



UNIVERSITE DE STRASBOURG



ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

—
UMR 7199 CNRS
—

**Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives
Equipe de Chimie et Neurobiologie moléculaire**

THESE DE DOCTORAT

présentée par :

Laurie PEVERINI

soutenue le : **2 novembre 2017**

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

Spécialité : Chimie Biologique et Thérapeutique

CONCEPTION ET APPLICATION DE NOUVEAUX OUTILS PHOTOCIMIQUES POUR L'ETUDE DES RECEPTEURS CANAUX P2X

THÈSE dirigée par :

Dr GRUTTER Thomas
Dr SPECHT Alexandre

Directeur de recherche, CNRS, Université de Strasbourg
Directeur de recherche, CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr BOUE-GRABOT Éric
Dr RONDARD Philippe

Directeur de recherche, CNRS, Université de Bordeaux
Directeur de recherche, INSERM, Université de Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr RENARD Pierre-Yves
Dr PAOLETTI Pierre

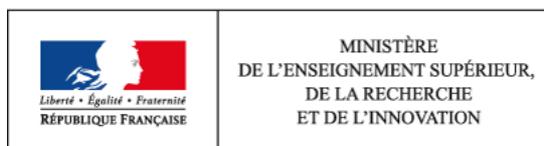
Professeur, Université de Rouen
Directeur de recherche, INSERM, Université de Paris

PREFACE



Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de conception et application de molécules bioactives (UMR7199) dans l'équipe de chimie et neurobiologie moléculaire sous la direction des docteurs Alexandre Specht et Thomas Grutter.

Il a été financé par une bourse doctorale accordée par le ministère de la recherche et de l'enseignement.



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury de l'intérêt porté à mes travaux : le professeur Pierre-Yves Renard qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse, ainsi que les docteurs Eric Boué-Grabot et Philippe Rondard qui ont accepté de juger ce manuscrit en tant que rapporteurs et enfin le docteur Pierre Paoletti qui s'est joint à eux pour évaluer mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes deux directeurs de thèse, les docteurs Thomas Grutter et Alexandre Specht qui, l'un comme l'autre, ont su me conseiller, m'aider avec mes projets de thèse et m'apprendre un nombre incalculable de choses au quotidien, avec une patience et un enthousiasme sans failles.

Merci Thomas de toujours trouver une solution quand il semble ne plus y en avoir, pour ta disponibilité pour discuter des projets, pour ta confiance en mes capacités et parce que tu m'as toujours poussée à faire mieux.

Merci Alex pour ta patience et ton empathie, pour avoir toujours été à l'écoute de mes problèmes de synthèses, pour tes conseils avisés et pour ta gentillesse.

Un énorme merci à mon ami Bastien, mon binôme de stage et de thèse, qui a vécu tous les deadlines et stress mais aussi les moments plus cool de la thèse avec moi. Merci pour les « soirées-labo » à faire des colonnes jusqu'à pas d'heure, pour les fous rires dans le bureau, pour les sempiternels Macdo, et bien sûr, les cours de danse que tu nous as procuré à tous. Bon courage pour ta soutenance chouchou !

Merci à mon autre ami, qui a squatté le labo assez souvent, Seb, pour toutes les soirées, pour ton écoute et ta patience, et pour m'avoir aidé à tenir le coup pendant le master, le concours de la MRT et pendant la rédaction. J'espère avoir pu te procurer autant de soutien et suis de tout cœur avec toi pour ta soutenance !

Merci à Juline, mon binôme de patch, avec qui le travail est toujours efficace et agréable, pour ta gentillesse, ton amitié, le soutien sans faille, les craquages en chanson devant le poste de patch, les soirées Bouffe/Karaoké/Danse jusqu'au petit matin, pour les moments passés en congrès. Bon courage pour la troisième année !

Merci à Kate, pour les retards matinaux, les bourdes, les pertes d'objet ou autre qui me font toujours rire, merci aussi pour tout le reste : la musique que l'on partage, les soirées, les repas et les bons moments.

Je suis de tout cœur avec vous pour la suite les filles.

Merci à Elie pour sa bonne humeur et ses chansons libanaises qui animent le labo, courage pour la troisième année !

Merci aussi aux stagiaires qui sont passés par le labo : Cyril, à la joie communicative, Justine et Aurore, les championnes des transfections multiples, Tina pour son efficacité et sa gentillesse, Florian et Philippe pour la bonne ambiance et les gâteaux.

Merci aux « anciens », tout d'abord le Dr. Damien Lemoine qui m'a encadré pendant mon stage et qui m'a initié aux joies des purifications d'azobenzène, le Dr. Chloé Habermacher et Adeline Martz qui m'ont appris la culture cellulaire, la biologie moléculaire et le patch, le Dr. Sebastien Piant qui m'a conseillée sur la synthèse durant mon stage et le début de ma thèse et enfin le Dr. Mahboubi Harkat qui m'a transmis son savoir sur la dilatation des récepteurs P2X.

Merci au Dr. Thierry Chataigneau pour son humour sans failles, au labo, lors des repas au RU et des congrès. Merci au Dr. Frédéric Bolze pour sa bonne humeur et pour l'ambiance sonore du laboratoire.

Merci à mes amis de « l'extérieur » qui m'ont soutenu depuis le début, qui m'ont consolée quand il le fallait, et encouragée à d'autres moments : Willy, j'ai hâte de venir à ta soutenance ; Vic qui est là depuis toujours, Thomas et Héloïse (et Mazu !) pour les soirées relax, Flore, Mathieu et Lulu ma petite bande de mosellans pour la vie, Cécile ma flûtiste préférée, Manu qui me fait rire quelles que soient les circonstances et Simon pour les entraînements sportifs de haut niveau.

Merci également à tous les membres de l'OUS.

Merci enfin à ma famille, mes grands-parents et mes parents, pour leur gentillesse, leur aide et leur soutien depuis le début de mes études.

SOMMAIRE

PREFACE.....	3
REMERCIEMENTS	5
ABBREVIATIONS.....	22
INTRODUCTION GENERALE.....	25
1. Les dates et acteurs clés des concepts de récepteurs et de canaux ioniques 25	
2. Les canaux ioniques.....	28
3. Les récepteurs P2X.....	30
3.1. Généralités.....	30
3.2. Sous-types	31
3.3. Localisation/distribution.....	32
3.3.1. Les récepteurs homomériques	32
3.3.2. Les hétéromères observés <i>in vivo</i>	34
3.3.3. Les différents variants d'épissage	35
3.4. Physiologie des récepteurs P2X	35
3.4.1. Généralités.....	35
3.4.2. Quelques exemples détaillés de rôles physio-pathologiques	37
3.4.3. Interactions avec d'autres récepteurs transmembranaires	39
3.5. Structure Globale des récepteurs P2X.....	39
3.6.3. Etat « dilaté »	46
3.7. Structure et fonctionnement des récepteurs P2X – apports et limites des structures cristallographiques.....	52
3.7.1. Première structure cristallographique : zfP2X4, état fermé.....	52
3.7.2. Structure de zfP2X4 fermée et ouverte en présence d'ATP	54
3.7.3. Structure cristallographique d'un P2X d'invertébré (<i>Amblyomma maculatum</i>) en présence d'ATP et de Zn ²⁺	55
3.7.4. Structures cristallographiques fermée, ouverte et désensibilisée des récepteurs hP2X3.....	56

3.7.5.	Structure cristallographique des récepteurs de P2X7 (panda) liés à des antagonistes	58
3.7.6.	Quelles sont les limites de ces structures ?	59
3.7.7.	Questions restantes.....	61
OBJECTIFS GENERAUX DE LA THESE.....		63
1.	L'électrophysiologie patch-clamp : méthodes et instrumentation	63
2.	L'utilisation de réactions photochimiques pour l'étude de phénomènes biologiques.....	66
3.	Combinaison des deux techniques.....	67
Chapitre 1 : Utilisation d'agrafes photo-isomérisables.....		71
1.	Généralités sur les molécules photo-isomérisables	71
2.	Les azobenzènes	72
2.1.	Historique et généralités	72
2.2.	Les propriétés des azobenzènes	73
2.3.	Les propriétés photo-physiques	73
2.4.	Les différentes classes d'azobenzènes :	74
2.5.	Les mécanismes responsables de la photo-isomérisation.....	75
3.	Utilisation en biologie	77
3.1.	Avantages des azobenzènes.....	77
3.2.	Exemples d'utilisation sur des récepteurs canaux	78
3.2.1.	Ligands photo-chromiques solubles (PCL):.....	78
3.2.2.	Ligands photo-isomérisables attachés (PTL).....	81
3.2.3.	Stratégie d'optogating.....	82
STRATEGIE GENERALE.....		84
1.	Stratégie des agrafes photo-isomérisables ou « opto-tweezers »	84
1.1.	La structure des outils.....	84
1.2.	La stratégie d'incorporation.....	84
PARTIE EXPERIMENTALE.....		88
1.	Synthèse des molécules : MAMs : Maléimides-Azobenzènes-Maléimides	88
1.1.	Stratégie de synthèse globale de la gamme 1	89

1.2.	Synthèse de la gamme 1 des MAMs	90
1.3.	Stratégie globale de synthèse de la gamme 2 :	97
1.4.	Synthèse de la deuxième gamme de MAMs.....	97
1.5.	Spectres UV.....	100
2.	Partie biologie.....	100
2.1.	Culture cellulaire et préparation des plaques pour l'électrophysiologie patch-clamp	100
2.2.	Mutagenèse dirigée	101
2.3.	Transfections	101
2.4.	Préparation des solutions de MAMs et incubation	102
2.5.	Obtention des Traces électrophysiologiques – irradiations simultanées	102
2.6.	Solutions utilisées	102
2.7.	Analyses	103
	RESULTATS	104
1.	Photorégulation des récepteurs P2X.....	104
1.1.	Différentes molécules	104
1.2.	Différents sous-types	105
1.3.	Enregistrements en configuration cellule entière et canal unique	106
2.	Elucidation de mécanismes moléculaires.....	107
2.1.	L'ouverture des récepteurs P2X dans un état perméable aux « petits cations » : le gating.....	107
2.2.	La dilatation.....	108
2.2.1.	Contexte de l'étude.....	108
2.2.2.	Criblage des zones transmembranaires	108
2.2.3.	Incorporation de molécules fluorescentes	113
2.2.4.	Enregistrements électrophysiologiques en canaux multiples et canal unique.	114
2.2.5.	Confirmation et apport au mécanisme à l'aide de la modélisation moléculaire	116
2.2.6.	Expérience de perméation du NMDG ⁺ en conditions symétriques sur les différents sous-types des récepteurs P2X.	117
2.2.7.	Expériences de perméation à la spermidine.....	118

2.2.8.	Conclusion.....	119
3.	Utilisation des MAMs comme règles moléculaires	120
3.1.	Affinement du modèle cristallographique	120
3.2.	Modélisation moléculaire	121
	DISCUSSION	124
1.	Solubilité des outils.....	124
2.	Pertinence des états piégés avec ces molécules : vérification des propriétés biophysiques du récepteur.	124
3.	Conséquences biologiques de notre étude sur la « dilatation » des récepteurs P2X	125
	CONCLUSION/PERSPECTIVES	126
1.	Générales.....	126
2.	Perspective immédiate sur la dilatation : agrandissement potentiel du pore ionique par mutagenèse dirigée (avec <i>Juline Beudez</i>).....	126
2.1.	Stratégie et enregistrements en cellule entière	126
2.2.	Enregistrements en canal unique sur le mutant T339A.	128
2.3.	Enregistrements en canal unique sur deux sous-types de récepteurs P2X différents.....	131
3.	Autres perspectives actuelles développées au laboratoire à l'aide des MAMs	132
	CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE ET INCORPORATION D'ACIDES AMINES PHOTO-CLIVABLES	135
1.	Incorporation d'acides aminés non naturels- buts et méthodes	135
2.	Extension du code génétique : intérêt et fonctionnement.....	136
2.1.	L'aminocyclation chimique des tRNA.....	138
3.	Synthèse et incorporation de nouveaux acides aminés photo-clivables...	139
3.1.	La photo-protéolyse	139
3.2.	Les groupements photo-clivables utilisés pour « cager » des biomolécules	139
3.2.1.	Historique	139

3.2.2.	Les caractéristiques d'un bon groupement protecteur photolabile et les principaux GPP	140
3.2.3.	Contrôle de récepteurs canaux via des réactions photo-lytiques...	141
3.3.	Libération de composés lié via des fonctions amides	143
3.4.	La famille des ortho-nitrophénétyles : choix et mécanisme de photo-clivage	144
STRATEGIE GENERALE.....		146
1.	Choix de nouvelles structures	146
2.	Stratégie globale de synthèse : Synthèse d'acides α -aminés de O'Donnell.	147
3.	Evaluation des propriétés photochimiques.....	148
4.	Incorporation d'un composé photo-clivable dans des cibles biologiques .	148
PARTIE EXPERIMENTALE ET RESULTATS.....		149
1.	Synthèse et caractérisation photochimique des acides aminés	149
1.1.	Acide aminé 1	149
1.2.	Précurseur Aa 2	153
1.3.	Précurseur Aa 3	155
2.	Synthèse des deux mimes de tripeptide, irradiations et caractérisations photo-chimiques, évaluation de l'efficacité du photo-clivage.....	156
2.1.	Tripeptide 1 avec un chromophore lié par une liaison amide	156
2.2.	Tripeptide 2 avec l'iso-glutamine.....	160
3.	Synthèse du CA-aa pour l'incorporation sur l'ARNt tronqué.....	164
4.	Incorporation de l'acide aminé dans une cible biologique.	167
DISCUSSION		168
1.	A propos de l'acide aminé 1	168
2.	Perspectives concernant les synthèses des acides aminés 2 et 3.....	170
PERSPECTIVES		172
Chapitre 3 : Incorporation d'acides aminés non naturels photo-réactifs sujets au photo-crosslinking.....		175

1.	Incorporation d'acides aminés non naturels : les différentes méthodes de suppression de codon STOP ambre	175
1.1.	Evolution et utilisation de la paire <i>E. coli</i> TyrRS/ <i>E. coli</i> tRNA ^{Tyr} pour incorporation dans un génome eucaryote (Chin, 2003) :.....	178
1.2.	Etablissement et utilisation de la paire <i>E. coli</i> TyrRS/ <i>Bacillus stearothermophilus</i> tRNA ^{Tyr}	179
2.	L'incorporation de composants photosensibles dans les protéines.....	181
2.1.	Les fonctions utilisées comme sondes de photo-marquage et exemples d'acides aminés qui en sont dérivés.....	181
2.2.	Photolyse des aryl-azides	182
2.3.	Acide aminé choisi AzF : <i>p</i> -azido-L-phenylalanine (AzF).....	183
	STRATEGIE GENERALE.....	185
1.	Composants de la méthode choisie pour l'incorporation de l'acide aminé photo-marquable.....	185
2.	Choix des mutations STOP effectuées.....	186
3.	Stratégie alternative face aux difficultés rencontrées.	189
	PARTIE EXPERIMENTALE.....	190
1.	Biologie Moléculaire	190
1.1.	Ligation rP2X2-GFP	190
1.2.	Gènes et plasmides utilisés	190
1.3.	Mutagenèse dirigée	190
2.	Transfections.....	191
3.	Préparation des solutions d'AzF.....	192
4.	Tests d'incorporation dans le gène de la luciférase.....	192
5.	Enregistrements électrophysiologiques	193
	RESULTATS	194
1.	rP2X2-GFP	194
2.	Expérience d'incorporation d'AzF dans la luciférase	195
3.	Expériences d'incorporation d'AzF dans les récepteurs P2X	196
4.	Analyse de AzF	197
	DISCUSSION	198

1.	Résultats obtenus dans d'autres publications	198
2.	Compétition avec une réparation endogène.....	198
3.	Compétition avec une réparation médiée par l'ARNt Yam	199
4.	Compétition avec réparation AzF-RS.....	200
5.	Problème avec la cible choisie	202
6.	Problème avec l'acide aminé AzF ?	202
PERSPECTIVES		203
1.	Ligation de Staudinger-Bertozzi (Köhn and Breinbauer, 2004)	203
2.	Cycloaddition [3+2] avec des alcynes terminaux, catalysée par des sels de Cu ^I (CuAAC)	203
CONCLUSION ET PERSPECTIVES GENERALES.....		207
1.	A propos des techniques.....	207
2.	À propos des récepteurs P2X.....	209
ANNEXES		211
BIBLIOGRAPHIE.....		213

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Propriétés physiologiques, pathologiques et pharmacologiques des sous-types homomériques des récepteurs P2X.....	34
Tableau 2: Les hétéromères observés in vivo	35
Tableau 3: Processus lytiques et non lytiques permettant le relargage de l'ATP dans le milieu extracellulaire.	36
Tableau 4: Interactions des récepteurs P2X avec d'autres récepteurs canaux et canaux ioniques.	39
Tableau 5 : Résolutions requises pour résoudre les principales structures protéiques	60
Tableau 6 : Structures des types de photo-switches les plus courants.	71
Tableau 7: Récapitulatif des données moléculaires découvertes pendant cette étude.	120
Tableau 8: Comparaison des prédictions des LogP	124
Tableau 9: Mise en évidence des avantages de la méthode des agrafes photo-isomérisables vis-à-vis d'autres méthodes combinant les molécules photo-isomérisables à des manipulations génétiques.	126
Tableau 10: Résultats des Ratios $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$ obtenus en conditions cellule entière sur les trois mutants alanine effectués.	128
Tableau 11: Comparaison des données obtenues en enregistrements canaux uniques.....	130
Tableau 12: Méthodes de modifications et incorporations d'acides aminés et leurs limitations	135
Tableau 13: Les groupements photolabiles les plus courants	141
Tableau 14: Concentrations de 2-4-methoxyacétamide utilisée pour effectuer l'étalonnage nécessaire à la quantification de photo-clivage du tripeptide 1. ...	158
Tableau 15: Aires obtenues avec des concentrations connues d'iso-glutamine dérivatisée à l'OPA.	163
Tableau 16: Fréquence d'utilisation des codons STOP chez l'humain	175
Tableau 17: Comparaison des deux méthodes d'incorporation d'UAA via la suppression d'un codon STOP ambre	176

Tableau 18: Déterminants d'identité des ARN de transfert responsables de la reconnaissance par les aaRS.....	177
Tableau 19: Quantités d'ADN utilisées des composants du système pour réaliser l'incorporation d'AzF dans des cellules HEK	191
Tableau 20: Récapitulatif des mutations effectuées sur le récepteurs rP2X2-GFP et fluorescence en absence du système d'incorporation à 48h de transfection...	196
Tableau 21 : Récapitulatif critique des méthodes testées pour étudier les récepteurs P2X durant cette thèse.	208

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Echelle de temps de quelques processus biologiques fondamentaux au maintien du vivant.....	25
Figure 2: Les cibles moléculaires des médicaments	28
Figure 3: Les trois familles de récepteurs canaux classés en fonction de leurs similitudes structurales.	30
Figure 4: Structure schématique générale des récepteurs P2X.	31
Figure 5: Profils de désensibilisation suivant une application courte ou longue d'ATP des différents sous-types des récepteurs P2X	32
Figure 6: Représentation schématique du fonctionnement des récepteurs P2X.	37
Figure 7: Implication des récepteurs P2X dans la neuromodulation.....	38
Figure 8: Résidus impliqués dans le site de liaison ATP	40
Figure 9: Mise en évidence de deux résidus impliqués dans la liaison de l'ATP dans son site d'interaction par marquage avec le NCS-ATP.....	41
Figure 10: Exploration des zones transmembranaires impliquées dans la formation du pore ionique des récepteurs P2X.	42
Figure 11: Représentation schématique des différents états allostériques connus des récepteurs P2X.....	43
Figure 12: Hypothèses proposées pour les voies menant à la perméation des ions	45
Figure 13: Schéma montrant les hypothèses prédominantes postulées pour expliquer le mécanisme de dilatation des récepteurs P2X.....	46
Figure 14: Observation d'un changement conformationnel lent des récepteurs P2X4 par microscopie de force atomique.....	47
Figure 15: Structures des cations utilisés pour étudier le phénomène de dilatation des récepteurs P2X.....	48
Figure 16: Mise en évidence biophysique de la dilatation des récepteurs P2X.	49
Figure 17: Incorporation de YO-PRO-1 en fonction du temps dans des cellules transfectées avec différents types de récepteurs.	50
Figure 18: Remise en cause de la dilatation.....	51
Figure 19: Structure cristallographique du récepteur zfP2X4 fermé	52
Figure 20: Structure d'une sous-unité, et sa représentation schématique en forme de dauphin.....	53

