linck, N., Rassendren, F., and Ulmann, L. (2018). Sensory neuronal P2RX4 receptors controls BDNF signaling in inflammatory pain. *Sci Rep* 8, 964.

Lalo, U., Allsopp, R.C., Mahaut-Smith, M.P., and Evans, R.J. (2010). P2X1 receptor mobility and trafficking; regulation by receptor insertion and activation. *J Neurochem* 113, 1177-1187.

Lalo, U., Jones, S., Roberts, J.A., Mahaut-Smith, M.P., and Evans, R.J. (2012). Heat shock protein 90 inhibitors reduce trafficking of ATP-gated P2X1 receptors and human platelet responsiveness. *J Biol Chem* 287, 32747-32754.

Lalo, U., Palygin, O., Rasooli-Nejad, S., Andrew, J., Haydon, P.G., and Pankratov, Y. (2014). Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol* 12, e1001747.

Lalo, U., Palygin, O., Verkhratsky, A., Grant, S.G., and Pankratov, Y. (2016). ATP from synaptic terminals and astrocytes regulates NMDA receptors and synaptic plasticity through PSD-95 multi-protein complex. *Sci Rep* 6, 33609.

Lalo, U., Pankratov, Y., Wichert, S.P., Rossner, M.J., North, R.A., Kirchhoff, F., and Verkhratsky, A. (2008). P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 28, 5473-5480.

Lalo, U., Verkhratsky, A., and Pankratov, Y. (2007). Ivermectin potentiates ATP-induced ion currents in cortical neurones: evidence for functional expression of P2X4 receptors? *Neurosci Lett* 421, 158-162.

Lalo, U., Verkhratsky, A., and Pankratov, Y. (2011). Ionotropic ATP receptors in neuronal-glial communication. *Semin Cell Dev Biol* 22, 220-228.

Lammas, D.A., Stober, C., Harvey, C.J., Kendrick, N., Panchalingam, S., and Kumararatne, D.S. (1997). ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity* 7, 433-444.

LaMonte, B.H., Wallace, K.E., Holloway, B.A., Shelly, S.S., Ascano, J., Tokito, M., Van Winkle, T., Howland, D.S., and Holzbaur, E.L. (2002). Disruption of dynein/dynactin inhibits

BIBLIOGRAPHIE

axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 34, 715-727.

Larsson, M., Sawada, K., Morland, C., Hiasa, M., Ormel, L., Moriyama, Y., and Gundersen, V. (2012). Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cereb Cortex* 22, 1203-1214.

Layhadi, J.A., and Fountain, S.J. (2017). P2X4 Receptor-Dependent Ca(2+) Influx in Model Human Monocytes and Macrophages. *Int J Mol Sci* 18.

Layhadi, J.A., Turner, J., Crossman, D., and Fountain, S.J. (2018). ATP Evokes Ca(2+) Responses and CXCL5 Secretion via P2X4 Receptor Activation in Human Monocyte-Derived Macrophages. *J Immunol* 200, 1159-1168.

Lazarowski, E.R. (2012). Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal* 8, 359-373.

Le Duc, D., Schulz, A., Lede, V., Schulze, A., Thor, D., Bruser, A., and Schoneberg, T. (2017). P2Y Receptors in Immune Response and Inflammation. *Adv Immunol* 136, 85-121.

Le Feuvre, R.A., Brough, D., Touzani, O., and Rothwell, N.J. (2003). Role of P2X7 receptors in ischemic and excitotoxic brain injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 381-384.

Le, K.T., Villeneuve, P., Ramjaun, A.R., McPherson, P.S., Beaudet, A., and Seguela, P. (1998). Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience* 83, 177-190.

Le Masson, G., Przedborski, S., and Abbott, L.F. (2014). A computational model of motor neuron degeneration. *Neuron* 83, 975-988.

Lee, S.E. (2011). Guam dementia syndrome revisited in 2011. *Curr Opin Neurol* 24, 517-524.

Lemoine, D., Habermacher, C., Martz, A., Mery, P.F., Bouquier, N., Diverchy, F., Taly, A., Rassendren, F., Specht, A., and Grutter, T. (2013). Optical control of an ion channel gate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 20813-20818.

Lenertz, L.Y., Wang, Z., Guadarrama, A., Hill, L.M., Gavala, M.L., and Bertics, P.J. (2010). Mutation of putative N-linked glycosylation sites on the human nucleotide receptor P2X7 reveals a key residue important for receptor function. *Biochemistry* 49, 4611-4619.

Lepore, A.C., Rauck, B., Dejea, C., Pardo, A.C., Rao, M.S., Rothstein, J.D., and Maragakis, N.J. (2008). Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat Neurosci* 11, 1294-1301.

Leroy, F., Lamotte d'Incamps, B., Imhoff-Manuel, R.D., and Zytnicki, D. (2014). Early intrinsic hyperexcitability does not contribute to motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Elife* 3.

Leveille, A., Kiernan, J., Goodwin, J.A., and Antel, J. (1982). Eye movements in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 39, 684-686.

BIBLIOGRAPHIE

- Lewis, K.E., Rasmussen, A.L., Bennett, W., King, A., West, A.K., Chung, R.S., and Chuah, M.I. (2014). Microglia and motor neurons during disease progression in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: changes in arginase1 and inducible nitric oxide synthase. *J Neuroinflammation* 11, 55.
- Lezi, E., and Swerdlow, R.H. (2012). Mitochondria in neurodegeneration. *Adv Exp Med Biol* 942, 269-286.
- Li, C.Y., Xiong, K.M., Wu, Y.X., Liu, Y.W., Chen, L., Stewart, R.R., Peoples, R.W., and Yi, C.L. (2013a). Conserved extracellular cysteines differentially regulate the potentiation produced by Zn²⁺ in rat P2X4 receptors. *Eur J Pharmacol* 707, 11-16.
- Li, F., Wang, L., Li, J.W., Gong, M., He, L., Feng, R., Dai, Z., and Li, S.Q. (2011). Hypoxia induced amoeboid microglial cell activation in postnatal rat brain is mediated by ATP receptor P2X4. *BMC Neurosci* 12, 111.
- Li, M., Chang, T.H., Silberberg, S.D., and Swartz, K.J. (2008). Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 11, 883-887.
- Li, M., Silberberg, S.D., and Swartz, K.J. (2013b). Subtype-specific control of P2X receptor channel signaling by ATP and Mg²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E3455-3463.
- Li, M., Toombes, G.E., Silberberg, S.D., and Swartz, K.J. (2015). Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 18, 1577-1583.
- Li, Z., Lu, Y., Xu, X.L., and Gao, F.B. (2013c). The FTD/ALS-associated RNA-binding protein TDP-43 regulates the robustness of neuronal specification through microRNA-9a in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 22, 218-225.
- Li, Z., Migita, K., Samways, D.S., Voigt, M.M., and Egan, T.M. (2004). Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor. *J Neurosci* 24, 7378-7386.
- Liao, B., Zhao, W., Beers, D.R., Henkel, J.S., and Appel, S.H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol* 237, 147-152.
- Lin, C.L., Bristol, L.A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L., and Rothstein, J.D. (1998). Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20, 589-602.
- Liu, G., Fiala, M., Mizwicki, M.T., Sayre, J., Magpantay, L., Siani, A., Mahanian, M., Chattopadhyay, M., La Cava, A., and Wiedau-Pazos, M. (2012). Neuronal phagocytosis by inflammatory macrophages in ALS spinal cord: inhibition of inflammation by resolvin D1. *Am J Neurodegener Dis* 1, 60-74.
- Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P.A., Vande Velde, C., Ward, C.M., Miller, T.M., Subramaniam, J.R., Rothstein, J.D., Marklund, S., Andersen, P.M., *et al.* (2004). Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* 43, 5-17.

BIBLIOGRAPHIE

Liu, J., and Wang, F. (2017). Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Immunol* 8, 1005.

Liu, X., Surprenant, A., Mao, H.J., Roger, S., Xia, R., Bradley, H., and Jiang, L.H. (2008). Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper. *Mol Pharmacol* 73, 252-259.

Liu, Y., Pattamatta, A., Zu, T., Reid, T., Bardhi, O., Borchelt, D.R., Yachnis, A.T., and Ranum, L.P. (2016). C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron* 90, 521-534.

Lohmann, K. (1929). Uber die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwiss*

Lopes, L.V., Cunha, R.A., Kull, B., Fredholm, B.B., and Ribeiro, J.A. (2002). Adenosine A(2A) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A(1) receptor inhibition. *Neuroscience* 112, 319-329.

Lopes, L.V., Cunha, R.A., and Ribeiro, J.A. (1999). Cross talk between A(1) and A(2A) adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats. *J Neurophysiol* 82, 3196-3203.

Lorca, R.A., Coddou, C., Gazitua, M.C., Bull, P., Arredondo, C., and Huidobro-Toro, J.P. (2005). Extracellular histidine residues identify common structural determinants in the copper/zinc P2X2 receptor modulation. *J Neurochem* 95, 499-512.

Lorinczi, E., Bhargava, Y., Marino, S.F., Taly, A., Kaczmarek-Hajek, K., Barrantes-Freer, A., Dutertre, S., Grutter, T., Rettinger, J., and Nicke, A. (2012). Involvement of the cysteine-rich head domain in activation and desensitization of the P2X1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 11396-11401.

Luo, J., Yin, G.F., Gu, Y.Z., Liu, Y., Dai, J.P., Li, C., and Li, Z.W. (2006). Characterization of three types of ATP-activated current in relation to P2X subunits in rat trigeminal ganglion neurons. *Brain Res* 1115, 9-15.

Lustig, K.D., Shiau, A.K., Brake, A.J., and Julius, D. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5113-5117.

M

Mackenzie, I.R., Rademakers, R., and Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 9, 995-1007.

Magrane, J., Cortez, C., Gan, W.B., and Manfredi, G. (2014). Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum Mol Genet* 23, 1413-1424.

Majounie, E., Renton, A.E., Mok, K., Dopper, E.G., Waite, A., Rollinson, S., Chio, A., Restagno, G., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., *et al.* (2012). Frequency of the C9orf72

BIBLIOGRAPHIE

hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 11, 323-330.

Malek, A.M., Barchowsky, A., Bowser, R., Heiman-Patterson, T., Lacomis, D., Rana, S., Ada, Y., and Talbott, E.O. (2015). Exposure to hazardous air pollutants and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Environ Pollut* 197, 181-186.

Malinow, R., and Malenka, R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25, 103-126.

Mammana, S., Fagone, P., Cavalli, E., Basile, M.S., Petralia, M.C., Nicoletti, F., Bramanti, P., and Mazzon, E. (2018). The Role of Macrophages in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Pathways of Alzheimer's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis: Pathogenetic Cellular Effectors and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* 19.

Mancuso, R., Oliván, S., Osta, R., and Navarro, X. (2011a). Evolution of gait abnormalities in SOD1(G93A) transgenic mice. *Brain Res* 1406, 65-73.

Mancuso, R., Santos-Nogueira, E., Osta, R., and Navarro, X. (2011b). Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clin Neurophysiol* 122, 1660-1670.

Mannen, T. (1991). [Neuropathology of Onuf's nucleus]. *Rinsho Shinkeigaku* 31, 1281-1285.

Mannen, T., Iwata, M., Toyokura, Y., and Nagashima, K. (1977). Preservation of a certain motoneurone group of the sacral cord in amyotrophic lateral sclerosis: its clinical significance. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 40, 464-469.

Mannen, T., Iwata, M., Toyokura, Y., and Nagashima, K. (1982). The Onuf's nucleus and the external anal sphincter muscles in amyotrophic lateral sclerosis and Shy-Drager syndrome. *Acta Neuropathol* 58, 255-260.

Mansoor, S.E., Lu, W., Oosterheert, W., Shekhar, M., Tajkhorshid, E., and Gouaux, E. (2016). X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action. *Nature* 538, 66-71.

Mantovani, S., Garbelli, S., Pasini, A., Alimonti, D., Perotti, C., Melazzini, M., Bendotti, C., and Mora, G. (2009). Immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients suggest an ongoing neuroinflammatory process. *J Neuroimmunol* 210, 73-79.

Mapplebeck, J.C., Beggs, S., and Salter, M.W. (2016). Sex differences in pain: a tale of two immune cells. *Pain* 157 Suppl 1, S2-6.

Marat, A.L., Dokainish, H., and McPherson, P.S. (2011). DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. *J Biol Chem* 286, 13791-13800.

Marchand-Pauvert, V., Peyre, I., Lackmy-Vallee, A., Querin, G., Bede, P., Lacomblez, L., Debs, R., and Pradat, P.F. (2019). Absence of hyperexcitability of spinal motoneurons in patients with ALS. *J Physiol*.

BIBLIOGRAPHIE

- Marchetto, M.C., Muotri, A.R., Mu, Y., Smith, A.M., Cezar, G.G., and Gage, F.H. (2008). Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 649-657.
- Martin, E., Cazenave, W., Cattaert, D., and Branchereau, P. (2013). Embryonic alteration of motoneuronal morphology induces hyperexcitability in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 54, 116-126.
- Martinez-Silva, M.L., Imhoff-Manuel, R.D., Sharma, A., Heckman, C.J., Shneider, N.A., Roselli, F., Zytnicki, D., and Manuel, M. (2018). Hypoexcitability precedes denervation in the large fast-contracting motor units in two unrelated mouse models of ALS. *Elife* 7.
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., *et al.* (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465, 223-226.
- Masin, M., Kerschensteiner, D., Dumke, K., Rubio, M.E., and Soto, F. (2006). Fe65 interacts with P2X2 subunits at excitatory synapses and modulates receptor function. *J Biol Chem* 281, 4100-4108.
- Matsumura, Y., Yamashita, T., Sasaki, A., Nakata, E., Kohno, K., Masuda, T., Tozaki-Saitoh, H., Imai, T., Kuraishi, Y., Tsuda, M., and Inoue, K. (2016). A novel P2X4 receptor-selective antagonist produces anti-allodynic effect in a mouse model of herpetic pain. *Sci Rep* 6, 32461.
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 277, 29626-29633.
- Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y.Y., Wang, L., Hawkins, R.D., and Kandel, E.R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274, 1678-1683.
- McDermott, C.J., and Shaw, P.J. (2008). Diagnosis and management of motor neurone disease. *BMJ* 336, 658-662.
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G.B., Hirota, S.A., Slaba, I., Waterhouse, C.C., Beck, P.L., Muruve, D.A., and Kuberski, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330, 362-366.
- Mead, R.J., Bennett, E.J., Kennerley, A.J., Sharp, P., Sunyach, C., Kasher, P., Berwick, J., Pettmann, B., Battaglia, G., Azzouz, M., *et al.* (2011). Optimised and rapid pre-clinical screening in the SOD1(G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One* 6, e23244.
- Medinas, D.B., Rozas, P., Martinez Traub, F., Woehlbier, U., Brown, R.H., Bosco, D.A., and Hetz, C. (2018). Endoplasmic reticulum stress leads to accumulation of wild-type SOD1 aggregates associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 8209-8214.

BIBLIOGRAPHIE

Meyer, K., Ferraiuolo, L., Miranda, C.J., Likhite, S., McElroy, S., Rensch, S., Ditsworth, D., Lagier-Tourenne, C., Smith, R.A., Ravits, J., *et al.* (2014). Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 829-832.

Michel, A.D., Chambers, L.J., and Walter, D.S. (2008). Negative and positive allosteric modulators of the P2X(7) receptor. *Br J Pharmacol* 153, 737-750.

Miklavc, P., Mair, N., Wittekindt, O.H., Haller, T., Dietl, P., Felder, E., Timmler, M., and Frick, M. (2011). Fusion-activated Ca²⁺ entry via vesicular P2X4 receptors promotes fusion pore opening and exocytotic content release in pneumocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14503-14508.

Miklavc, P., Thompson, K.E., and Frick, M. (2013). A new role for P2X4 receptors as modulators of lung surfactant secretion. *Front Cell Neurosci* 7, 171.

Millecamps, S., and Julien, J.P. (2013). Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 14, 161-176.

Miller, K.E., and Sheetz, M.P. (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci* 117, 2791-2804.

Miller, R.G., Mitchell, J.D., Lyon, M., and Moore, D.H. (2007). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*, CD001447.

Mio, K., Kubo, Y., Ogura, T., Yamamoto, T., and Sato, C. (2005). Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 998-1005.

Mio, K., Ogura, T., Yamamoto, T., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Kubo, Y., and Sato, C. (2009). Reconstruction of the P2X(2) receptor reveals a vase-shaped structure with lateral tunnels above the membrane. *Structure* 17, 266-275.

Mitchell, J.C., McGoldrick, P., Vance, C., Hortobagyi, T., Sreedharan, J., Rogelj, B., Tudor, E.L., Smith, B.N., Klasen, C., Miller, C.C., *et al.* (2013). Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathol* 125, 273-288.

Mitsumoto, H., Santella, R.M., Liu, X., Bogdanov, M., Zipprich, J., Wu, H.C., Mahata, J., Kilty, M., Bednarz, K., Bell, D., *et al.* (2008). Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 9, 177-183.

Moehring, F., Cowie, A.M., Menzel, A.D., Weyer, A.D., Grzybowski, M., Arzua, T., Geurts, A.M., Palygin, O., and Stucky, C.L. (2018). Keratinocytes mediate innocuous and noxious touch via ATP-P2X4 signaling. *Elife* 7.

Mojsilovic-Petrovic, J., Jeong, G.B., Crocker, A., Arneja, A., David, S., Russell, D.S., and Kalb, R.G. (2006). Protecting motor neurons from toxic insult by antagonism of adenosine A2a and Trk receptors. *J Neurosci* 26, 9250-9263.

BIBLIOGRAPHIE

Mondola, P., Santillo, M., Seru, R., Damiano, S., Alvino, C., Ruggiero, G., Formisano, P., Terrazzano, G., Secondo, A., and Annunziato, L. (2004). Cu,Zn superoxide dismutase increases intracellular calcium levels via a phospholipase C-protein kinase C pathway in SK-N-BE neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 887-892.

Morato, X., Lujan, R., Lopez-Cano, M., Gandia, J., Stagljar, I., Watanabe, M., Cunha, R.A., Fernandez-Duenas, V., and Ciruela, F. (2017). The Parkinson's disease-associated GPR37 receptor interacts with striatal adenosine A2A receptor controlling its cell surface expression and function in vivo. *Sci Rep* 7, 9452.

Morfini, G.A., Burns, M., Binder, L.I., Kanaan, N.M., LaPointe, N., Bosco, D.A., Brown, R.H., Jr., Brown, H., Tiwari, A., Hayward, L., *et al.* (2009). Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J Neurosci* 29, 12776-12786.

Mori, M., Heuss, C., Gahwiler, B.H., and Gerber, U. (2001). Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol* 535, 115-123.

Moriyama, Y., Hiasa, M., Sakamoto, S., Omote, H., and Nomura, M. (2017). Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signal* 13, 387-404.

Mourelatos, Z., Gonatas, N.K., Stieber, A., Gurney, M.E., and Dal Canto, M.C. (1996). The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5472-5477.

Muller, F.L., Song, W., Liu, Y., Chaudhuri, A., Pieke-Dahl, S., Strong, R., Huang, T.T., Epstein, C.J., Roberts, L.J., 2nd, Csete, M., *et al.* (2006). Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med* 40, 1993-2004.

Murakami, T., Yang, S.P., Xie, L., Kawano, T., Fu, D., Mukai, A., Bohm, C., Chen, F., Robertson, J., Suzuki, H., *et al.* (2012). ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism. *Hum Mol Genet* 21, 1-9.

Murrell-Lagnado, R.D., and Frick, M. (2019). P2X4 and lysosome fusion. *Curr Opin Pharmacol* 47, 126-132.

N

Nagai, M., Re, D.B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T.M., Wichterle, H., and Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10, 615-622.

BIBLIOGRAPHIE

- Nagaya, N., Tittle, R.K., Saar, N., Dellal, S.S., and Hume, R.I. (2005). An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. *J Biol Chem* 280, 25982-25993.
- Nakazawa, K. (1994). ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14, 740-750.
- Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T., and Ohno, Y. (2005). Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. *Eur J Pharmacol* 518, 107-110.
- Naujock, M., Stanslowsky, N., Bufler, S., Naumann, M., Reinhardt, P., Sternecker, J., Kefalakes, E., Kassebaum, C., Bursch, F., Lojewski, X., *et al.* (2016). 4-Aminopyridine Induced Activity Rescues Hypoexcitable Motor Neurons from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 34, 1563-1575.
- Neumann, M., Kwong, L.K., Lee, E.B., Kremmer, E., Flatley, A., Xu, Y., Forman, M.S., Troost, D., Kretschmar, H.A., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2009). Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta Neuropathol* 117, 137-149.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., *et al.* (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130-133.
- Newbolt, A., Stoop, R., Virginio, C., Surprenant, A., North, R.A., Buell, G., and Rassendren, F. (1998). Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 273, 15177-15182.
- Nicholls, D.G., and Budd, S.L. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80, 315-360.
- Nicke, A., Baumert, H.G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., and Schmalzing, G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17, 3016-3028.
- Nicoll, R.A., Tomita, S., and Brecht, D.S. (2006). Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science* 311, 1253-1256.
- Nolan, M., Talbot, K., and Ansorge, O. (2016). Pathogenesis of FUS-associated ALS and FTD: insights from rodent models. *Acta Neuropathol Commun* 4, 99.
- Norden, D.M., Trojanowski, P.J., Villanueva, E., Navarro, E., and Godbout, J.P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia* 64, 300-316.
- Norenberg, W., Sobottka, H., Hempel, C., Plotz, T., Fischer, W., Schmalzing, G., and Schaefer, M. (2012). Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *Br J Pharmacol* 167, 48-66.
- North, R.A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82, 1013-1067.

BIBLIOGRAPHIE

Noto, Y., Shibuya, K., Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2016). Novel therapies in development that inhibit motor neuron hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Neurother* 16, 1147-1154.

Novak, I. (2011). Purinergic signalling in epithelial ion transport: regulation of secretion and absorption. *Acta Physiol (Oxf)* 202, 501-522.

O

O'Rourke, J.G., Bogdanik, L., Yanez, A., Lall, D., Wolf, A.J., Muhammad, A.K., Ho, R., Carmona, S., Vit, J.P., Zarrow, J., *et al.* (2016). C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science* 351, 1324-1329.

Oeckl, P., Jardel, C., Salachas, F., Lamari, F., Andersen, P.M., Bowser, R., de Carvalho, M., Costa, J., van Damme, P., Gray, E., *et al.* (2016). Multicenter validation of CSF neurofilaments as diagnostic biomarkers for ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 17, 404-413.

Oh, Y.K., Shin, K.S., Yuan, J., and Kang, S.J. (2008). Superoxide dismutase 1 mutants related to amyotrophic lateral sclerosis induce endoplasmic stress in neuro2a cells. *J Neurochem* 104, 993-1005.

Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2007). Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia* 55, 604-616.

Okada, S.F., Nicholas, R.A., Kreda, S.M., Lazarowski, E.R., and Boucher, R.C. (2006). Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. *J Biol Chem* 281, 22992-23002.

Olney, J.W. (1969). Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 28, 455-474.

Ormond, S.J., Barrera, N.P., Qureshi, O.S., Henderson, R.M., Edwardson, J.M., and Murrell-Lagnado, R.D. (2006). An uncharged region within the N terminus of the P2X6 receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol* 69, 1692-1700.

Ostrovskaya, O., Asatryan, L., Wyatt, L., Popova, M., Li, K., Peoples, R.W., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2011). Ethanol is a fast channel inhibitor of P2X4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 337, 171-179.

Oury, C., Lecut, C., Hego, A., Wera, O., and Delierneux, C. (2015). Purinergic control of inflammation and thrombosis: Role of P2X1 receptors. *Comput Struct Biotechnol J* 13, 106-110.

Oya, M., Kitaguchi, T., Yanagihara, Y., Numano, R., Kakeyama, M., Ikematsu, K., and Tsuboi, T. (2013). Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 438, 145-151.

BIBLIOGRAPHIE

Ozaki, T., Muramatsu, R., Sasai, M., Yamamoto, M., Kubota, Y., Fujinaka, T., Yoshimine, T., and Yamashita, T. (2016). The P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning. *Sci Rep* 6, 25893.

P

Pagani, M.R., Reisin, R.C., and Uchitel, O.D. (2006). Calcium signaling pathways mediating synaptic potentiation triggered by amyotrophic lateral sclerosis IgG in motor nerve terminals. *J Neurosci* 26, 2661-2672.

Pagnussat, N., Almeida, A.S., Marques, D.M., Nunes, F., Chenet, G.C., Botton, P.H., Mioranza, S., Loss, C.M., Cunha, R.A., and Porciuncula, L.O. (2015). Adenosine A(2A) receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. *Br J Pharmacol* 172, 3831-3845.

Palygin, O., Lalo, U., Verkhratsky, A., and Pankratov, Y. (2010). Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium* 48, 225-231.

Pambo-Pambo, A., Durand, J., and Gueritaud, J.P. (2009). Early excitability changes in lumbar motoneurons of transgenic SOD1G85R and SOD1G(93A-Low) mice. *J Neurophysiol* 102, 3627-3642.

Pamphlett, R., Kril, J., and Hng, T.M. (1995). Motor neuron disease: a primary disorder of corticomotoneurons? *Muscle Nerve* 18, 314-318.

Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O., and Verkhratsky, A. (2002a). Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex. *J Physiol* 542, 529-536.

Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O.A., and Verkhratsky, A. (2009). P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 158, 137-148.

Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., and North, R.A. (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch* 452, 589-597.

Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., and North, R.A. (2007). Quantal release of ATP in mouse cortex. *J Gen Physiol* 129, 257-265.

Pankratov, Y.V., Lalo, U.V., and Krishtal, O.A. (2002b). Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J Neurosci* 22, 8363-8369.

Papadeas, S.T., Kraig, S.E., O'Banion, C., Lepore, A.C., and Maragakis, N.J. (2011). Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17803-17808.

BIBLIOGRAPHIE

- Pardo, A.C., Wong, V., Benson, L.M., Dykes, M., Tanaka, K., Rothstein, J.D., and Maragakis, N.J. (2006). Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1(G93A) mice. *Exp Neurol* 201, 120-130.
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., 3rd, Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., and Gan, W.B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155, 1596-1609.
- Pasinelli, P., Belford, M.E., Lennon, N., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., Trotti, D., and Brown, R.H., Jr. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 43, 19-30.
- Pasinelli, P., and Brown, R.H. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7, 710-723.
- Payne, B.A., and Chinnery, P.F. (2015). Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochim Biophys Acta* 1847, 1347-1353.
- Perez-Flores, G., Levesque, S.A., Pacheco, J., Vaca, L., Lacroix, S., Perez-Cornejo, P., and Arreola, J. (2015). The P2X7/P2X4 interaction shapes the purinergic response in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 467, 484-490.
- Peters, O.M., Cabrera, G.T., Tran, H., Gendron, T.F., McKeon, J.E., Metterville, J., Weiss, A., Wightman, N., Salameh, J., Kim, J., *et al.* (2015). Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. *Neuron* 88, 902-909.
- Pettengill, M.A., Marques-da-Silva, C., Avila, M.L., d'Arc dos Santos Oliveira, S., Lam, V.W., Ollawa, I., Abdul Sater, A.A., Coutinho-Silva, R., Hacker, G., and Ojcius, D.M. (2012). Reversible inhibition of *Chlamydia trachomatis* infection in epithelial cells due to stimulation of P2X(4) receptors. *Infect Immun* 80, 4232-4238.
- Philips, T., and Robberecht, W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 10, 253-263.
- Philips, T., and Rothstein, J.D. (2015). Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol* 69, 5 67 61-21.
- Pieri, M., Albo, F., Gaetti, C., Spalloni, A., Bengtson, C.P., Longone, P., Cavalcanti, S., and Zona, C. (2003). Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 351, 153-156.
- Piskuric, N.A., and Nurse, C.A. (2013). Expanding role of ATP as a versatile messenger at carotid and aortic body chemoreceptors. *J Physiol* 591, 415-422.
- Placido, R., Auricchio, G., Falzoni, S., Battistini, L., Colizzi, V., Brunetti, E., Di Virgilio, F., and Mancino, G. (2006). P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* reducing the intracellular bacterial viability. *Cell Immunol* 244, 10-18.

BIBLIOGRAPHIE

Plaitakis, A., and Constantakakis, E. (1993). Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartyl-glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull* 30, 381-386.

Pokrishevsky, E., Grad, L.I., Yousefi, M., Wang, J., Mackenzie, I.R., and Cashman, N.R. (2012). Aberrant localization of FUS and TDP43 is associated with misfolding of SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7, e35050.

Pompl, P.N., Ho, L., Bianchi, M., McManus, T., Qin, W., and Pasinetti, G.M. (2003). A therapeutic role for cyclooxygenase-2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J* 17, 725-727.

Popova, M., Asatryan, L., Ostrovskaya, O., Wyatt, L.R., Li, K., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2010). A point mutation in the ectodomain-transmembrane 2 interface eliminates the inhibitory effects of ethanol in P2X4 receptors. *J Neurochem* 112, 307-317.

Popova, M., Trudell, J., Li, K., Alkana, R., Davies, D., and Asatryan, L. (2013). Tryptophan 46 is a site for ethanol and ivermectin action in P2X4 receptors. *Purinergic Signal* 9, 621-632.

Pougnat, J.T., Compans, B., Martinez, A., Choquet, D., Hosy, E., and Boue-Grabot, E. (2016). P2X-mediated AMPA receptor internalization and synaptic depression is controlled by two CaMKII phosphorylation sites on GluA1 in hippocampal neurons. *Sci Rep* 6, 31836.

Pougnat, J.T., Toulme, E., Martinez, A., Choquet, D., Hosy, E., and Boue-Grabot, E. (2014). ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron* 83, 417-430.

Pradat, P.F., Bruneteau, G., Gonzalez de Aguilar, J.L., Dupuis, L., Jokic, N., Salachas, F., Le Forestier, N., Echaniz-Laguna, A., Dubourg, O., Hauw, J.J., *et al.* (2007). Muscle Nogo-A expression is a prognostic marker in lower motor neuron syndromes. *Ann Neurol* 62, 15-20.

Priel, A., and Silberberg, S.D. (2004). Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol* 123, 281-293.

Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L., and Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9, 408-419.

Punthambaker, S., and Hume, R.I. (2014). Potent and long-lasting inhibition of human P2X2 receptors by copper. *Neuropharmacology* 77, 167-176.

Qian, K., Huang, H., Peterson, A., Hu, B., Maragakis, N.J., Ming, G.L., Chen, H., and Zhang, S.C. (2017). Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports* 8, 843-855.

Q

Qiu, H., Lee, S., Shang, Y., Wang, W.Y., Au, K.F., Kamiya, S., Barmada, S.J., Finkbeiner, S., Lui, H., Carlton, C.E., *et al.* (2014). ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects. *J Clin Invest* 124, 981-999.

Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L.L., Louie, S., Cupp, J.E., Dubyak, G.R., Hackos, D., and Dixit, V.M. (2011). Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol* 186, 6553-6561.

Quinlan, K.A., Schuster, J.E., Fu, R., Siddique, T., and Heckman, C.J. (2011). Altered postnatal maturation of electrical properties in spinal motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 589, 2245-2260.

Qureshi, O.S., Paramasivam, A., Yu, J.C., and Murrell-Lagnado, R.D. (2007). Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J Cell Sci* 120, 3838-3849.

R

Rabizadeh, S., Gralla, E.B., Borchelt, D.R., Gwinn, R., Valentine, J.S., Sisodia, S., Wong, P., Lee, M., Hahn, H., and Bredesen, D.E. (1995). Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3024-3028.

Rademakers, R., and van Blitterswijk, M. (2013). Motor neuron disease in 2012: Novel causal genes and disease modifiers. *Nat Rev Neurol* 9, 63-64.

Radford, K.M., Virginio, C., Surprenant, A., North, R.A., and Kawashima, E. (1997). Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors. *J Neurosci* 17, 6529-6533.

Radford, R.A., Morsch, M., Rayner, S.L., Cole, N.J., Pountney, D.L., and Chung, R.S. (2015). The established and emerging roles of astrocytes and microglia in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Front Cell Neurosci* 9, 414.

Radunovic, A., and Leigh, P.N. (1996). Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis: correlation between genotype and clinical features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61, 565-572.

Ralevic, V., and Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50, 413-492.

Ralevic, V., and Dunn, W.R. (2015). Purinergic transmission in blood vessels. *Auton Neurosci* 191, 48-66.

BIBLIOGRAPHIE

- Rangaraju, V., Calloway, N., and Ryan, T.A. (2014). Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell* 156, 825-835.
- Rasooli-Nejad, S., Palygin, O., Lalo, U., and Pankratov, Y. (2014). Cannabinoid receptors contribute to astroglial Ca(2)(+)-signalling and control of synaptic plasticity in the neocortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20140077.
- Rassendren, F., Buell, G., Newbolt, A., North, R.A., and Surprenant, A. (1997). Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J* 16, 3446-3454.
- Ravichandran, K.S. (2011). Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 35, 445-455.
- Ravits, J., Appel, S., Baloh, R.H., Barohn, R., Brooks, B.R., Elman, L., Floeter, M.K., Henderson, C., Lomen-Hoerth, C., Macklis, J.D., *et al.* (2013). Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: what phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14 Suppl 1, 5-18.
- Ravits, J., Paul, P., and Jorg, C. (2007). Focality of upper and lower motor neuron degeneration at the clinical onset of ALS. *Neurology* 68, 1571-1575.
- Ray, A., and Dittel, B.N. (2010). Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp*.
- Re, D.B., Le Verche, V., Yu, C., Amoroso, M.W., Politi, K.A., Phani, S., Ikiz, B., Hoffmann, L., Koolen, M., Nagata, T., *et al.* (2014). Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron* 81, 1001-1008.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Jr., *et al.* (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13, 43-47.
- Reiner, A., Medina, L., Figueredo-Cardenas, G., and Anfinson, S. (1995). Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. *Exp Neurol* 131, 239-250.
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., *et al.* (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257-268.
- Rettinger, J., Aschrafi, A., and Schmalzing, G. (2000). Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *J Biol Chem* 275, 33542-33547.
- Ricci, C., Marzocchi, C., and Battistini, S. (2018). MicroRNAs as Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells* 7.
- Richler, E., Shigetomi, E., and Khakh, B.S. (2011). Neuronal P2X2 receptors are mobile ATP sensors that explore the plasma membrane when activated. *J Neurosci* 31, 16716-16730.

BIBLIOGRAPHIE

- Ripps, M.E., Huntley, G.W., Hof, P.R., Morrison, J.H., and Gordon, J.W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 689-693.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 566-578.
- Robberecht, W., and Philips, T. (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 14, 248-264.
- Roberts, J.A., Allsopp, R.C., El Ajouz, S., Vial, C., Schmid, R., Young, M.T., and Evans, R.J. (2012). Agonist binding evokes extensive conformational changes in the extracellular domain of the ATP-gated human P2X1 receptor ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 4663-4667.
- Roberts, J.A., Digby, H.R., Kara, M., El Ajouz, S., Sutcliffe, M.J., and Evans, R.J. (2008). Cysteine substitution mutagenesis and the effects of methanethiosulfonate reagents at P2X2 and P2X4 receptors support a core common mode of ATP action at P2X receptors. *J Biol Chem* 283, 20126-20136.
- Roberts, K., Zeineddine, R., Corcoran, L., Li, W., Campbell, I.L., and Yerbury, J.J. (2013). Extracellular aggregated Cu/Zn superoxide dismutase activates microglia to give a cytotoxic phenotype. *Glia* 61, 409-419.
- Robinson, L.E., and Murrell-Lagnado, R.D. (2013). The trafficking and targeting of P2X receptors. *Front Cell Neurosci* 7, 233.
- Rocha, M.C., Pousinha, P.A., Correia, A.M., Sebastiao, A.M., and Ribeiro, J.A. (2013). Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PLoS One* 8, e73846.
- Rodrigues, R.J., Almeida, T., Richardson, P.J., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2005). Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci* 25, 6286-6295.
- Rodrigues, R.J., Tome, A.R., and Cunha, R.A. (2015). ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Front Neurosci* 9, 148.
- Rokic, M.B., Stojilkovic, S.S., Vavra, V., Kuzyk, P., Tvrdonova, V., and Zemkova, H. (2013). Multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the function of the rat P2X4 receptor. *PLoS One* 8, e59411.
- Roman, R.M., and Fitz, J.G. (1999). Emerging roles of purinergic signaling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function. *Gastroenterology* 116, 964-979.
- Rooney, J., Vajda, A., Heverin, M., Crampsie, A., Tobin, K., McLaughlin, R., Staines, A., and Hardiman, O. (2016). No association between soil constituents and amyotrophic lateral sclerosis relative risk in Ireland. *Environ Res* 147, 102-107.

BIBLIOGRAPHIE

Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., and et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62.

Rothstein, J.D., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326, 1464-1468.

Rothwell, S.W., Stansfeld, P.J., Bragg, L., Verkhratsky, A., and North, R.A. (2014). Direct gating of ATP-activated ion channels (P2X2 receptors) by lipophilic attachment at the outer end of the second transmembrane domain. *J Biol Chem* 289, 618-626.

Rotunno, M.S., and Bosco, D.A. (2013). An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. *Front Cell Neurosci* 7, 253.

Rowland, L.P., and Shneider, N.A. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344, 1688-1700.

Royle, S.J., Bobanovic, L.K., and Murrell-Lagnado, R.D. (2002). Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *J Biol Chem* 277, 35378-35385.

Royle, S.J., Qureshi, O.S., Bobanovic, L.K., Evans, P.R., Owen, D.J., and Murrell-Lagnado, R.D. (2005). Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *J Cell Sci* 118, 3073-3080.

Rubio, M.E., and Soto, F. (2001). Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21, 641-653.

S

Saccon, R.A., Bunton-Stasyshyn, R.K., Fisher, E.M., and Fratta, P. (2013). Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain* 136, 2342-2358.

Saeed, M., Siddique, N., Hung, W.Y., Usacheva, E., Liu, E., Sufit, R.L., Heller, S.L., Haines, J.L., Pericak-Vance, M., and Siddique, T. (2006). Paraoxonase cluster polymorphisms are associated with sporadic ALS. *Neurology* 67, 771-776.

Saeed, M., Yang, Y., Deng, H.X., Hung, W.Y., Siddique, N., Dellefave, L., Gellera, C., Andersen, P.M., and Siddique, T. (2009). Age and founder effect of SOD1 A4V mutation causing ALS. *Neurology* 72, 1634-1639.

Saijo, K., and Glass, C.K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11, 775-787.

Samways, D.S., and Egan, T.M. (2007). Acidic amino acids impart enhanced Ca²⁺ permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family. *J Gen Physiol* 129, 245-256.

BIBLIOGRAPHIE

Samways, D.S., Khakh, B.S., Dutertre, S., and Egan, T.M. (2011). Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 13800-13805.

Samways, D.S., Migita, K., Li, Z., and Egan, T.M. (2008). On the role of the first transmembrane domain in cation permeability and flux of the ATP-gated P2X2 receptor. *J Biol Chem* 283, 5110-5117.

Sano, R., and Reed, J.C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1833, 3460-3470.

Sasayama, H., Shimamura, M., Tokuda, T., Azuma, Y., Yoshida, T., Mizuno, T., Nakagawa, M., Fujikake, N., Nagai, Y., and Yamaguchi, M. (2012). Knockdown of the *Drosophila* fused in sarcoma (FUS) homologue causes deficient locomotive behavior and shortening of motoneuron terminal branches. *PLoS One* 7, e39483.

Sau, D., Rusmini, P., Crippa, V., Onesto, E., Bolzoni, E., Ratti, A., and Poletti, A. (2011). Dysregulation of axonal transport and motoneuron diseases. *Biol Cell* 103, 87-107.

Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5683-5686.

Saxena, S., Cabuy, E., and Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 12, 627-636.

Saxena, S., Roselli, F., Singh, K., Leptien, K., Julien, J.P., Gros-Louis, F., and Caroni, P. (2013). Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival. *Neuron* 80, 80-96.

Scarmeas, N., Shih, T., Stern, Y., Ottman, R., and Rowland, L.P. (2002). Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in ALS. *Neurology* 59, 773-775.

Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H.E., Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., Allmeroth, K., Dieterle, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., *et al.* (2017). Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133, 887-906.

Scekic-Zahirovic, J., Sendscheid, O., El Oussini, H., Jambeau, M., Sun, Y., Mersmann, S., Wagner, M., Dieterle, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., *et al.* (2016). Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J* 35, 1077-1097.

Scemes, E., Suadicani, S.O., Dahl, G., and Spray, D.C. (2007). Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol* 3, 199-208.

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., and Marsden, C.D. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1, 1269.

BIBLIOGRAPHIE

- Schreiber, A., and Peter, M. (2014). Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 1843, 163-181.
- Schulte, G., and Fredholm, B.B. (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* 15, 813-827.
- Schulze-Lohoff, E., Hugo, C., Rost, S., Arnold, S., Gruber, A., Brune, B., and Sterzel, R.B. (1998). Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *Am J Physiol* 275, F962-971.
- Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* 23, 5080-5081.
- Shan, X., Chiang, P.M., Price, D.L., and Wong, P.C. (2010). Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16325-16330.
- Sharma, A., Lyashchenko, A.K., Lu, L., Nasrabady, S.E., Elmaleh, M., Mendelsohn, M., Nemes, A., Tapia, J.C., Mentis, G.Z., and Shneider, N.A. (2016). ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nat Commun* 7, 10465.
- Shaw, B.F., and Valentine, J.S. (2007). How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends Biochem Sci* 32, 78-85.
- Shaw, P.J., Forrest, V., Ince, P.G., Richardson, J.P., and Wastell, H.J. (1995a). CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 4, 209-216.
- Shaw, P.J., Ince, P.G., Falkous, G., and Mantle, D. (1995b). Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol* 38, 691-695.
- Shefner, J.M., Reaume, A.G., Flood, D.G., Scott, R.W., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Upton-Rice, M., and Brown, R.H., Jr. (1999). Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology* 53, 1239-1246.
- Shelkovnikova, T.A., Peters, O.M., Deykin, A.V., Connor-Robson, N., Robinson, H., Ustyugov, A.A., Bachurin, S.O., Ermolkevich, T.G., Goldman, I.L., Sadchikova, E.R., *et al.* (2013). Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice. *J Biol Chem* 288, 25266-25274.
- Shibata, N., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Yamada, S., Hirano, A., Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Sasaki, S., and Kobayashi, M. (2001). Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* 917, 97-104.

BIBLIOGRAPHIE

- Shinozaki, Y., Sumitomo, K., Tsuda, M., Koizumi, S., Inoue, K., and Torimitsu, K. (2009). Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X(4) receptors. *PLoS Biol* 7, e1000103.
- Shrivastava, A.N., Triller, A., and Sieghart, W. (2011a). GABA(A) Receptors: Post-Synaptic Co-Localization and Cross-Talk with Other Receptors. *Front Cell Neurosci* 5, 7.
- Shrivastava, A.N., Triller, A., Sieghart, W., and Sarto-Jackson, I. (2011b). Regulation of GABA(A) receptor dynamics by interaction with purinergic P2X(2) receptors. *J Biol Chem* 286, 14455-14468.
- Siddique, T., Figlewicz, D.A., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Rouleau, G., Jeffers, A.J., Sapp, P., Hung, W.Y., Bebout, J., McKenna-Yasek, D., and et al. (1991). Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N Engl J Med* 324, 1381-1384.
- Sikora, J., Orlov, S.N., Furuya, K., and Grygorczyk, R. (2014). Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. *Blood* 124, 2150-2157.
- Silberberg, S.D., Chang, T.H., and Swartz, K.J. (2005). Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol* 125, 347-359.
- Silberberg, S.D., Li, M., and Swartz, K.J. (2007). Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels. *Neuron* 54, 263-274.
- Silinsky, E.M., Gerzanich, V., and Vanner, S.M. (1992). ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones. *Br J Pharmacol* 106, 762-763.
- Sim, J.A., Chaumont, S., Jo, J., Ulmann, L., Young, M.T., Cho, K., Buell, G., North, R.A., and Rassendren, F. (2006). Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. *J Neurosci* 26, 9006-9009.
- Sim, J.A., Park, C.K., Oh, S.B., Evans, R.J., and North, R.A. (2007). P2X1 and P2X4 receptor currents in mouse macrophages. *Br J Pharmacol* 152, 1283-1290.
- Sim, J.A., Young, M.T., Sung, H.Y., North, R.A., and Surprenant, A. (2004). Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. *J Neurosci* 24, 6307-6314.
- Sluyter, R., Bartlett, R., Ly, D., and Yerbury, J.J. (2017). P2X7 receptor antagonism in amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regen Res* 12, 749-750.
- Smith, F.M., Humphrey, P.P., and Murrell-Lagnado, R.D. (1999). Identification of amino acids within the P2X2 receptor C-terminus that regulate desensitization. *J Physiol* 520 Pt 1, 91-99.
- Smith, R.G., Henry, Y.K., Mattson, M.P., and Appel, S.H. (1998). Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 44, 696-699.

BIBLIOGRAPHIE

Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths, R.J., and Gabel, C.A. (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276, 125-132.

Son, E.Y., Ichida, J.K., Wainger, B.J., Toma, J.S., Rafuse, V.F., Woolf, C.J., and Eggen, K. (2011). Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell* 9, 205-218.

Sorge, R.E., Mapplebeck, J.C., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J.K., Martin, L.J., Austin, J.S., Sotocinal, S.G., Chen, D., *et al.* (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci* 18, 1081-1083.

Soto, F., Garcia-Guzman, M., Gomez-Hernandez, J.M., Hollmann, M., Karschin, C., and Stuhmer, W. (1996a). P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3684-3688.

Soto, F., Garcia-Guzman, M., Karschin, C., and Stuhmer, W. (1996b). Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 223, 456-460.

Spalloni, A., Nutini, M., and Longone, P. (2013). Role of the N-methyl-d-aspartate receptors complex in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1832, 312-322.

Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., *et al.* (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319, 1668-1672.

Stachon, P., Heidenreich, A., Merz, J., Hilgendorf, I., Wolf, D., Willecke, F., von Garlen, S., Albrecht, P., Hardtner, C., Ehrat, N., *et al.* (2017). P2X7 Deficiency Blocks Lesional Inflammation Activity and Ameliorates Atherosclerosis in Mice. *Circulation* 135, 2524-2533.

Stallings, N.R., Puttaparthi, K., Luther, C.M., Burns, D.K., and Elliott, J.L. (2010). Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiol Dis* 40, 404-414.

Stanchev, D., Flehmig, G., Gerevich, Z., Norenberg, W., Dihazi, H., Furst, S., Eschrich, K., Illes, P., and Wirkner, K. (2006). Decrease of current responses at human recombinant P2X3 receptors after substitution by Asp of Ser/Thr residues in protein kinase C phosphorylation sites of their ecto-domains. *Neurosci Lett* 393, 78-83.

Starke, K., Bultmann, R., Bulloch, J.M., and von Kugelgen, I. (1991). Noradrenaline-ATP corelease and cotransmission following activation of nicotine receptors at postganglionic sympathetic axons. *J Neural Transm Suppl* 34, 93-98.

Steinacker, P., Feneberg, E., Weishaupt, J., Brettschneider, J., Tumani, H., Andersen, P.M., von Arnim, C.A., Bohm, S., Kassubek, J., Kubisch, C., *et al.* (2016). Neurofilaments in the diagnosis of motoneuron diseases: a prospective study on 455 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 12-20.

BIBLIOGRAPHIE

- Stelmashenko, O., Lalo, U., Yang, Y., Bragg, L., North, R.A., and Compan, V. (2012). Activation of trimeric P2X2 receptors by fewer than three ATP molecules. *Mol Pharmacol* 82, 760-766.
- Stepito, A., Gallo, J.M., Shaw, C.E., and Hirth, F. (2014). Modelling C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol* 127, 377-389.
- Stober, C.B., Lammas, D.A., Li, C.M., Kumararatne, D.S., Lightman, S.L., and McArdle, C.A. (2001). ATP-mediated killing of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin within human macrophages is calcium dependent and associated with the acidification of mycobacteria-containing phagosomes. *J Immunol* 166, 6276-6286.
- Stojilkovic, S.S. (2009). Purinergic regulation of hypothalamopituitary functions. *Trends Endocrinol Metab* 20, 460-468.
- Stojilkovic, S.S., and Zemkova, H. (2013). P2X receptor channels in endocrine glands. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 2, 173-180.
- Stokes, L., Layhadi, J.A., Bibic, L., Dhuna, K., and Fountain, S.J. (2017). P2X4 Receptor Function in the Nervous System and Current Breakthroughs in Pharmacology. *Front Pharmacol* 8, 291.
- Stokes, L., Scurrah, K., Ellis, J.A., Cromer, B.A., Skarratt, K.K., Gu, B.J., Harrap, S.B., and Wiley, J.S. (2011). A loss-of-function polymorphism in the human P2X4 receptor is associated with increased pulse pressure. *Hypertension* 58, 1086-1092.
- Stokes, L., and Surprenant, A. (2009). Dynamic regulation of the P2X4 receptor in alveolar macrophages by phagocytosis and classical activation. *Eur J Immunol* 39, 986-995.
- Stoop, R., Thomas, S., Rassendren, F., Kawashima, E., Buell, G., Surprenant, A., and North, R.A. (1999). Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol Pharmacol* 56, 973-981.
- Sullivan, P.M., Zhou, X., Robins, A.M., Paushter, D.H., Kim, D., Smolka, M.B., and Hu, F. (2016). The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway. *Acta Neuropathol Commun* 4, 51.
- Sun, C.N., Araoz, C., Lucas, G., Morgan, P.N., and White, H.J. (1975). Amyotrophic lateral sclerosis. Inclusion bodies in a case of the classic sporadic form. *Ann Clin Lab Sci* 5, 38-44.
- Suurvali, J., Boudinot, P., Kanellopoulos, J., and Ruutel Boudinot, S. (2017). P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor. *Biomed J* 40, 245-256.
- Suzuki, M., McHugh, J., Tork, C., Shelley, B., Hayes, A., Bellantuono, I., Aebischer, P., and Svendsen, C.N. (2008). Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. *Mol Ther* 16, 2002-2010.

BIBLIOGRAPHIE

Swarup, V., Phaneuf, D., Bareil, C., Robertson, J., Rouleau, G.A., Kriz, J., and Julien, J.P. (2011). Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain* 134, 2610-2626.

T

Taga, A., and Maragakis, N.J. (2018). Current and emerging ALS biomarkers: utility and potential in clinical trials. *Expert Rev Neurother* 18, 871-886.