Figure 21: Structures ouverte (en présence d'ATP) et fermée des récepteurs zfP2X4	54
Figure 22: Structure cristallographique des récepteurs amP2X avec vue sur les sites de liaison aux métaux.....	56
Figure 23: Structures cristallographiques des trois états conformationnels obtenus des récepteurs hP2X3.	57
Figure 24: Structure cristallographique des récepteurs pdP2X7. Vues sur la zone de liaison de l'ATP et sur la zone de liaison des antagonistes.	58
Figure 25: Les différentes configuration d'enregistrements d'électrophysiologie patch- clamp.....	65
Figure 26: Photographie de notre poste d'électrophysiologie patch-clamp	65
Figure 27: Représentation schématique des réactions photochimiques qui ont été utilisées lors de cette thèse	67
Figure 28: Schéma de notre poste d'électrophysiologie patch-clamp couplé au système d'irradiation.....	68
Figure 29: Schéma général de l'isomérisation des azobenzènes.....	72
Figure 30: Les états d'excitation singulets possibles des azobenzènes	74
Figure 31: Les différentes classes d'azobenzènes d'après Rau	74
Figure 32: Mécanismes postulés pour l'isomérisation des azobenzènes	76
Figure 33: Photo-contrôle de la structure hélicoïdale d'un peptide à l'aide de dérivés d'azobenzènes.	78
Figure 34: Structure du Bis-Q	79
Figure 35: Photo-contrôle des récepteurs ionotropiques au glutamate à l'aide d'un ligand photo-chromique soluble.....	79
Figure 36: Photorégulation des récepteurs Kainates à l'aide d'un ligand photochromiques soluble pouvant se lier covalamment à sa cible	80
Figure 37: Photo-activation et photo-inhibition des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine à l'aide d'un ligand et d'un inhibiteur photo-isomérisables attachés.....	81
Figure 38: Photo-régulation des récepteurs GABA _A à l'aide d'une molécule photo- isomérisable attachée récepteurs.....	82
Figure 39: Optogating des récepteurs P2X.....	83
Figure 40: Structure générale des agrafes photo-isomérisables.	84

Figure 41: Stratégie globale de photo-contrôle des récepteurs P2X avec des dérivés d'azobenzènes développés au laboratoire.	85
Figure 42: Méthode d'incorporation des agrafes photo-isomérisables	86
Figure 43: Réactifs et conditions utilisées pour la formation de liaisons amides	89
Figure 44: Réaction utilisée pour la synthèse des maléimides	89
Figure 45: Stratégie de synthèse de la gamme 2 des MAMs.	97
Figure 46: Traces électrophysiologiques en configuration cellule entière montrant la photo-régulation du mutant I328C (sur rP2X2-3T).	104
Figure 47: Traces électrophysiologiques en configuration cellule entière montrant la photo-régulation du mutant I328C (sur rP2X2-3T)	105
Figure 48: Traces électrophysiologiques en configuration cellule entière montrant la photo-régulation du mutant V335C (sur rP2X7).	106
Figure 49: Enregistrement en canal unique sur le mutant I328C incubé avec la molécule MAM3.....	106
Figure 50: Mouvements moléculaires des hélices transmembranaires impliqués dans le gating des récepteurs P2X mis en évidence à l'aide de la molécule MAM3.	107
Figure 51: Vue latérale des mutants sélectionnés pour le screening dans les hélices TM2 des récepteurs P2X.....	109
Figure 52: Traces électrophysiologiques obtenues lors du criblage des mouvements des zones transmembranaires des récepteurs P2X.....	110
Figure 53: Enregistrements électrophysiologiques effectués lors du criblage.	111
Figure 54: Criblage des mutants dont les mouvements moléculaires, induits par l'irradiation des MAMs, aboutissent à une perméation au NMDG ⁺ en conditions symétriques NMDG ⁺ _{in} /NMDG ⁺ _{out}	112
Figure 55: Incorporation de YO-PRO-1 dans les récepteurs P2X mutés exprimés dans des cellules HEK293, incubés avec les MAMs et irradiés.	114
Figure 56: Enregistrements en configuration <i>outside-out</i> en multi-canaux et en canal unique de réponses ATP en conditions symétriques NMDG ⁺ _{in} /NMDG ⁺ _{out} et asymétriques NMDG ⁺ _{in} /Na ⁺ _{out} sur les récepteurs rP2X2-3T transfectées dans des cellules HEK-293.....	116
Figure 57: Importance de l'orientation dans le passage du NMDG ⁺ dans les récepteurs P2X.....	117

Figure 58: Expérience de perméation du NMDG ⁺ sur les sous-types rP2X3, rP2X4 et rP2X7 en conditions symétriques NMDG ⁺ _{in} /NMDG ⁺ _{out} et asymétriques NMDG ⁺ _{in} /Na ⁺ _{out}	118
Figure 59: Structures chimiques des polyamines.	118
Figure 60: Perméabilité des récepteurs hP2X2 et hP2X3 à la spermidine	119
Figure 61: Exemple d'utilisation des Mams comme "règles moléculaires" dans l'affinement des modèles cristallographiques.	121
Figure 62: Probabilité de distributions de taille des isomères <i>cis</i> et <i>trans</i> des MAMs	122
Figure 63: Utilisation potentielle du MAMBp1 comme règle moléculaire.	123
Figure 64: Stratégie d'agrandissement du pore ionique des récepteurs P2X par mutagenèse dirigée.	127
Figure 65: Enregistrements en configuration canal unique sur le mutant T339A de rP2X2-3T.	129
Figure 66 : Comparaison des conductances moyennes obtenues sur les mutants T339A et T339Q.	130
Figure 67 : Enregistrements en single-channel en conditions symétriques NMDG ⁺ _{in} /NMDG ⁺ _{out} et bi-ioniques NMDG ⁺ _{in} /Na ⁺ _{out} sur la même cellule sur deux sous-types des récepteurs P2X.	131
Figure 68: Alignement de séquence des hélices TM2 de différents sous-types des récepteurs P2X.	132
Figure 69: Principe de l'amino-acylation semi-synthétique des ARNt tronqués avec des acides aminés non naturels.	138
Figure 70: Principe général de la photo-protéolyse.	139
Figure 71: ATP « cagé » à l'aide de groupements ortho-nitrobenzyles	140
Figure 72: Photoactivation des récepteurs du GABA _A à l'aide d'un précurseur photolabile.	142
Figure 73: Photo-activation des récepteurs au NMDA par un précurseur photolabile de NMDA.	142
Figure 74: Photo-activation des récepteurs canaux P2X par le DMNPE-ATP.	143
Figure 75: Structures chimiques des acides aminés photo-clivables publiés précédemment.	143
Figure 76: Mécanismes généraux de photo-clivage des ortho-nitrophényles.	145

Figure 77: Structure de l'acide aminé 1.	146
Figure 78: Structure de l'acide aminé 2.	146
Figure 79: Structure de l'acide aminé 3.	147
Figure 80: Stratégie globale de la synthèse d'acides aminés d' O'Donnell.....	148
Figure 81: Schéma général de la synthèse de l'acide aminé 1	149
Figure 82: Synthèse et clivage du tripeptide 1	156
Figure 83: Etalonnage pour le dosage HPLC à l'aide de concentrations connues de 2-4-methoxyacétamide	158
Figure 84: Evolution du profil UV du tripeptide 1. Les mesures UV sont effectuées toutes les minutes.....	159
Figure 85: Stratégie de synthèse et clivage du tripeptide 2	160
Figure 86: Principe de la dérivation des acides aminés avec l'OPA.....	162
Figure 87: Droite d'étalonnage obtenue pour évaluer l'efficacité du tripeptide 2.....	163
Figure 88: Suivi de l'évolution UV du tripeptide 2 irradié à 405nm.....	164
Figure 89: Stratégie de synthèse générale de l'amino-acylation chimique de l'acide aminé 1 sur le dinucléotide dCA.	165
Figure 90: Formation de l'anion <i>aci</i> -nitro en fonction de la quantité en eau et du pH	168
Figure 91: Influence d'un groupement basique, situé à proximité d'un groupement photo-clivable, sur la β -élimination.	169
Figure 92: Réaction de Mitsunobu-Tsunoda.....	171
Figure 93: Stratégie d'incorporation des UAA en micro-injectant l'ARNt amino-acylé chimiquement et l'ARNm du gène d'intérêt possédant un codon STOP	172
Figure 94: Site actif de la tyrosyl-ARNt synthetase de B. Stearothermophilus et représentations des acides aminés qui ont été mutés chez E Coli.....	178
Figure 95: Différences structurales entre les ARNt d' E. coli et de B. stearothermophilus	180
Figure 96: Les principaux groupements utilisés comme sondes de photo-marquage.	182
Figure 97: Mécanisme de photo-réaction de la fonction phényl-azide.....	183
Figure 98: Utilisation d'azido-L-phenylalanine dans l'étude des récepteurs ionotropiques au glutamate.	184

Figure 99: Stratégie générale d'incorporation d'AzF dans les récepteurs rP2X2-GFP.	186
Figure 100: Structures chimiques de la tyrosine (Tyr) et de la para-azido-L- phénylalanine (AzF).....	187
Figure 101: Mutations STOP effectuées par mutagenèse dirigée sur le récepteur rP2X2-GFP lors de ce projet, représentées sur le modèle dérivé de la structure cristallographique.	187
Figure 102: Interaction V48C/I328C montrées par réduction induite par le DTT de la liaison S-S formée	188
Figure 103: Réaction d'oxydation de la luciférine par la luciférase menant à l'obtention d'oxyluciférine et d'un photon.....	189
Figure 104: Analyses des récepteurs rP2X2-GFP transfectées dans des cellules HEK293T.....	194
Figure 105: Plaques 96 puits transfectées avec la luciférase wild-type et son mutant ambre (Fluc70Amb) et différentes concentrations des composants du système d'incorporation, AzF-RS et Yam en présence ou absence d'AzF, révélées au luminomètre.....	195
Figure 106: Tests des composants du système d'incorporation pour en évaluer l'efficacité et la fidélité dans des ovocytes de Xénope transfectés avec des récepteurs ionotropiques au glutamate contenant des codons STOP ambre..	200
Figure 107: Réponse ATP enregistrée en configuration whole-cell du mutant Y210* en absence d'AzF mais en présence de Yam et AzF-RS.....	201

ABBREVIATIONS

5-HT : 5-hydroxytryptamine

Å : Angström

Aa : acide aminé

aaRS : aminoacyl-ARNt synthétase

ABC : ATP-binding cassette

AChE : acétylcholine estérase

ACN : acétonitrile

ADN : acide désoxyribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ATP : adénosine 5'-triphosphate

AzF : para-azidophénylalanine

BET : bromure d'éthidium

Boc : tert-butoxy carbonyle

CCM : chromatographie sur couches minces

CIP : Calf Intestinal alkaline Phosphatase

CMBP : cyanomethylene tributyl phosphorane

CMPP : cyanomethylene triphenylphosphorane

d : doublet

DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

DIPEA : di-isopropylethylamine

DMAP: 4-Diméthylaminopyridine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF : N,N-diméthylformamide

DMSO: diméthylsulfoxyde

EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique

EGFP: enhanced green fluorescent protein

Erev: potential d'inversion

FBS: Fetal Bovine Serum (sérum de veau foetal)

GABA: acide γ -aminobutyrique

HATU : hexafluorophosphate de N,N-diméthylméthaniminium

HEK-293T: human embryonic kidney cell
Hela: lignée cellulaire
HOSu : N-hydroxysuccinimide
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
IL : interleukine
LB: Milieu Luria-Bertini, milieu nutritif pour les bactéries
LGICs : ligand-gated ion channels
m: multiplet
MTS: méthanothiosulfonate
nBuLi : n-butyllithium
NES : Normal External Solution
NIS : Normal Internal Solution
NMDA: acide N-méthyl-D-aspartique
NMDG⁺: N-méthyl-D-glucamine
oNB : *ortho*-nitrobenzyle
oNPE : *ortho*-nitrophénylyle
PBS: phosphate buffered saline
PCL : photochromic ligand
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PKC : protéine kinase C
PTL: photoswitchable tethered ligand
s: singulet
SPD: spermidine
t : triplet
TFA : acide trifluoroacétique
THF: tétrahydrofurane
TM : transmembrane
UV : ultraviolet
Vis : Visible

INTRODUCTION GENERALE

Les organismes eucaryotes sont des systèmes complexes, organisés de manière interactive et flexible, avec des interconnexions au niveau de leurs organes, de leurs tissus et au niveaux cellulaires et moléculaires. Au sein d'un organisme eucaryote pluricellulaire, les cellules, entourées de membranes, doivent pouvoir communiquer les unes avec les autres, et intégrer les stimuli externes afin de s'adapter à leur environnement et d'effectuer leurs rôles biologiques. La communication est nécessaire au maintien de l'intégrité de l'organisme, et elle est médiée via différentes voies, mettant en jeu des atomes et molécules porteuses d'informations, transmettant des signaux électriques et/ou chimiques. Tous ces événements cellulaires sont multiples mais organisés et coordonnés et se passent à des échelles de temps variables (**figure 1**).

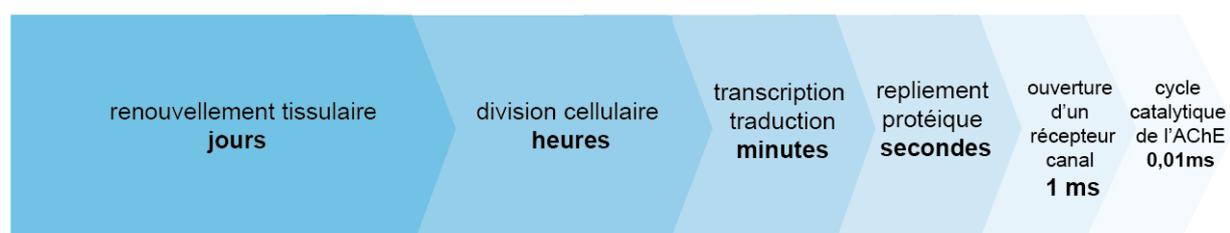


Figure 1: Echelle de temps de quelques processus biologiques fondamentaux au maintien du vivant (ACHé: Acétylcholine Estérase).

La reconnaissance, l'intégration, la propagation et la transduction des signaux rapides entre le milieu extérieur et la cellule ou entre cellules est effectuée en partie par des protéines membranaires, notamment par les canaux ioniques. Ceux-ci sont responsables de l'excitabilité des cellules, car ils sont responsables des fluctuations des potentiels électrochimiques des cellules.

1. Les dates et acteurs clés des concepts de récepteurs et de canaux ioniques

En 1857, Claude Bernard montra que le curare bloque la transmission entre la fibre nerveuse, et la fibre musculaire, mettant pour la première fois en évidence un moyen de communication intermédiaire (Bernard, 1857). Une vingtaine d'année plus tard, Sydney Ringer montra que les cellules peuvent modifier leur comportement en fonction des variations de la composition ionique du milieu externe (Ringer, 1882). Cette découverte fut affinée en 1905 quand Rudolf Hober observa que l'augmentation de la concentration extracellulaire en ions potassium avait un effet sur le potentiel de repos des cellules (Amberson, 1954). Au même moment, John Newport Langley postula l'existence d'une « substance réceptrice » qui va interagir avec les messagers et transmettre l'information aux cellules (Maehle, 2004).

Il a fallu attendre la fin des années 1950 pour qu'Alan Lloyd Hodgkin et Andrew Fielding Huxley relient les observations de leurs prédécesseurs avec la découverte de la bioélectricité, et développent la première méthode d'étude concernant les canaux ioniques, la technique de voltage-clamp, d'après le modèle établi à partir de l'axone géant de calmar (Hodgkin and Huxley, 1952). En 1970 une avancée majeure eu lieu quand Jean-Pierre Changeux effectua la première purification d'un récepteur, à savoir le récepteur nicotinique à l'acétylcholine lié à l' α -bungarotoxine (Changeux et al., 1970) et ce même récepteur fût l'objet de la première détermination de séquence par l'équipe de Shosaku Numa en 1982 (Noda et al., 1982). L'étude des récepteurs canaux et des canaux ioniques subit ensuite une poussée exponentielle grâce à l'établissement de la technique d'électrophysiologie patch-clamp par Erwin Neher et Bert Sakmann en 1976, qui leur valut d'ailleurs le prix Nobel de physiologie en 1991 (Neher and Sakmann, 1976), (Sakmann and Neher, 1984) et à son amélioration cinq ans plus tard (Hamill et al., 1981). Enfin, la première structure cristallographique à haute résolution d'un canal ionique (KcsA : canal potassique bactérien) par Roderick Mackinnon (prix Nobel 2003 en chimie) fut publiée en 1998.

Concernant les récepteurs P2X, ils ont une histoire plutôt récente, l'hypothèse formulée par Geoffrey Burnstock en 1972 que l'ATP avait, outre son rôle dans le métabolisme énergétique, une fonction de neurotransmetteur ayant été longtemps controversée (Burnstock, 1972). La découverte du gène codant les récepteurs P2X eu lieu de ce fait tardivement et fût effectuée par deux équipes distinctes en 1994 (Valera et al., 1994) (Brake et al., 1994). Quinze ans après, la première structure

cristallographique à haute résolution des récepteurs P2X fut publiée, consistant une avancée majeure dans l'étude de ces récepteurs trop longtemps négligés (Kawate et al., 2009a).

De nos jours, quelques chiffres notables permettent de mettre en évidence l'importance de ces découvertes et des récepteurs canaux et canaux ioniques (**figure 2**) dans le maintien de l'intégrité du vivant ainsi que dans les problématiques de santé publique :

- Environ **350** gènes codent pour des canaux ioniques chez l'humain
- Il existe **plus de 40** canalopathies (correspondant à des dysfonctionnements des canaux ioniques membranaires causés par des mutations des gènes codant pour ceux-ci) différentes décrites, responsables par exemple de phénomènes d'hypertension, de problèmes cardiaques, de processus impliqués dans le diabète, dans l'épilepsie et dans les maladies psychiatriques (Cannon, 2006)
- **Plus de 180** médicaments exerçant leurs actions sur des canaux ioniques ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration)

Il est évident que la compréhension fine et précise des processus biologiques est le premier pas vers la conception de moyens thérapeutiques sélectifs et efficaces. Expliquer, sous un angle moléculaire, les phénomènes biologiques régissant le fonctionnement des récepteurs canaux ioniques membranaires peut permettre, à terme, de développer des stratégies innovantes les ciblant plus particulièrement et de manière plus rationalisée. Ces études, ayant pour but de comprendre des cibles dynamiques et complexes nécessitent néanmoins des moyens d'investigation précis et contrôlables. Investiguer des cibles biologiques telles que des canaux ioniques, au niveau moléculaire, requiert donc des stratégies permettant une résolution spatiale et temporelle extrêmement fine et une approche multidisciplinaire.

2. Les canaux ioniques

Parmi les grandes familles biologiques, les canaux ioniques sont des cibles de choix (Overington et al., 2006). Ce sont des éléments fondamentaux de transmission de stimuli et messages dans les membranes des cellules car ils régulent, conduisent et contrôlent les flux d'ions transitant à travers les membranes cellulaires. Leur ouverture et fermeture en réponse à un signal engendre des changements de potentiels membranaires et des entrées ou sorties d'ions rapides provoquant des cascades de réponses cellulaires et ainsi une communication entre cellules et avec l'environnement, processus primordial pour le maintien du vivant. Ces mécanismes sont particulièrement importants au niveau neuronal, où les récepteurs ioniques peuvent occasionner l'initiation et la propagation des potentiels d'action, ayant des effets excitateurs ou inhibiteurs en fonction des concentrations relatives locales d'ions de part et d'autre de la membrane.

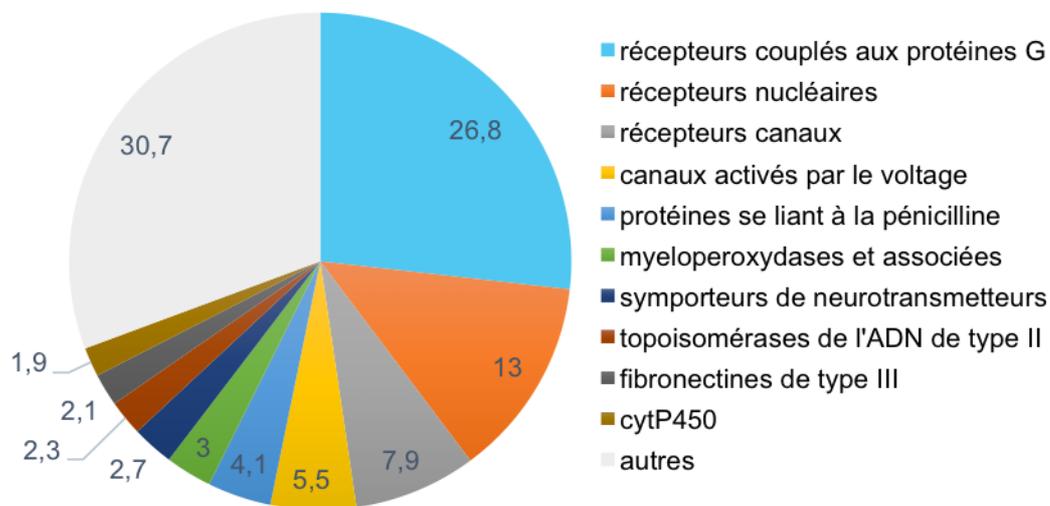


Figure 2: les cibles moléculaires des médicaments (d'après Overington et al., 2006)

Ces canaux ioniques peuvent être activés par une variation de potentiel membranaire, ce sont les canaux voltages-dépendants (VGICs), ou par des stimuli mécaniques (canaux Piezo (Coste et al., 2012)), variations de pH ou de température (canaux TRP

(Liao et al., 2013)), mais également par des molécules chimiques, ou ligands, pour les LGICs (Ligand Gated Ion Channels) aussi appelés récepteurs canaux.

Les canaux ioniques et récepteurs canaux sont sélectifs de certains types d'ions mais leur transport se fait par diffusion passive ce qui implique que des déterminants moléculaires soient responsables de la sélectivité ionique.

Les récepteurs canaux sont donc des protéines transmembranaires qui permettent, après la liaison réversible (principalement non covalente) de leur ligand (ou agoniste) sur son site d'interaction (situé en partie extracellulaire), de laisser passer des ions après des changements conformationnels aboutissant à l'ouverture, appelée « gating », d'un canal ionique formé par les différentes sous-unités du récepteur, qui va constituer en quelque sorte un pore dans la membrane plasmique de la cellule (Collingridge et al., 2009). Les récepteurs canaux ont de nombreux rôles physiologiques et sont notamment très largement distribués au niveau du système nerveux central et périphérique où ils transmettent les influx nerveux rapides, grâce à leur capacité à engendrer rapidement des influx et efflux d'ions (Lemoine et al., 2012).

Il existe 3 familles de récepteurs canaux (**figure 3**) classées selon le nombre de sous-unités constituant un récepteur fonctionnel, subdivisées en sous-familles en fonction de la nature du ligand.

Les récepteurs **pentamériques (figure 3A)**, aussi appelés récepteurs Cys-loop (d'après une paire de cystéines localisée dans la partie extracellulaire), incluent des récepteurs ayant des actions inhibitrices ou excitatrices, ayant des perméabilités ioniques différentes. Ils contiennent notamment les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (perméables aux ions sodium et potassium), les récepteurs ionotropiques à la sérotonine, ainsi que les récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA), Gaba_A (perméables aux ions chlorures).

Il existe également les récepteurs **tétramériques (figure 3B)**, contenant les récepteurs excitateurs au glutamate, assemblés en hétéro-tétramères et sous-classifiés en fonction de leur sensibilité aux agonistes.

Enfin, la troisième catégorie est constituée des récepteurs **trimériques (figure 3C)** dont font partie les récepteurs P2X, cibles de cette étude, liant l'ATP comme agoniste physiologique.

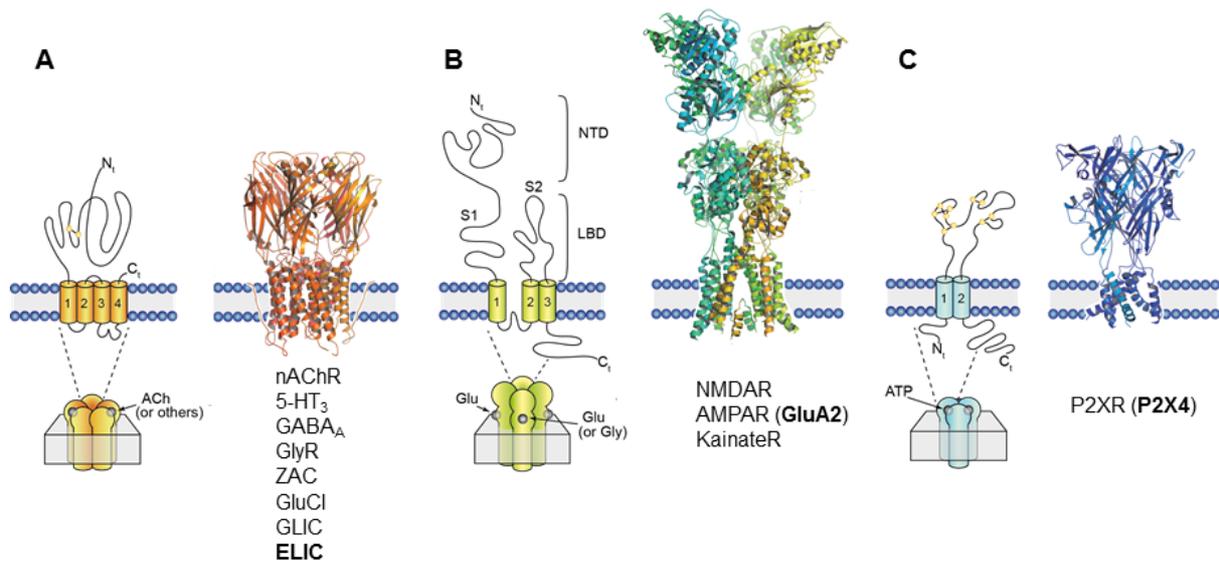


Figure 3: Les trois familles de récepteurs canaux classés en fonction de leurs similitudes structurales. **A.** Les récepteurs pentamériques, structure schématique et structure cristallographique des récepteurs ELIC. **B.** Les récepteurs tétramériques, structure schématique et structure cristallographique des récepteurs GluA2. **C.** Les récepteurs trimériques, structure schématique et structure cristallographique des récepteurs P2X4. NTD : Domaine NTerminal, LBD : Ligand Binding Domain (zone de liaison du ligand). ACh : acétylcholine, Glu : glutamate, Gly : glycine, nAChR : récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, 5-HT₃R : récepteurs ionotropiques à la sérotonine, GABA_AR : récepteurs ionotropiques au GABA, GlyR : récepteurs ionotropiques à la glycine, ZAC : Zinc-Activated Channel (récepteurs ionotropiques activés par le zinc), GluCl : Glutamate-Gated Chloride channels (canaux chlorures activés par le glutamate), GLIC : Gloebacter Ligand-gated Ion Channel (récepteur ionotropique bactérien activé par les protons), ELIC : Erwinia Ligand-gated ion channel, NMDAR : récepteur NMDA, AMPAR : récepteur AMPA, Kainate R : récepteur kainate, (d'après Lemoine et al., 2012).

3. Les récepteurs P2X

3.1. Généralités

Les récepteurs P2X sont des protéines membranaires, identifiés chez les eucaryotes, qui appartiennent à la famille des récepteurs canaux, dont l'existence a été montrée depuis 1994 par la découverte de leurs gènes (Brake et al., 1994) (Valera et al., 1994). Ces récepteurs canaux trimériques s'ouvrent pour laisser passer des cations selon leur gradient électrochimique (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ; flux de $6\text{-}20 \cdot 10^6$ ions/s (150mM, -120mV)) en réponse à la liaison de l'ATP extracellulaire. On distingue ces récepteurs canaux des récepteurs P2Y, qui bien qu'activés par l'ATP, font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G.

Ils sont formés de 3 sous-unités et chaque sous-unité est constituée de deux segments transmembranaires reliés par une large boucle extracellulaire riche en ponts disulfures et en sites de glycosylation, les extrémités aminées et carboxylées terminales étant cytoplasmiques (**figure 4**).

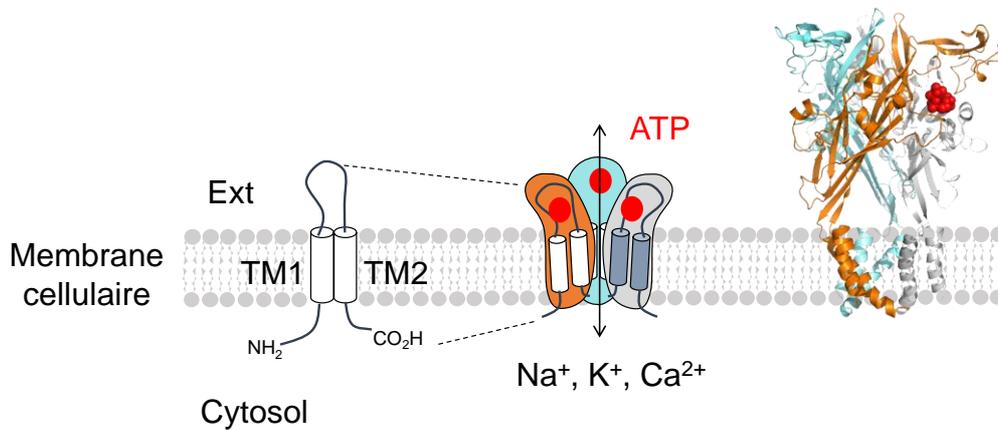


Figure 4: Structure schématique générale des récepteurs P2X. De gauche à droite : structure d'une sous-unité, structure schématique des récepteurs P2X et structure cristallographique de l'état lié à l'ATP.

3.2. Sous-types

Il existe 7 sous-types différents codés par 7 gènes *P2RX1-7* chez l'humain ayant des homologies de séquences en acides aminés comprises entre 40 et 55% (North, 2002). Leur assemblage se fait en homotrimères ou hétérotrimères.

Tous présentent une perméabilité pour les cations sodium, potassium et calcium. Seul le sous-type P2X5 présente, en plus, une perméabilité aux ions chlorures (Bo et al 2003). Chaque sous-type montre un EC₅₀ particulier vis-à-vis de l'agoniste ATP. Leurs propriétés envers les antagonistes et modulateurs diffèrent également.

L'intensité des phénomènes de désensibilisation est aussi variable en fonction des sous-types, P2X2 et P2X4 subissent une lente désensibilisation tandis que P2X1 et P2X3 ont un profil de désensibilisation rapide (**figure 5**). Le déclin du courant est non seulement rapide mais la récupération du courant après la désensibilisation est très

lente, des attentes de plus de 15 minutes étant nécessaires pour récupérer la réponse ATP. Enfin, le sous-type P2X7 ne semble subir aucune désensibilisation même après une application prolongée d'ATP.

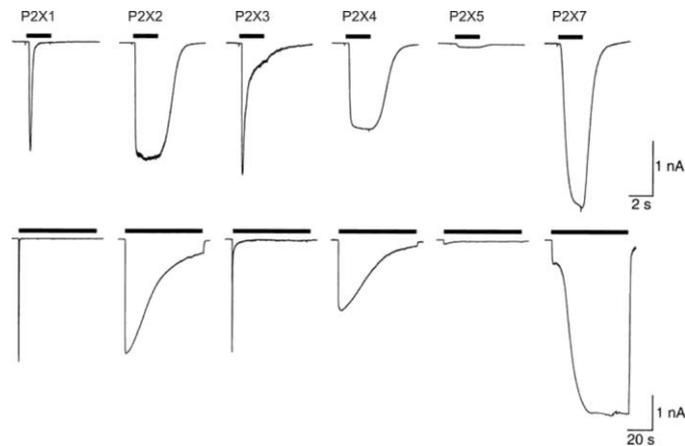


Figure 5: Profils de désensibilisation suivant une application courte ou longue d'ATP des différents sous-types des récepteurs P2X (North, 2002).

3.3. Localisation/distribution

Ces récepteurs retrouvés chez les Eucaryotes, sont exprimés dans tous les tissus et sont très nombreux au niveau du système nerveux central.

3.3.1. Les récepteurs homomériques

Les récepteurs P2X forment des homotrimères (**tableau 1**) sauf la sous-unité P2X6 qui ne semble pas être apte à former des homotrimères *in vitro* et *in vivo* (Barrera et al., 2005).

	P2X1	P2X2 ¹	P2X3	P2X4	P2X5 ²	P2X6 ²	P2X7 ^{3,4}
Nombre d'aa	399	472	393	389	455	379	595
Taille Cterm (en nombre aa)	45	119	53	31	96	26	239
Localisation⁵	Vaisseaux sanguins des muscles lisses (organes : vessie, spermiducte, intestins, artères) Plaquettes	SNC et périphérique, pancréas, muscle lisse, ganglion sensoriel et autonome	Neurones sensoriels nociceptifs, sympathiques, SNC	Microglie activée, Cellules endothéliales, Glandes salivaires, colon, testicule	Système nerveux central ⁶ , Muscle squelettique, Peau, épithélium	Neurones, nerfs périphériques	Cellules immunitaires macrophages Cellules gliales, microglie, peau
Perméabilité ionique⁷ P_{Ca²⁺}/P_{Na⁺}	Sodium, potassium, calcium 4,8	Sodium, potassium Calcium 2,8	Sodium, potassium, calcium 1,2	Sodium, potassium, calcium 4,2	Sodium, potassium, calcium, ions chlorures ⁸ 1,5	Sodium, potassium, calcium n.d.	Sodium, potassium, Calcium n.d.
Rôles physiologiques	Contraction des muscles lisses Régulation de la Psanguine Activation plaquettes Fonction vessie	Transduction du goût Réponses pré et post synaptique ⁹ Protection de l'audition	Reflexes vessie Goût	Remodelage vasculaire	Différentiation cellulaire des cellules du muscle squelettique ¹⁰	Différentiation des cellules souches mésenchymateuses	Perception de la douleur
Rôles pathologiques¹¹	Thrombose	Perte audition (V60L/G353R) Hyperalgésie Allodynie	Douleur chronique Epilepsie	Douleur neuropathique ¹²	Inflammation	Transmission douleur Développement tumoral Insuffisance cardiaque chronique ¹³	Douleur chronique Leucémies lymphocytaires chroniques et ostéoporose Dépression Arthrose
Phénotype Knock-out	Stérilité ¹⁴ (mâle) ↓ Fonctionnalité des reins ↓ Thrombose artérielle	↓ Douleur inflammatoire ↓ Réflexe urinaire vessie ↓ Sensation de goût ↓ Mobilité intestinale	↓ LTD au niveau de l'hippocampe ↓ Réflexe vessie ↓ Sensation goût et sensation de température ↓ Mobilité intestinale ¹⁵	↑ Pression sanguine et fonction cardiaque ¹⁶ ↓ Douleur neuropathique et inflammatoire ↓ LTD hippocampe	/	/	↓ Inflammation via production de cytokine ^{17,18} Douleur ¹⁹ Sécrétion de fluides Anomalies squelette ²⁰
EC50 ATP (μM)²¹	0,07	1,2	0,5	10	10	12	100-500
Dilatation observée²²	non	oui	non	oui	oui	/	oui
Cinétique de désensibilisation²³	Rapide (<1s)	Lente	Rapide (<1s)	Lente	Lente	Lente	Lente
Influence du pH acide^{24,25}	↓	↑	↓	↓	↓	/	↓
Modulation par le Zn²⁺²⁶	-	↑<100μM ↓>mM	↑<100μM ↓>mM	↑<100μM ↓>mM	↑ ↓>300microM	/	-
Ca²⁺²⁷	Pas d'inhibition	↓ (0.3-30mM)	Pas d'inhibition		↓	/	↓
Modulateur allostérique	/	DHEA, progestérone	Ethanol Cibachron blue	Cibachron blue Ivermectine	/	/	/
Agonistes²⁸	MgATP ²⁻ β,γ-MeATP α,β-MeATP ATPγS	ATPγS	MgATP ²⁻ α,β-MeATP ATPγS	ATPγS	ATPγS	ATPγS	Bz-ATP
Antagonistes²⁹	NF023 NF449 PPADS TNP-ATP	NF770 NF778 PPADS TNP-ATP	A-317491 RO-51 AF-219 PPADS TNP-ATP	5-BDBD paroxetine TNP-ATP	PPADS	/	Brillant blue G AACBA KN-62

Tableau 1: Propriétés physiologiques, pathologiques et pharmacologiques des sous-types homomériques des récepteurs P2X.

Abbréviations : **A-317491** : acide 5-([3-phenoxybenzyl][(15)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]amino)carbonyl)-1,2,4-benzenetricarboxylique; **AACBCA** : (adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R-amino-pyrrolidin-1-yl)methyl]-2-chloro-benzamide ; **ATP γ S** : adenosine 5'-(3-thio)triphosphate; **α,β -MeATP** : α,β -methylene-adenosine 5'-triphosphate; bc-meATP ; **β,γ -MeATP** : β,γ -methylene-adenosine 5'-triphosphate; **5-BDBD** : 5-(3-Bromophenyl)-1,3-dihydro-2H-Benzofuro[3,2-e]-1,4-diazepin-2-one; **Bz-ATP** : 2,3-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP; **DHEA** : déhydroépiandrostérone; **KN-62** : 4-[(2S)-2-[(5-isoquinolinylsulfonyl)methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)propyl] phenyl isoquinolinesulfonic acid ester; **NF023** : acide 8,8'-[carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino)]bis-1,3,5-naphthalene-trisulphonique ; **NF449** : acide 4,4',4'',4'''-(carbonylbis[imino-5,1,3-benzenetriyl-bis(carbonylimino)])tetrakisbenzene-1,3-disulfonique; **NF770** : acide 7,7'-(carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylene)carbonylimino))bis(1-methoxy-naphthalene-3,6-disulfonique); **NF778** : acide 2-[[4-methyl-5-[[3-[[3-[[2-methyl-5-[(1,3,7-trisulfonaphthalen-2-yl)carbonyl]amino]phenyl]carbonyl]phenyl]carbonylamino]cyclohexa-2,5-diene-1-carbonyl]amino]cyclohexa-2,4-diene-1-carbonyl]amino]naphthalene-1,3,7-trisulfonique
PPADS : pyridoxalphosphate-6-azophenyl-20 ,40 -disulphonate; **RO-51** : 2-[[4-amino-5-(5-iodo-4-methoxy-2-propan-2-ylphenoxy)pyrimidin-2-yl]amino]propane-1,3-diol; **TNP-ATP** : 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP

D'après: 1: (Ding and Sachs, 1999), 2 : (Collo et al., 1996), 3 : (Rassendren et al., 1997a), 4 : (Collo et al., 1997), 5 : (Burnstock and Knight, 2004), 6 : ,(Ruan and Burnstock, 2005), 7 : (North, 2002), 8 : (Bo et al., 2003), 9 : (Ren et al., 2003), 10 : (Ryten et al., 2002), 11 : (Puchałowicz et al., 2014), 12 : (Tsuda et al., 2003), 13 : (Banfi et al., 2005), 14 : (Mulryan et al., 2000), 15 : (Souslova et al., 2000), 16 : (Yamamoto et al., 2006), 17 : (Solle et al., 2001), 18 : (Chessell et al., 2005), 19 : (Hansen et al., 2011), 20 : (Ke et al., 2003), 21 : (Soto et al., 1997) , 22 : (Khakh et al., 1999a),23 : (North, 2002) 24 : (Stoop et al., 1997), 25 : (Wildman et al., 1999), 26 : (Huidobro-Toro et al., 2008), 27 : (Evans et al., 1996), 28 : (Li et al., 2013), 29 : (North and Jarvis, 2013)

3.3.2. Les hétéromères observés *in vivo*

Des hétéromères sont fonctionnels quand ils sont reconstitués et exprimés dans des cellules mais des preuves claires de leur présence dans des tissus natifs n'ont pas été encore obtenues ((Saul et al., 2013) et (Torres et al., 1999)): P2X1/2, P2X1/4, P2X2/5, P2X2/6, P2X4/7 et P2X2/4/7 ont ainsi pu être exprimés. Concernant les hétéromères observés *in vivo*, il existe les assemblages P2X2/3, P2X1/5, P2X4/6 et P2X2/6 (tableau 2).