Takahashi, K., Nakamura, H., and Okada, E. (1972). Hereditary amyotrophic lateral sclerosis. Histochemical and electron microscopic study of hyaline inclusions in motor neurons. *Arch Neurol* 27, 292-299.

Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2, 3081-3089.

Tan, R.H., Ke, Y.D., Ittner, L.M., and Halliday, G.M. (2017). ALS/FTLD: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133, 177-196.

Tan, W., Naniche, N., Bogush, A., Pedrini, S., Trotti, D., and Pasinelli, P. (2013). Small peptides against the mutant SOD1/Bcl-2 toxic mitochondrial complex restore mitochondrial function and cell viability in mutant SOD1-mediated ALS. *J Neurosci* 33, 11588-11598.

Tan, Y., Zhao, B., Zeng, Q.C., Shi, C.M., Zhao, F.B., and Li, Z.W. (2009). Characteristics of ATP-activated current in nodose ganglion neurons of rats. *Neurosci Lett* 459, 25-29.

Taruno, A. (2018). ATP Release Channels. *Int J Mol Sci* 19.

Taura, D., Noguchi, M., Sone, M., Hosoda, K., Mori, E., Okada, Y., Takahashi, K., Homma, K., Oyamada, N., Inuzuka, M., *et al.* (2009). Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 583, 1029-1033.

Taylor, A.L., Schwiebert, L.M., Smith, J.J., King, C., Jones, J.R., Sorscher, E.J., and Schwiebert, E.M. (1999). Epithelial P2X purinergic receptor channel expression and function. *J Clin Invest* 104, 875-884.

Thompson, A.G., and Turner, M.R. (2019). Untangling neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.

Thompson, K.E., Korbmacher, J.P., Hecht, E., Hobi, N., Wittekindt, O.H., Dietl, P., Kranz, C., and Frick, M. (2013). Fusion-activated cation entry (FACE) via P2X(4) couples surfactant secretion and alveolar fluid transport. *FASEB J* 27, 1772-1783.

Ticozzi, N., Silani, V., LeClerc, A.L., Keagle, P., Gellera, C., Ratti, A., Taroni, F., Kwiatkowski, T.J., Jr., McKenna-Yasek, D.M., Sapp, P.C., *et al.* (2009). Analysis of FUS

BIBLIOGRAPHIE

gene mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis within an Italian cohort. *Neurology* 73, 1180-1185.

Tiryaki, E., and Horak, H.A. (2014). ALS and other motor neuron diseases. *Continuum (Minneapolis)* 20, 1185-1207.

Tomkins, J., Usher, P., Slade, J.Y., Ince, P.G., Curtis, A., Bushby, K., and Shaw, P.J. (1998). Novel insertion in the KSP region of the neurofilament heavy gene in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuroreport* 9, 3967-3970.

Torres, G.E., Egan, T.M., and Voigt, M.M. (1998). N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry* 37, 14845-14851.

Torres, G.E., Egan, T.M., and Voigt, M.M. (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274, 6653-6659.

Toth, A., Antal, Z., Bereczki, D., and Sperlagh, B. (2019). Purinergic Signalling in Parkinson's Disease: A Multi-target System to Combat Neurodegeneration. *Neurochem Res* 44, 2413-2422.

Toulme, E., Blais, D., Leger, C., Landry, M., Garret, M., Seguela, P., and Boue-Grabot, E. (2007). An intracellular motif of P2X(3) receptors is required for functional cross-talk with GABA(A) receptors in nociceptive DRG neurons. *J Neurochem* 102, 1357-1368.

Toulme, E., Garcia, A., Samways, D., Egan, T.M., Carson, M.J., and Khakh, B.S. (2010). P2X4 receptors in activated C8-B4 cells of cerebellar microglial origin. *J Gen Physiol* 135, 333-353.

Toulme, E., and Khakh, B.S. (2012). Imaging P2X4 receptor lateral mobility in microglia: regulation by calcium and p38 MAPK. *J Biol Chem* 287, 14734-14748.

Toulme, E., Soto, F., Garret, M., and Boue-Grabot, E. (2006). Functional properties of internalization-deficient P2X4 receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin. *Mol Pharmacol* 69, 576-587.

Trang, T., Beggs, S., Wan, X., and Salter, M.W. (2009). P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurosci* 29, 3518-3528.

Trautmann, A. (2009). Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Sci Signal* 2, pe6.

Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62, 405-496.

Triller, A., and Choquet, D. (2005). Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! *Trends Neurosci* 28, 133-139.

BIBLIOGRAPHIE

- Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N.C., Brown, R.H., Jr., and Hediger, M.A. (1999). SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* 2, 848.
- Tsien, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., Mayford, M., Kandel, E.R., and Tonegawa, S. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87, 1317-1326.
- Tsuda, M., Kuboyama, K., Inoue, T., Nagata, K., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2009). Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Mol Pain* 5, 28.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003a). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778-783.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003b). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. In *Nature*, pp. 778-783.
- Turner, B.J., and Talbot, K. (2008). Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 85, 94-134.
- Turner, M.R. (2018). Progress and new frontiers in biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Biomark Med* 12, 693-696.
- Turner, M.R., Cagnin, A., Turkheimer, F.E., Miller, C.C., Shaw, C.E., Brooks, D.J., Leigh, P.N., and Banati, R.B. (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [¹¹C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15, 601-609.
- Turner, M.R., Kiernan, M.C., Leigh, P.N., and Talbot, K. (2009). Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 8, 94-109.

U

- Ulmann, L., Hatcher, J.P., Hughes, J.P., Chaumont, S., Green, P.J., Conquet, F., Buell, G.N., Reeve, A.J., Chessell, I.P., and Rassendren, F. (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci* 28, 11263-11268.
- Ulmann, L., Hirbec, H., and Rassendren, F. (2010a). P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J* 29, 2290-2300.
- Ulmann, L., Hirbec, H., and Rassendren, F. (2010b). P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. In *EMBO J*, pp. 2290-2300.

BIBLIOGRAPHIE

Ulmann, L., Levavasseur, F., Avignone, E., Peyroutou, R., Hirbec, H., Audinat, E., and Rassendren, F. (2013). Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus. *Glia* 61, 1306-1319.

Urabe, S., Miyoshi, H., Fujiwara, H., Yamaoka, K., and Kudo, Y. (2009). Enhanced expression of P2X4 and P2X7 purinergic receptors in the myometrium of pregnant rats in preterm delivery models. *Reprod Sci* 16, 1186-1192.

V

Vacca, F., D'Ambrosi, N., Nestola, V., Amadio, S., Giustizieri, M., Cucchiaroni, M.L., Tozzi, A., Velluz, M.C., Mercuri, N.B., and Volonte, C. (2011). N-Glycans mutations rule oligomeric assembly and functional expression of P2X3 receptor for extracellular ATP. *Glycobiology* 21, 634-643.

Vacca, F., Giustizieri, M., Ciotti, M.T., Mercuri, N.B., and Volonte, C. (2009). Rapid constitutive and ligand-activated endocytic trafficking of P2X receptor. *J Neurochem* 109, 1031-1041.

Valdmanis, P.N., Daoud, H., Dion, P.A., and Rouleau, G.A. (2009). Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9, 198-205.

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

Van Blitterswijk, M., DeJesus-Hernandez, M., Niemantsverdriet, E., Murray, M.E., Heckman, M.G., Diehl, N.N., Brown, P.H., Baker, M.C., Finch, N.A., Bauer, P.O., *et al.* (2013). Association between repeat sizes and clinical and pathological characteristics in carriers of C9ORF72 repeat expansions (Xpansize-72): a cross-sectional cohort study. *Lancet Neurol* 12, 978-988.

Van Damme, P., Braeken, D., Callewaert, G., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2005a). GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 605-612.

Van Damme, P., Dewil, M., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2005b). Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 2, 147-159.

Van Damme, P., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. *Dis Model Mech* 10, 537-549.

Van der Kloot, W. (2003). Loading and recycling of synaptic vesicles in the Torpedo electric organ and the vertebrate neuromuscular junction. *Prog Neurobiol* 71, 269-303.

Van Dyke, J.M., Smit-Oistad, I.M., Macrander, C., Krakora, D., Meyer, M.G., and Suzuki, M. (2016). Macrophage-mediated inflammation and glial response in the skeletal muscle of a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Exp Neurol* 277, 275-282.

BIBLIOGRAPHIE

- Van Zundert, B., Izaurieta, P., Fritz, E., and Alvarez, F.J. (2012). Early pathogenesis in the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J Cell Biochem* 113, 3301-3312.
- Van Zundert, B., Peuscher, M.H., Hynynen, M., Chen, A., Neve, R.L., Brown, R.H., Jr., Constantine-Paton, M., and Bellingham, M.C. (2008). Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 28, 10864-10874.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., *et al.* (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323, 1208-1211.
- Vargas, M.R., and Johnson, J.A. (2010). Astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics* 7, 471-481.
- Varma, R., Chai, Y., Troncoso, J., Gu, J., Xing, H., Stojilkovic, S.S., Mattson, M.P., and Haughey, N.J. (2009). Amyloid-beta induces a caspase-mediated cleavage of P2X4 to promote purinotoxicity. *Neuromolecular Med* 11, 63-75.
- Vatovec, S., Kovanda, A., and Rogelj, B. (2014). Unconventional features of C9ORF72 expanded repeat in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiol Aging* 35, 2421 e2421-2421 e2412.
- Vavra, V., Bhattacharya, A., and Zemkova, H. (2011). Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices. *Neuroscience* 188, 1-12.
- Vazquez-Villoldo, N., Domercq, M., Martin, A., Llop, J., Gomez-Vallejo, V., and Matute, C. (2014). P2X4 receptors control the fate and survival of activated microglia. *Glia* 62, 171-184.
- Vehvilainen, P., Koistinaho, J., and Gundars, G. (2014). Mechanisms of mutant SOD1 induced mitochondrial toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* 8, 126.
- Veldink, J.H., Bar, P.R., Joosten, E.A., Otten, M., Wokke, J.H., and van den Berg, L.H. (2003). Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul Disord* 13, 737-743.
- Vergani, A., Tezza, S., Fotino, C., Visner, G., Pileggi, A., Chandraker, A., and Fiorina, P. (2014). The purinergic system in allotransplantation. *Am J Transplant* 14, 507-514.
- Verkhatsky, A., Pankratov, Y., Lalo, U., and Nedergaard, M. (2012). P2X receptors in neuroglia. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 1.
- Vijayvergiya, C., Beal, M.F., Buck, J., and Manfredi, G. (2005). Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci* 25, 2463-2470.

BIBLIOGRAPHIE

Villa, K.L., Berry, K.P., Subramanian, J., Cha, J.W., Chan Oh, W., Kwon, H.B., Kubota, Y., So, P.T., and Nedivi, E. (2016). Inhibitory Synapses Are Repeatedly Assembled and Removed at Persistent Sites In Vivo. *Neuron* 90, 662-664.

Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013a). Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav* 3, 335-350.

Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013b). Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav* 3, 431-457.

Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F.A., North, R.A., and Surprenant, A. (1999). Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 2, 315-321.

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

Volonte, C., Amadio, S., Cavaliere, F., D'Ambrosi, N., Vacca, F., and Bernardi, G. (2003). Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2, 403-412.

Volonte, C., Apolloni, S., Carri, M.T., and D'Ambrosi, N. (2011). ALS: focus on purinergic signalling. *Pharmacol Ther* 132, 111-122.

Volonte, C., Apolloni, S., Parisi, C., and Amadio, S. (2016). Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology* 104, 180-193.

Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2010). Upregulation of persistent sodium conductances in familial ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 222-227.

Vucic, S., Nicholson, G.A., and Kiernan, M.C. (2008). Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131, 1540-1550.

Vucic, S., Rothstein, J.D., and Kiernan, M.C. (2014). Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci* 37, 433-442.



Waibel, S., Neumann, M., Rosenbohm, A., Birve, A., Volk, A.E., Weishaupt, J.H., Meyer, T., Muller, U., Andersen, P.M., and Ludolph, A.C. (2013). Truncating mutations in FUS/TLS give rise to a more aggressive ALS-phenotype than missense mutations: a clinico-genetic study in Germany. *Eur J Neurol* 20, 540-546.

Wainger, B.J., Kiskinis, E., Mellin, C., Wiskow, O., Han, S.S., Sandoe, J., Perez, N.P.,

BIBLIOGRAPHIE

- Williams, L.A., Lee, S., Boulting, G., *et al.* (2014). Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep* 7, 1-11.
- Walker, A.K., Spiller, K.J., Ge, G., Zheng, A., Xu, Y., Zhou, M., Tripathy, K., Kwong, L.K., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2015). Functional recovery in new mouse models of ALS/FTLD after clearance of pathological cytoplasmic TDP-43. *Acta Neuropathol* 130, 643-660.
- Wang, H., Zhou, M., Cong, B., He, P., Xu, M., Ni, X., and Ma, B. (2008). Transient changes in P2X3 but not TRPV1 mRNA expression in rat after prenatal exposure to glucocorticoids. *Auton Neurosci* 141, 112-116.
- Wang, L., Gutmann, D.H., and Roos, R.P. (2011). Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Hum Mol Genet* 20, 286-293.
- Wang, M.D., Little, J., Gomes, J., Cashman, N.R., and Krewski, D. (2017). Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology* 61, 101-130.
- Wang, R., and Zhang, D. (2005). Memantine prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Eur J Neurosci* 22, 2376-2380.
- Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Culotta, V.C., Price, D.L., Wong, P.C., and Rothstein, J.D. (2001). Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* 8, 933-941.
- Wate, R., Ito, H., Zhang, J.H., Ohnishi, S., Nakano, S., and Kusaka, H. (2005). Expression of an endoplasmic reticulum-resident chaperone, glucose-regulated stress protein 78, in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 110, 557-562.
- Webb, T.E., Simon, J., Krishek, B.J., Bateson, A.N., Smart, T.G., King, B.F., Burnstock, G., and Barnard, E.A. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 324, 219-225.
- Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N.J., Miller, T.M., and Baloh, R.H. (2009). TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18809-18814.
- Werner, P., Seward, E.P., Buell, G.N., and North, R.A. (1996). Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15485-15490.
- Weydt, P., and Moller, T. (2005). Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 16, 527-531.
- Wheeler-Schilling, T.H., Marquardt, K., Kohler, K., Guenther, E., and Jabs, R. (2001). Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells. *Brain Res Mol Brain Res* 92, 177-180.

BIBLIOGRAPHIE

- Wieskopf, J.S., Mathur, J., Limapichat, W., Post, M.R., Al-Qazzaz, M., Sorge, R.E., Martin, L.J., Zaykin, D.V., Smith, S.B., Freitas, K., *et al.* (2015). The nicotinic alpha6 subunit gene determines variability in chronic pain sensitivity via cross-inhibition of P2X2/3 receptors. *Sci Transl Med* 7, 287ra272.
- Wildman, S.S., Brown, S.G., Rahman, M., Noel, C.A., Churchill, L., Burnstock, G., Unwin, R.J., and King, B.F. (2002). Sensitization by extracellular Ca(2+) of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1). *Mol Pharmacol* 62, 957-966.
- Wildman, S.S., King, B.F., and Burnstock, G. (1999). Modulatory activity of extracellular H⁺ and Zn²⁺ on ATP-responses at rP2X1 and rP2X3 receptors. *Br J Pharmacol* 128, 486-492.
- Wilkinson, W.J., Jiang, L.H., Surprenant, A., and North, R.A. (2006). Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Mol Pharmacol* 70, 1159-1163.
- Williams, T.L., Day, N.C., Ince, P.G., Kamboj, R.K., and Shaw, P.J. (1997). Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 42, 200-207.
- Williamson, T.L., and Cleveland, D.W. (1999). Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 2, 50-56.
- Wills, A.M., Cronin, S., Slowik, A., Kasperaviciute, D., Van Es, M.A., Morahan, J.M., Valdmanis, P.N., Meininger, V., Melki, J., Shaw, C.E., *et al.* (2009). A large-scale international meta-analysis of paraoxonase gene polymorphisms in sporadic ALS. *Neurology* 73, 16-24.
- Wils, H., Kleinberger, G., Janssens, J., Pereson, S., Joris, G., Cuijt, I., Smits, V., Ceuterick-de Groote, C., Van Broeckhoven, C., and Kumar-Singh, S. (2010). TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3858-3863.
- Wishart, T.M., Parson, S.H., and Gillingwater, T.H. (2006). Synaptic vulnerability in neurodegenerative disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 733-739.
- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., and Price, D.L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14, 1105-1116.
- Wooley, C.M., Sher, R.B., Kale, A., Frankel, W.N., Cox, G.A., and Seburn, K.L. (2005). Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve* 32, 43-50.
- Wright, A., Mahaut-Smith, M., Symon, F., Sylvius, N., Ran, S., Bafadhel, M., Muessel, M., Bradding, P., Wardlaw, A., and Vial, C. (2016). Impaired P2X1 Receptor-Mediated Adhesion in Eosinophils from Asthmatic Patients. *J Immunol* 196, 4877-4884.
- Wyatt, L.R., Finn, D.A., Khoja, S., Yardley, M.M., Asatryan, L., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2014). Contribution of P2X4 receptors to ethanol intake in male C57BL/6 mice. *Neurochem Res* 39, 1127-1139.

X

Xiao, S., McLean, J., and Robertson, J. (2006). Neuronal intermediate filaments and ALS: a new look at an old question. *Biochim Biophys Acta* 1762, 1001-1012.

Xiong, K., Hu, X.Q., Stewart, R.R., Weight, F.F., and Li, C. (2005). The mechanism by which ethanol inhibits rat P2X4 receptors is altered by mutation of histidine 241. *Br J Pharmacol* 145, 576-586.

Xiong, K., Stewart, R.R., Hu, X.Q., Werby, E., Peoples, R.W., Weight, F.F., and Li, C. (2004). Role of extracellular histidines in agonist sensitivity of the rat P2X4 receptor. *Neurosci Lett* 365, 195-199.

Xiong, Y., Teng, S., Zheng, L., Sun, S., Li, J., Guo, N., Li, M., Wang, L., Zhu, F., Wang, C., *et al.* (2018). Stretch-induced Ca(2+) independent ATP release in hippocampal astrocytes. *J Physiol* 596, 1931-1947.

Xu, J., Bernstein, A.M., Wong, A., Lu, X.H., Khoja, S., Yang, X.W., Davies, D.L., Micevych, P., Sofroniew, M.V., and Khakh, B.S. (2016). P2X4 Receptor Reporter Mice: Sparse Brain Expression and Feeding-Related Presynaptic Facilitation in the Arcuate Nucleus. *J Neurosci* 36, 8902-8920.

Xu, J., Chai, H., Ehinger, K., Egan, T.M., Srinivasan, R., Frick, M., and Khakh, B.S. (2014). Imaging P2X4 receptor subcellular distribution, trafficking, and regulation using P2X4-pHluorin. *J Gen Physiol* 144, 81-104.

Xu, Y.F., Gendron, T.F., Zhang, Y.J., Lin, W.L., D'Alton, S., Sheng, H., Casey, M.C., Tong, J., Knight, J., Yu, X., *et al.* (2010). Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J Neurosci* 30, 10851-10859.

Xu, Y.F., Zhang, Y.J., Lin, W.L., Cao, X., Stetler, C., Dickson, D.W., Lewis, J., and Petrucelli, L. (2011). Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Mol Neurodegener* 6, 73.

Y

Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., *et al.* (2006). Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* 12, 133-137.

Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H., and Cleveland, D.W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11, 251-253.

BIBLIOGRAPHIE

Yan, D., Zhu, Y., Walsh, T., Xie, D., Yuan, H., Sirmaci, A., Fujikawa, T., Wong, A.C., Loh, T.L., Du, L., *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, 2228-2233.

Yan, Z., Khadra, A., Sherman, A., and Stojilkovic, S.S. (2011). Calcium-dependent block of P2X7 receptor channel function is allosteric. *J Gen Physiol* 138, 437-452.

Yan, Z., Liang, Z., Obsil, T., and Stojilkovic, S.S. (2006). Participation of the Lys313-Ile333 sequence of the purinergic P2X4 receptor in agonist binding and transduction of signals to the channel gate. *J Biol Chem* 281, 32649-32659.

Yang, T., Shen, J.B., Yang, R., Redden, J., Dodge-Kafka, K., Grady, J., Jacobson, K.A., and Liang, B.T. (2014). Novel protective role of endogenous cardiac myocyte P2X4 receptors in heart failure. *Circ Heart Fail* 7, 510-518.

Yardley, M.M., Wyatt, L., Khoja, S., Asatryan, L., Ramaker, M.J., Finn, D.A., Alkana, R.L., Huynh, N., Louie, S.G., Petasis, N.A., *et al.* (2012). Ivermectin reduces alcohol intake and preference in mice. *Neuropharmacology* 63, 190-201.

Yiangou, Y., Facer, P., Durrenberger, P., Chessell, I.P., Naylor, A., Bountra, C., Banati, R.R., and Anand, P. (2006). COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* 6, 12.

Z

Zavodszky, E., Vicinanza, M., and Rubinsztein, D.C. (2013). Biology and trafficking of ATG9 and ATG16L1, two proteins that regulate autophagosome formation. *FEBS Lett* 587, 1988-1996.

Zech, A., Wiesler, B., Ayata, C.K., Schlaich, T., Durk, T., Hossfeld, M., Ehrat, N., Cicko, S., and Idzko, M. (2016). P2rx4 deficiency in mice alleviates allergen-induced airway inflammation. *Oncotarget* 7, 80288-80297.

Zemkova, H., Kucka, M., Li, S., Gonzalez-Iglesias, A.E., Tomic, M., and Stojilkovic, S.S. (2010). Characterization of purinergic P2X4 receptor channels expressed in anterior pituitary cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E644-651.

Zemkova, H., Yan, Z., Liang, Z., Jelinkova, I., Tomic, M., and Stojilkovic, S.S. (2007). Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions. *J Neurochem* 102, 1139-1150.

Zhang, B., Tu, P., Abtahian, F., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1997). Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J Cell Biol* 139, 1307-1315.

BIBLIOGRAPHIE

- Zhang, D., Iyer, L.M., He, F., and Aravind, L. (2012). Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Front Genet* 3, 283.
- Zhang, H., Tan, C.F., Mori, F., Tanji, K., Kakita, A., Takahashi, H., and Wakabayashi, K. (2008). TDP-43-immunoreactive neuronal and glial inclusions in the neostriatum in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. *Acta Neuropathol* 115, 115-122.
- Zhang, K., Donnelly, C.J., Haeusler, A.R., Grima, J.C., Machamer, J.B., Steinwald, P., Daley, E.L., Miller, S.J., Cunningham, K.M., Vidensky, S., *et al.* (2015). The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature* 525, 56-61.
- Zhang, X., Li, L., Chen, S., Yang, D., Wang, Y., Zhang, X., Wang, Z., and Le, W. (2011). Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 7, 412-425.
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X.S., and Duan, S. (2007). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* 9, 945-953.
- Zhao, Q., Yang, M., Ting, A.T., and Logothetis, D.E. (2007). PIP(2) regulates the ionic current of P2X receptors and P2X(7) receptor-mediated cell death. *Channels (Austin)* 1, 46-55.
- Zhao, W., Beers, D.R., and Appel, S.H. (2013). Immune-mediated mechanisms in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 8, 888-899.
- Zhao, W., Beers, D.R., Hooten, K.G., Sieglaff, D.H., Zhang, A., Kalyana-Sundaram, S., Traini, C.M., Halsey, W.S., Hughes, A.M., Sathe, G.M., *et al.* (2017). Characterization of Gene Expression Phenotype in Amyotrophic Lateral Sclerosis Monocytes. *JAMA Neurol* 74, 677-685.
- Zheng, L.M., Zychlinsky, A., Liu, C.C., Ojcius, D.M., and Young, J.D. (1991). Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol* 112, 279-288.
- Zondler, L., Feiler, M.S., Freischmidt, A., Ruf, W.P., Ludolph, A.C., Danzer, K.M., and Weishaupt, J.H. (2017). Impaired activation of ALS monocytes by exosomes. *Immunol Cell Biol* 95, 207-214.
- Zondler, L., Muller, K., Khalaji, S., Bliederauser, C., Ruf, W.P., Grozdanov, V., Thiemann, M., Fundel-Clemes, K., Freischmidt, A., Holzmann, K., *et al.* (2016). Peripheral monocytes are functionally altered and invade the CNS in ALS patients. *Acta Neuropathol* 132, 391-411.
- Zurcher, N.R., Loggia, M.L., Lawson, R., Chonde, D.B., Izquierdo-Garcia, D., Yasek, J.E., Akeju, O., Catana, C., Rosen, B.R., Cudkowicz, M.E., *et al.* (2015). Increased in vivo glial activation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: assessed with [(11)C]-PBR28. *Neuroimage Clin* 7, 409-414.

ANNEXES

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

▪ Publications et présentations en lien avec la thèse

PUBLICATIONS

Articles de Recherche :

E. Bertin, T. Deluc, K. S. Pilch, A. Martinez, J-T Pougnet, E. Doudnikoff, A-E Allain, P. Bergmann, M. Russeau, E. Toulmé, E. Bezaud, F. Koch-Nolte, P. Séguéla, S. Lévi, B. Bontempi, F. Georges, S. S. Bertrand, O. Nicole and E. Boué-Grabot. (2020) Increased surface P2X4 receptor expression regulates synaptic plasticity and behavior in P2X4 internalization-defective knock-in mice. *Molecular Psychiatry*.

E. Bertin, A. Martinez, A. Fayoux, P-O. Fernagut, G. Le Masson, S.S. Bertrand and E. Boué-Grabot. P2X4 purinoreceptors as key factor in the pathogenesis of ALS and biomarker (**en préparation**).

A. Martinez, **E. Bertin**, A. Ase, E. Eiselt, S. Lévi, M-B. Emerit, P. Séguéla and E. Boué-Grabot. Insulin regulates P2X4 receptor function and promotes its rapid delivery to the cell surface (**en préparation**).

Chapitre de livre :

E. Bertin, A. Martinez, and E. Boué-Grabot. (2020) P2X Electrophysiology and Surface Trafficking in *Xenopus Oocytes*. *Methods in Molecular Biology*, by Humana Press-Springer.

COMMUNICATIONS ORALES

Prix Jeune Chercheur ARSLA 2018

E. Bertin, A. Martinez, A. Fayoux, P-O. Fernagut, S. Bertrand, and E. Boué-Grabot. (2018) Récepteurs P2X4 de l'ATP : un acteur clé de la pathogénèse de la SLA ? 4èmes Journées de la Recherche sur la SLA et les Maladies du Neurone Moteur, Paris, France.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

E. Bertin, A. Martinez, A. Fayoux, P-O. Fernagut, S.S. Bertrand and E. Boué-Grabot. (2019) P2X4 ATP-gated receptor channels play key role in amyotrophic lateral sclerosis Pathogenesis. Society for Neurosciences Meeting, Chicago, U.S.A.

E. Bertin, A. Martinez, A. Ase, E. Eiselt, P. Séguéla, M-B. Emerit and E. Boué-Grabot (2019) Insulin regulates P2X4 receptor function and promotes its rapid delivery to the cell surface. Society for Neurosciences Meeting, Chicago, U.S.A.

E. Bertin, A. Martinez, A. Fayoux, P-O. Fernagut, S.S. Bertrand and E. Boué-Grabot. (2018) P2X4 purinoreceptors as key factor in the pathogenesis of ALS. 29ème colloque de l'association des canaux ioniques 2018, Sète, France.

E. Bertin, A. Martinez, A. Fayoux, P-O. Fernagut, S.S. Bertrand and E. Boué-Grabot. Unravelling the implication of P2X4 purinoreceptors in ALS pathogenesis. Journées de l'Ecole Doctorale SVS, Bordeaux, France.

E. Bertin, A. Martinez, A. Fayoux, P-O. Fernagut, S.S. Bertrand and E. Boué-Grabot. (2017) Unraveling the implication of P2X4 purinoreceptors in ALS pathogenesis. 3eme Journées de Recherche FILSAN/ARSLA, Paris, France.

E. Bertin, A. Martinez, E. Eiselt, A.Ozgun Gezer, M.B. Emerit and E. Boué-Grabot. (2017) Insulin regulates P2X4 receptor function and promotes its rapid delivery to the cell surface. 13d International meeting NeuroFrance, Bordeaux, France.

▪ Autres apparitions dans des publications

Articles de Recherche :

M. Jaffredo, **E. Bertin**, A. Pirog, S. Oucherif, F. Lebreton, D. Bosco, B. Catagari, D. Cattaert, S. Renaud, J. Lang, and M. Raoux. Biphasic islet micro-organ activity is encoded by dynamic patterns of distinct uni- and multicellular modes in pancreatic β -cells (**soumis**).



Increased surface P2X4 receptor regulates anxiety and memory in P2X4 internalization-defective knock-in mice

Eléonore Bertin^{1,2} · Thomas Deluc^{1,2,3} · Kjara S. Pilch^{1,2} · Audrey Martinez^{1,2} · Johan-Till Pougnet^{1,2} · Evelyne Doudnikoff^{1,2} · Anne-Emilie Allain^{4,5} · Philine Bergmann⁶ · Marion Russeau⁷ · Estelle Toulmé^{1,2} · Erwan Bezar^{1,2} · Friedrich Koch-Nolte⁶ · Philippe Séguéla³ · Sabine Lévi⁷ · Bruno Bontempi^{1,2} · François Georges^{1,2} · Sandrine S. Bertrand^{4,5} · Olivier Nicole^{1,2} · Eric Boué-Grabot^{1,2}

Received: 16 September 2019 / Revised: 10 December 2019 / Accepted: 12 December 2019
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2020

Abstract

ATP signaling and surface P2X4 receptors are upregulated selectively in neurons and/or glia in various CNS disorders including anxiety, chronic pain, epilepsy, ischemia, and neurodegenerative diseases. However, the cell-specific functions of P2X4 in pathological contexts remain elusive. To elucidate P2X4 functions, we created a conditional transgenic knock-in P2X4 mouse line (Floxed P2X4mCherryIN) allowing the Cre activity-dependent genetic swapping of the internalization motif of P2X4 by the fluorescent mCherry protein to prevent constitutive endocytosis of P2X4. By combining molecular, cellular, electrophysiological, and behavioral approaches, we characterized two distinct knock-in mouse lines expressing noninternalized P2X4mCherryIN either exclusively in excitatory forebrain neurons or in all cells natively expressing P2X4. The genetic substitution of wild-type P2X4 by noninternalized P2X4mCherryIN in both knock-in mouse models did not alter the sparse distribution and subcellular localization of P2X4 but increased the number of P2X4 receptors at the surface of the targeted cells mimicking the pathological increased surface P2X4 state. Increased surface P2X4 density in the hippocampus of knock-in mice altered LTP and LTD plasticity phenomena at CA1 synapses without affecting basal excitatory transmission. Moreover, these cellular events translated into anxiolytic effects and deficits in spatial memory. Our results show that increased surface density of neuronal P2X4 contributes to synaptic deficits and alterations in anxiety and memory functions consistent with the implication of P2X4 in neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. Furthermore, these conditional P2X4mCherryIN knock-in mice will allow exploring the cell-specific roles of P2X4 in various physiological and pathological contexts.

These authors contributed equally: Eléonore Bertin, Thomas Deluc, Kjara S. Pilch

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0641-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Eric Boué-Grabot
eric.boue-grabot@u-bordeaux.fr

- ¹ Université de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France
- ² CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France
- ³ Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, Alan Edwards Centre for Research on Pain, McGill University, Montreal, QC H3A 2B4, Canada

Introduction

The release and extracellular action of ATP are a widespread mechanism for cell-to-cell communication in living organisms through activation of P2X and P2Y receptors expressed at the cell surface of most tissues, including the nervous system [1]. Several P2X receptors (P2X) are

- ⁴ Université de Bordeaux, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, UMR5287, F-33000 Bordeaux, France
- ⁵ CNRS, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, UMR5287, F-33000 Bordeaux, France
- ⁶ Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg, Germany
- ⁷ INSERM UMR-S 1270, Sorbonne Université, Institut du Fer à Moulin, 75005 Paris, France

expressed in the central nervous system (CNS) with varying distributions in neurons as well as in glia [2–4]. P2X receptors are ATP-gated cation channels and their activation by ATP, co-released by neurons with other neurotransmitters [5, 6] or released as a gliotransmitter by astrocytes [7–9], has profound modulatory actions at synapses [1, 10, 11]. Among the seven P2X subunits, P2X4 displays high calcium permeability [12, 13] and a widespread distribution in CNS neurons and glial cells as well as in peripheral tissues [14–16]. Nevertheless P2X4 expression in the brain is sparse [15] and its contribution to the synaptic modulation in normal conditions remains debated [17, 18]. A growing body of evidence suggests that upregulated P2X4 expression plays important roles in various CNS disorders including chronic pain and neurodegenerative diseases such as Alzheimer’s disease (AD) or amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [19–26]. In the healthy organism, P2X4 is constitutively internalized by the interaction between the adapter protein 2 (AP2) and a noncanonical endocytosis motif in the C-tail of P2X4 subunit [27, 28]. As a result, P2X4 is found preferentially in intracellular compartments ensuring a low surface expression not only in neurons, but also in microglia and macrophages [29–32]. Intracellular P2X4 may promote vesicle fusion of endosomes or lysosomes [32, 33]. Importantly, intracellular P2X4 pools can be mobilized and trafficked to the cell surface [31, 34], consistent with the critical role of increased P2X4 surface expression in pathological states [19, 21, 24–26, 35–37]. The specific increase in P2X4 expression and surface trafficking in spinal microglia is critical for the pathogenesis of chronic pain [24, 38–41]. Increased P2X4 expression and surface density in neurons have been observed in the hippocampus or in the spinal cord of AD or ALS mouse models, respectively, suggesting that upregulated P2X4 may contribute to synaptic dysfunction and/or cell death in AD or ALS [23, 25, 26, 35]. However, the extent of the upregulated surface P2X4 state and the cell-specific functions of P2X4 in the pathological context remain elusive.

Here we report the development of conditional knock-in (P2X4mCherryIN) mice mimicking a pathological increase of surface P2X4. We show that the increase of P2X4 at the surface of excitatory neurons decreases anxiety, impairs memory processing, and alters activity-dependent synaptic plasticity phenomena in the hippocampus suggesting that upregulation of neuronal P2X4 observed in AD [25] may have key roles in AD pathogenesis. Overall, we provide an innovative knock-in P2X4 model to study the functional contributions of upregulated P2X4 in specific cells of the nervous system but also in peripheral tissues throughout the body.

Materials and methods

Experimental model

The *P2rx4* conditional knock-in mouse line was established at the MCI/ICS (Mouse Clinical Institute, France). *Xenopus* oocytes were isolated as described [42, 43]. Cultures of hippocampal neurons were prepared as described [44] with some modifications. Peritoneal cells were isolated as described [45] (see Supplementary information).

Immunofluorescence and microscopy

Immunofluorescence studies of neurons, macrophages, brain immunohistochemistry, and image acquisition are described in the Supplementary and electron microscopy (E.M.) was performed as previously described [46] (see Supplementary information).

Biotinylation assays and immunoblotting

Surface biotinylation experiments were performed as described previously [8, 43, 47] from injected *Xenopus* oocytes, mouse peritoneal macrophages, and hippocampal cell cultures (see Supplementary information).

Electrophysiology

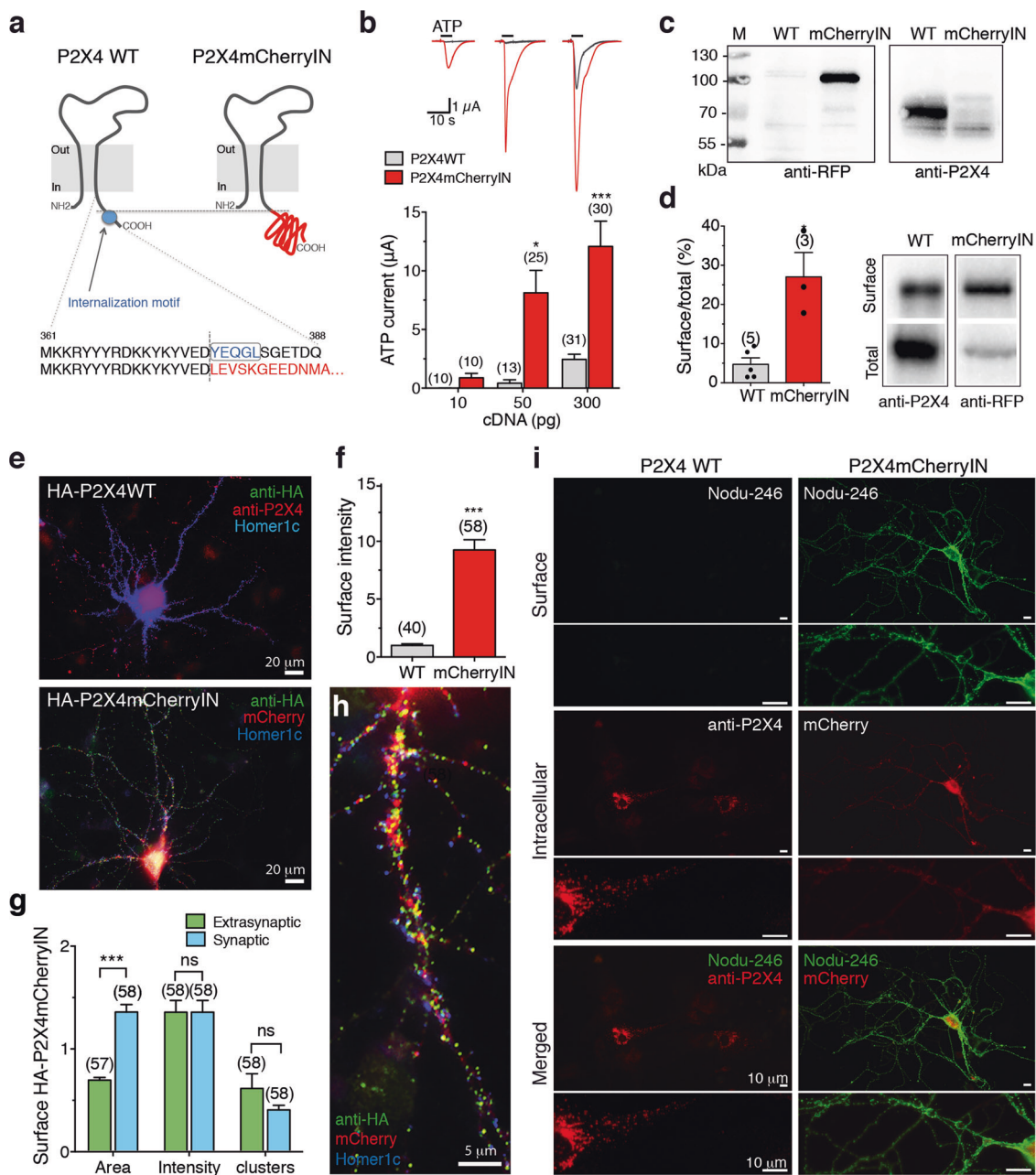
Extracellular field recordings and induction of synaptic plasticity in hippocampal brain slices are described in the Supplementary. Two-electrode voltage-clamp recordings from *Xenopus* oocyte were performed as previously described (see Supplementary information).

Mouse behavior

Open field procedure, novel object recognition test [48, 49], elevated plus maze [50], the Y-maze two-trial procedure [51], and spatial memory testing conducted in an eight-arm radial maze are described in the Supplementary information.

Quantification and statistical analysis

The number of independent experiments or animals (n), the statistical test used for comparison and the statistical significance (p values) are specified for each figure panel in the corresponding figure legend. Data are presented as mean \pm s.e.m. Data were analyzed and graphs were generated using GraphPad Prism.



Results

Substitution of the internalization motif of P2X4 by mCherry protein increases surface density of functional P2X4 receptors

Mutation or ablation of the endocytosis motif of P2X4 (Y³⁷⁸xxGL) was previously shown to increase the surface trafficking of P2X4 without altering its functional properties [28, 43]. We generated a P2X4mCherryIN construct in which the endocytosis motif of mouse wild-type (WT) P2X4 was suppressed by swapping the last 11 amino acids in the C-tail of P2X4 with the sequence coding for the red fluorescent

protein mCherry (Fig. 1a). ATP-evoked currents recorded from P2X4WT or P2X4mCherryIN expressing *Xenopus* oocytes (Fig. 1b) showed that P2X4mCherryIN response amplitudes were significantly larger than those recorded from P2X4WT (Fig. 1b). We next examined the surface level of P2X4WT and P2X4mCherryIN by biotinylation assays and western blotting from oocytes (Fig. 1c, d). Anti-P2X4 antibodies allowed the detection of P2X4WT (70 kDa) but not P2X4mCherryIN (the anti-P2X4 epitope (amino acids 370–388) is deleted in P2X4mCherryIN constructs). P2X4mCherryIN was detected using anti-RFP antibodies showing a band at 100 kDa in agreement with the fusion of mCherry (30 kDa) to P2X4 (Fig. 1c). Surface/total protein

◀ Fig. 1 Substitution of the internalization motif of P2X4 by mCherry increases ATP current density and surface expression of P2X4 receptors. **a** Schematic representation of the mouse P2X4 subunit topology and C-terminal sequence of wild-type P2X4 (WT) and P2X4mCherryIN subunits. The AP2 binding site (blue circle) within the C-terminal sequence of mouse P2X4WT was exchanged for the red fluorescent protein mCherry sequence (P2X4) preventing clathrin-dependent internalization. **b** Representative superimposed currents evoked by applications of ATP (100 μ M, 5 s) from oocytes expressing wild-type P2X4 (WT) (black traces) or P2X4mCherryIN receptors (red traces). Bar graphs of the mean amplitude of ATP current recorded from oocytes expressing P2X4WT or P2X4mCherryIN as a function of the quantity of injected cDNAs. Recordings were performed the same day (2 or 3 days) postnuclear injection. Error bars represent s.e.m., the number of cells is indicated in parentheses, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, one-way ANOVA and Tukey's post hoc test. Blockade of P2X4 internalization induced an approximately sevenfold increase in ATP current amplitudes. **c** Specific detection by western blots of total proteins from oocytes expressing P2X4WT (70 kDa) or P2X4mCherryIN (100 kDa) with anti-P2X4 or anti-RFP antibodies, respectively. **d** Representative immunoblots of total and surface biotinylated proteins from oocytes expressing P2X4WT (WT) or P2X4mCherryIN (mCherryIN) using anti-P2X4 or anti-RFP antibodies. Bars represent mean \pm s.e.m. of the surface/total ratio of P2X4WT (gray bars, $4.73 \pm 1.64\%$, $n = 5$) and P2X4mCherryIN (red bars, $27.05 \pm 6.2\%$, $n = 3$). The number of independent experiments is indicated in parentheses, $*p < 0.05$, unpaired *t*-test. **e** Confocal overlay images of hippocampal neurons transfected with extracellular HA-tagged P2X4WT or HA-P2X4mCherryIN revealed a strong increase in surface P2X4 in neurons expressing P2X4mCherryIN vs. P2X4 WT. Surface P2X4 was revealed by labeling living cells with anti-HA antibodies (green). Total P2X4 was detected after fixation, permeabilization, and staining with anti-P2X4 antibody (red) in P2X4 WT cells or by mCherry fluorescence (red) in P2X4mCherryIN cells. Scale bars, 20 μ m. **f** Mean fluorescence intensity of surface HA-P2X4WT and HA-P2X4mCherryIN illustrated in **e** and in Supplementary Fig. S1. Error bars, s.e.m., the number of cells is indicated in parentheses, $***p < 0.001$, unpaired Mann–Whitney test. **g, h** Enlarged image of a dendrite, showing surface clustering of HA-P2X4mCherryIN. Postsynaptic regions are indicated by detection of Homer 1c (blue). Scale bar, 5 μ m. Overall, 42% of clusters are localized in the vicinity of excitatory glutamatergic synapses. **g** Quantification of the size, fluorescence intensity, and density of clusters at extrasynaptic site and in the vicinity of glutamatergic synapses showing P2X4 form larger clusters near synapses. Error bars: s.e.m., two-way ANOVA and Tukey's post hoc test, interaction $F(2, 341) = 11.38$; $***p < 0.001$. **i** Epifluorescence images of hippocampal neurons transfected with P2X4WT or P2X4mCherryIN revealed the strong increase of surface P2X4mCherryIN compared with P2X4WT. Surface P2X4WT and P2X4mCherryIN were revealed on living cells with Nodu-246 antibody (green) recognizing the native extracellular domain of P2X4. Total P2X4WT or P2X4mCherryIN was detected after fixation and permeabilization with anti-P2X4 antibodies (red) or directly by the red fluorescence of mCherry protein, respectively. Scale bar, 10 μ m.

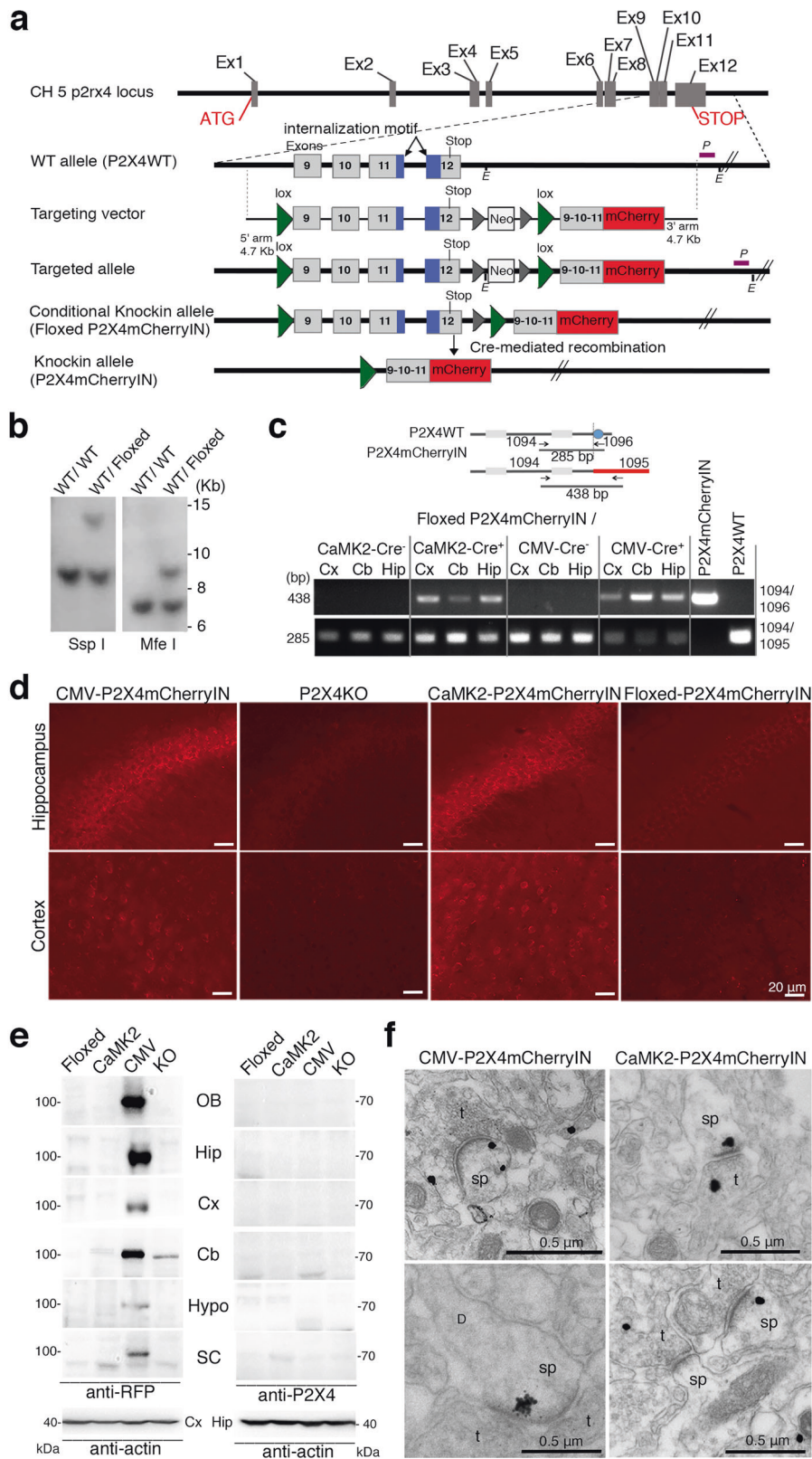
ratio showed that P2X4mCherryIN is more effectively translocated to the surface than P2X4WT in *Xenopus* oocytes (Fig. 1d, $p < 0.05$).

We next transfected hippocampal neurons and Cos cells (Fig. 1e–h and Supplementary Fig. S1a–d) with extracellularly tagged HA-P2X4WT and HA-P2X4mCherryIN to visualize surface P2X4 on living cells using anti-HA

antibodies. Total HA-P2X4 was revealed after cell permeabilization using anti-P2X4 antibodies while the endogenous fluorescence of mCherry fused to P2X4 allowed for direct visualization. HA-P2X4WT is weakly expressed at the surface and is found mainly in intracellular puncta restricted to the soma and proximal dendrites of neurons [27]. In contrast, HA-P2X4mCherryIN was ~ 10 times more expressed at the surface of neurons. Surface P2X4mCherryIN puncta are uniformly distributed at the surface including distal dendrites. Co-staining with the postsynaptic marker Homer-1c-GFP revealed that surface P2X4mCherryIN are equally distributed in small extrasynaptic clusters and in larger clusters juxtaposed to synapses (Fig. 1g, h and Supplementary Fig. S1d). Finally, we confirmed the predominant intracellular localization of untagged P2X4WT in mouse transfected hippocampal neurons using Nodu-246, a rat monoclonal antibody recognizing the native extracellular domain of mouse P2X4 [52], whereas P2X4mCherryIN is highly and uniformly distributed at the cell surface (Fig. 1i).