Hétéromères	P2X2/3 (Lewis et al., 1995)	P2X1/5 (Lê et al., 1999) (Lalo et al., 2008)	P2X4/6 (Lê et al., 1998) (Bobanovic et al., 2002)	P2X2/6 (King et al., 2000)
Localisation	Neurones sympathiques, sensoriels et cérébraux	Astrocytes du cortex	Cellules épithéliales de différents organes	Cellules sécrétrices endocrines (pancréas, thyroïde, glandes pituitaires et surrénales, testicules)
Rôles physiologiques	Transmission sensorielle	N.D.	Modulation de la transmission synaptique	Contrôle du sodium dans les reins
Rôles pathologiques	Modulation de la sensibilité à la douleur	N.D.	N.D.	N.D.

Tableau 2: les hétéromères observés in vivo. N.D. : non déterminé

3.3.3. Les différents variants d'épissage

Outre les différents sous-types et les différentes oligomérisations qu'ils arborent, les récepteurs P2X d'un tissu donné peuvent provenir de différents types d'épissage, qui vont en moduler leurs propriétés. Ainsi, un variant d'épissage des récepteurs P2X2, plus court de 207 paires de base (appelé P2X2-2) montre des cinétiques de désensibilisation différentes (Brändle et al., 1997). De la même manière, l'épissage des récepteurs P2X5 chez l'humain provoque la formation d'un récepteur non fonctionnel, tandis que des polymorphismes empêchant cet épissage donnent lieu à un récepteur fonctionnel (Bo et al., 2003).

3.4. Physiologie des récepteurs P2X

3.4.1. Généralités

L'ATP est synthétisé de manière ubiquitaire et par conséquent présent dans toutes les cellules à des concentrations avoisinant le millimolaire et son relargage peut avoir lieu

dans différents contextes et via différents mécanismes impliquant la lyse des cellules en réponse à des dommages mais également des mécanismes non lytiques (Gordon, 1986) (**tableau 3**).

Relargage d'ATP via des mécanismes non lytiques	Relargage d'ATP via des mécanismes lytiques
<ul style="list-style-type: none"> • Exocytoses via des vésicules remplies d'ATP (Montana et al., 2006) • Co-relargage avec un autre neurotransmetteur au niveau de vésicules synaptiques (Pankratov et al., 2006) • Canaux ABC (Praetorius and Leipziger, 2009) • Héli-canaux : pannexines et connexines (Lazarowski, 2012) • P2X7 (Pellegatti et al., 2005) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dommages cellulaires • Apoptose • Nécrose <p style="text-align: right;">(Cook and McCleskey, 2002)</p>

Tableau 3: Processus lytiques et non lytiques permettant le relargage de l'ATP dans le milieu extracellulaire.

Les P2X ayant une haute perméabilité au calcium (Egan, 2004), ils vont être responsables de l'activation conséquentielle des effecteurs dépendants du calcium et de la signalisation cellulaire qui y est associée (Koshimizu et al., 2000) (**figure 6**). De par leurs effets physiologiques et pathologiques variés ainsi que parce qu'ils sont le lien direct avec l'effet de l'ATP extracellulaire sur les potentiels membranaires et sur la concentration en Ca^{2+} cytosolique ces récepteurs sont des cibles de recherche réellement attractives. Au niveau du système nerveux central, ils sont impliqués dans les phénomènes de transmission synaptique rapide, et de modulation.

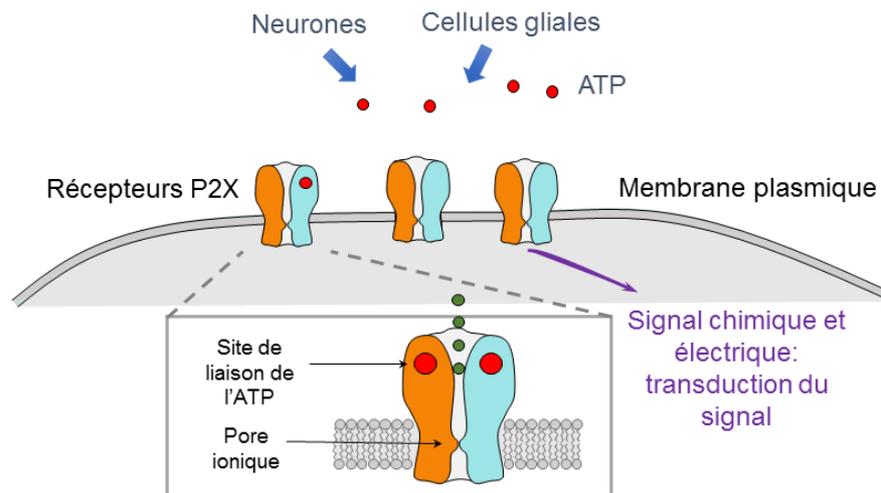


Figure 6: représentation schématique du fonctionnement des récepteurs P2X.

3.4.2. Quelques exemples détaillés de rôles physio-pathologiques

Ces récepteurs ont montré être impliqué dans les phénomènes de **douleur**. En effet, le relargage de l'ATP dans le milieu extracellulaire peut être un signal de danger qui intervient après une nécrose ou apoptose d'une cellule. Cela va activer des récepteurs P2X3, P2X2/3 et P2X2 localisés au niveau des terminaisons nerveuses des fibres sensibles. Cette activation et l'entrée massive de cations qui en résulte induit une dépolarisation membranaire qui va augmenter la libération de glutamate. Ceci va activer les récepteurs ionotropiques au glutamate impliqués dans la douleur. Une preuve importante de cette implication a été montrée grâce à des souris knock-out pour le gène codant pour P2X3 qui arborent une douleur mécanique largement réduite (Cockayne et al., 2000).

D'autre part dans la **douleur neuropathique**, une lésion nerveuse va provoquer l'activation de la microglie localisée dans la corne dorsale de la moelle épinière. Celle-ci va surexprimer le sous-type P2X4 et il va y avoir libération de BDNF (brain-derived neurotrophic factor) qui active TrkB (récepteur tyrosyl kinase) qui va baisser l'expression de KCC2 (co-transporteur K^+/Cl^- qui est responsable de la sortie des ions chlorures) au niveau des neurones post-synaptiques. De ce fait la concentration d'ions chlorures intracellulaire va augmenter provoquant un courant chlore sortant via les récepteurs canaux $GABA_A$ et glycine, aboutissant à une désinhibition des systèmes inhibiteurs GABAergique et glycinergique, ce qui induit une dépolarisation de la

membrane et une hyperexcitabilité des neurones post-synaptiques, et donc une plus grande sensibilité de ceux-ci. (Ulmann et al., 2008)

Au niveau du système nerveux central, les récepteurs P2X ont montré être très impliqués dans les phénomènes concernant la **modulation de la transmission synaptique rapide**. Par exemple, une libération de glutamate et de noradrénaline au niveau présynaptique va provoquer la libération d'ATP contenu dans les astrocytes. Ce relargage d'ATP va activer les récepteurs P2X2 localisés au niveau post-synaptique, ce qui va entraîner l'activation de voies médiées par le Ca^{2+} et l'IP3K (Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase) menant à une augmentation de la transmission glutamatergique via les récepteurs AMPA (**figure 7**, Khakh and North, 2012) dans les neurones de l'hypothalamus et à une diminution de la transmission glutamatergique via une voie médiée par la CAMKII (calcium-calmoduline dépendante kinase 2) dans les neurones de l'hippocampe (Pouget et al., 2014).

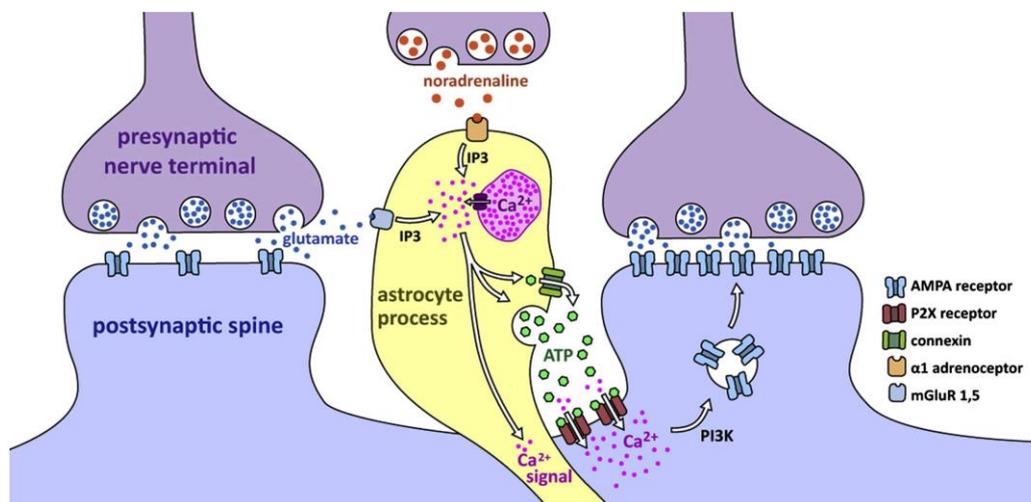


Figure 7: Implication des récepteurs P2X dans la neuromodulation (Khakh and North, 2012)

Enfin dans les phénomènes d'**inflammation**, les récepteurs P2X7 localisés à la membrane des macrophages vont induire le relargage d'interleukine 1 β , médiateur important de l'inflammation, après activation par l'ATP (Ferrari et al., 2006).

3.4.3. Interactions avec d'autres récepteurs transmembranaires

Les récepteurs P2X peuvent interagir avec différentes protéines, et notamment avec d'autres récepteurs transmembranaires (**tableau 4**). Les raisons moléculaires et l'importance physiologique de ces interactions restent encore globalement méconnues et semblent tributaires du type cellulaire observé.

Récepteur	Description de l'interaction
GABA _A	<i>Neurones des ganglions de la racine dorsale</i> : co-expression (Labrakakis et al., 2003) <i>Moelle épinière</i> : forment des complexes transitoires qui sont co-adressés à la membrane (Shrivastava et al., 2011) <i>Neurones de l'hypothalamus</i> : Inhibition réciproque des deux récepteurs (Jo et al., 2011)
GABA _C	<i>Système nerveux central</i> : Cross-talk inhibiteur des deux récepteurs (Boué-Grabot et al., 2004)
AChR	<i>Neurones myentériques</i> : Inhibition réciproque des P2X et des AChR (Zhou and Galligan, 1998)
5-HT ₃	<i>Neurones de l'hippocampe</i> : Inhibition mutuelle des deux récepteurs et aide à l'adresse des récepteurs 5-HT _{3A} par les récepteurs P2X2 (Emerit et al., 2016)
Pannexine-1	<i>Monocytes, macrophages, astrocytes</i> : se co-localise et s'active avec les récepteurs P2X7 (voir introduction sur les récepteurs P2X et la dilatation) (Pelegriin and Surprenant, 2006)

Tableau 4: Interactions des récepteurs P2X avec d'autres récepteurs canaux et canaux ioniques.

3.5. Structure Globale des récepteurs P2X

3.5.1. Partie extracellulaire

La partie extracellulaire dépasse d'environ 70 Å au-dessus de la membrane. Elle partage une structure relativement similaire entre les différents sous-types car elle contient des structures secondaires similaires (feuilletés β) et dix cystéines conservées

dont les ponts disulfures, conservés entre les sous-types de la famille des récepteurs P2X, en assurent le repliement. Le site de liaison de l'ATP se situe dans une cavité à la jonction de deux sous-unités, mis en évidence par la formation de ponts disulfures inter-sous-unités par mutagenèse dirigée en cystéine (Marquez-Klaka et al., 2007) et est localisé à 45 Å de la membrane dans une structure ressemblant à une « mâchoire » qui ne contient étrangement pas de séquence consensus de liaison à l'ATP mais des acides aminés chargés positivement (lysine et arginine) conservés (**figure 8**).

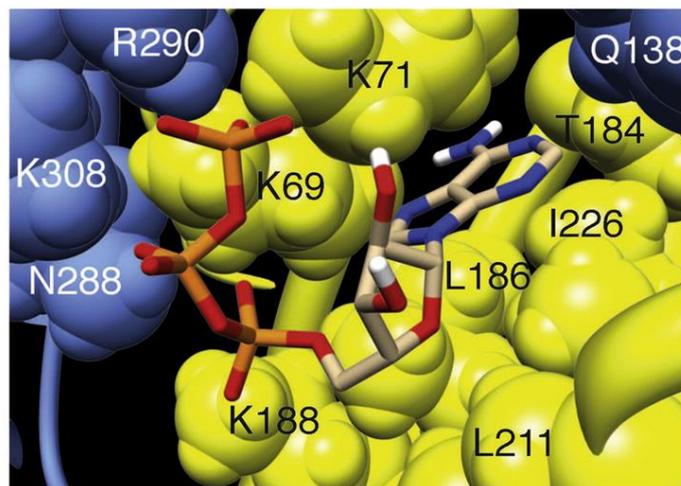


Figure 8: Résidus impliqués dans le site de liaison ATP (Khakh and North, 2012b) (notation rP2X2).

D'une part, des résidus ont été identifiés par alanine scanning, K69 et K71 ont ainsi montré être impliqués dans la liaison de l'ATP (Jiang et al., 2000). D'autre part, des acides aminés (N140 et L186) impliqués dans les interactions au sein de la poche de liaison ont été mis précédemment en évidence grâce au NCS-ATP (8-thiocyano-ATP), dérivé d'ATP réactif vis-à-vis des thiols pouvant créer des liaisons covalentes (**figure 9**) (Jiang et al., 2011).

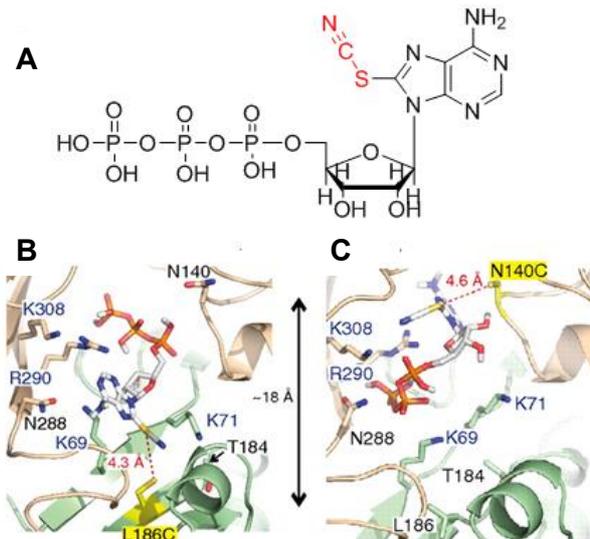


Figure 9: Mise en évidence de deux résidus impliqués dans la liaison de l'ATP dans son site d'interaction par marquage avec le NCS-ATP (notation rP2X2). **A.** Structure chimique du dérivé NCS-ATP. **B.** Mise en évidence de l'interaction avec le résidu L186. **C.** Mise en évidence de l'interaction avec le dérivé N140 (Jiang et al., 2011).

La poche de liaison de l'ATP est également constituée de résidus non conservés entre les espèces et sous-types, qui sont responsables de l'hétérogénéité de propriétés vis-à-vis des agonistes.

Outre, le site d'interaction de l'ATP, la partie extracellulaire contient également des sites de liaisons pour des antagonistes et des sites de modulation par les ions métalliques ainsi que des sites de N-glycosylation conservés (au nombre de 3 à 6 en fonction des sous-types et des espèces) semblant essentiels pour l'adressage à la membrane des récepteurs.

3.5.2. Zone transmembranaire

La structure hélicoïdale des parties transmembranaires, confirmée depuis par les données cristallographiques, avait été suggérée par des expériences de mutagenèse dirigée, chaque résidu étant substitué par des tryptophanes, cystéines ou alanines. Les hélices transmembranaires forment le canal ionique : TM1 et TM2 sont impliquées dans les mouvements menant à l'ouverture du pore ionique (TM1 mouvements d'amplitude plus modérée que TM2). Les hélices TM2 bordent le pore ionique, tandis

que les hélices TM1 ne sont pas directement confrontées au passage des ions ((Jiang et al., 2001) et (Samways et al., 2008)). De manière plus précise, des résidus bordant le pore ont été identifiés par mutagenèse en cystéine suivie d'application de MTS (méthane thio sulfonates) (**figure 10A**) (Rassendren et al., 1997a) ou de Cd^{2+} (**figure 10B**), ce qui a permis de mettre en évidence les acides aminés formant le contour du pore (Kracun et al., 2010). Les résidus N333, T336, T339 sont localisés dans les hélices alpha chacun un tour d'hélice plus bas que le précédent, et bordent le pore ionique, et constituent la partie la plus étroite du canal.

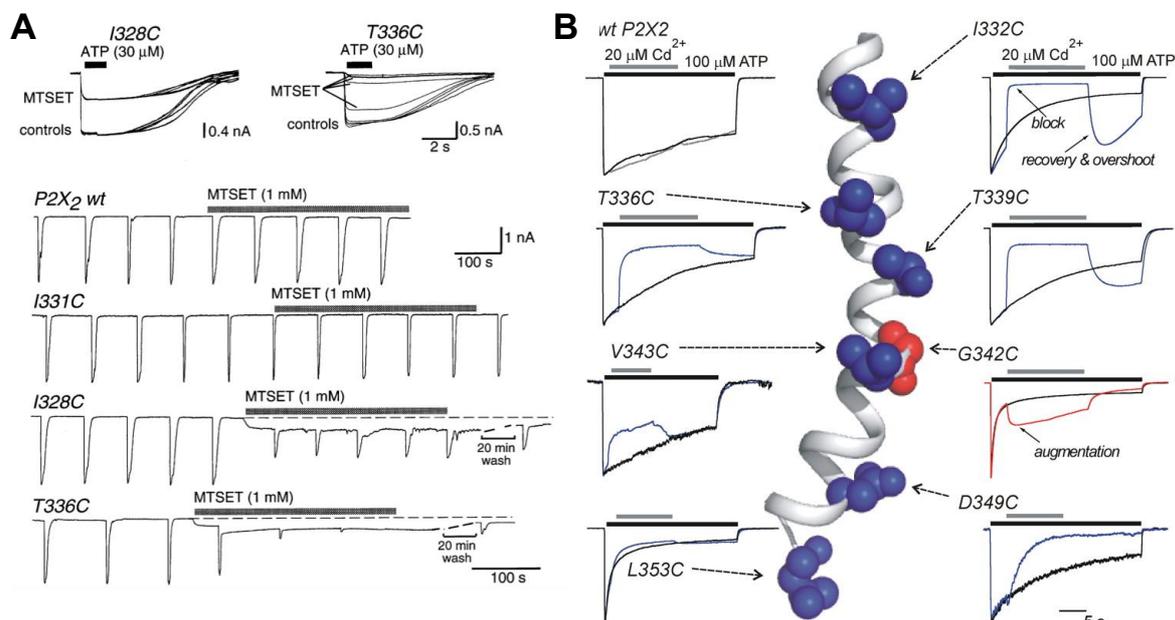


Figure 10: Exploration des zones transmembranaires impliquées dans la formation du pore ionique des récepteurs P2X. A. Mise en évidence de résidus impliqués dans la formation du pore ionique par réaction de cystéines incorporées par mutagenèse dirigée avec des MTS (Rassendren et al., 1997a). **B.** Mise en évidence de résidus impliqués dans la formation du pore ionique par blockage au Cd^{2+} (Kracun et al., 2010).