Generation of knock-in mice with noninternalized P2X4mCherryIN and expression in the brain

We generated the conditional Floxed P2X4mCherryIN knock-in mice (Floxed) by homologous recombination using a targeting vector (see Fig. 2a) designed to flox the last four exons (exons 9 to 12) of *P2rx4* allele (P2X4 internalization motif being located on exons 11 and 12) and followed by the insertion of a DNA fragment corresponding to the fusion of exons 9, 10, and partially 11 with mCherry cDNA. We next generated CMVCre⁺-P2X4mCherryIN^{F/F} (namely CMV) mice and CaMK2Cre⁺-P2X4mCherryIN^{F/F} (CaMK2) mice by breeding Floxed mice with mice either expressing the Cre recombinase under the cytomegalovirus (CMV-Cre) or the calmodulin kinase 2 (CaMK2-Cre) promoter (Supplementary Fig. S2). Cre-dependent excision of Floxed P2X4mCherryIN allele would lead to the replacement of P2X4WT by noninternalized P2X4mCherryIN. It is important to note that excised *p2rx4* gene remains under the control of its own promoter, thus P2X4mCherryIN will replace P2X4WT only in cells expressing natively P2X4 without altering its distribution pattern or its expression level. In CMV mice, where a Cre-dependent excision occurs in all cells, P2X4mCherryIN would replace P2X4WT in all cells natively expressing P2X4 throughout the body. In CaMK2 mice, substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN is expected to be restricted to excitatory forebrain neurons natively expressing P2X4, while other P2X4 expressing cells such as glial cells and other neuronal types express P2X4WT. Homozygous Floxed, CMV and CaMK2 mice were used in all the following experiments and were viable, normal in size or weight reproduced



◀ **Fig. 2 Generation of conditional P2X4mCherryIN knock-in mice and P2X4 expression in CMV-Cre or CaMK2-Cre P2X4mCherryIN knock-in mice.** **a** Schematic diagram of the mouse *P2xr4* gene and targeting vector strategy used to generate Floxed P2X4mCherryIN knock-in mice by homologous recombination (Floxed). By breeding Floxed P2X4mCherryIN with CMV-Cre mice or CaMK2-Cre mice, we generated constitutive CMVCre-P2X4mCherryIN (CMV) and CaMK2Cre-P2X4mCherryIN (CaMK2) to obtain a gain-of-function of P2X4 in all cells or in excitatory forebrain neurons natively expressing P2X4, respectively. **b** Southern blot of genomic DNA of WT and targeted allele (Floxed) using external probe (P) after digestion by *MfeI* or *SspI* enzyme (E) indicated in **a**. **c** Expression of P2X4WT and P2X4mCherryIN mRNAs by RT-PCR in cortex (Cx), cerebellum (Cb), and hippocampus (Hip) brain regions from Floxed P2X4mCherryIN, CMVCre⁺/Floxed P2X4mCherryIN (CMV) and CaMK2Cre⁺/Floxed P2X4mCherryIN (CaMK2) mice. **d–f** Protein expression of P2X4mCherryIN in the mouse brain revealed using anti-RFP antibodies recognizing mCherry protein. **d** Brain sections immunostained with anti-RFP antibodies show P2X4mCherryIN expression in the hippocampus and cortex of CMVCre-P2X4mCherryIN and CaMK2Cre-P2X4mCherryIN while no signal is visible in Floxed P2X4mCherryIN and P2X4 Knockout (KO) mice (see also Supplementary Fig. S3). Scale bar, 20 μ m. **e** Western blotting of total proteins extracted from distinct CNS regions isolated from CMV-P2X4mCherryIN (CMV), CaMK2-P2X4mCherryIN (CaMK2), Floxed P2X4mCherryIN, and P2X4KO mice revealed with anti-RFP or anti-P2X4 antibodies. Anti-tubulin antibody was used as a loading control. OB olfactory bulb, Hip hippocampus, Cx cortex, Cb cerebellum, Hypo hypothalamus, SC spinal cord. **f** Electron microscopy images showing preembedding anti-RFP immunostaining in CA1 region of the hippocampus or cortex from CMV-P2X4mCherryIN and CaMK2-P2X4mCherryIN mice (see also Supplementary Fig. S3). Staining is close to the plasma membrane of pre- and post-synaptic specializations of excitatory asymmetric synapses (top). Examples of spines where P2X4mCherryIN is detected only at the postsynapse, mainly located at the edge of the postsynaptic density. t presynaptic, sp spine. Scale bar, 0.5 μ m.

normally and displayed no obvious physical or behavioral abnormalities (see Supplementary information).

Reverse transcription (RT)-PCR in different brain regions from the different mice showed that Floxed mice solely expressed P2X4WT mRNA while CMV mice only expressed P2X4mCherryIN mRNA (Fig. 2c). As expected, CaMK2 mice expressed both WT and knock-in mRNAs since only a subset of P2X4 expressing cells (forebrain excitatory neurons) replace P2X4WT by P2X4mCherryIN. Next, we tested P2X4mCherryIN expression in the brain on a protein level (Fig. 2d–f). The sparse expression of P2X4 throughout the brain observed in previous works [3, 53] was recently confirmed using tdTomato *p2xr4* reporter mice in which the detection of cytosolic tdTomato-expressing cells required the use of anti-tdTomato antibodies [15]. Not surprisingly, endogenous fluorescence of mCherry fused to P2X4 was not directly visible on brain slices of the different knock-in mice but could be visualized using anti-RFP antibodies. P2X4mCherryIN was detected in the pyramidal neuron layer of the hippocampus and in the soma of neurons throughout the cortex [3, 15] in both CMV and CaMK2, but not in Floxed or P2X4 knockout (P2X4KO)

mice (Fig. 2d). In addition, we confirmed the abundant expression of P2X4mCherryIN in the epithelial glomerular layer of the olfactory bulb [15, 54], as well as a moderate presence in cerebellar Purkinje cells [3, 15] of CMV mice but not of CaMK2 mice, as expected. These results showed that P2X4mCherryIN distribution in CMV mice is similar to that of P2X4 in WT mice [15] and the restricted detection of P2X4mCherryIN in forebrain neurons in CaMK2 mice confirmed the specificity of Cre-dependent excision. (Supplementary Fig. S3a–b). The detection of a 100 kDa band with anti-RFP antibodies in western blots of total proteins from different brain regions confirmed the substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN in CMV mice (Fig. 2e). The absence of detection of P2X4mCherryIN in CaMK2 mice indicated that the replacement of P2X4WT by P2X4mCherryIN is more widespread in the CMV than in CaMK2 mice, as expected. Moreover, the absence of detection of P2X4WT in Floxed or CaMK2 mice with anti-P2X4 confirmed the sparse P2X4 expression in the brain tissues (Fig. 2e).

E.M. of anti-RFP labeling in hippocampal CA1 region or cortex revealed that P2X4mCherryIN was present at post-synaptic sites of excitatory synapses, preferentially at the edge of the postsynaptic density (Fig. 2f). At some asymmetric excitatory synapses, P2X4mCherryIN was located at both pre- and post-synaptic sites (Fig. 2f) and also found intracellularly in association with the endoplasmic reticulum membranes or occasionally with mitochondria (Supplementary Fig. S3c). This suggests that replacement of P2X4WT by P2X4mCherryIN does not alter its subcellular distribution [3]. The identification of symmetric synapses on morphological criteria being difficult, the presence of P2X4 at GABAergic synapses was not confirmed in CMV mice. In contrast, E.M. analysis revealed the presence of P2X4mCherryIN in astrocytes of CMV mice in the astrocyte end-feet encircling endothelial cells (Supplementary Fig. S3d).

Endogenous P2X4mCherryIN fluorescence is directly observable in macrophages or after LPS-induced de novo expression in microglia of CMV mice

In mice, de novo P2X4 expression was observed in spinal microglia after nerve injury or in the brain after intracerebral lipopolysaccharide (LPS) injection in tdTomato *P2xr4* reporter mice [15, 38, 39, 41, 55]. We performed in vivo LPS microinjections into the hippocampus of CMV, CaMK2, Floxed, and P2X4KO mice and examined P2X4mCherryIN fluorescence (Fig. 3 and Supplementary Fig. S4). In control saline-injected mice, no endogenous mCherry fluorescence was visible in the hippocampus of all mouse genotypes and only a faint staining was revealed for the microglial marker Iba1 (Fig. 3a). In contrast, a strong

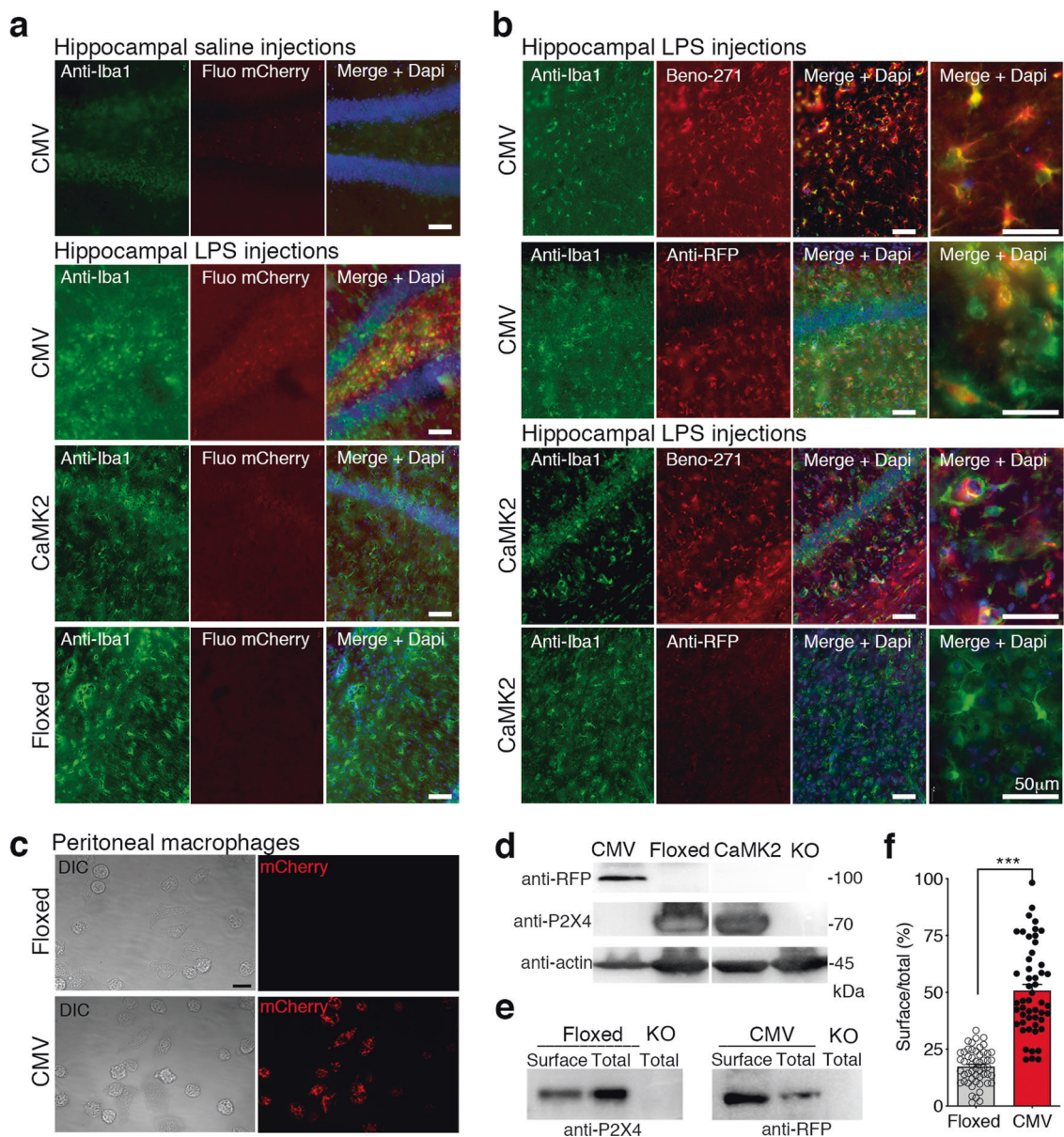


Fig. 3 Endogenous P2X4mCherryIN fluorescence in hippocampal microglia after LPS-induced de novo P2X4 expression and in peritoneal macrophages from CMV-P2X4mCherryIN mice. **a** Representative immunohistochemistry images of Iba1 and endogenous fluorescence of P2X4 mCherryIN (top, left) from the hippocampal region of the different mice injected with saline or 4 μ g LPS on each side (see also Supplementary Fig. S4). The mCherry fluorescence increased in Iba1-positive cells after LPS specifically in CMV mice. **b** Immunodetection of P2X4mCherryIN using Beno-271 antibodies (a camelid nanobody directed against the extracellular domain of native P2X4) and anti-RFP antibodies from CMV or CaMK2 mice after LPS injections. An enlarged overlay reveals that the increase of P2X4mCherryIN is detected in Iba1-positive microglia cells by both antibodies in CMV mice while such increase is observed only with Beno-271 in CaMK2 mice. Scale Bar, 50 μ m. **c** Endogenous P2X4mCherryIN fluorescence of macrophages isolated from the peritoneal cavity of Floxed and CMV mice. Differential interference contrast (DIC) and red fluorescence images reveal the P2X4mCherryIN exclusively in CMV mice. Scale bar, 20 μ m. **d** Western blotting

of total proteins from macrophages of CMV, CaMK2, Floxed, and P2X4KO mice using anti-RFP and anti-P2X4 revealed that P2X4WT is substituted by P2X4mCherryIN in macrophages of CMV mice only. P2X4mCherryIN is not detected by anti-P2X4 directed against the C-terminal of P2X4. Antiactin antibody was used as loading control. **e, f** Surface P2X4 expression is increased in CMV mouse peritoneal macrophages. Representative immunoblots of total and biotinylated surface proteins from peritoneal macrophages isolated from Floxed and CMV mice revealed with anti-P2X4 and anti-RFP antibodies, respectively. As in **d**, total proteins of P2X4KO macrophages were used as a negative control. **f** Quantification of surface/total expression of P2X4WT and P2X4mCherryIN in macrophages shown representatively in **e**. Bars represent mean \pm s.e.m. of the surface/total ratio of P2X4WT (Gray bar, $17.36 \pm 1.03\%$, $n = 53$) in Floxed mice and P2X4mCherryIN in CMV mice (red bar, $50.79 \pm 2.71\%$, $n = 51$) and show that P2X4 surface expression is strongly increased in cells expressing P2X4mCherryIN mice compared with those expressing P2X4WT. The number of independent experiments is indicated by clear and black circles. *** $P < 0.001$, unpaired t -test.

increase in Iba1 staining was detected in all LPS-injected mouse lines attesting the microglial activation (Fig. 3a, b and Supplementary Fig. S4). Remarkably, endogenous fluorescence of P2X4mCherryIN was directly visible and colocalized with Iba1 in CMV mice, but not in Floxed or CaMK2 mice. Anti-RFP confirmed the abundant and specific P2X4mCherryIN expression in Iba1-positive cells solely in LPS-treated CMV mice. Notably, using Beno-271, a camelid nanobody recognizing the extracellular domain of mouse P2X4 [52], we showed increased P2X4 surface expression in microglia of CMV, CaMK2, and Floxed but not of P2X4KO mice (Fig. 3b and Supplementary Fig. S4). These results validate the cellular specificity of the Cre-mediated excision in both knock-in mice and show that de novo expression of P2X4 induced by LPS can be directly monitored by the visualization of the fluorescence of mCherry fused to P2X4.

P2X4 has been shown to be highly expressed in macrophages [41]. Endogenous mCherry fluorescence was directly visualized in freshly isolated peritoneal macrophages from CMV mice (Fig. 3c), the only knock-in line expressing P2X4mCherryIN receptors in macrophages as confirmed by western blots of macrophages isolated from CMV, CaMK2, Floxed, and P2X4KO mice (Fig. 3d). To assess surface/total ratio of P2X4 and P2X4mCherryIN by western blot analysis, biotinylation assays were performed using macrophages in suspension. Our results showed that the number of surface P2X4mCherryIN is significantly higher in CMV (Fig. 3e, f) than in Floxed mice expressing P2X4WT, demonstrating that the substitution of P2X4 by P2X4mCherryIN leads to an increase in surface P2X4 density in macrophages from CMV mice.

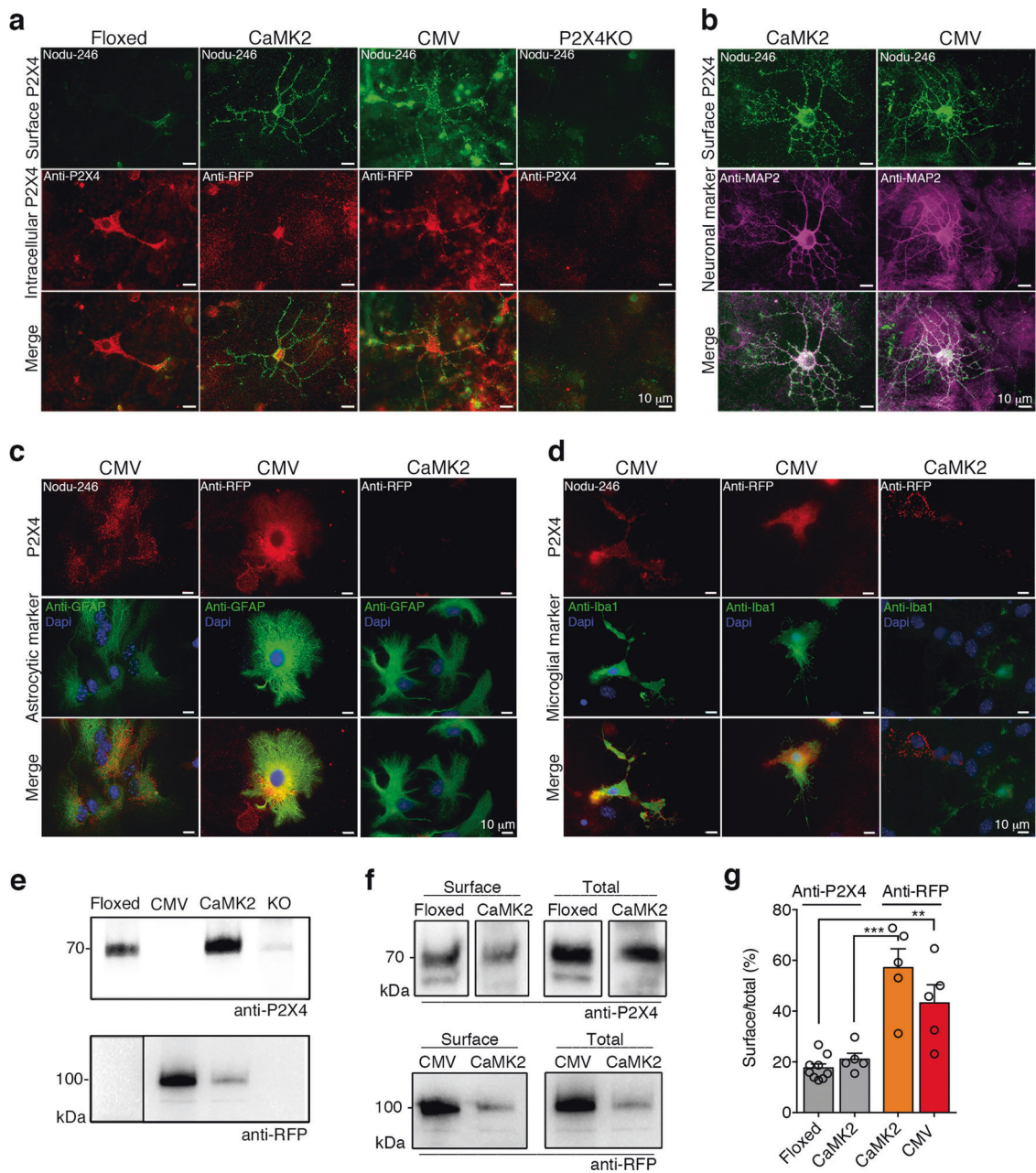
P2X4mCherryIN is differentially upregulated at the surface of neurons and glia in CMV and CaMK2 mice

To demonstrate surface upregulation of P2X4mCherryIN in the CNS, we performed immunofluorescence experiments using hippocampal cultures from pups of both CMV, CaMK2 Floxed, or P2X4KO mice. We showed the distribution of surface vs. intracellular P2X4 using antibodies targeting either the native extracellular domain of P2X4 (Nodu-246), or against the intracellular C-tail of either P2X4WT (anti-P2X4) or P2X4mCherryIN (anti-RFP, Fig. 4). In the Floxed mice, most P2X4WT was detected intracellularly (Fig. 4a) as described previously [27, 28, 34]. In contrast, in both CMV and CaMK2 cells, a strong surface staining was detected using Nodu-246, as well as the presence of RFP labeling, indicating the high density of P2X4mCherryIN on the surface of these hippocampal cells (Fig. 4a). In cells from P2X4KO mice, no P2X4 was detected on the cell surface or intracellular (Fig. 4a). Anti-MAP2 antibodies revealed the specific expression of

P2X4mCherryIN in neurons in both CMV and CaMK2 transgenic lines (Fig. 4b and Supplementary Fig. S5a). Using antibodies against astrocytic GFAP and microglial Iba1 markers combined with Nodu-246 and anti-RFP, revealed the presence of surface P2X4mCherryIN in microglia and astrocytes from CMV, but not CaMK2 mice (Fig. 4c, d and Supplementary Fig. S5b). Consistently, western blotting of proteins extracted from hippocampal cultures of the different knock-in lines allowed the identification of P2X4mCherryIN proteins in the CMV and CaMK2 exclusively, whereas P2X4WT was detected in Floxed and CaMK2 hippocampal cells (Fig. 4e). Next, we examined surface and total P2X4 levels using either anti-P2X4 or anti-RFP antibodies by biotinylation assays and western blotting of hippocampal cells from the different transgenic mice. Quantification of immunoblots (Fig. 4f) clearly indicates that P2X4WT in Floxed and CaMK2 mice is mainly intracellular (Fig. 4g), while the amount of P2X4mCherryIN on the cell surface is significantly higher in both CMV and CaMK2 cells (Fig. 4a–d). Altogether, these results confirm that substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN is restricted to excitatory neurons of CaMK2 mice while in CMV mice, the substitution occurs in all cells endogenously expressing P2X4 in CMV mice. In addition, our results demonstrate that P2X4mCherryIN expression leads to a stronger surface localization of P2X4mCherryIN in both CMV and CaMK2 mice (Fig. 4g).

Increased surface density of P2X4 alters LTP and LTD at CA1 hippocampal synapses

We next examined the impact of noninternalized P2X4mCherryIN in hippocampal synaptic plasticity. Field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) were recorded in the hippocampal CA1 region after stimulation of pre-synaptic Schaffer collateral axons in acute brain slices from control Floxed and both CaMK2 or CMV mice (Fig. 5a–f). The input/output curves obtained by plotting fEPSP slopes against the amplitude of stimulation (Fig. 5b) showed no significant differences between slices from CMV or CaMK2 mice compared with control Floxed mice indicating that increased P2X4 surface receptors do not disrupt basal excitatory transmission at CA1 synapses. LTP and LTD were then evaluated. Robust LTP was induced in slices from Floxed mice with persistent potentiation (Fig. 5c, d). High frequency stimulation failed to trigger a potentiation in CaMK2 slices, while in CMV slices a potentiation was induced, but evoked responses returned rapidly to baseline after the induction. At 40 min post induction, LTP was absent in slices from both CMV and CaMK2 mice (Fig. 5c, d). Increased surface P2X4 appears to block LTD as well (Fig. 5e, f). LTD was induced in slices from Floxed, CMV and CaMK2 mice but a significant persistent synaptic



depression was recorded solely in Floxed mice only (Fig. 5e, f). LTD from CMV and CaMK2 slices was not significantly different from baseline. Altogether, these results demonstrate that increased surface P2X4 blocks LTP and alters LTD at hippocampal CA1 synapses. Moreover, the effects are more pronounced when surface P2X4 is increased exclusively in forebrain excitatory neurons.

Increased surface density of P2X4 in forebrain neurons alters anxiety and memory functions

Next, the impact of noninternalized P2X4mCherryIN expression on the behavior of the different transgenic mice

was then examined using a battery of tests (Fig. 5g–p and Supplementary Fig. S6). First, potential changes in their general activity were assessed during open field exploration (Fig. 5g–i). Floxed, CaMK2, and CMV mice showed similar velocity and total distance traveled in the arena, indicating that increased surface P2X4 does not modulate basal locomotor activity (Fig. 5g, h and Supplementary Fig. S6b). Interestingly, CaMK2 mice spent significantly more times in the central zone (red area) compared with the other groups of mice (Fig. 5i), suggesting that increased surface P2X4 density may reduce anxiety-like behavior. Neophobia-related anxiety was additionally examined by placing a novel object in the center of the arena (Fig. 5j–l;

◀ **Fig. 4 Surface P2X4mCherryIN expression is increased in hippocampal neurons of CaMK2 or CMV mice as well as in glial cells of CMV mice.** **a** Representative images of surface and total P2X4WT and/or P2X4mCherryIN in Floxed, CMV, and CaMK2 primary hippocampal cell cultures reveal that surface P2X4mCherryIN is strongly increased compared with P2X4WT. Extracellular surface P2X4 and P2X4mCherryIN are visualized using Nodu-246 (green) antibodies. Intracellular P2X4WT is revealed by anti-P2X4 antibodies (red) in Floxed and P2X4KO mice while intracellular P2X4mCherryIN is revealed using anti-RFP antibodies (red) from CaMK2 and CMV mice. Staining was performed at 21 *div*. Scale bars, 10 μ m. **b** High density of surface P2X4mCherryIN using Nodu-246 (green) is detected in CaMK2 and CMV neurons identified using neuronal MAP2 marker (magenta). Surface P2X4WT is almost absent in Floxed mice and not detected in P2X4KO neurons (see Supplementary Fig. S5). **c, d** P2X4mCherryIN is expressed only in astrocytes and microglia of CMV mice solely. **c** Surface and total P2X4mCherryIN revealed using Nodu-246 and anti-RFP antibodies (red) respectively, in GFAP-positive astrocytes (green) from seven *div* primary hippocampal CMV cells. Nuclear marker DAPI is shown in blue. **d** Surface and total P2X4mCherryIN using Nodu-246 or anti-RFP antibodies (red), respectively, in microglia stained using anti-Iba1 antibodies (green) from 21 *div* primary hippocampal cells from CMV mice. Nuclear marker DAPI is shown in blue. **e** Western blotting of total proteins from primary hippocampal cells from Floxed, CMV, CaMK2, and P2X4KO mice using anti-RFP and anti-P2X4 antibodies reveal P2X4mCherryIN specifically in CMV and CaMK2 mice while P2X4WT is detected in CaMK2 and Floxed mice. **f** Representative immunoblots of total and biotinylated surface proteins from primary hippocampal cells isolated from Floxed, CMV, and CaMK2 mice revealed with either anti-P2X4, anti-RFP or both antibodies, respectively. As in **e**, total proteins of P2X4KO macrophages were used as a negative control. **g** Quantification of surface/total P2X4WT and P2X4mCherryIN in hippocampal cells. Bars represent mean \pm s.e.m. of the surface/total ratio of P2X4WT (gray bar) in Floxed and CaMK2 mice and P2X4mCherryIN in CaMK2 (orange bar) or CMV mice (red bar) and show that P2X4 surface expression is strongly increased in cells expressing P2X4mCherryIN mice compared with those expressing P2X4WT. The number of independent experiments is indicated by circles. one-way ANOVA, and Bonferroni's post hoc test, $F(3, 20) = 17.2$; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

[56]). The latency to first exploring the novel object was slightly lower for CaMK2 than for CMV and Floxed mice but this difference failed to reach significance (Fig. 5k). However, CaMK2 mice spent significantly more time exploring the object than Floxed or CMV mice (Fig. 5l), suggesting that anxiety is lower in these mice. To corroborate these findings, the three mouse lines were tested in the elevated plus maze (Fig. 5m). Compared with CMV and Floxed mice, CaMK2 mice spent a greater proportion of time in the open arms of the maze, confirming their anxiolytic phenotype. These results indicate that neuronal P2X4 is involved in the regulation of anxiety-like behavior, with an increased number of P2X4 on neuronal surfaces resulting in reduced anxiety.