3.5.3. Parties intracellulaires

Les parties intracellulaires sont de longueurs variables en fonction des sous-types. Ainsi, l'extrémité C-terminale peut être constituée de 26 (récepteur P2X6) à 239 (pour le récepteur P2X7) résidus. Bien que leurs rôles restent incertains, des troncatures, délétions et mutations de cette zone semblent affecter les paramètres cinétiques d'ouverture et fermeture du canal ainsi que la perméabilité ionique (Eickhorst et al., 2002) et le processus de désensibilisation des récepteurs P2X. La séquence de cette

extrémité contient un motif retrouvé dans tous les sous-types, constitué de la séquence YXXXK (X= aa variable) qui est impliqué dans la rétention à la membrane (Chaumont et al., 2004). L'extrémité N-terminale, constituée de 20 à 30 acides aminés selon les sous-types, contient une séquence consensus pour les protéines kinase C (Thr-X-Lys/Arg), conservées dans tous les sous-types. Dans le sous-type P2X2, il a été montré que la thréonine 18 est phosphorylée et que les mutants ayant un site PKC perturbé montrent une cinétique de désensibilisation plus rapide (Boué-Grabot et al., 2000). Ces parties intracellulaires sont également connues pour être importantes dans l'adressage à la membrane des récepteurs.

3.6. Les différents états allostériques et leurs implications structurales

Les récepteurs P2X peuvent s'interconvertir entre différents états allostériques suivant la liaison ou la dissociation de l'agoniste.

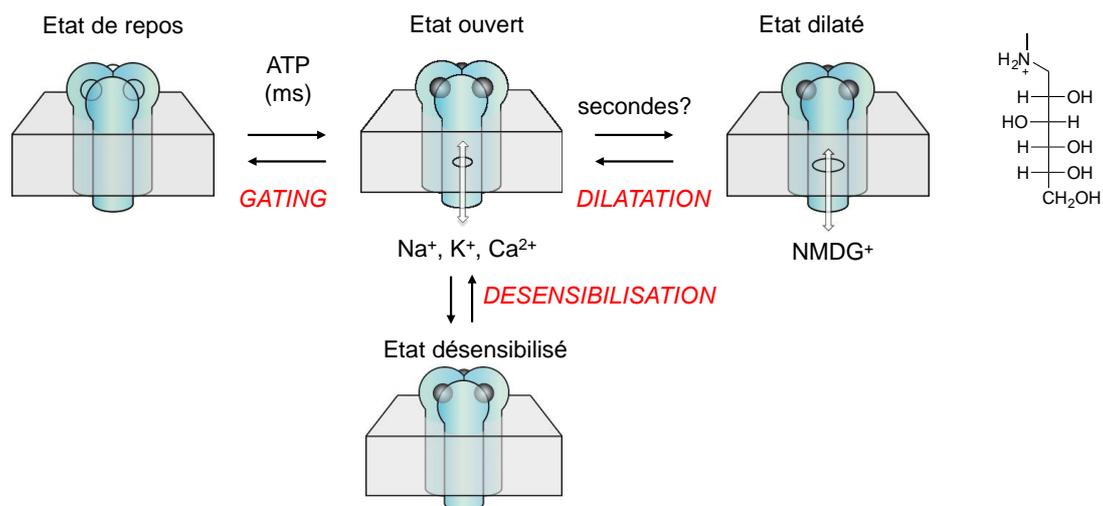


Figure 11: Représentation schématique des différents états allostériques connus des récepteurs P2X.

3.6.1. L'ouverture du pore ionique ou *gating*

3.6.1.1. Conséquences structurales de la liaison d'ATP

La liaison de l'ATP dans son site de liaison va engendrer le passage des récepteurs d'un état de repos, fermé, vers un état ouvert, conductant (aussi appelé état I1) et perméable aux cations Na^+ , K^+ et Ca^{2+} qui vont franchir le pore selon leur gradient électrochimique. Par microscopie à force atomique (AFM) (Shinozaki et al., 2009) et par des expériences de mutagénèse dirigée, il a pu être montré que l'écartement des sous-unités, notamment au niveau transmembranaire (Khakh and Egan, 2005), était la base du mécanisme d'ouverture du pore.

D'un point de vue moléculaire, la liaison de l'ATP va provoquer un grand nombre de mouvements moléculaires qui vont se répercuter sur la structure entière du récepteur. Après s'être logé dans sa poche de liaison, ressemblant à une mâchoire, ces mâchoires vont se rapprocher et les régions basses extracellulaires des sous-unités du récepteur vont bouger dans un mouvement de fléchissement, les fenestrations latérales vont s'agrandir, le pore bordé des hélices TM2 s'ouvre d'après une expansion de ces hélices et le récepteur va se retrouver dans un état actif, laissant passer les cations.

Les récepteurs étudiés en canal unique montrent une multitude d'ouverture et de fermeture extrêmement rapide qu'on appelle le « flickering », qui serait la preuve que d'autres états conformationnels rapides ouverts existent, ainsi que des états sous-conductants rapides (Ding and Sachs, 1999).

3.6.1.2. Passage des ions

Deux voies ont été postulées pour le passage des ions à travers les récepteurs P2X (**figure 12**). Premièrement, des fenestrations latérales pourraient permettre le passage des ions à travers le pore. D'autre part, il a également été émis l'hypothèse que les ions pourraient passer de manière centrale, ce qui a été déduit par la présence de vestibules centraux larges susceptibles d'accueillir les ions (Kawate et al., 2009a). Ces hypothèses ont été investiguées par mutagénèse dirigée et les conclusions de ces études convergent vers un passage latéral des ions (Samways et al., 2011). En effet, outre les calculs d'énergie libre qui montrent que les fenestrations latérales sont énergiquement favorisées pour le passage des ions (Kawate et al., 2011), la formation

de ponts disulfures entre cystéines générées dans la zone centrale n'empêche pas le passage des ions.

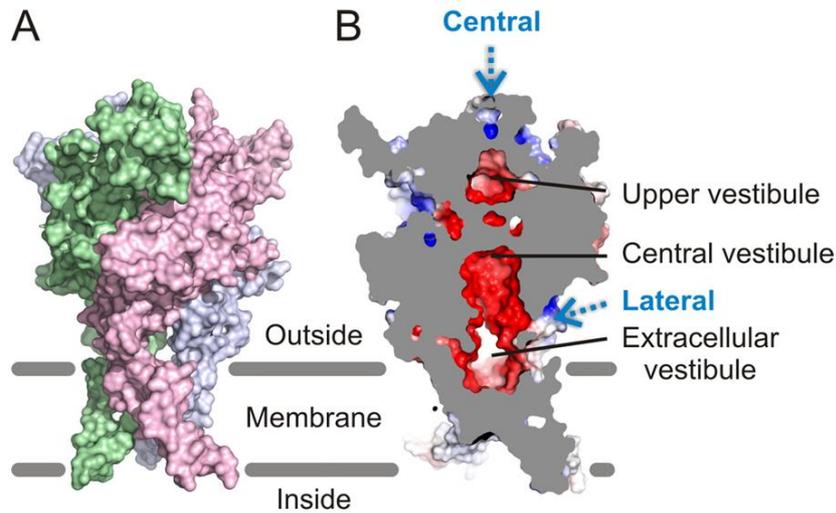


Figure 12: Hypothèses proposées pour les voies menant à la perméation des ions (Kawate et al., 2011). A. Schéma de la structure cristallographique. B. Visualisation des deux voies possibles pour l'entrée des cations.

3.6.2. Etat désensibilisé

Lors d'une application prolongée d'ATP et après un laps de temps variable en fonction des sous-types de récepteurs P2X, le récepteur, quoique toujours lié à l'ATP, va se refermer et demeurer dans un état inactif, c'est l'état dit **désensibilisé**. Cette inactivation temporaire, plus ou moins longue selon le type cellulaire, va se reverser lorsque l'ATP va se dissocier de son site et le récepteur se restructurer dans son état fermé de repos. Il pourra ensuite de nouveau subir une activation induite par l'ATP. Les mécanismes menant à ce changement conformationnel sont encore mal connus. Cet état a été étudié par la formation de chimères combinant des domaines appartenant à des sous-types désensibilisants lentement (P2X2) et des sous-types désensibilisant rapidement (P2X1) afin d'identifier des zones responsables de ce processus. Deux segments de 34 aa (localisés au niveau bas des hélices transmembranaires) ont été échangés entre ces deux sous-types par l'équipe d'Alan North (Werner et al., 1996) et les récepteurs P2X2 ont été rendu rapidement désensibilisant tandis que les récepteurs P2X1 ont montré une désensibilisation plus lente. Ceci suggère que la fermeture des récepteurs en présence d'ATP implique des

mouvements moléculaires de ces zones. D'autre part, les résidus K68 et dans une moindre mesure R292 et K309 (notation P2X1) ont été mutés respectivement en A, K et A et cela a induit une baisse de la désensibilisation. Dans la partie N terminale cette fois, la thréonine de la séquence consensus PKC a été mutée en alanine (T18A) et les récepteurs ont abordé une désensibilisation dix fois plus rapide (Ennion and Evans, 2002).

3.6.3. Etat « dilaté »

Un état ouvert conductant additionnel a été observé (appelé aussi I₂), nommé jusqu'à maintenant **dilatation**. Cet état a été observé pour les sous-types P2X₂, P2X_{2/3}, P2X_{2/5}, P2X₄, et P2X₇. En bref, le pore P2X, qui semble n'être perméant qu'aux petits cations sodium, potassium et calcium, augmente graduellement sa perméabilité jusqu'à laisser passer des molécules jusqu'à 900 Da (N-méthyl-D-glucamine, fluorophores cationiques) suite à une application prolongée d'ATP (plusieurs secondes).

Deux hypothèses principales ont été avancées jusqu'à maintenant concernant le mécanisme de ce changement de perméabilité ionique (**figure 13**).

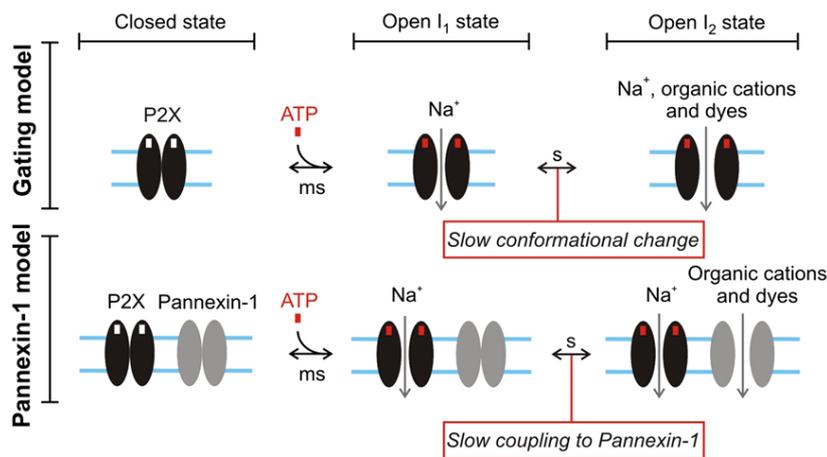


Figure 13: Schéma montrant les hypothèses prédominantes postulées pour expliquer le mécanisme de dilatation des récepteurs P2X (d'après (Khakh and North, 2012)).

La première hypothèse consiste en un changement conformationnel intrinsèque de la protéine. Une extension du pore ionique lente et progressive suite à une application prolongée d'ATP est postulée, suivant le modèle du gating, c'est-à-dire via un mécanisme proche mais de plus grande amplitude. En d'autres termes, une dilatation physique, des mouvements de plus grandes amplitudes au niveau des hélices transmembranaires ont été proposés. Cette hypothèse est appuyée par des expériences de microscopie de force atomique qui ont montré un changement conformationnel des récepteurs P2X4 (**figure 14**) (Shinozaki et al., 2009).

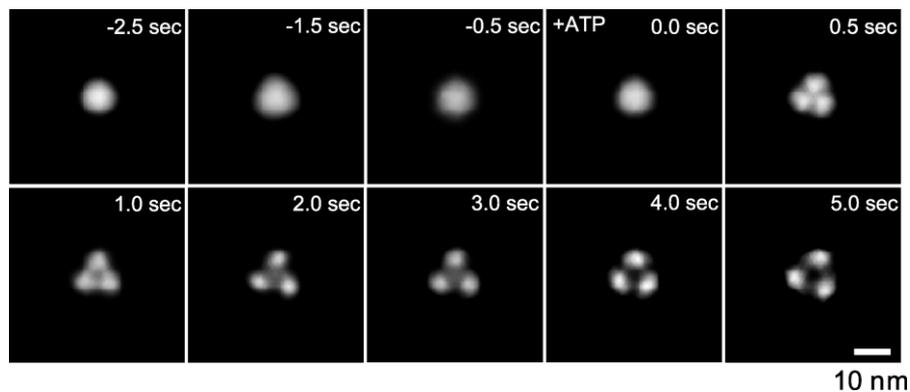


Figure 14: Observation d'un changement conformationnel lent des récepteurs P2X4 par microscopie de force atomique (Shinozaki et al., 2009).

La deuxième hypothèse postule que le recrutement d'une protéine membranaire annexe serait responsable du passage des gros cations. Cette protéine de la famille des héli-canaux, la pannexine-1, a notamment montré, lorsque surexprimée, augmenter l'incorporation de marqueurs dans des cellules exprimant les récepteurs P2X7 tandis que son blocage menait à une inhibition de l'entrée de ces marqueurs fluorescents de grande taille (Pelegri-n et Surprenant, 2006). Cette hypothèse est soutenue par le fait que quelle que soit le type de transfection utilisée, la quantité de cellules montrant un comportement de dilatation n'est jamais égale à 100% mais comprise entre 20 et 50% en fonction des conditions et du type cellulaire ce qui pourrait être le signe de la dépendance à une autre protéine.

Ces deux hypothèses ne s'excluent pas l'une et l'autre mais pourraient être concomitantes et liées au type de molécules passant le pore. De plus, cet état semble être sous la gouverne des régions Carboxy terminales quel que soit le modèle étudié

(Eickhorst et al., 2002) mais également dépendre des sous-types observés (Jiang, 2005). Les récepteurs P2X7 semblent notamment arborer des cinétiques de dilatation différentes des autres sous-types (Virginio et al., 1999a).

Cet état de perméabilité accrue est d'un intérêt primordial car il soulève la question d'un autre mode de signalisation impliquant les récepteurs P2X, le pore dilaté ayant les dimensions nécessaires pour laisser passer des molécules plus grosses, il pourrait permettre l'entrée et/ou la sortie de composés impliqués dans des réponses physiologiques et des voies de signalisation inattendues. Jusqu'à maintenant, aucune molécule physiologique n'a été identifiée comme pouvant passer le pore du récepteur P2X.

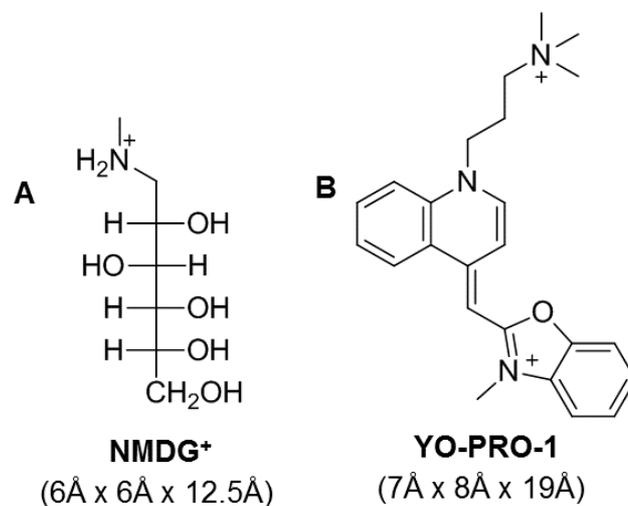


Figure 15: Structures des cations utilisés pour étudier le phénomène de dilatation des récepteurs P2X. **A.** N-methyl-D-glucamine. **B.** YO-PRO-1: 3-methyl-2-((1-(3-(trimethylammonio)propyl)quinolin-4(1H)-ylidene)methyl)benzo[d]oxazol-3-ium

L'étude de la dilatation s'effectue classiquement de manière biophysique en regardant l'évolution de la perméabilité du récepteur pour un cation organique non physiologique, la N-methyl-D-glucamine (NMDG⁺) (**figure 15A**), en conditions bi-ioniques (NMDG⁺_{ext}/Na⁺_{int}) en présence d'ATP et en effectuant des courbes intensité en fonction du potentiel, aussi appelées courbes IV, qui permettent de mettre en évidence les valeurs du potentiel d'inversion (E_{rev}) des ions et ainsi en déduire la perméabilité pour un canal donné. Un changement de E_{rev} en fonction du temps correspond donc à un changement de perméabilité ou à une variation de concentration de part et d'autre de la membrane. Pour l'étude de la perméabilité au NMDG⁺ des récepteurs P2X, la

membrane est maintenue à un potentiel négatif fixe (-60mV) et dans ce contexte, un courant sortant a lieu, celui-ci va diminuer et au bout de quelques secondes un courant entrant va être visualisé. Deux rampes de potentiel, une avant l'application d'ATP et une pendant l'application d'ATP, passant de -120mV à +120mV en général, sont effectuées afin d'établir les courbes IV. Ce protocole est répété après une longue application d'ATP. Le potentiel d'inversion résultant des courbes IV va se situer au début de l'application à des valeurs très négatives, ce qui indique que le NMDG⁺ ne semble pas entrer dans la cellule via le pore ionique, et au fur à mesure du temps va se déplacer au niveau de potentiels d'inversion moins négatifs (**figure 16**). Cette variation de E_{rev} a mené à l'hypothèse que la perméabilité du NMDG⁺ au début de l'application est faible et augmente avec le temps (Virginio et al., 1999b). Un fait intrigant est que ces résultats expérimentaux semblent variables d'une étude à l'autre et parfois non reproductible sur une grande partie des cellules d'une même transfection.

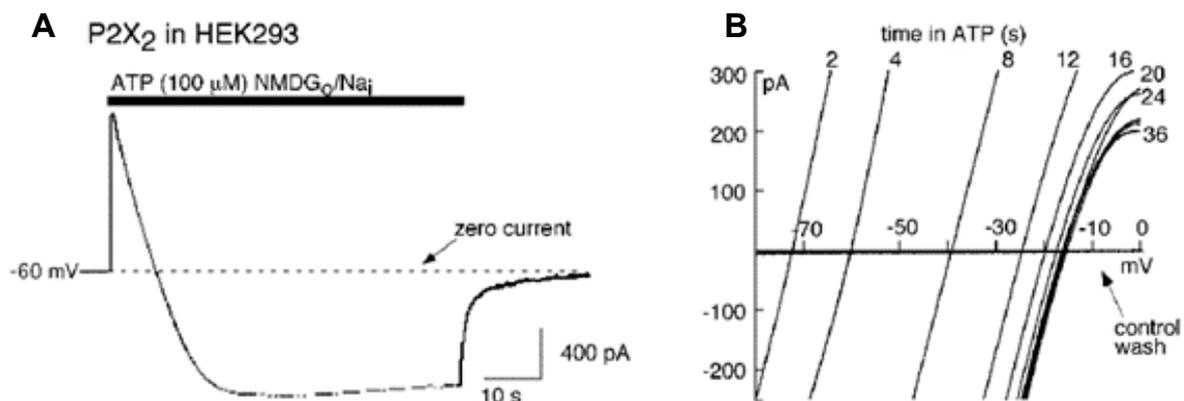


Figure 16: Mise en évidence biophysique de la dilatation des récepteurs P2X. **A.** Enregistrement électrophysiologique en conditions bi-ioniques Na⁺_{in}/NMDG⁺_{out} **B.** Déplacement du E_{rev} observé lors d'une application prolongée d'ATP (Virginio et al., 1999b).

Une deuxième méthode pour étudier la dilatation des récepteurs P2X en conditions plus physiologiques (en présence de sodium externe) consiste en l'incorporation d'un marqueur fluorescent de l'ADN, le YO-PRO-1 (**figure 15B** et **figure 17**) (Virginio et al., 1999a), qui est un cation de grande dimension.

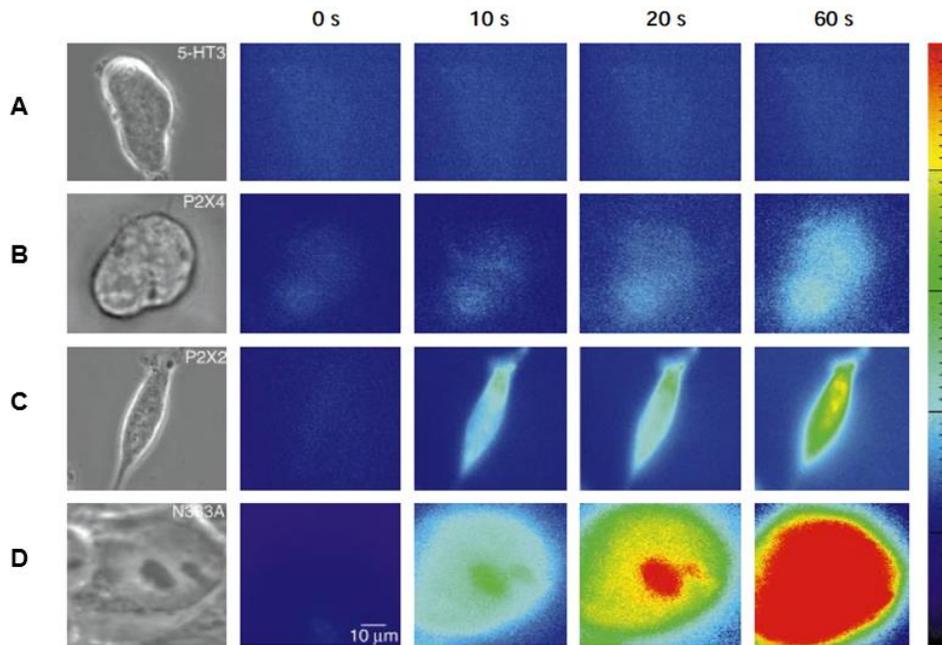


Figure 17: Incorporation de YO-PRO-1 en fonction du temps dans des cellules transfectées avec différents types de récepteurs. A. Dans des cellules exprimant les récepteurs ionotropiques à la sérotonine. **B.** Dans des cellules exprimant les récepteurs P2X4. **C.** Dans des cellules exprimant les récepteurs P2X2. **D.** Dans des cellules exprimant le récepteur P2X2 où l'arginine 333 et mutée en alanine (Virginio et al., 1999b).

Il est important de noter que la perméabilité à des molécules telles que le YO-PRO-1 et le NMDG⁺ n'a cependant jamais été observée au niveau du canal unique, les enregistrements en canal unique montrant une perméabilité constante pendant des applications d'ATP de plus d'une minute (Riedel et al., 2007).

Cependant une étude a remis en cause la dilatation en septembre 2015 (Li et al., 2015), en démontrant par un modèle physique que cette modulation du potentiel d'inversion observée après une activation prolongée du récepteur P2X était provoquée par le changement dans le temps de la concentration intracellulaire des ions qui avait lieu lors de l'utilisation de conditions bi-ioniques (NMDG⁺_{ext}/Na⁺_{int}) pendant les enregistrements électrophysiologiques et non par un changement de perméabilité. En bref, les variations de E_{rev} sont tributaires de différents paramètres, tels que la densité de récepteurs canaux exprimés à la membrane (**figure 18A**) et la résistance d'accès qui vont jouer sur les concentrations ioniques. La modulation des concentrations internes et externes en conditions bi-ioniques consiste en une déplétion rapide des

ions Na^+ vers le milieu extérieur et une accumulation de NMDG^+ en intracellulaire, jusqu'à atteindre un équilibre (**figure 18B**) qui est associé au changement du Erev.

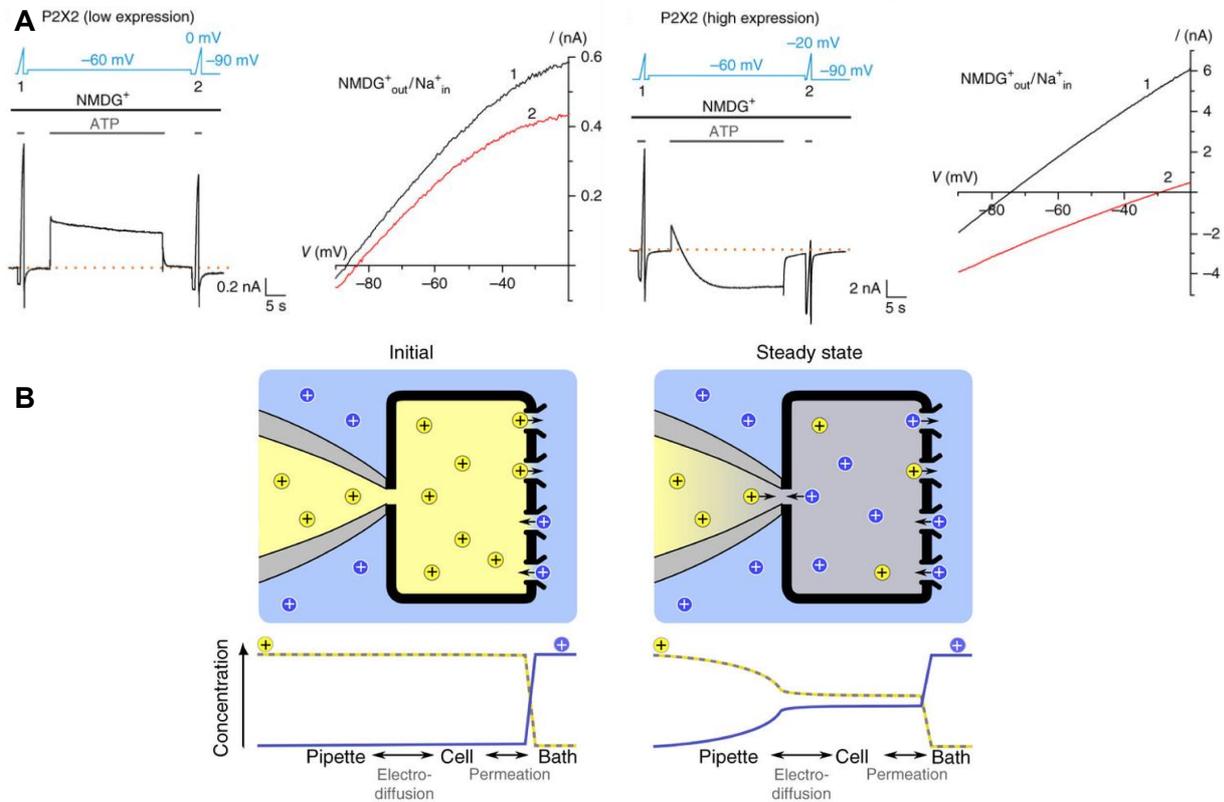


Figure 18: Remise en cause de la dilatation. A. Observation de la dépendance des déplacements de Erev à la quantité de récepteurs exprimés. **B.** Modèle expliquant les fluctuations ioniques induites par l'utilisation de conditions bio-ioniques (Li et al., 2015).

De ce fait, l'étude de la dilatation en conditions whole-cell ne peut pas réellement s'effectuer en conditions bi-ioniques, et par des expériences en conditions symétriques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{NMDG}^+_{\text{out}}$, une entrée immédiate de NMDG^+ via le pore ionique a pu être observée.

Cet état très controversé, dont la cinétique a été remise en question par cette publication, a été étudié au niveau de ses mécanismes moléculaires et de ses propriétés biophysiques grâce au travail de cette thèse.

3.7. Structure et fonctionnement des récepteurs P2X – apports et limites des structures cristallographiques

Un grand nombre d'études combinant mutagenèse, électrophysiologie et expériences biochimiques et pharmacologiques ont été publiées, aboutissant à des données essentielles à la compréhension de la structure et des mécanismes régissant les changements allostériques de ces récepteurs, mais les avancées majeures concernant l'élucidation du fonctionnement de ces récepteurs ont été amenées par l'obtention de structures cristallographiques.

3.7.1. Première structure cristallographique : zfP2X4, état fermé

En 2009, une première structure cristallographique du récepteur **zfP2X4** dans l'état **fermé** est publiée avec une résolution de 3,1 Å (Kawate et al., 2009).

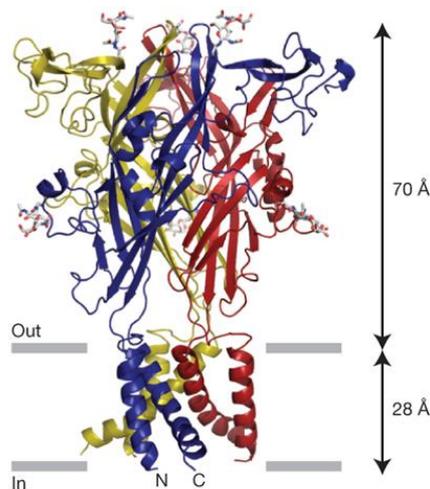


Figure 19: Structure cristallographique du récepteur zfP2X4 fermé, représentée sous format cartoon

Cette première structure cristallographique (**figure 19**), qui a représenté une avancée majeure dans l'étude des récepteurs P2X, a permis de confirmer l'architecture globale des récepteurs et leur stœchiométrie trimérique, et par extension de fait, l'existence de trois sites de liaison à l'ATP.

La constitution des sous-unités a pu être mise en évidence de manière précise, en délimitant des zones faites de différentes structures secondaires et agencements particuliers des résidus, la forme globale ressemblant, avec un peu d'imagination, à

un dauphin (**figure 20**). Les parties d'une sous-unité sont délimitées en fonction de leurs structures secondaires en: Head, Body (distingué en upper body pour les régions hautes, et lower body pour les régions plus proches de la membrane), Right flipper, Left flipper, Dorsal fin et Fluke. Ce découpage permet l'explicitation plus précise des implications de chaque zone dans les mécanismes moléculaires menant aux transitions allostériques. Les parties intracellulaires sont bien entendus manquantes dans ce modèle, puisque tronquées.

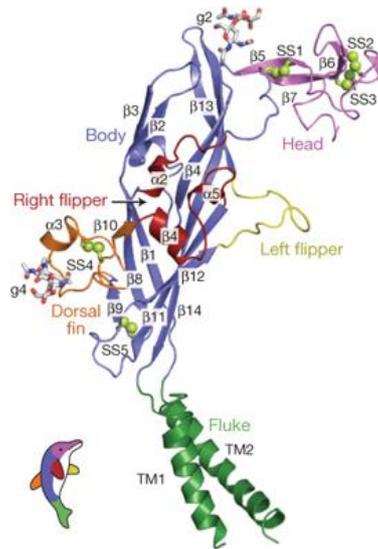


Figure 20: Structure d'une sous-unité, et sa représentation schématisée en forme de dauphin

Cette structure est très informative sur le domaine extracellulaire dont le corps (Body) est constitué de feuillets β , largement glycosylé, et confirme la présence de 5 ponts disulfures conservés et nécessaires au repliement correct de la protéine. Les régions des « nageoires » (Right flipper, left flipper et dorsal fin) semblent plus susceptibles à être flexibles et donc impliquées dans des mouvements moléculaires de par leurs structures secondaires moins rigides. Les contacts entre les sous-unités sont également visibles, semblant très présentes dans la zone de l'upper body.

En partie transmembranaire, le récepteur trimérique est constitué de 6 hélices alpha : les hélices TM2, dont l'angle par rapport au plan de la membrane est de 45° , sont agencées autour d'un axe de symétrie d'ordre 3 et sont entourées des hélices TM1.

Des fenestrations, localisées dans la région liant les hélices transmembranaires aux parties extracellulaires (lower body) et formées aux interfaces entre les sous-unités, sont également observées, ce qui soulève l'hypothèse que les ions pourraient transiter par celles-ci pour leur passage, au lieu de passer par les parties hautes et le vestibule central du récepteur. La sélectivité ionique semble être déterminées par les résidus acides qui bordent le vestibule central.

Une troncature importante des domaines intracellulaires a été effectuée (Δ zfP2X4-B) afin de permettre le processus de cristallogénèse et l'obtention de cette structure. Des mutations ont été effectuées : C17F / N78C / N187R, les deux dernières étant des mutations touchant deux sites de glycosylation. Du Gd^{3+} , qui est un inhibiteur des récepteurs P2X, a été utilisé et la solubilisation des membranes a été faite avec du DDM : n-dodecyl-beta-d-maltoside.

3.7.2. Structure de zfP2X4 fermée et ouverte en présence d'ATP

En 2012, une deuxième publication a révélé la structure des récepteurs **zfP2X4 fermés**, à une résolution supérieure que la précédente (2,9 Å sans ATP) mais également en conformation ouverte liés à l'atp (Résolution 2,8 Å avec ATP) par l'équipe de Gouaux (Hattori and Gouaux, 2012).

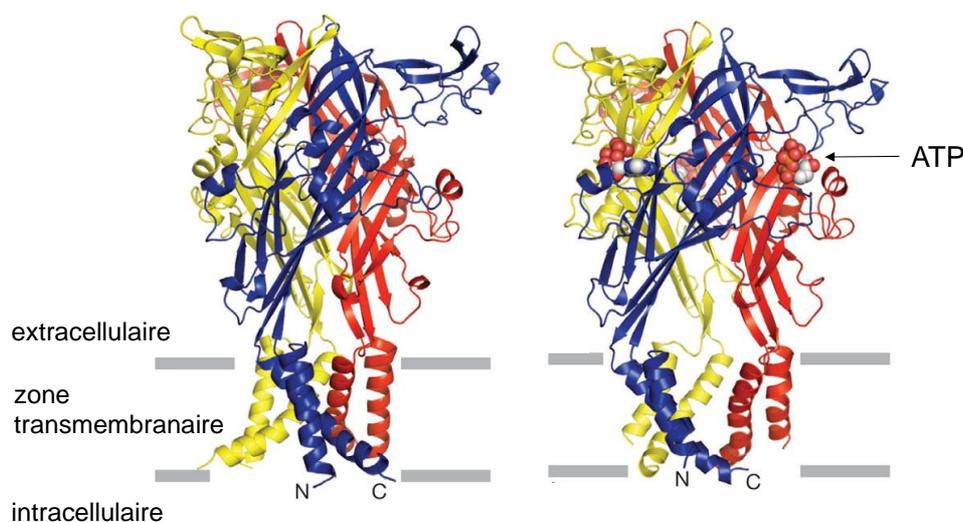


Figure 21: Structures ouverte (en présence d'ATP) et fermée des récepteurs zfP2X4

Cette structure a permis la localisation précise du site de liaison de l'ATP, à l'extérieur des feuillets β et dans une zone ressemblant à une mâchoire, différent des sites canoniques de reconnaissance de l'ATP, ainsi que la confirmation des résidus précédemment identifiés par des expériences de mutagenèse dirigée et de marquage d'affinité spécifique, participant à la reconnaissance et la liaison de la molécule d'ATP. D'un point de vue moléculaire, d'autres interactions ont pu être mises en évidence par cette structure, les résidus K70, K72, K316, N296, R298 stabilisent la structure en U des triphosphates. Le résidu L186 coordine l'adénine, K70 et T189 forment une liaison hydrogène avec l'adénine et les résidus L191 et I232 des interactions hydrophobes (Chataigneau et al., 2013).

La structure ouverte offre un aperçu des fondements moléculaires du mécanisme de « gating ». Le vestibule extracellulaire subit une expansion radiale, tandis que les hélices TM2 s'écartent largement. Les hélices TM1 subissent une rotation de 10° par rapport à un axe central au pore et les hélices TM2 de 55° . Le pore s'élargit ainsi d'environ 3 Å.

Point supplémentaire important, ces structures ont permis de modéliser les récepteurs P2X dans les états ouverts et fermés, donnant accès à des informations cruciales pour concevoir de nouvelles expériences.

Ces structures ont été obtenues à partir de la construction $\Delta zfp2X4-B$ (voir structure précédente) dont des résidus supplémentaires ont été tronqués, appelées $\Delta zfp2X4-B$ correspondant à la construction $\Delta N27/\Delta C24/N78K/N187R$ arborant deux sites de glycosylation éliminés.

3.7.3. Structure cristallographique d'un P2X d'invertébré (*Amblyomma maculatum*) en présence d'ATP et de Zn^{2+}

Cette structure, obtenue avec une résolution de 2,8 Å a pu mettre en évidence l'architecture de deux sites de liaison des métaux (Kasuya et al., 2016)..

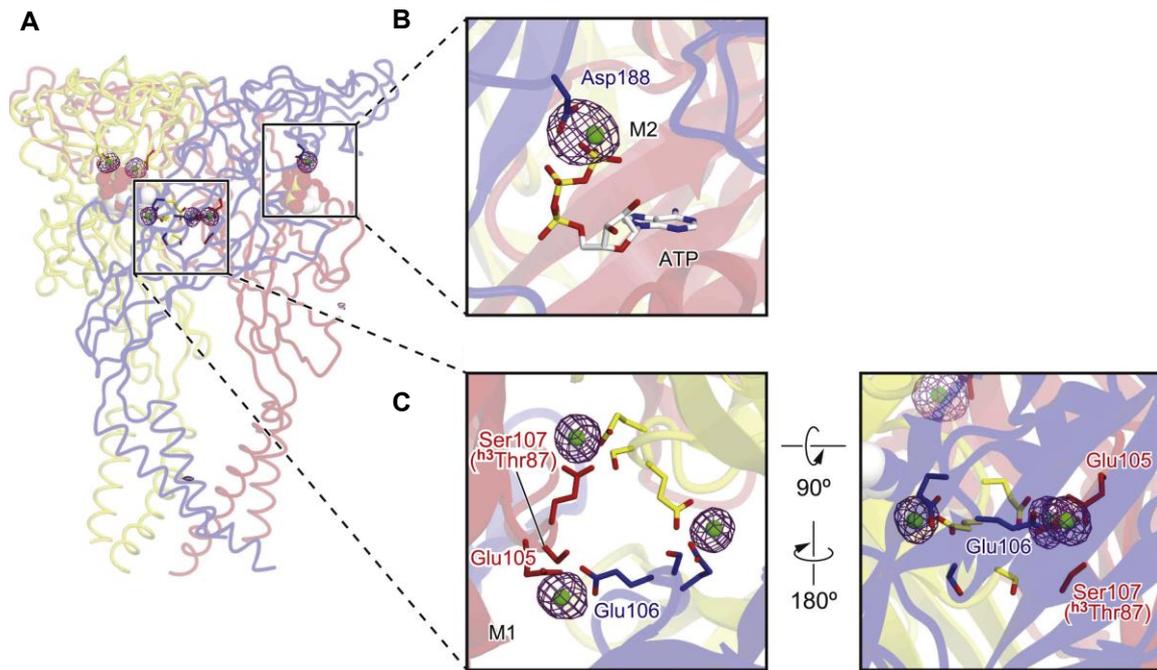


Figure 22: Structure cristallographique des récepteurs amP2X avec vue sur les sites de liaison aux métaux. A. Structure globale. B. M2, site magnésium et C. M1, site zinc

Le site M1, localisé dans la région extracellulaire à l'interface entre les trois sous-unités et à la jonction entre l'upper body et le lower body, est responsable de la potentiation par le zinc. Celui-ci, lorsqu'il est lié dans ce site, va faciliter le changement structural du domaine extracellulaire menant à l'ouverture du pore.