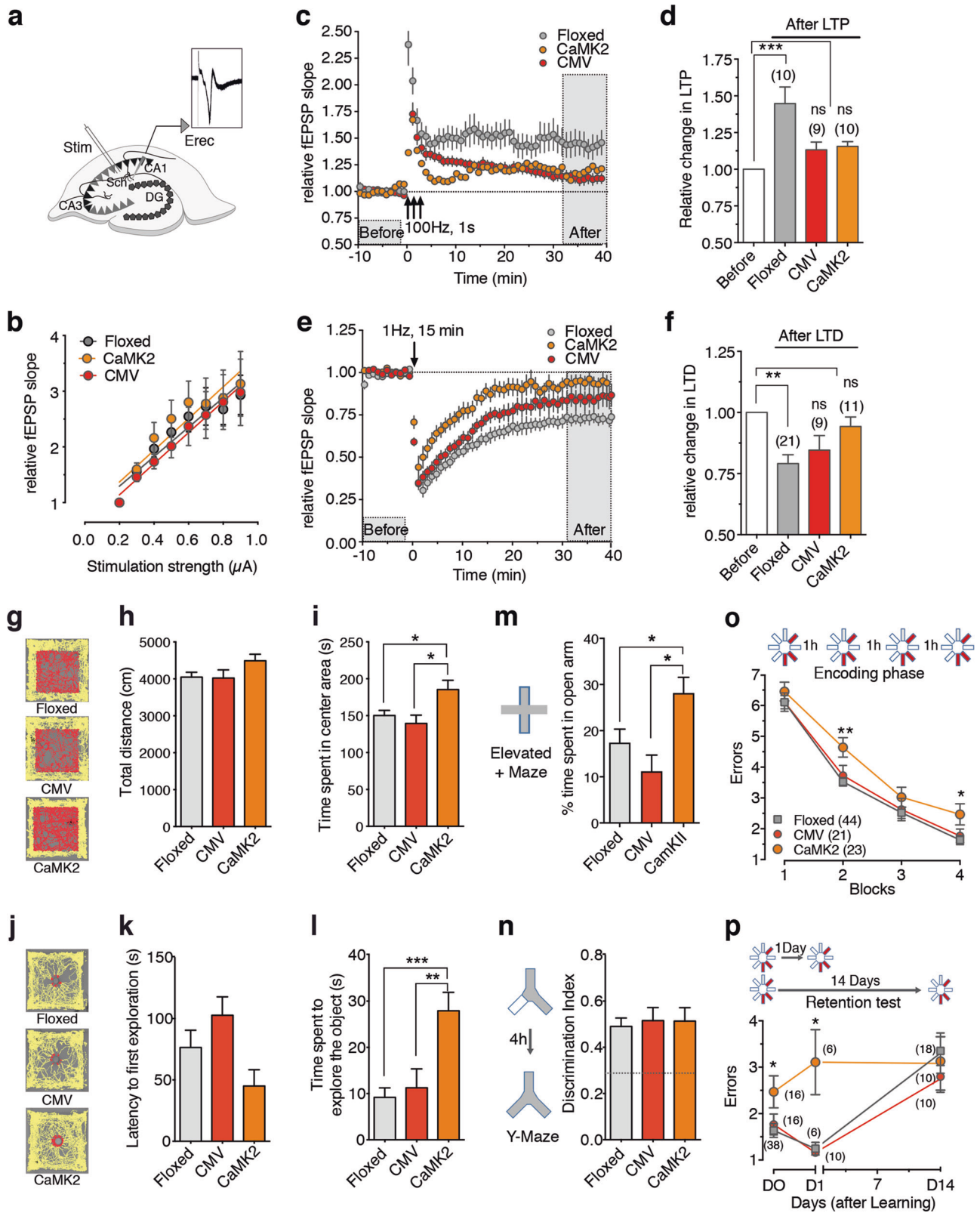
Spatial recognition memory was then evaluated using a modified version of the Y-maze two-trial arm discrimination task (Fig. 5n and Supplementary Fig. S6; [57]). After a single encoding phase of 10 min with only two accessible

arms, an inter-trial interval of 4 h resulted in a robust and similar preference for the unexplored, previously inaccessible, arm during the test phase in CMV, CaMK2, and Floxed mice. Thus, mice from all genotypes were capable of processing visuo-spatial information and forming short-term spatial recognition memory.

We next asked whether impairments in learning and memory underlie the observed synaptic plasticity deficits. We examined spatial memory in a more cognitively challenging situation by submitting CMV, CaMK2, and Floxed mice to spatial discrimination tests in the eight-arm radial maze. Mice were required to locate the three constantly baited arms of the maze (Fig. 5o). To provide a rigorous control over the time course of neuronal events induced by spatial learning, we trained the mice over one single day. Reference memory training consisted of four equivalent blocks of six trials separated by a 1 h interval. Each trial started with all eight arms opened and terminated when the mouse entered the third baited arm and returned to the central platform of the maze. While the number of reference memory errors (i.e., entries into unbaited arms) decreased significantly over the four training blocks in all three mouse lines (Fig. 5o), CaMK2 mice made significantly more errors than CMV and Floxed mice (Fig. 5k, $p = 0.0094$). Poorer performance of CaMK2 was particularly apparent in training blocks 2 and 4 compared with Floxed and CMV mice. Subsequently recent and long-term memory were evaluated by submitting mice to retrieval testing 1 and 14 days after training completion (Fig. 5p). As expected, Floxed mice exhibited memory decay over time with an increased number of reference memory errors at day 14. A similar decay was observed in CMV mice, indicating that forgetting was unaffected in this mouse line. In contrast, the poorer performance of CaMK2 mice achieved upon training remained stable across delays and was not further exacerbated by the passage of time. At day 14, the number of reference memory errors was elevated but similar for all three genotypes. Thus, selective expression of non-internalized P2X4mCherryIN in excitatory forebrain neurons translated into impaired spatial memory processing.

Discussion

To address pathologically increased surface P2X4 functions, we created a Floxed knock-in P2X4mCherryIN mouse line and generated two distinct conditional P2X4mCherryIN lines, expressing noninternalized P2X4mCherryIN either in all cells natively expressing P2X4 (CMV mice) or in excitatory forebrain neurons (CaMK2 mice), respectively. Both CMV and CaMK2 P2X4mCherryIN knock-in mice were viable, reproduced normally and displayed no manifest phenotypic issues. The key finding of this study



is that the increased surface density of P2X4 in forebrain excitatory neurons is a major regulator of hippocampal synaptic plasticity, learning and memory and anxiety

functions indicating that increased neuronal P2X4 observed in AD models may have a key role in the pathogenesis of AD [25].

Fig. 5 Surface increase of neuronal P2X4 impairs LTP and LTD at CA1 hippocampal synapses and alters anxiety, spatial learning, and memory.

a Schematic drawing of the experimental protocol and example of an fEPSP recorded from the hippocampal CA1 region (Erec). fEPSP were induced by the electrical stimulation (stim) of the Schaffer collaterals (Sch) in the CA3 area and recorded in the stratum radiatum layer in brain slices of Floxed, CaMK2, and CMV P2X4mCherryIN mice. DG dentate gyrus. **b** The relative field slope is plotted against stimulation intensity. The input/output curves for neurons in hippocampal slices from Floxed (gray circles, $n = 7$), CaMK2 (orange circles, $n = 7$) and CMV P2X4mCherryIN (red circles, $n = 6$) mice show similar linear regression (mean \pm s.e.m., one-way ANOVA, $F(2, 18) = 0.15$; $p = 0.85$) indicating that basal synaptic transmission is not affected by the increase of surface P2X4 expression. **c, d** Surface P2X4 increase impairs LTP. **c** Plots of normalized fEPSP slopes recorded in CA1 over time before and after the induction of LTP. LTP was induced by three tetanic trains (100 Hz, 1 s) with a 20 sec interval) in control Floxed ($n = 10$), CaMK2 ($n = 10$) or CMV mice ($n = 9$). **d** Bar graph summary showing the relative change of fEPSP slope 30–40 min after the induction of LTP in Floxed ($144.7 \pm 11.3\%$ of baseline, $n = 10$), CMV mice ($113.2 \pm 5.27\%$ of baseline, $n = 9$) or CaMK2 ($115.6 \pm 3.25\%$ of baseline, $n = 10$), one-way ANOVA and tuckey's post hoc test; $F(3, 25) = 9.41$; $p = 0.002$, $***p < 0.001$. Error bars: s.e.m.; the number of mice is indicated in parentheses. **e, f** Increased surface P2X4 impairs LTD. **e** Plots of normalized fEPSP slopes recorded in CA1 over the time before and after the induction of LTD with a 1 Hz, 15 min train Floxed ($n = 21$), CaMK2 ($n = 11$), and CMV mice ($n = 9$). **f** Bar graph summary showing the relative change of fEPSP slope 30–40 min after the induction of LTD in Floxed ($79.09 \pm 3.63\%$ of the baseline, $n = 22$, $p < 0.001$), CMV ($84.58 \pm 5.97\%$ of baseline, $n = 8$, $p > 0.05$) and CaMK2 mice ($94.24 \pm 3.89\%$ of baseline, $n = 9$, $p > 0.05$). one-way ANOVA and tuckey's post hoc test; $F(3, 44) = 5.44$; $p = 0.0028$, $**p < 0.01$; Error bars: s.e.m.; the number of mice is indicated in parentheses. **g–i** Open field assessments of control (Floxed mice, $n = 24$) and CaMK2 ($n = 13$) or CMV ($n = 12$) P2X4mCherryIN mice. **g** Examples of exploration trajectories (top view) in the empty arena for each type of mice. Peripheral and central activities are indicated by yellow and red traces, respectively. **h** Similar total travel distance by

each mouse line in the empty arena during 10 min was similar. **i** CaMK2 mice spent more time in the central arena compared with Floxed and CMV mice, one-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test; $F(2, 46) = 5.139$; $p = 0.0097$, $**p < 0.01$. **j–l** One object exploration test in control (Floxed mice, $n = 24$) and CaMK2 ($n = 13$) or CMV ($n = 12$) P2X4mCherryIN mice. **j** Examples of exploration trajectories (top view) for each type of mice. Activities far away or at proximity of the object are indicated in yellow or red, respectively. **k** Latency to first interaction with the novel object is shown for each type of mouse. One-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test, $F(2, 46) = 2.868$; $p = 0.067$. **l** CaMK2 mice spent more time exploring the novel object than Floxed and CMV mice. One-way ANOVA, $F(2, 46) = 10.27$; $p = 0.0002$; $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. **m** Mean percent of time spent in the open arms of the elevated plus maze for Floxed mice ($n = 22$), CaMK2 ($n = 14$), and CMV ($n = 11$) mice. CaMK2 spent more time in the open arms, indicating reduced anxiety compared with the other mouse lines. One-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test, $F(2, 44) = 5.186$; $p = 0.0095$; $*p < 0.05$. **n** Spatial recognition memory evaluated in the Y-maze. Floxed ($n = 24$), CaMK2 ($n = 13$), or CMV ($n = 12$) mice were able to recognize the novel arm of the maze that was rendered accessible 4 h after encoding (one-way ANOVA, $F(2, 46) = 0.097$; $p = 0.907$). **o, p** Spatial learning and memory assessment using the eight-radial maze in Floxed mice (gray), CaMK2 (orange) and CMV (red) mice. The number of mice in each group is indicated in parentheses. **o** Learning occurred over one single day and consisted of four blocks of six trials separated by a 1 h interval. The location of the three constantly baited arms of the maze is indicated in red. CaMK2 mice committed more reference memory errors (visits to unbaited arms) compared with Floxed and CMV mice. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. Paired two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test, Time effect, $F(3, 255) = 205.3$, $p < 0.0001$. Paired two-way ANOVA, genotype effect, $F(2, 85) = 4927$, $p = 0.0094$. **p** Retrieval testing 1 (recent) or 14 (long-term) days after initial training in the eight-arm radial maze for all three mouse lines. Performance achieved on the fourth training block (D0) is shown for comparison. The poorer performance exhibited by CaMK2 mice (higher number of errors) was not exacerbated by the passage of time. $*p < 0.05$, paired two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test, delay effect, $F(1, 35) = 11.70$; $p = 0.0016$. All data are presented as mean \pm s.e.m.

Importantly, analysis of P2X4mCherryIN expression showed that substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN occurred in the expected brain regions in both strains. In CMV mice, the expression pattern of P2X4mCherryIN is consistent with what was described for WT P2X4 in the CNS, i.e., high expression in the olfactory epithelium and a sparse expression in the hippocampus, cortex, cerebellum, and spinal cord [3, 15, 53]. In addition, and in line with other findings [41, 58], P2X4mCherryIN was also found expressed in peritoneal macrophages of CMV mice. In CaMK2 mice, P2X4mCherryIN expression was mainly restricted to hippocampal and cortical regions, in line with previous reports of CaMK2 promoter selectivity [59]. The in vitro expression of P2X4mCherryIN construct revealed that the substitution of the last 11 amino acids of the C-tail of mouse P2X4 by the red fluorescent protein mCherry increases surface trafficking without altering P2X4 function and subcellular targeting [3, 27, 28, 30, 42, 43]. Indeed, in both CMV and CaMK2 knock-in mice, E.M. confirmed that P2X4mCherryIN are localized at both

pre- and post-synaptic specializations in hippocampal or cortical excitatory neurons, as expected [2, 3, 15]. Inhibitory symmetric synapses are difficult to identify based on morphology criteria, thus the presence of P2X4mCherryIN at the GABAergic synapse, where P2X4 was reported to be present, remains to be shown by including specific markers [9, 10, 42]. Surface and intracellular staining on hippocampal cultures as well as biotinylation experiments from the different knock-in mice demonstrate that substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN induced a significant increase in surface P2X4 in both CaMK2 and CMV neurons. In addition, P2X4mCherryIN was found to be present and upregulated at the surface of hippocampal microglia and astrocytes as well as macrophages of CMV mice. P2X4 expression in astrocytes has been previously observed, but was debated [60]. Notably, P2X4mCherryIN was detected in hippocampal astrocytes in vitro, but was detected on brain slices by E.M. only.

In contrast to transfected cells overexpressing P2X4mCherryIN, direct fluorescence of P2X4mCherryIN

was undetectable from brain slices and hippocampal cultures of both knock-in mice, preventing the direct identification and functional characterization of P2X4mCherryIN-expressing cells. Fluorescence of P2X4mCherryIN was directly visible solely in isolated peritoneal macrophages of CMV mice in agreement with its high basal expression in macrophages [41]. Interestingly, following LPS injection in the hippocampus to induce microglial activation and increase de novo P2X4 expression [15], endogenous fluorescence of P2X4mCherryIN was revealed in Iba1-positive microglia exclusively in CMV mice. These results indicate that the P2X4mCherryIN fluorescence may represent a unique tool to directly monitor increased P2X4 expression in pathological models such as chronic pain, AD, ALS, alcohol intake, inflammation, epilepsy, ischemia, or brain trauma [14, 19, 22, 23, 25, 26, 35–38, 55, 61].

LTP and LTD phenomena are widely recognized as crucial molecular mechanisms underlying cognitive functions such as learning and memory [62]. Although activation of P2X receptors by glial ATP was recently shown to directly modulate glutamatergic synaptic strength [10], P2X receptors exert modulatory actions exclusively during activity-dependent plasticity at central synapses and do not influence basal synaptic transmission [17, 18, 63]. Previous studies have shown P2X4 modulating hippocampal LTP via N-methyl-D-aspartate receptor receptors (NMDAR), however these findings remained controversial. The first work using P2X4KO mice revealed that LTP in CA1 neurons was slightly reduced compared with WT mice and that potentiation of P2X4 by ivermectin enhanced LTP only in WT mice [17]. Results suggested that P2X4 may enhance the content of NR2B subunits in synaptic NMDARs [63]. In contrast, an other study showed that the pharmacological blockade of P2X4 facilitated the induction of NMDAR-dependent LTP indicating an inhibitory impact of P2X4 [18, 64]. Furthermore, increased P2X4 expression was reported in AD models [25] suggesting that P2X4 might also contribute to synaptic dysfunction and memory deficits. Field potential recordings show that P2X4mCherryIN expression does not change the basal excitatory transmission at CA1 synapses but causes impairments in both LTP and LTD in agreement with a negative impact of P2X4 on synaptic plasticity. Surprisingly, but in full agreement with our behavioral results, these deficits were stronger in CaMK2 than in CMV mice. Impaired LTP observed in CaMK2 mice occurred immediately suggesting a deficit of LTP induction. In contrast, in CMV mice, LTP was induced but progressively returned to baseline, rather indicating a deficit in LTP maintenance. Since basal excitation mediated by α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) is unchanged, and LTD or LTP in hippocampal CA1 neurons are mainly initiated post synaptically by NMDAR [62], our results suggest that

increased P2X4 in CA1 neurons might alter NMDAR function. P2X4 is highly permeable to calcium and can mediate a strong calcium influx at the resting membrane potential that may induce NMDAR inactivation [64]. P2X4 interacts also dynamically with various other ligand-gated ion channels such as GABA_A [10, 42, 65] and may lead to NMDAR inhibition by similar crosstalk.

Behavioral phenotyping of the CMV mice did not reveal any overt alterations. In contrast, CaMK2 mice exhibited a significant decrease in anxiety-like behaviors and impaired spatial learning and memory functions. No change in locomotor, anxiety-like or cognitive functions were previously observed in P2X4KO mice [66]. Together, these results suggest that, in contrast to the basal state, increased surface P2X4 density observed in neurons in pathological situations such as in AD [25] might play essential roles in the regulation of synaptic plasticity and behavior such as anxiety and learning and memory.

The absence of a phenotype of the CMV mice, although in agreement with the weaker effects on the synaptic plasticity of CMV compared with CaMK2 mice, is intriguing since substitution of P2X4WT by P2X4mCherryIN in all cells natively expressing P2X4 was expected to have more pronounced effects than specific P2X4mCherryIN expression solely in forebrain excitatory neurons. However, this could be explained by temporal differences between CMV and CaMK2 promoter activation. CMV is a ubiquitous early gene promoter leading to the genetic excision of Floxed P2X4mCherryIN in the germ-line and consequently from the beginning of the embryonic development while the CaMK2 promoter is considered as an adult promoter with postnatal activity reaching its maximum around the third postnatal week [67]. Expression of P2X4mCherryIN in all cells natively expressing P2X4 during the developmental period and thereafter may have deleterious effects leading to developmental compensations. Another possibility is that the expression of P2X4mCherryIN in CMV mice in other types of neurons along with expression in glial cells may counterbalance the effect of its increased surface density specifically in excitatory neurons. Indeed, increased P2X4 expression in spinal cord microglia during neuropathic conditions triggers the release of BDNF by microglia resulting in neuronal hyperexcitability [39, 40]. In addition, microglia and BDNF have been shown to influence synaptic plasticity and learning in the brain [68]. These results suggest that increased surface P2X4 in microglia of CMV mice may promote synaptic plasticity and counterbalance the negative impact of an increase of surface P2X4 specifically in excitatory neurons of CaMK2 mice.

P2X4 is present in multiple cell types in the peripheral or CNS and in various epithelial, endothelial, or immune cells. After injury and during inflammation and cell damage, high

levels of ATP are released and P2X4 is strongly upregulated on cell surfaces. This upregulation seems to orchestrate key events during neurodegenerative diseases, neuropathic and inflammatory pain, ischemia-induced inflammation, alcohol intake, airways inflammation in asthma, rheumatoid arthritis or postsurgical liver regeneration (see for review [14]).

These novel conditional knock-in mice defective for P2X4 internalization provide a valuable tool which will allow to further decipher the role of upregulated P2X4 state not only in the context of neurological diseases, but also of peripheral inflammation, infection as well as in lung, cardiac or liver functions [69–73].

Acknowledgements We thank G. Dabee for the production of all transgenic mice at the animal facility, H. Orignac for help with *Xenopus* facilities and E. Normand for stereotaxic injection. We thank the Mouse Clinical Institute (Institut Clinique de la Souris, MCI/ICS) in the Genetic Engineering and Model Validation Department who established the mouse mutant floxed P2X4mCherryIN line. We are grateful to F. Ras-sendren (IGF, Montpellier) for providing P2X4KO mice. We also thank the biochemistry facility of Bordeaux Neurocampus. Electron microscopy was performed at the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University. This work was supported by CNRS, University of Bordeaux, a grant LabEx BRAIN ANR-10-LABX-43 to EB-G and EB, a grant from Inserm for the generation of the mouse line to EB-G, the Louise and Alan Edwards Foundation, an awarded grant from Quebec Pain Research Network (QPRN) to TD, International Ph. D program of the IdEX of Bordeaux to EB-G and PS and DFG grant SFB1328-Z02 to FK-N.

Author contributions EB, TD, KSP, AM, J-TP, ED, A-EA, ET, MR, FG, ON performed the experiments and analyzed the data. PS, BB, SL, FG, SB, ON and EB-G designed the experiments and analyzed the data. PB, EB, FK-N contributed with key reagents. EB-G conceived the knock-in mice and the study. KSP, ON, and EB-G wrote the paper. All authors commented the paper.

Compliance with ethical standards

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

Ethical approval All experimental procedures complied with official European guidelines for the care and use of laboratory animals (Directive 2010/63/UE).

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Khakh BS, North RA. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*. 2012;76:51–69.
2. Rodrigues RJ, Almeida T, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA. Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 2005;25:6286–95.
3. Rubio ME, Soto F. Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci*. 2001;21:641–53.
4. Kaczmarek-Hajek K, Zhang J, Kopp R, Grosche A, Rissiek B, Saul A, et al. Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *eLife*. 2018;7:e36217.
5. Jo YH, Schlichter R. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci*. 1999;2:241–5.
6. Mori M, Heuss C, Gahwiler BH, Gerber U. Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol*. 2001;535:115–23.
7. Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, Bains JS. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci*. 2005;8:1078–86.
8. Pougnet JT, Toulme E, Martinez A, Choquet D, Hosy E, Boue-Grabot E. ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron*. 2014;83:417–30.
9. Lalo U, Palygin O, Rasooli-Nejad S, Andrew J, Haydon PG, Pankratov Y. Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol*. 2014;12:e1001747.
10. Boué-Grabot E, Pankratov Y. Modulation of central synapses by astrocyte-released ATP and postsynaptic P2X receptors. *Neural Plast*. 2017;2017:9454275.
11. Illes P, Verkhratsky A. Purinergic neurone-glia signalling in cognitive-related pathologies. *Neuropharmacology*. 2016;104:62–75.
12. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature*. 2009;460:592–8.
13. Egan TM, Khakh BS. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci*. 2004;24:3413–20.
14. Suurväli J, Boudinot P, Kanellopoulos J, Rützel Boudinot S. P2X4: a fast and sensitive purinergic receptor. *Biomed J*. 2017;40:245–56.
15. Xu J, Bernstein AM, Wong A, Lu XH, Khoja S, Yang XW, et al. P2X4 receptor reporter mice: sparse brain expression and feeding-related presynaptic facilitation in the arcuate nucleus. *J Neurosci*. 2016;36:8902–20.
16. Yeung D, Kharidia R, Brown SC, Gorecki DC. Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiol Dis*. 2004;15:212–20.
17. Sim JA, Chaumont S, Jo J, Ulmann L, Young MT, Cho K, et al. Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. *J Neurosci*. 2006;26:9006–9.
18. Pankratov Y, Lalo U, Krishtal OA, Verkhratsky A. P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience*. 2009;158:137–148.
19. Cavaliere F, Florenzano F, Amadio S, Fusco FR, Viscomi MT, D'Ambrosi N, et al. Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience*. 2003;120:85–98.
20. Franke H, Illes P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharm Ther*. 2006;109:297–324.
21. Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Disco*. 2008;7:575–90.
22. Apolloni S, Montilli C, Finocchi P, Amadio S. Membrane compartments and purinergic signalling: P2X receptors in neurodegenerative and neuroinflammatory events. *FEBS J*. 2009;276:354–64.
23. Volonte C, Apolloni S, Parisi C, Amadio S. Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology*. 2016;104:180–93.
24. Beggs S, Trang T, Salter MW. P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nat Neurosci*. 2012;15:1068–73.
25. Varma R, Chai Y, Troncoso J, Gu J, Xing H, Stojilkovic SS, et al. Amyloid-beta induces a caspase-mediated cleavage of P2X4 to promote purinotoxicity. *Neuromolecular Med*. 2009;11:63–75.
26. Casanovas A, Hernandez S, Tarabal O, Rossello J, Esquerda JE. Strong P2X4 purinergic receptor-like immunoreactivity is

- selectively associated with degenerating neurons in transgenic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol*. 2008;506:75–92.
27. Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD. P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci*. 2002; 22:4814–24.
 28. Royle SJ, Bobanovic LK, Murrell-Lagnado RD. Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *J Biol Chem*. 2002;277:35378–85.
 29. Qureshi OS, Paramasivam A, Yu JC, Murrell-Lagnado RD. Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J Cell Sci*. 2007;120:3838–49.
 30. Royle SJ, Qureshi OS, Bobanovic LK, Evans PR, Owen DJ, Murrell-Lagnado RD. Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *J Cell Sci*. 2005;118:3073–80.
 31. Toulme E, Garcia A, Samways D, Egan TM, Carson MJ, Khakh BS. P2X4 receptors in activated C8-B4 cells of cerebellar microglial origin. *J Gen Physiol*. 2010;135:333–53.
 32. Cao Q, Zhong XZ, Zou Y, Murrell-Lagnado R, Zhu MX, Dong XP. Calcium release through P2X4 activates calmodulin to promote endolysosomal membrane fusion. *J Cell Biol*. 2015;209:879–94.
 33. Huang P, Zou Y, Zhong XZ, Cao Q, Zhao K, Zhu MX, et al. P2X4 forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH. *J Biol Chem*. 2014;289:17658–67.
 34. Robinson LE, Murrell-Lagnado RD. The trafficking and targeting of P2X receptors. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:233.
 35. Andries M, Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L. Ivermectin inhibits AMPA receptor-mediated excitotoxicity in cultured motor neurons and extends the life span of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2007;25:8–16.
 36. Khoja S, Huynh N, Asatryan L, Jakowec MW, Davies DL. Reduced expression of purinergic P2X4 receptors increases voluntary ethanol intake in C57BL/6J mice. *Alcohol*. 2018; 68:63–70.
 37. Wyatt LR, Finn DA, Khoja S, Yardley MM, Asatryan L, Alkana RL, et al. Contribution of P2X4 receptors to ethanol intake in male C57BL/6 mice. *Neurochem Res*. 2014;39:1127–39.
 38. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003;424:778–83.
 39. Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, et al. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci*. 2008;28:11263–8.
 40. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 2005;438:1017–21.
 41. Ulmann L, Hirbec H, Rassendren F. P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J*. 2010;29:2290–300.
 42. Jo YH, Donier E, Martinez A, Garret M, Toulme E, Boue-Grabot E. Cross-talk between P2X4 and gamma-aminobutyric acid, type A receptors determines synaptic efficacy at a central synapse. *J Biol Chem*. 2011;286:19993–20004.
 43. Toulme E, Soto F, Garret M, Boue-Grabot E. Functional properties of internalization-deficient P2X4 receptors reveal a novel mechanism of ligand-gated channel facilitation by ivermectin. *Mol Pharm*. 2006;69:576–87.
 44. Chamma I, Heubl M, Chevy Q, Renner M, Moutkine I, Eugene E, et al. Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2013;33:15488–503.
 45. Ray A, Dittel BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp*. 2010.
 46. Berthet A, Porras G, Doudnikoff E, Stark H, Cador M, Bezard E, et al. Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci*. 2009;29:4829–35.
 47. Bertin E, Martinez A, Boue-Grabot E. P2X Electrophysiology and Surface Trafficking in *Xenopus* Oocytes. *Methods Mol Biol*. 2020;2041:243–59.
 48. Belzung C. Hippocampal mossy fibres: implication in novelty reactions or in anxiety behaviours? *Behav Brain Res*. 1992;51:149–55.
 49. Renner MJ, Bennett AJ, White JC. Age and sex as factors influencing spontaneous exploration and object investigation by preadult rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol*. 1992;106:217–27.
 50. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharm Biochem Behav*. 1986;24:525–9.
 51. Dellu F, Contarino A, Simon H, Koob GF, Gold LH. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2000;73:31–48.
 52. Bergmann P, Garcia de Paco A, Rissiek B, Menzel S, Dubberke G, Hua J et al. Generation and characterization of specific monoclonal antibodies and Nanobodies directed against the ATP-gated channel P2X4. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:498.
 53. Lê KT, Villeneuve P, Ramjaun AR, McPherson PS, Beaudet A, Seguela P. Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience*. 1998;83:177–90.
 54. Buell G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A. An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J*. 1996;15:55–62.
 55. Ulmann L, Levavasseur F, Avignone E, Peyrourou R, Hirbec H, Audinat E, et al. Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus. *Glia*. 2013; 61:1306–19.
 56. Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA. Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci*. 1999;19:9550–6.
 57. Nicole O, Hadzibegovic S, Gajda J, Bontempi B, Bem T, Meyrand P. Soluble amyloid beta oligomers block the learning-induced increase in hippocampal sharp wave-ripple rate and impair spatial memory formation. *Sci Rep*. 2016;6:22728.
 58. Layhadi JA, Turner J, Crossman D, Fountain SJ. ATP evokes Ca (2+) responses and CXCL5 secretion via P2X4 receptor activation in human monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2018;200:1159–68.
 59. T sien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, et al. Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*. 1996;87:1317–26.
 60. Stokes L, Layhadi JA, Bibic L, Dhuna K, Fountain SJ. P2X4 receptor function in the nervous system and current breakthroughs in pharmacology. *Front Pharm*. 2017;8:291.
 61. Franklin KM, Asatryan L, Jakowec MW, Trudell JR, Bell RL, Davies DL. P2X4 receptors (P2X4Rs) represent a novel target for the development of drugs to prevent and/or treat alcohol use disorders. *Front Neurosci*. 2014;8:176.
 62. Huganir RL, Nicoll RA. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*. 2013;80:704–17.
 63. Baxter AW, Choi SJ, Sim JA, North RA. Role of P2X4 receptors in synaptic strengthening in mouse CA1 hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*. 2011;34:213–20.
 64. Pankratov YV, Lalo UV, Krishtal OA. Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J Neurosci*. 2002;22:8363–9.

65. Jo YH, Boue-Grabot E. Interplay between ionotropic receptors modulates inhibitory synaptic strength. *Commun Integr Biol.* 2011;4:706–9.
66. Wyatt LR, Godar SC, Khoja S, Jakowec MW, Alkana RL, Bortolato M et al. Sociocommunicative and sensorimotor impairments in male P2X4-deficient mice. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38:1993–2002.
67. Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science.* 1996;274:1678–83.
68. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR 3rd, Lafaille JJ, et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell.* 2013;155:1596–609.
69. Hafner S, Wagner K, Weber S, Groger M, Wepler M, McCook O, et al. Role of the purinergic receptor P2XR4 after blunt chest trauma in cigarette smoke-exposed mice. *Shock.* 2017;47:193–9.
70. Chen H, Xia Q, Feng X, Cao F, Yu H, Song Y, et al. Effect of P2X4R on airway inflammation and airway remodeling in allergic airway challenge in mice. *Mol Med Rep.* 2016;13:697–704.
71. Yang T, Shen JB, Yang R, Redden J, Dodge-Kafka K, Grady J, et al. Novel protective role of endogenous cardiac myocyte P2X4 receptors in heart failure. *Circ Heart Fail.* 2014; 7:510–8.
72. Pettengill MA, Marques-da-Silva C, Avila ML, d'Arc dos Santos Oliveira S, Lam VW, Ollawa I, et al. Reversible inhibition of *Chlamydia trachomatis* infection in epithelial cells due to stimulation of P2X(4) receptors. *Infect Immun.* 2012; 80:4232–8.
73. Gonzales E, Julien B, Serriere-Lanneau V, Nicou A, Doignon I, Lagoudakis L, et al. ATP release after partial hepatectomy regulates liver regeneration in the rat. *J Hepatol.* 2010;52:54–62.



Chapter 18

P2X Electrophysiology and Surface Trafficking in *Xenopus* Oocytes

Eléonore Bertin, Audrey Martínez, and Eric Boué-Grabot

Abstract

Xenopus oocytes serve as a standard heterologous expression system for the study of various ligand-gated ion channels including ATP P2X receptors. Here we describe the whole-cell two-electrode voltage clamp and biotinylation/Western blotting techniques to investigate the functional properties and surface trafficking from P2X-expressing oocytes.

Key words P2X, ATP-gated channels, Double-electrode patch clamp, Electrophysiology, Receptor function, Surface trafficking, *Xenopus*, Oocytes

1 Introduction

Xenopus oocyte expression system and electrophysiology is a powerful system to study ion channels and ligand-gated ion channels. Following the pioneer observation of Gurdon et al. [1] showing that injection of foreign RNA could be translated into proteins, other works demonstrate that receptors and channels could be expressed in the oocytes and characterized [2]. Since the characterization of the functional properties of the cloned acetylcholine receptor expressed into oocytes in 1985 [3], this system was widely and continues to be used for heterologous expression and electrophysiological characterization of channels and receptors including P2X receptors (for reviews [4–6]). Expression cloning using *Xenopus* oocytes has also been proven to be an excellent tool for functional identification of proteins. In 1994, the first member of P2X receptor family was identified and cloned by the functional screening of a cDNA library made from the total population of mRNA isolated from the rat vas deferens [7]. *Xenopus* oocytes present several advantages compared to other recombinant systems: (1) Hundreds to thousands of oocytes can be isolated surgically from a given frog without sacrificing the animal. (2) Oocytes are

large cells (1 mm in diameter) easy to handle, to inject with DNA, RNA as well as with non-membrane-permeable drugs, and to maintain at room temperature (19 °C) after isolation or injection. (3) Oocytes have few endogenous ionic conductance and no endogenous ligand-gated channels (in contrast to most of the cells which express a plethora of channels and receptors), allowing for the study of a particular receptor channel exogenously expressed in virtual isolation by electrophysiological recordings and/or biochemistry experiments. Functional characterization of ligand-gated ion channels and in particular P2X receptors into oocytes were mainly performed using two-electrodes voltage-clamp recordings in which the membrane potential is clamped at a desired value. Clamped oocytes under constant perfusion can be tested by applications of agonists, antagonists, or drugs. Functional and pharmacological properties of several homomeric and heteromeric P2X receptors from different species were characterized into oocytes by electrophysiology or biochemical methods [7–18] and more recently using FRET-based methods [19]. Combination of mutational approaches and electrophysiological recordings or biochemistry experiments from expressing oocytes produced a powerful system to identify specific protein domains or residues involved in P2X subunit assembly, receptor function, and trafficking [20–39]. The great ability of oocytes to express numerous foreign proteins was also extensively used to identify and characterize cross talk between distinct receptors occurring natively in neurons. Cross-inhibition between several P2X receptors and several members of the “Cys-loop” receptors family including nicotinic, 5-HT₃, and GABA_A receptors were characterized into oocytes. Electrophysiological, molecular, and biochemical approaches from coexpressing oocytes revealed that a molecular coupling underlies their activity-dependent cross-inhibition. In addition, the interaction between P2X and GABA_A or 5-HT₃ receptors may also regulate receptor trafficking and targeting [40–47]. Recently, coexpression of AMPA and P2X receptors into oocytes was useful to demonstrate that P2X activation regulates AMPA receptors surface trafficking by triggering their internalization. This mechanism identified in oocytes was shown to induce synaptic plasticity in the hippocampal neurons [48–50]. In addition to RNA or DNA, injection of membranes preparations from cells or tissues into oocytes fused within a few hours to the oocyte membrane. Pioneered by the observation that Torpedo electroplaque injection into oocytes caused the appearance of functional Torpedo acetylcholine receptors and chloride channels [51], this approach was developed further to transplant already assembled receptors in membranes from animal or postmortem human tissues to the plasma membrane of oocytes and study their functional properties by electrophysiology [52–54]. Here we describe the two-electrode voltage-clamp method to explore the function from P2X expressing oocytes.

While RNA injection is used in most of the laboratories, we exclusively use in routine nuclear injection of DNA plasmids coding the receptors of interest. Nuclear nanoinjection requires some practice to reach efficiently the nucleus but this method is faster by suppressing time-consuming steps such as in vitro RNA synthesis and quality check and avoid RNAses-free conditions for injection. Biotinylation/Western blotting experiments from oocytes is also a powerful tool to explore surface protein trafficking. Biotin has the capability to bind to primary amines on proteins. Using a non-membrane-permeable sulfo-NHS-SS-biotin, solely surface proteins will be biotinylated and can be subsequently isolated from total protein extracts by affinity purification method. We here also describe this method that allows for measuring the surface/total P2X expression in various conditions.

2 Materials

All solutions for oocytes preparation and maintenance, for electrophysiological recordings and biochemical experiments are prepared with ultrapure deionized water (18 M Ω -cm at 25 °C). Concentrated stock solutions (10 \times , 20 \times , or 40 \times , *see* below) are filtered and stored at 4 °C.

2.1 Anesthetic and Oocytes Media

1. Anesthetic: 1.5 mg/mL ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (also called tricaine). Prepare 400 mL of solution in cold tap water.
2. Dissection media OR2 (1 \times): 82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 5 mM HEPES. The solution is prepared from filtrated 20 \times OR2 solution. pH is adjusted to 7.5.
3. 1.5 mg/mL collagenase 1A in OR2 media.
4. Barth's solution (1 \times): 83 mM NaCl, 5 mM NaOH, 1 mM KCl, 0.82 mM MgSO₄·7H₂O, 2.4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES. The complete Barth's solution is prepared from filtrated 20 \times Barth's stock solution with addition of 0.55 mg/mL pyruvic acid, 10 mg/mL gentamycin, and 1.8 mM CaCl₂. The pH is adjusted to 7.4 and then 0.1 mg/mL BSA is added.

2.2 Oocytes Injection

1. Nanoinjector (Drummond, Nanoject II or WPI) mounted on a suitable micromanipulator such as MM33.
2. Pulled micropipettes from the glass adapted to the nanoinjector.
3. Mineral oil.
4. Stereomicroscope (as the Nikon SM2645) with LED lamp, but other similar equipment is also suitable.

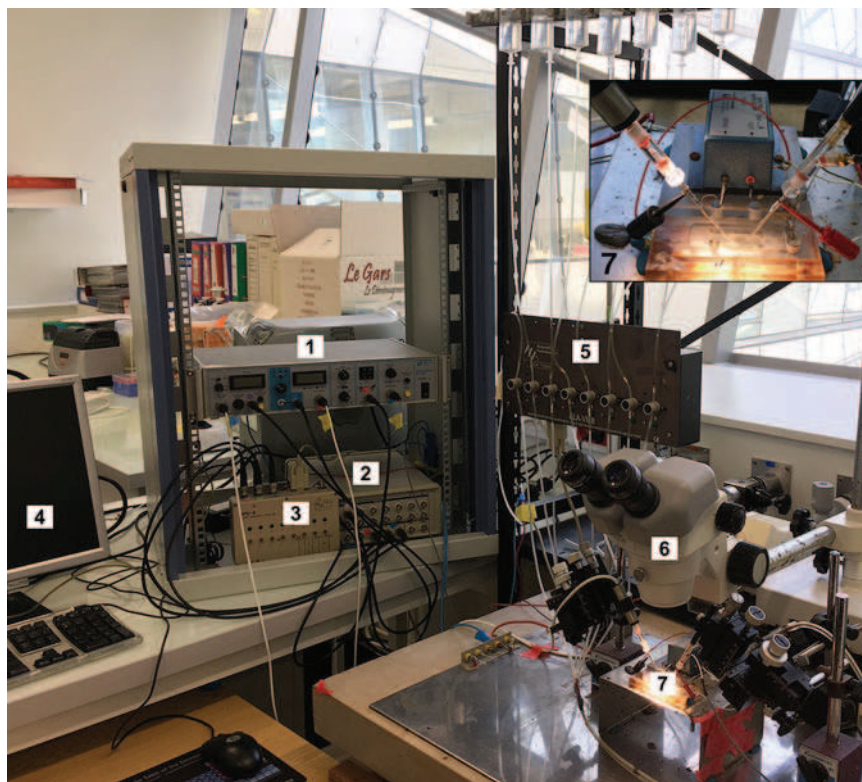


Fig. 1 Overview of a double-electrode voltage clamp station composed of (1) amplifier, (2) digitizer, (3) computer-driven valve controller, (4) personal computer and screen with acquisition software, (5) perfusion system and valves, (6) stereomicroscope, (7) recording chamber (*see* insert). Insert: recording chamber with the two electrodes mounted on holders and silver wire ground electrodes

2.3 Recording Buffers

Ringer solution 1×: 115 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM NaOH. Prepare a filtrated 40× Ringer stock solution. Dilute the 40× solution to obtain 4 L of Ringer 1× and add 1.8 mM CaCl₂. pH adjusted to 7.4 (*see* Note 1).

2.4 Recording Set Up (See Fig. 1)

1. Amplifier: OC-725C Oocyte Clamp (Warner Instruments) a main unit connected to the voltage recording probe with electrode holder, current electrode with holder and current sensing bath probe with silver wire electrodes.
2. Digitizer: Analogic data recorded by the amplifier are digitized at 1 kHz using an interface (Instrutech or Digidata) linked to a computer using Axograph X software (Axograph).
3. Computer-driven 4 or 8 valve system (ALA Scientific Instruments, BPS-4 or 8) controlling gravity Ringer perfusion and drug application.
4. Pulled borosilicate glass capillaries adapted to the voltage and current holders (Harvard apparatus, GCISOTF-10 1.5 mm

OD × 1.17 mm ID) mounted on two adapted micromanipulators (MM33).

5. Recording chambers dedicated to oocytes recordings are available commercially. Connect the entry of the chamber to the gravity perfusion system and exit to a vacuum suction system to allow for continuous perfusion of the oocyte during recordings.
6. Stereomicroscope and LED lamp.

2.5 Pharmacology

Adenosine 5'-triphosphate disodium hydrate (ATP) and all other drugs are prepared at their desired final concentrations in the perfusion solution (50 mL). For ATP, prepare stock solution at 100 mM in deionized water and keep aliquots at -20°C for single use. Useful P2X agonist and antagonists were previously summarized [55].

2.6 Biotinylation

1. 1 mg/mL solution of sulfo-NHS-SS-biotin in cold Ringer 1×. Maintain on ice until use.
2. 100 mM solution of glycine in cold Ringer 1×. Maintain on ice until use.

2.7 Purification

1. High Capacity NeutrAvidin™ Agarose or similar.
2. Spin Column Snap-Cap.

2.8 Protein Isolation Reagents

1. Homogenization Buffer (HB) with 2% Triton: 10 mM HEPES, 300 mM sucrose, pH 7.5, 2% Triton X-100. Add one pellet of Complete™ Protease Inhibitor Cocktail for 40 mL of HB. Vortex well until perfect homogenization.
2. HB 1% Triton: same protocol with 1% Triton.

2.9 Blotting Buffers and Reagents

1. Loading buffer 4× (LB4×): Laemmli buffer 4× with 12% β-mercaptoethanol.
2. Loading buffer 2× (LB2×): dilute one volume of LB4× in one volume of HB 1% Triton.
3. Prestained Protein Ladder.

2.10 Protein Electrophoresis and Western Blot

1. Precast gels (manufactured gels such as Bio-Rad's Ready Gel®, Mini-PROTEAN®, and Criterion™ Precast Gels) or hand-cast gels can be used.
2. Hand-cast gels 12%.
3. Running Buffer 10×: for 1 L mix 100 mL SDS 10%, 30.3 g Trizma base, 144 g glycine.
4. Membrane PVDF. Different techniques such as semidry or tank transfers can be used.

5. Transfer buffer 10× for tank system: for 1 L mix 30.3 g Trizma base and 144 g glycine.
6. Transfer buffer 5× for semidry system: kit transfer.
7. Blocking solution: PBS with 0.1% Tween 20 and 2% of BSA.
8. PBST: PBS with 0.1% Tween 20.
9. Antibodies primary solution: 5 mL for one membrane. Dilute primary antibody in PBST with 1% of BSA.
10. Antibodies secondary HRP solution: 5 mL for one membrane. Dilute antibody in PBST with 5% of milk.
11. Immunological detection: chemiluminescent detection or fluorescence. For HRP use a with ECL Kit Clarity™ Western ECL Substrate, 200 mL. Alternative ECL substrates are also suitable.

2.11 Gel and Blot Imaging Equipment

1. ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad) or similar.
2. Trans-Blot® Turbo™ System (Bio-Rad) or similar.
3. Power Supplies for Electrophoretic Transfers.

2.12 Antibodies

Several primary antibodies directed against the different P2X subunits are available commercially from several companies such as Alomone Labs, Abcam, or Antibodies-online. C-terminal tagged-P2X subunits with HA, Flag, His, or Myc tags are commonly used to detect P2X subunits expression by Western blots using specific anti-tag antibodies.

3 Methods

3.1 Oocytes Isolation

Oocytes are surgically removed from female *Xenopus laevis* without sacrificing the animal (Fig. 2a). A frog can be used several times with a minimal period of 4 weeks between two surgeries.

1. Place the animal in a closed box or a 2 L beaker containing 400 mL of cold anesthetic solution in tap water during 15–20 min depending on the size of the frog.
2. Verify the depth of anesthesia by pinching the animal's paw with forceps before operating.
3. Place the animal on the back in a tray containing ice to slow down its metabolism.
4. Make small abdominal incisures of the skin (10 mm) and the underlying fascia with a scalpel. Ovaries are usually directly visible after incision.
5. Gently take out bundles of oocytes with forceps from ovaries and place them in a petri dish containing OR2 solution.

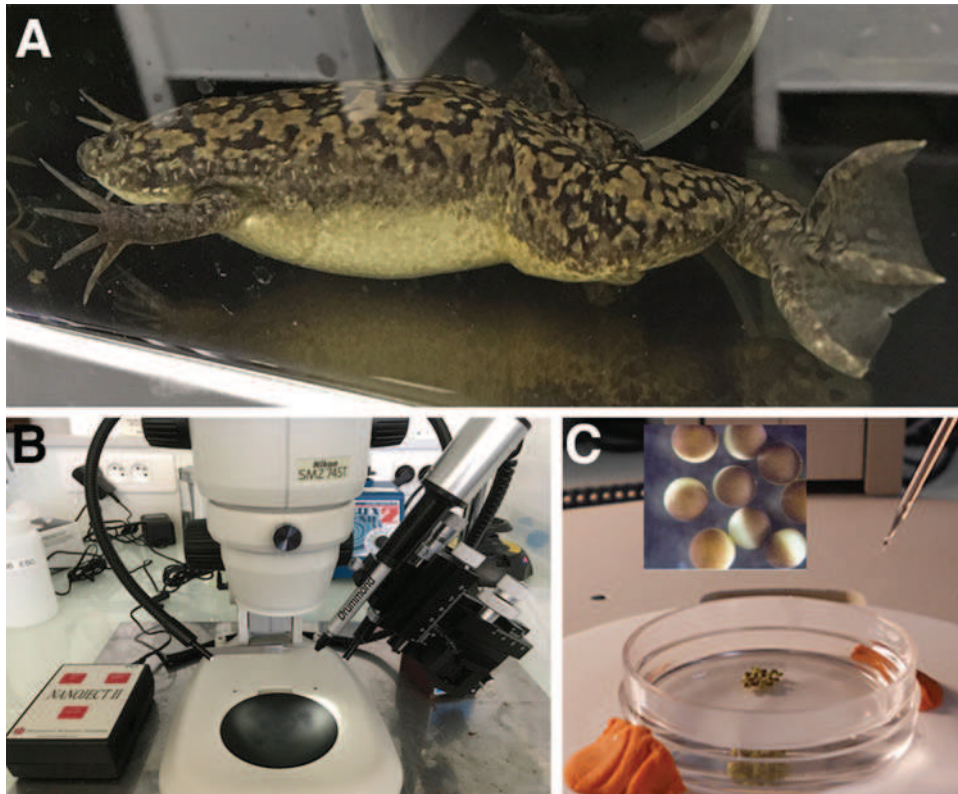


Fig. 2 (a) Picture of a female *Xenopus laevis* taken in our amphibian facility. (b) Overview of a microinjection station. (c) Selected mature oocytes selected for nuclear injection with the glass micropipette containing DNA solution

6. Pushed back the remaining ovary into the abdomen and stitch the muscular layer first to close the excision and then, the skin.
7. Wash briefly the animal in tap water and then transfer to a box or beaker containing only tap water. Very important: Adjust the level of tap water to be sure to not drown the frogs since frogs are air breathers. Let the frog back out of the water to permit skin breath.
8. Once the animal has recovered (1 or 2 h), transfer it to an isolated tank for few days before it is returned to the colony in order to avoid transmission of an eventual infection after operation to other frogs.