Le site M2, à proximité du site de liaison de l'ATP, pourrait être responsable de la régulation par le magnésium.

La structure cristallographique correspond à la construction AmP2X Δ N23/ Δ C7/N171Q/C374L : une troncature de 23 acides aminés en Nterm et 7 en cterm a été effectuée et les mutations N171Q/C374L correspondent pour la première à la suppression d'un site de glycosylation et la seconde à l'élimination d'une cystéine libre pour éviter la formation de ponts disulfures.

3.7.4. Structures cristallographiques fermée, ouverte et désensibilisée des récepteurs hP2X3 (Mansoor et al., 2016)

Ces structures cristallographiques représentent trois étapes différentes du cycle de changements conformationnels provoqués par l'ATP des récepteurs P2X : la structure fermée, au repos, puis ouverte liée à l'ATP et enfin désensibilisée, fermée liée à l'ATP. Elles ont permis de mettre en évidence que le récepteur ouvert était stabilisé par un motif intracellulaire appelé « cytoplasmic cap » constitué de brins β provenant des extrémités Nterm et des extrémités Cterm qui vont s'associer en réseau et former un feuillet β . Lors de l'ouverture, TM2 passe d'une hélice α à une hélice 3_{10} centrée sur la séquence G333-V334-G335 (notation hP2X3), provoquant un étirement de l'hélice d'environ 4 Å.

Cette structure fourni le premier aperçu des mouvements impliqués dans les phénomènes de désensibilisation. On peut observer que la capsule cytoplasmique se dissocie et que l'hélice 3_{10} de TM2 revient à une structure α .

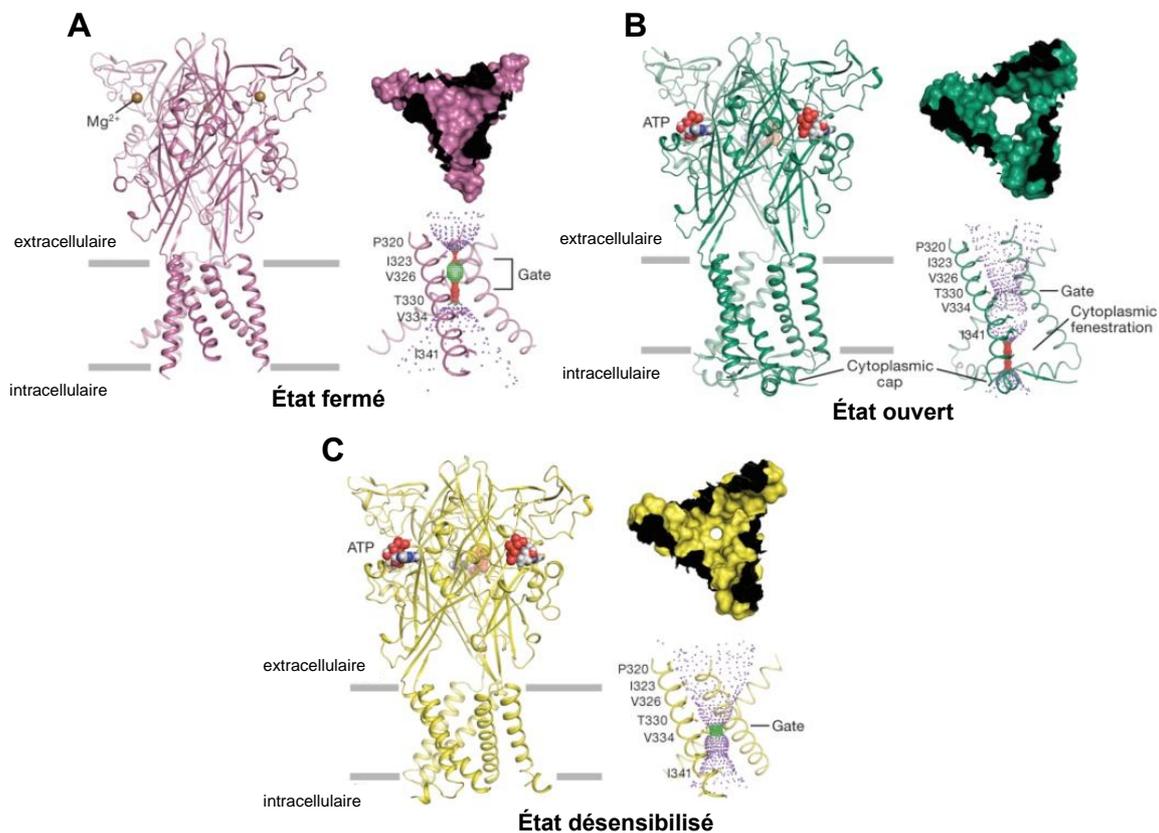


Figure 23: Structures cristallographiques des trois états conformationnels obtenus des récepteurs hP2X3. A. Etat fermé de repos B. Etat ouvert en présence d'ATP C. Etat désensibilisé en présence d'ATP

La construction utilisée (hP2X3- Δ N5 Δ 33-T13P/S15V/V16I) est le récepteur hP2X3 tronqué de 5 acides aminés en Nterm et de 33 acides aminés en Cterm. 3 mutations ont été effectuées pour conférer un profil de désensibilisation plus lent au récepteur en remplaçant certains acides aminés de Nterm par des acides aminés provenant du Nterm de rP2X2 (présentant une désensibilisation lente).

3.7.5. Structure cristallographique des récepteurs de P2X7 (panda) liés à des antagonistes (Karasawa and Kawate, 2016)

Cette structure (obtenue à une résolution de 3,5 Å) a permis de mettre en évidence un site allostérique spécifique des récepteurs P2X7 impliqué dans la reconnaissance d'inhibiteurs. Cinq antagonistes sélectifs des récepteurs P2X7 ont montré se lier dans une poche formée de résidus provenant majoritairement des feuillets β 4, 13 et 14 dans la partie haute de deux sous-unités adjacentes à proximité de la poche contenant le site de liaison de l'atp. La liaison des antagonistes semble gêner la fermeture de la mâchoire (mouvement nécessaire à l'activation) en présence d'ATP, ce qui expliquerait l'inhibition.

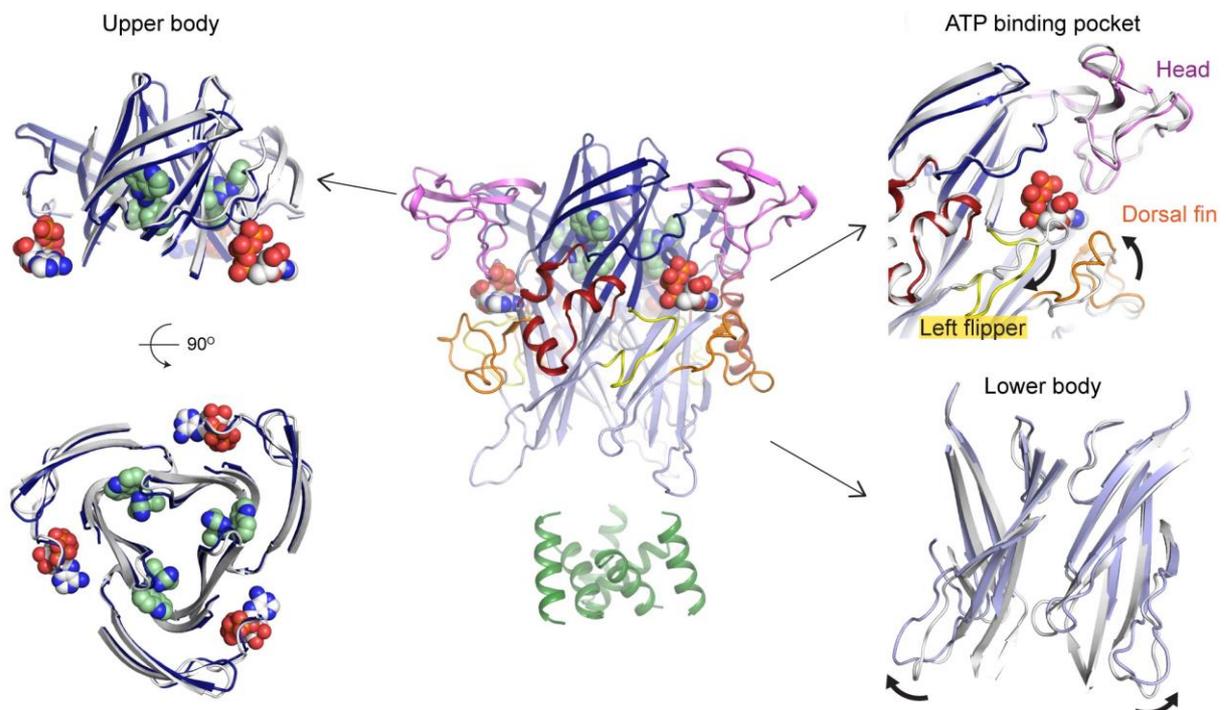


Figure 24: Structure cristallographique des récepteurs pdP2X7. Vues sur la zone de liaison de l'ATP et sur la zone de liaison des antagonistes.

Cette structure provient de la construction $\Delta 1-21/\Delta 360-600/N241S/N284S/V35A/R125A/E174K$ effectuée sur le récepteur pdP2X7. Les domaines Nterm et Cterm sont considérablement tronqués, et des sites de glycosylation sont éliminés.

Toutes ces structures cristallographiques ont permis de comprendre de manière non exhaustive les mécanismes de fonctionnement des récepteurs P2X. Elles permettent également de rationaliser et d'élaborer des expériences et manipulations plus précises pour en continuer l'étude en étant une plateforme incroyable d'hypothèses et de prédictions sur les mécanismes des transitions allostériques impliquées.

3.7.6. Quelles sont les limites de ces structures ?

Le processus de cristallogenèse nécessite la purification de protéines en grande quantité et l'expression sous forme de solide ordonné, ce qui engendre des limites (Minor, 2007).

1. Les structures cristallographiques représentent le récepteur dans un état conformationnel donné, il n'y a donc pas accès à des informations dynamiques, ni aux mouvements précis impliqués dans les changements allostériques, seulement des vues figées.
2. Un certain nombre de sites de glycosylation et des mutations sont effectuées pour éviter l'hétérogénéité des échantillons, mais ces modifications post-traductionnelles sont souvent nécessaires au repliement correct de la protéine.
3. Toutes les structures présentent des troncatures plus ou moins importantes des domaines cytosoliques. En effet, ces structures étant mobiles et désordonnées, elles entraînent trop d'instabilité pour la formation de cristaux et sont donc classiquement tronquées dans la résolution des structures de protéines membranaires, tout comme les régions trop instables. Cependant, des études ont montrées que des extrémités N-term et C-term tronquées des récepteurs P2X pouvaient entraîner des déstabilisations, une absence d'interactions entre les sous-unités. De plus, les récepteurs tronqués n'ont pas les mêmes profils de réponse aux applications d'ATP que le récepteur

wild-type, entraînant une augmentation de l'EC50, ainsi qu'une moins grande expression des récepteurs à la membrane (Kawate et al., 2009).

4. Le processus de cristallogénèse, nécessitant l'utilisation d'agents de cristallisation (par exemple des PEGs ou des alcools) pour aider les interactions moléculaires de la protéine, ainsi que des variations de pH, de concentration en sels ou en température peut engendrer des artefacts (Mcpherson, 2004).
5. Dans le cadre des protéines membranaires, il est nécessaire d'effectuer un traitement supplémentaire, avec des détergents, afin de solubiliser les parties transmembranaires hydrophobes. Ce fait pose également des problèmes car la zone transmembranaire de la protéine est libérée de la contrainte exercée par la membrane, qui peut être en partie responsable de son agencement (Wiener, 2004).
6. Les résolutions supérieures à 2 Å, largement suffisantes pour repérer des structures telles que des hélices α ou feuillet β , ne permettent pas d'attester précisément la position des chaînes latérales individuelles, certaines parties de la protéine peuvent être résolues de manière moins fiable (Blow, 2002).

Types de structure	Résolution approximative nécessaire
Hélice α	9 Å
Feuillet β	4 Å
Chaîne latérale non impliquée dans une structure particulière	3,7 Å
Chaîne latérale des résidus aromatiques	3,5 Å
Densité des petites chaînes latérales	3,2 Å
Conformations interprétables pour les chaînes latérales	2,9 Å
Densité pour les fonctions carbonyles des chaînes principales, plans des liaisons peptidiques	2,7 Å
Molécules d'eau	2,7 Å
Résolution des atomes individuels (hors H ⁺)	1,5 Å

Tableau 5 : Résolutions requises pour résoudre les principales structures protéiques (d'après Blow, 2002).

3.7.7. Questions restantes

De plus, un grand nombre de questions restent ouvertes malgré les pistes apportées par ces structures :

1. Quel est le mécanisme précis au niveau moléculaire, voire atomique, du gating des récepteurs P2X ? comment les ions sont-ils transportés à travers la membrane ? d'autres ions / molécules sont-ils transportés ? Pourquoi préférence cations VS anions ?
2. Quel est le mécanisme moléculaire de la dilatation des récepteurs P2X ?
3. Quel est le mécanisme de la désensibilisation des récepteurs P2X ?
4. Les structures cristallographiques obtenues pour les sous-types P2X₄, P2X₃ et P2X₇ semblent montrer les mêmes changements conformationnels après activation par l'ATP, alors pourquoi ces différences de fonctionnement entre les sous-types ? Qu'est ce qui détermine au niveau moléculaire les différences entre les différentes sous-unités ? Il est nécessaire de comprendre les mécanismes précis de fonctionnement et les différences entre les sous-unités afin d'en concevoir des antagonistes sélectifs.
5. Quelle est la contribution des récepteurs P2X dans diverses situations physiopathologiques, dans la signalisation cellulaire ?

OBJECTIFS GENERAUX DE LA THESE

L'objectif de ma thèse est de concevoir et appliquer de nouveaux outils photochimiques pour déterminer au niveau moléculaire les processus biologiques dynamiques rapides ayant lieu dans le fonctionnement des récepteurs P2X, dans les changements d'activités provenant de changements allostériques.

Les récepteurs P2X s'activent à l'échelle de la milliseconde, la liaison de l'ATP étant directement associée à l'ouverture du pore, il faut donc des méthodes contrôlables de manière temporelle précise. De plus, les informations recherchées sont à l'échelle atomique, il faut donc des outils contrôlables spatialement précisément. Le stimulus combinant ces deux avantages est la **lumière**.

La méthode instrumentale la plus complète et puissante pour étudier les récepteurs canaux ioniques est l'**électrophysiologie patch-clamp**.

Les nouveaux outils développés pour étudier les récepteurs canaux doivent donc pouvoir d'une part être couplés à l'électrophysiologie patch-clamp et d'autre part être contrôlables par la lumière.

1. L'électrophysiologie patch-clamp : méthodes et instrumentation

L'électrophysiologie patch-clamp est une technique développée par Neher et Sakmann à la fin des années 70, qui leur a valu le prix Nobel en 1991. Son affinement par Hamill et al 1981, a permis une résolution supérieure des courants au niveau canal unique. Elle consiste à isoler électriquement un fragment de membrane cellulaire, appelé patch, grâce à la pression d'une pipette préalablement polie. Cela rend possible la mesure des fluctuations rapides de courants électriques à travers la membrane cellulaire, avec une grande sensibilité pouvant aller jusqu'à 10^{-13} ampères. Cette technique donne aussi accès aux paramètres biophysiques des récepteurs canaux.

La première étape consiste en l'application, à l'aide d'un micromanipulateur, sur la membrane de la cellule d'une pipette en verre préalablement remplie de solution interne et polie ayant une pointe d'un diamètre avoisinant le micromètre. Celle-ci va

former, au point de jonction avec la membrane, un scellement avec une résistance de l'ordre du *gigaohm* (aussi appelé « gigaseal ») à l'aide de la pression appliquée par aspiration qui va donner une stabilité mécanique à l'ensemble pipette-cellule.

Différentes configurations sont possibles après l'établissement de ce gigaseal (**figure 25**) :

- « Cell-attached » ou cellule attachée : la pipette est appliquée sur la membrane mais celle-ci est laissée intacte, on ne change pas la composition du cytoplasme
- Lors d'enregistrements dit « whole-cell » ou cellule entière, on enregistre des courants macroscopiques provenant de l'ensemble de la population des canaux ou récepteurs de la membrane. En pratique, après l'obtention d'un giga-seal, la membrane est déchirée par un brève aspiration d'assez forte pression. Le cytoplasme et l'intérieur de la pipette se retrouvent ainsi en continuité et l'intérieur de la cellule est dialysé. Dans ce cadre, si le potentiel membranaire est maintenu (voltage-clamp), on a accès aux fluctuations du courant à travers la membrane, alors que si le courant est fixé (current-clamp) on peut observer les modulations du potentiel membranaire.
- Inside-out : un patch de membrane est arraché après établissement du giga-seal par éloignement lent de la pipette afin d'enregistrer les courants résultant de l'activation de quelque ou un seul canal. L'intérieur de la pipette est donc en contact avec la face extracellulaire de la membrane, l'application d'agents (agonistes, antagonistes, activateurs, modulateurs) se fait donc de manière passive du côté intracellulaire. Cette méthode permet d'avoir des informations cinétiques précises, avec des résolutions s'approchant de la microseconde, ainsi que donne accès à la conductance unitaire d'un récepteur.
- Outside-out : la pipette est également éloignée de la membrane après l'obtention d'une configuration whole-cell ce qui permet l'arrachement d'un petit fragment de membrane. La pipette est en contact avec la face intracellulaire, on peut donc moduler les applications d'agents sur la face extracellulaire à l'aide du système de perfusion.

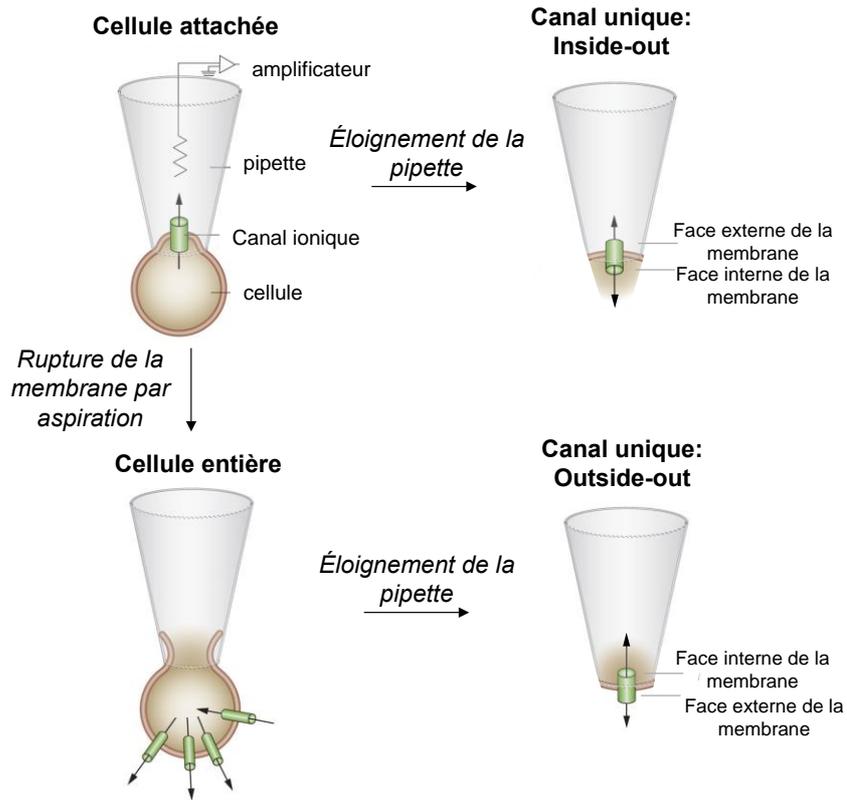


Figure 25: Les différentes configuration d'enregistrements d'électrophysiologie patch-clamp (schéma adapté de (Ashcroft and Rorsman, 2013)).