3.2 Oocytes Isolation and Sorting

Oocytes extracted from the ovary consist of many cells held together by connective tissue and are each surrounded by follicular cells. For injection and recordings, it is necessary to isolate each oocyte and to remove the follicular layer.

1. Cut bundles of oocytes into small pieces of around 50 cells before being placed into enzymatic treatment.

2. Oocytes are placed into a 50 mL sterile plastic tube containing 15 mL of Calcium-free OR2 collagenase 1A solution under moderate agitation at room temperature during 2 h. After 1 h, replace the enzymatic solution with a fresh collagenase 1A solution to maintain optimal enzymatic activity and to ensure complete dissociation and partial or total removal of follicular layer (*see Note 2*).
3. Wash oocytes three times with OR2 to remove both collagenase and lysed cells.
4. Wash two times oocytes with complete Barth's and place oocytes in a petri dish containing complete Barth's at 19 °C at least 1–2 h before sorting.
5. *Xenopus* oocytes have six developmental stages (I–VI) [56]. The more mature oocytes (stage V and VI) are larger and display a clear demarcation between the animal pole, very pigmented, and the light vegetal pole. Select manually the healthy and more mature oocytes for injection (*see Note 3*).

3.3 Oocytes Injection

10–80 nL of RNA (mRNA from tissues or cDNA-derived mRNA) or 10 nL of plasmids can be injected into the cytoplasm or the nucleus of oocytes, respectively. We describe here the nuclear injection method (Fig. 2b, c).

1. Pull the tips of glass micropipettes and then break them off with forceps under the stereomicroscope. Ideally the tip size should be between 10 and 30 μm .
2. Backfill the micropipettes with mineral oil using a nonmetallic needle and syringe (*see Note 4*).
3. Push the micropipette onto the wire plunger of the nanoinjector and once positioned, tighten the collect securely.
4. Place the tip of the pipette into your DNA sample (2–4 μL of DNA on the top of a drop of mineral oil) and then, fill the pipette with your sample by pressing the FILL button (the wire plunger will retract) (*see Note 5*).
5. Place a small number of oocytes in a small petri dish with complete Barth's. Adapted quantity of each DNA plasmid is injected into the nucleus using a single injection of 10 nL (*see Note 6*). Touch the top of the animal pole of one oocyte (dark side) with the tips of the micropipette. Important align the vertical axis between the two poles of the oocyte and the pipette axis to reach the nucleus. Go down slowly the micropipette using the micromanipulator and enter into the oocyte. As soon as the micropipette is inside, inject the selected volume using the INJECT button. Because oocyte have a tendency to move away, it is essential to fix the oocytes using a scratched petri dish, for example.

6. Store injected oocytes at 19 °C in small petri dishes containing Barth's medium. Change the medium daily and discard unhealthy oocytes.
7. Recordings will be performed 24–48 h after injection to allow for protein expression.

3.4 Double-Electrode Voltage-Clamp Recordings

1. Backfill two pulled microelectrodes with filtered 3 M KCl using a nonmetallic needle and a syringe. Avoid air bubbles lodged near the tip to ensure electrical coupling. The resistance of the pipette should be between 0.3 and 2 M Ω to ensure fast clamp. A resistance test is available on the amplifier.
2. Install the electrodes into the holders to ensure contact between the chlorided silver wire and the KCl into the pipette for the electrical coupling. The current electrode should be shielded from the voltage electrode and that shield should be grounded to the circuit ground. This is accomplished by wrapping both pipettes with aluminum foil (*see Note 7*).
3. Place one oocyte into the chamber containing Ringer solution and insert the voltage and the current electrodes into the oocytes from each side of the oocyte to maintain the oocytes into the chamber when the perfusion will be shut on. Successful impalement of each electrode is easily seen by monitoring the resting potential on the amplifier. For healthy oocytes this value is between –20 and –50 mV.
4. Shut on the perfusion system and control the volume into the chamber with a suction pipette (*see Note 8*).
5. Then clamp the oocyte at the desired voltage. Holding potential for ligand-induced current is classically set at –60 mV, but oocytes can be easily clamped between –100 and +40 mV to perform current–voltage relationship (Fig. 3) (*see Note 9*).
6. The double electrode voltage-clamp recordings are very stable. You can measure repetitive applications of agonist of diverse drugs on one oocyte expressing ligand-gated ion channels up to several hours (Fig. 3) (*see Note 10*).

3.5 Biotinylation of Oocytes

Solutions and oocytes should be kept at 4 °C during all the steps of the procedure.

1. Place 10–15 expressing oocytes per condition in 500 μ L of an ice-cold Ringer solution containing 1 mg/mL sulfo-NHS-SS-biotin and incubate at 4 °C during 4 h (or overnight) under gentle agitation (*see Note 11*).
2. Wash oocytes thrice with 500 μ L of ice-cold Ringer.
3. Wash once with 100 mM glycine to quench free Sulfo-NHS-SS-Biotin.
4. Remove all the liquid and store oocytes at –80 °C (*see Note 12*).

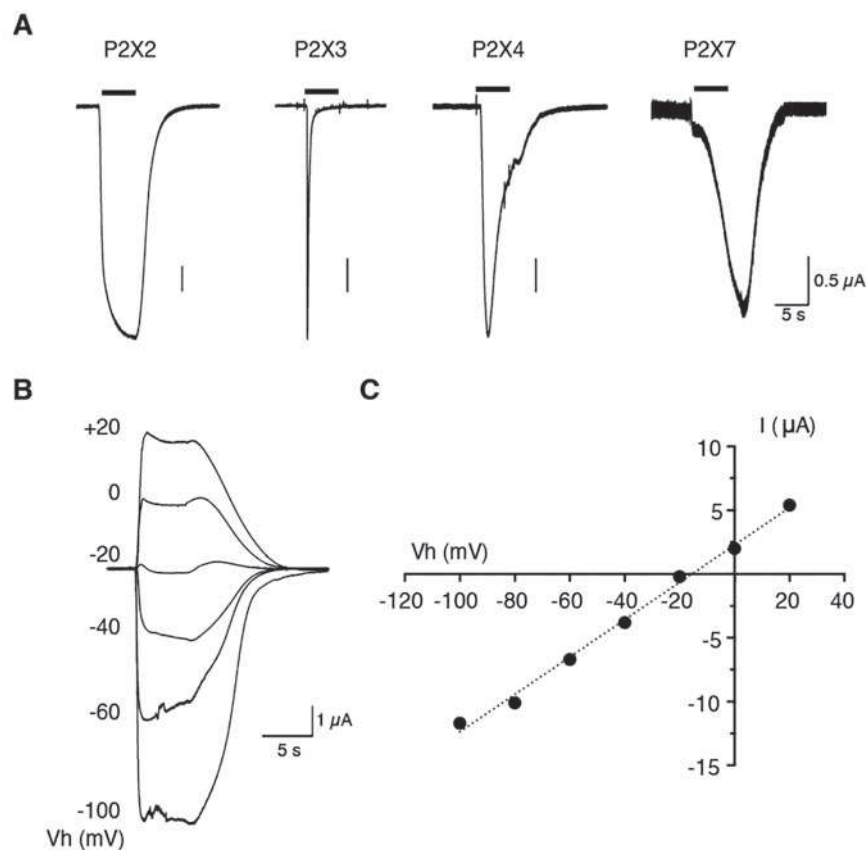


Fig. 3 (a) ATP-induced currents recorded by double-electrode voltage clamp of oocytes expressing P2X2, P2X3, P2X4, or P2X7 receptors. Holding potential -60 mV. $100 \mu\text{M}$ of ATP was applied at a concentration of $100 \mu\text{M}$ for P2X2, P2X3, and P2X4 and $500 \mu\text{M}$ for P2X7. (b) Superimposed currents evoked on a P2X2-expressing oocytes by successive application of $100 \mu\text{M}$ of ATP at the indicated holding potential. The Intensity current-voltage relationship of P2X subunits displays a reversion potential around -15 mV in *Xenopus* oocytes recorded in ringer solution

3.6 Protein Extraction

1. Add $20 \mu\text{L}$ per oocyte of HB 2% Triton to each batch of oocytes (*see Note 13*).
2. Lyse cells of each sample on ice by sonication using three pulses of 3 s at 80% of the maximal power with intervals between pulses of 5 s.
3. Incubate at 4°C during 2 h under gentle agitation to solubilize membrane proteins.
4. Centrifuge at $10,000 \times g$ during 15 min at 4°C .
5. Collect the supernatant containing total proteins and keep a fraction for total protein detection.
6. Add LB4 \times to the protein extract to be at $1 \times$ final in a fume cupboard and mix by pipetting (*see Note 14*).
7. Boil samples at 100°C during 5 min and place them immediately on ice (*see Note 15*).

3.7 Surface Proteins Purification

1. Use 20 μL of NeutrAvidin agarose resin (at 50% in the storage solution) per batch of oocytes. Equilibrate the NeutrAvidin agarose resin by washing twice with 500 μL of HB 1% Triton. Add one volume of HB 1% Triton to reconstitute the resin at 50%.
2. Pipet 20 μL of resin (at 50%) in a column for each sample.
3. Apply protein extracts to the column (*see Note 16*).
4. Add then the same volume of HB as protein extract volume.
5. Complete with HB 1% Triton to reach a total volume of 500 μL .
6. Leave overnight the columns on a vertical wheel at 4 $^{\circ}\text{C}$ to allow for the binding of biotinylated proteins.
7. Centrifuge columns at $2000 \times g$ during 1 min.
8. Wash three times the columns with 500 μL of HB 1% Triton by centrifugation at $2000 \times g$ during 1 min.
9. Place the columns in clean 1.5 mL tubes to collect the eluate.
10. Add 20 μL of warm P2X (100 $^{\circ}\text{C}$) on each column in a fume cupboard.
11. Incubate for 10 min at room temperature.
12. Centrifuge columns at $2000 \times g$ during 1 min to elute the bound biotinylated proteins (*see Note 17*). Proceed to Western blot analysis or store proteins at -20°C .

3.8 Western Blot

1. Prepare gels for total and surface proteins including lanes for markers of size.
2. Gels are placed in the electrophoresis cell. Running buffer is added and samples are loaded (20 μL).
3. Run the gel 60 min at 120 V.
4. Transfer separated proteins onto a PVDF membrane either using a tank system (35 min at 120 V) or a semidry (7 min).
5. Wash membrane with PBS–Tween briefly to remove trace of methanol.
6. Saturate PVDF membrane for 1 or 2 h in the blocking buffer at room temperature.
7. Incubate membrane with primary antibody overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$ under agitation.
8. Wash five times, 5 min each, with PBS–Tween 0.1%.
9. Incubate with secondary antibody for 1 h at room temperature under agitation.
10. Wash three times, 10 min each, with PBS–Tween 0.1%.
11. Mix the clarity substrate kit components in a 1:1 ratio (5 mL for one membrane).

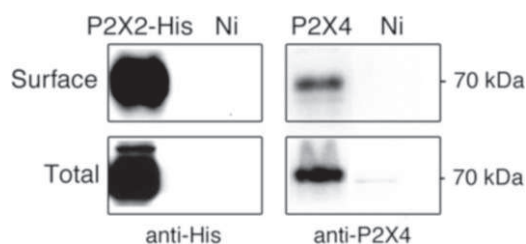


Fig. 4 Detection by Western blotting of total and surface proteins from oocytes expressing P2X2 or P2X4 receptors. Representative immunoblots of total and surface biotinylated proteins from oocytes expressing rat P2X2-HIS or mouse P2X4 wild-type using anti-His (1:1500, Genscript) or anti-P2X4 (1:1000, Alomone) primary antibodies respectively and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1:5000, Jackson ImmunoResearch). 10–25 μ g and 150–300 μ g of pcDNA3 plasmids coding for P2X2-HIS and P2X4 are used for nuclear injection. Biotinylation was performed 48–72 h after injection to allow for receptor expression. Total protein bands corresponded to one-third of oocyte (7 μ L of total proteins) and surface or internalized fractions corresponded to seven oocytes (140 μ L of total proteins prior purification). No bands are detected in noninjected oocytes (Ni). Note that P2X2 is highly expressed into oocytes and highly targeted to the surface, while P2X4 is mainly detected in intracellular compartments due to its constitutive internalization

12. Incubate the membrane in the substrate solution for 5 min.
13. Place the blotting membrane back on the sample stage of the ChemiDoc MP imager.
14. Start Image Lab software and capture the chemiluminescent signals on the blot (Fig. 4).

4 Notes

1. The continuous gravity perfusion of oocytes during electrophysiological recordings at a flow rate of 10–12 mL/min requires preparing between 4 and 8 L of Ringer for 2 days of recordings and two tanks of 10 L.
2. Prolonged exposure to collagenase could be deleterious for oocytes, therefore adjust the concentration and the time of incubation depending on the purity and enzymatic activity of collagenase in testing on different batches to find ideal conditions.
3. Collagenase treatment sometimes does not fully remove the follicular layer. This can be done directly by means of forceps one oocyte per one oocyte or after treatment with a defolliculation solution causing an osmotic change: 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 4 mM K₂HPO₄, 6 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂EGTA, pH 6.5.

4. When backfilling the entire capillaries with mineral oil, take care to avoid bubbles. If there is any, punch the capillaries with the fingertips to make them leave.
5. When filling the capillary with DNA, check the decrease of the drop of DNA under the stereomicroscope and verify there no air bubbles into the pipette. The interface between oil and DNA solution is visible. Before injection of oocytes verify that each push on INJECT button delivers a drop of the same size by placing the pipette tips into a drop of oil for example.
6. The quantity of DNA for nuclear injection to obtain protein expression has to be determined for each plasmid. If several plasmids need to be coexpressed in oocytes prepare first a mixture of the desired plasmids to perform a single nuclear injection of 10 nL. For P2X expression, we routinely inject 150–300 pg of one plasmid for most of the native P2X subunits. P2X2 has a high capability of expression in oocytes, and 5–20 pg is sufficient to record ATP-evoked currents with amplitudes of 5–10 μ A. Different DNA quantities need to be tested in order to find the best current amplitude (between 1 and 10 μ A). For coexpression of several receptors, it is important to limit the total quantity of DNAs injected (up to 1 ng/oocyte) otherwise the survival of oocyte and/or receptor expression may be altered.
7. Silver wire should be regularly chlorided to reduce noise and prevent exposure of the cell to toxic silver ions. The silver chloride coat can be renewed easily between experiments by incubation into bleach (1 h) and then rinsed with deionized water.
8. Decrease the level of perfusion into the recording chamber as much as possible (be sure to keep the oocyte immersed to avoid disruption of the membrane by flow changes) to increase the speed of solution exchange between ringer and drugs to record fast activation and deactivation of agonist-evoked currents.
9. At a holding potential of -60 mV, healthy oocytes do not display leak current exceeding -100 nA.
10. For P2X receptors, applications of ATP during 2–5 s are routinely used to record ATP-evoked currents (Fig. 3). ATP concentration to evoke the maximal response will be adjusted depending on P2X subtypes. In Fig. 3, 100 μ M of ATP is applied during 5 s for P2X2, P2X3, and P2X4, while 500 μ M of ATP is used for P2X7.
11. The number of oocytes per condition can be adapted (2–30 oocytes), but we generally use batches of 15 oocytes to limit the variability of the results. Expressing oocytes can be kept

postrecordings and used for biochemistry. Noninjected oocytes should be also considered as negative control.

12. Oocytes can be stored at -80°C (no alteration of the biotinylation was observed after 1–2 months) or used directly for protein extraction.
13. The oocyte cytoplasm contains a large quantity of yolk platelets challenging the preparation of total protein extract for Western blot analysis of heterologous expressed proteins. For this reason, we preferentially used HB buffer containing Triton (up to 2%) rather than for example RIPA buffer. Oocyte proteins extracted with RIPA solubilized the yolk content altering the protein migration during the electrophoresis.
14. For P2X receptors, total proteins corresponding to 1/3 (7 μL) or 1/2 (10 μL) oocyte loaded onto the gel is sufficient to obtain a strong signal by Western blots using specific anti-P2X subunits.
15. Samples can be directly used for Western blotting or conserved at -20°C .
16. Detection of surface P2X receptor fraction by Western blotting requires loading onto a gel the purified biotinylated proteins corresponding to 4–10 oocytes according to the surface trafficking on the considered P2X receptors. For constitutively internalized P2X4, a minimum of seven oocytes is generally used (*see* Fig. 4).
17. Samples can be directly used for Western blotting or conserved at -20°C .

References

1. Gurdon JB, Woodland HR, Lingrel JB (1974) The translation of mammalian globin mRNA injected into fertilized eggs of *Xenopus laevis*. I. Message stability in development. *Dev Biol* 39:125–133
2. Gundersen CB, Miledi R, Parker I (1983) Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 219:103–109
3. Sakmann B, Methfessel C, Mishina M, Takahashi T, Takai T, Kurasaki M, Fukuda K, Numa S (1985) Role of acetylcholine receptor subunits in gating of the channel. *Nature* 318:538–543
4. Burnstock G (2012) Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest. *Br J Pharmacol* 167:238–255
5. Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, Evans RJ (2006) Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch* 452:486–500
6. Sigel E (1990) Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membr Biol* 117:201–221
7. 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
8. Le KT, Boue-Grabot E, Archambault V, Seguela P (1999) Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *J Biol Chem* 274:15415–15419
9. Brown SG, Townsend-Nicholson A, Jacobson KA, Burnstock G, King BF (2002) Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther* 300:673–680

10. Liu M, King BF, Dunn PM, Rong W, Townsend-Nicholson A, Burnstock G (2001) Coexpression of P2X(3) and P2X(2) receptor subunits in varying amounts generates heterogeneous populations of P2X receptors that evoke a spectrum of agonist responses comparable to that seen in sensory neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 296:1043–1050
11. Xiong K, Li C, Weight FF (2000) Inhibition by ethanol of rat P2X(4) receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* 130:1394–1398
12. Boue-Grabot E, Akimenko MA, Seguela P (2000) Unique functional properties of a sensory neuronal P2X ATP-gated channel from zebrafish. *J Neurochem* 75:1600–1607
13. Bo X, Schoepfer R, Burnstock G (2000) Molecular cloning and characterization of a novel ATP P2X receptor subtype from embryonic chick skeletal muscle. *J Biol Chem* 275:14401–14407
14. Wang CZ, Namba N, Gono T, Inagaki N, Seino S (1996) Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 220:196–202
15. Seguela P, Haghghi A, Soghomonian JJ, Cooper E (1996) A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J Neurosci* 16:448–455
16. 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
17. 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
18. Le KT, Paquet M, Nouel D, Babinski K, Seguela P (1997) Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system. *FEBS Lett* 418:195–199
19. Schneider M, Prudic K, Pippel A, Klapperstück M, Braam U, Müller CE, Schmalzing G, Markwardt F (2017) Interaction of purinergic P2X4 and P2X7 receptor subunits. *Front Pharmacol* 8:860
20. Wen H, Evans RJ (2009) Regions of the amino terminus of the P2X receptor required for modification by phorbol ester and mGluR1alpha receptors. *J Neurochem* 108:331–340
21. Codocedo JF, Rodriguez FE, Huidobro-Toro JP (2009) Neurosteroids differentially modulate P2X ATP-gated channels through non-genomic interactions. *J Neurochem* 110:734–744
22. Low SE, Kuwada JY, Hume RI (2008) Amino acid variations resulting in functional and non-functional zebrafish P2X(1) and P2X (5.1) receptors. *Purinergic Signal* 4:383–392
23. 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
24. Roberts JA, Evans RJ (2005) Mutagenesis studies of conserved proline residues of human P2X receptors for ATP indicate that proline 272 contributes to channel function. *J Neurochem* 92:1256–1264
25. Davies DL, Kochegarov AA, Kuo ST, Kulkarni AA, Woodward JJ, King BF, Alkana RL (2005) Ethanol differentially affects ATP-gated P2X (3) and P2X(4) receptor subtypes expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuropharmacology* 49:243–253
26. Kanjhan R, Raybould NP, Jagger DJ, Greenwood D, Housley GD (2003) Allosteric modulation of native cochlear P2X receptors: insights from comparison with recombinant P2X2 receptors. *Audiol Neurootol* 8:115–128
27. Paukert M, Hidayat S, Grunder S (2002) The P2X(7) receptor from *Xenopus laevis*: formation of a large pore in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 513:253–258
28. Nakazawa K, Ojima H, Ohno Y (2002) A highly conserved tryptophane residue indispensable for cloned rat neuronal P2X receptor activation. *Neurosci Lett* 324:141–144
29. Ennion SJ, Evans RJ (2002) Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol* 61:303–311
30. Ennion SJ, Evans RJ (2002) P2X(1) receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 291:611–616
31. 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
32. Clyne JD, LaPointe LD, Hume RI (2002) The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. *J Physiol* 539:347–359

33. Ennion SJ, Ritson J, Evans RJ (2001) Conserved negatively charged residues are not required for ATP action at P2X(1) receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 289:700–704
34. Ennion S, Hagan S, Evans RJ (2000) The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors. *J Biol Chem* 275:29361–29367
35. Dutton JL, Poronnik P, Li GH, Holding CA, Worthington RA, Vandenberg RJ, Cook DI, Barden JA, Bennett MR (2000) P2X(1) receptor membrane redistribution and down-regulation visualized by using receptor-coupled green fluorescent protein chimeras. *Neuropharmacology* 39:2054–2066
36. Boue-Grabot E, Archambault V, Seguela P (2000) A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J Biol Chem* 275:10190–10195
37. Newbolt A, Stoop R, Virginio C, Surprenant A, North RA, Buell G, Rassendren F (1998) Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 273:15177–15182
38. Werner P, Seward EP, Buell GN, North RA (1996) Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15485–15490
39. Becker D, Woltersdorf R, Boldt W, Schmitz S, Braam U, Schmalzing G, Markwardt F (2008) The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity. *J Biol Chem* 283:25725–25734
40. Emerit MB, Baranowski C, Diaz J, Martinez A, Areias J, Alterio J, Masson J, Boue-Grabot E, Darmon M (2016) A new mechanism of receptor targeting by interaction between two classes of ligand-gated ion channels. *J Neurosci* 36:1456–1470
41. Jo YH, Donier E, Martinez A, Garret M, Toulme E, Boue-Grabot E (2011) Cross-talk between P2X4 and gamma-aminobutyric acid, type A receptors determines synaptic efficacy at a central synapse. *J Biol Chem* 286:19993–20004
42. Toulme E, Blais D, Leger C, Landry M, Garret M, Seguela P, Boue-Grabot E (2007) An intracellular motif of P2X(3) receptors is required for functional cross-talk with GABA(A) receptors in nociceptive DRG neurons. *J Neurochem* 102:1357–1368
43. Khakh BS, Fisher JA, Nashmi R, Bowser DN, Lester HA (2005) An angstrom scale interaction between plasma membrane ATP-gated P2X2 and alpha4beta2 nicotinic channels measured with fluorescence resonance energy transfer and total internal reflection fluorescence microscopy. *J Neurosci* 25:6911–6920
44. Boue-Grabot E, Toulme E, Emerit MB, Garret M (2004) Subunit-specific coupling between gamma-aminobutyric acid type A and P2X2 receptor channels. *J Biol Chem* 279:52517–52525
45. Khakh BS, Zhou X, Sydes J, Galligan JJ, Lester HA (2000) State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature* 406:405–410
46. Boue-Grabot E, Barajas-Lopez C, Chakfe Y, Blais D, Belanger D, Emerit MB, Seguela P (2003) Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *J Neurosci* 23:1246–1253
47. Boue-Grabot E, Emerit MB, Toulme E, Seguela P, Garret M (2004) Cross-talk and co-trafficking between rho1/GABA receptors and ATP-gated channels. *J Biol Chem* 279:6967–6975
48. Pougnet JT, Compans B, Martinez A, Choquet D, Hosy E, Boue-Grabot E (2016) P2X-mediated AMPA receptor internalization and synaptic depression is controlled by two CaMKII phosphorylation sites on GluA1 in hippocampal neurons. *Sci Rep* 6:31836
49. Pougnet JT, Toulme E, Martinez A, Choquet D, Hosy E, Boue-Grabot E (2014) ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron* 83:417–430
50. Boue-Grabot E, Pankratov Y (2017) Modulation of central synapses by astrocyte-released ATP and postsynaptic P2X receptors. *Neural Plast* 2017:9454275
51. Marsal J, Tigvi G, Miledi R (1995) Incorporation of acetylcholine receptors and Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5224–5228
52. Miledi R, Eusebi F, Martinez-Torres A, Palma E, Trettel F (2002) Expression of functional neurotransmitter receptors in *Xenopus* oocytes after injection of human brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13238–13242
53. Bernareggi A, Reyes-Ruiz JM, Lorenzon P, Ruzzier F, Miledi R (2011) Microtransplantation of acetylcholine receptors from normal or denervated rat skeletal muscles to frog oocytes. *J Physiol* 589:1133–1142
54. Belujon P, Baufreton J, Grandoso L, Boue-Grabot E, Batten TF, Ugedo L, Garret M,

- Taupignon AI (2009) Inhibitory transmission in locus coeruleus neurons expressing GABA_A receptor epsilon subunit has a number of unique properties. *J Neurophysiol* 102:2312–2325
55. North RA, Jarvis MF (2013) P2X receptors as drug targets. *Mol Pharmacol* 83:759–769
56. Dumont JN (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136:153–179