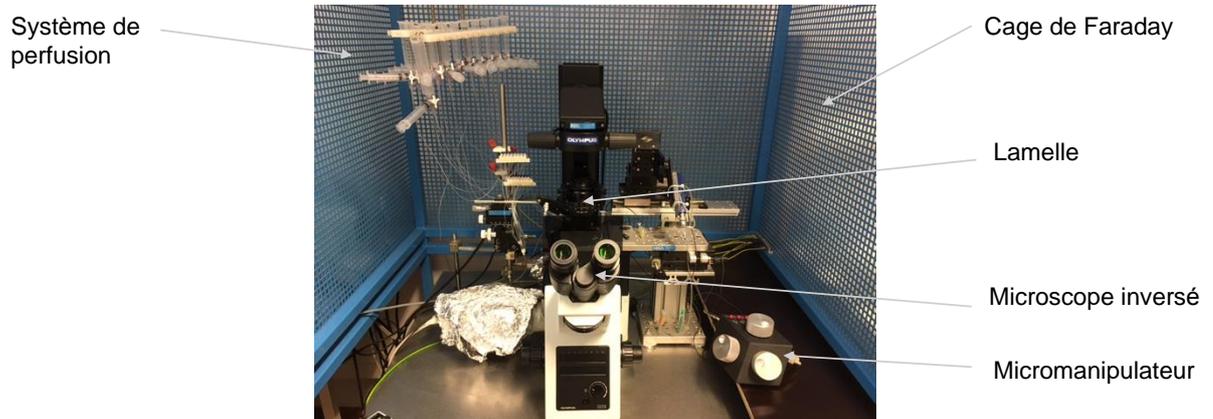


Figure 26: Photographie de notre poste d'électrophysiologie patch-clamp

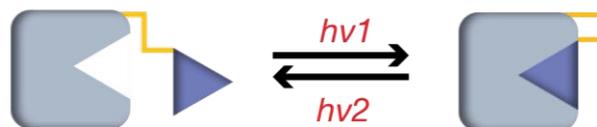
2. L'utilisation de réactions photochimiques pour l'étude de phénomènes biologiques

Une réaction photochimique provient de l'interaction entre un chromophore et un photon suite à l'absorption de lumière. Si l'énergie du photon absorbé est en adéquation avec la différence d'énergie entre l'état de repos et l'état excité du chromophore, cela va engendrer un état excité de la molécule, et le relargage de l'énergie supplémentaire va mener à un photo-produit. Ce photo-produit peut être stable, c'est le cas d'une photo-activation irréversible, par exemple lorsque celui-ci provient de la rupture d'une liaison. Il peut aussi être instable et subir une transformation réversible, et mener à plusieurs cycles de photo-activation après régénération, c'est le cas par exemple des photo-switches (Szymański et al., 2013).

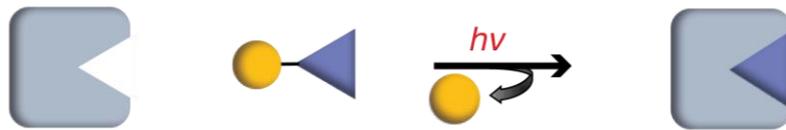
Les avantages du stimulus lumineux sont nombreux. Tout d'abord la lumière permet un contrôle orthogonal vis-à-vis de nombreux types cellulaires, très peu de ceux-ci étant photo-sensibles. Ensuite, si les longueurs d'ondes sont d'énergie et d'intensité raisonnables, elle permet d'agir de manière non invasive, sans générer de perturbations ou contamination du système étudié. Le contrôle spatial et temporel de la lumière est incomparable : il est extrêmement plus rapide (peut être activé et modulé dans son intensité en quelques femto-secondes) qu'un stimulus engendré par une molécule (médicament, toxines ou autres) et peut ainsi permettre l'étude de phénomènes dynamiques biologiques rapides, et a la possibilité d'être manipulé de manière spatiale très précise, selon le type d'instrumentation utilisé.

3 types de réactions photochimiques (**figure 27**) sont classiquement utilisées dans le contrôle et l'étude d'activités biologiques :

- les réactions de photo-isomérisation



- les réactions photo-lytiques dans le cadre de l'utilisation de ligands dit « cagés »



- les réactions de photo-marquage

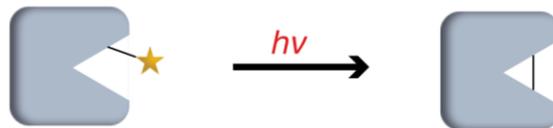


Figure 27: Représentation schématique des réactions photochimiques qui ont été utilisées lors de cette thèse

3. Combinaison des deux techniques

L'adaptation aux cibles biologiques de la combinaison électrophysiologie patch-clamp et outils photochimiques (**figure 28**) permet l'accès à différents paramètres tels que la perméabilité, la conductance, la vitesse, les paramètres dynamiques, les mouvements moléculaires, d'effectuer des relations structure/fonction et d'étudier des paramètres physiologiques en faisant varier les modalités telles que les solutions utilisées, les molécules utilisées ou le type d'enregistrement effectué.

La combinaison de tous ces choix se fait en fonction de la question biologique que l'on veut étudier et lors de cette thèse nous avons abordé différentes combinaisons adaptées aux questions et problématiques concernant les récepteurs P2X que nous nous sommes posées.

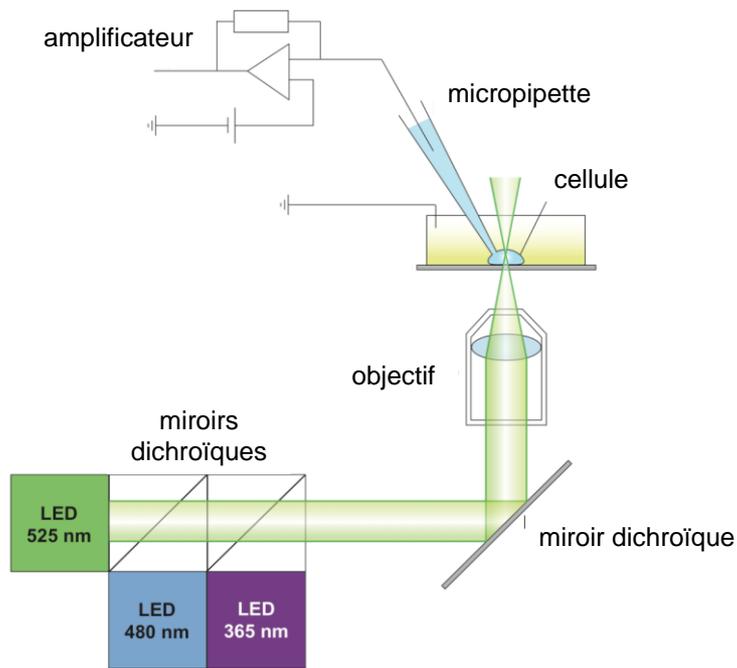


Figure 28: Schéma de notre poste d'électrophysiologie patch-clamp couplé au système d'irradiation

Suivant ce principe, trois stratégies ont été étudiées pendant cette thèse, correspondant aux trois chapitres de ce manuscrit.

Le **chapitre 1** traite de l'utilisation de molécules photo-isomérisables incorporées dans les récepteurs P2X afin d'en photo-contrôler l'activité et d'en étudier les mouvements moléculaires. Le **chapitre 2** concerne la synthèse d'acides aminés photo-clivables et leurs caractérisations photochimiques ainsi que leur future incorporation dans les récepteurs P2X. Le **chapitre 3** décrit l'incorporation d'un acide aminé pouvant effectuer du photo-marquage dans les récepteurs P2X.

CHAPITRE 1 : UTILISATION D'AGRAFES PHOTO-ISOMÉRISABLES

1. Généralités sur les molécules photo-isomérisables

Il existe plusieurs familles de photo-switches caractérisées par des chromophores différents, et donc par des propriétés photochimiques différentes, pouvant intervertir entre différentes formes : *trans* et *cis* ou ouverte et fermée (**tableau 6**). Ces changements vont engendrer des modifications de la géométrie plus ou moins marquées des molécules et/ou des changements de polarité. Pour des applications en biologie, plus ces changements seront marqués, plus ils auront une chance d'induire un effet significatif sur le système étudié.

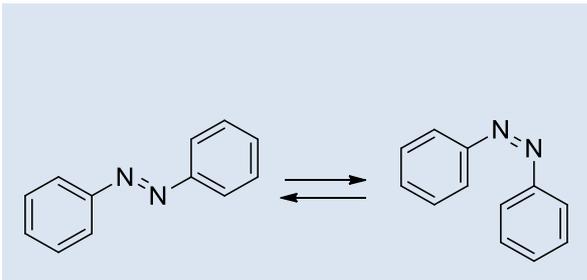
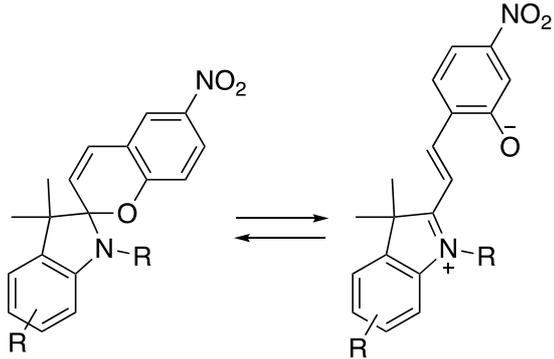
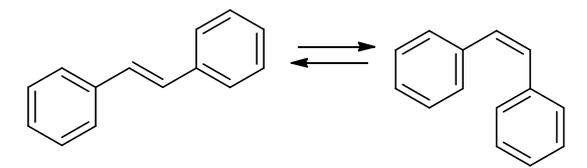
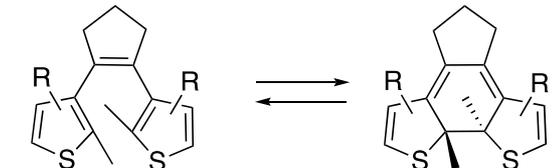
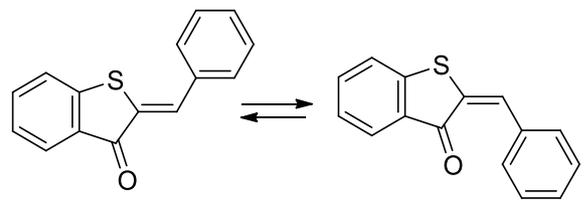
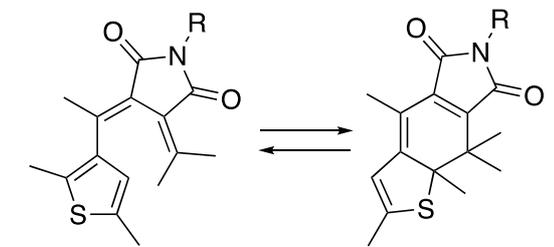
<i>Trans/cis</i>	Ouvert/fermé
<p>Azobenzènes</p> 	<p>Spiropyranes</p> 
<p>Stilbènes</p> 	<p>Diaryléthènes</p> 
<p>Hémithioindigos</p> 	<p>Fulgides</p> 

Tableau 6 : Structures des types de photo-switches les plus courants. Les domaines de longueur d'onde utilisés sont : Azobenzènes : UV/UV-Vis ; Stilbènes : UV/UV ; Hémithioindigos : Vis/Vis ; Spiropyranes : UV-Vis ; Diaryléthènes : UV-Vis ; Fulgides : UV-Vis , d'après (Brieke et al., 2012).

2. Les azobenzènes

2.1. Historique et généralités

Les molécules photo-isomérisables les plus utilisées jusqu'à maintenant pour conférer aux protéines une sensibilité à la lumière sont les azobenzènes. Lorsque ces molécules sont incorporées dans des biomolécules dans des zones mobiles participant aux changements conformationnels, leur changement de géométrie peut engendrer une transition fonctionnelle de la biomolécule.

La famille des azobenzènes a été découverte en 1834 par Eilhard Mitscherlich (Mitscherlich, 1834), lors d'une distillation en présence de base de nitro-benzène, sans en découvrir la structure il en a effectué une analyse élémentaire. La solubilité en milieu aqueux de ces composés avait déjà été jugée faible. Il a fallu attendre cent ans pour que l'examen des propriétés photochimiques de la liaison N=N soit publiée par G. S. Hartley (Hartley, 1937). Celui-ci s'est rendu compte, lors d'expériences de recristallisation des azobenzènes dans de l'acétone, que ses résultats n'étaient pas reproductibles en présence de fortes lumières. Après avoir recristallisé la forme *cis*, il a déterminé que son moment dipolaire était de 3 Debye, et il a mis en évidence expérimentalement pour la première fois les états photo-stationnaires des azobenzènes en montrant qu'à l'état d'équilibre, il y avait entre 20 et 25% de forme *cis* en solution.

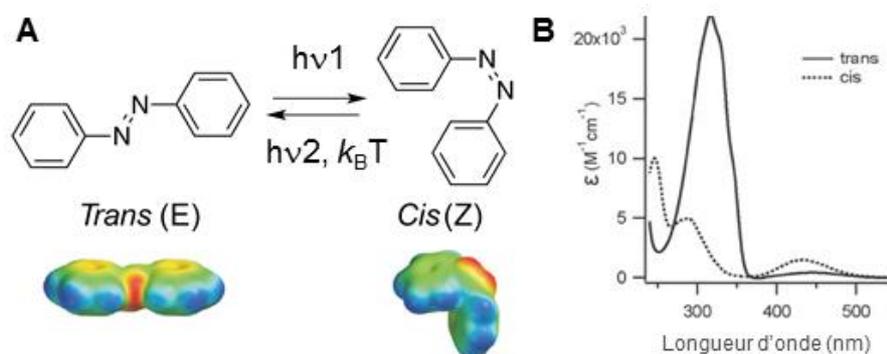


Figure 29: Schéma général de l'isomérisation des azobenzènes. A. Isomérisation d'un azobenzène non substitué et modèles de potentiel électrostatiques correspondant aux isomères. **B.** Spectres UV des isomères *cis* et *trans* d'un azobenzène non substitué en solution dans de l'éthanol (d'après (Beharry and Woolley, 2011)).

2.2. Les propriétés des azobenzènes

Les azobenzènes sont des molécules photo-chromiques, c'est-à-dire qu'une transformation réversible entre deux formes (avec des spectres d'absorption différents) est induite par absorption de rayonnement électromagnétique (**figure 29**). La photo-isomérisation est induite par une irradiation dans les domaines UV-Visible, l'azobenzène passant de l'état *trans*, thermodynamiquement plus stable d'environ 10-12kcal/mol à un état *cis* par une irradiation dans le domaine de l'UV. La molécule peut revenir à l'isomère *trans* par relaxation thermique ou par une irradiation dans les domaines du visible (Bandara and Burdette, 2012).

Des modifications sont induites par l'isomérisation : le changement de distance entre les deux carbones positionnés en para est d'environ 3,5 Å pour un azobenzène non substitué (Beharry and Woolley, 2011) entre la forme *trans* et la forme *cis* (où les cycles phényles sont placés à environ 55°). C'est cette propriété qui va principalement être exploitée dans l'utilisation de ces molécules pour étudier les phénomènes biologiques. Les azobenzènes subissent aussi un changement dans leurs moments dipolaires d'environ 3 Debye lors de l'isomérisation.

2.3. Les propriétés photo-physiques

Par absorption d'un photon, les azobenzènes peuvent passer de $S_0 \rightarrow S_2$ correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ autorisée. De plus, les azobenzènes possèdent des doublets électroniques libres sur les atomes d'azote, susceptibles d'engendrer la transition $n \rightarrow \pi^*$ suivant le passage des niveaux d'énergie $S_0 \rightarrow S_1$. La photo-isomérisation a lieu suivant l'excitation à l'état S_1 ou S_2 mais semble procéder de différents mécanismes selon le niveau d'énergie atteint (Bortolus and Monti, 1979) (**figure 30**).

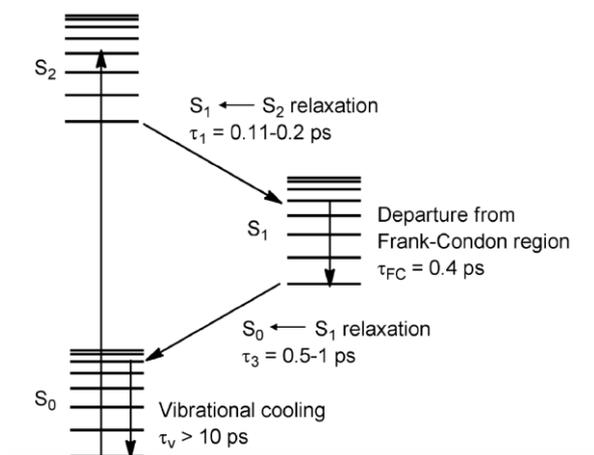
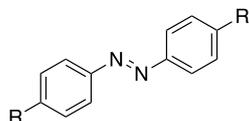


Figure 30: Les états d'excitation singlets possibles des azobenzènes (Bandara and Burdette, 2012).

2.4. Les différentes classes d'azobenzènes :

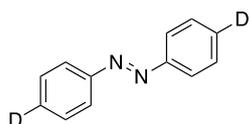
Les propriétés photochimiques sont différentes en fonction de la substitution car les substituants localisés sur les cycles phényles influencent de manière très marquée l'absorption des azobenzènes (figure 31).

A Type Azobenzène



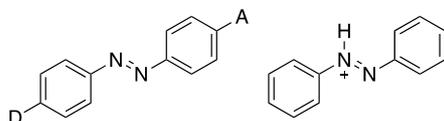
R: alkyle, aryle, halogène, carbonyle, acide carboxylique, ester, amide, nitrile, nitro, *mé*ta-amine, *mé*ta-éther

B Type Amino-azobenzène



D: *ortho* ou *para* amine, *ortho* ou *para* hydroxyle, *ortho* ou *para* éther

C Pseudo-stilbènes



D: amine ou hydroxyle
A: nitro, acide carboxylique

D Azobenzènes pontés

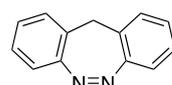


Figure 31: Les différentes classes d'azobenzènes d'après Rau (Rabek and Scott, 1989) A. les types azobenzènes B. les types amino-azobenzènes C. les pseudo-stilbènes) et D. les azobenzènes pontés, d'après (Siewertsen et al., 2009).

Trois classes d'azobenzènes substitués ont été déterminées, selon la classification proposée par Rau (Rabek and Scott, 1989) en fonction des propriétés d'absorption des molécules.

* les types azobenzènes (figure 31A), qui regroupent les molécules n'ayant pas de substituants aminés, alcools ou éthers et qui vont présenter une bande d'absorption $n \rightarrow \pi^*$ peu intense dans le domaine du visible et une bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ intense en UV

* les amino-azobenzènes (figure 31B), substitués en *ortho* ou *para* par des groupements électro-donneurs de type amine, alcools ou éthers dont les bandes d'absorption $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$ vont être plus proches, et qui vont engendrer des isomérisations thermiques *cis*→*trans* plus rapides

* les pseudo-stilbènes (figure 31C) qui sont constitués des azobenzènes protonnés sur un azote ainsi que des azobenzènes substitués d'un groupement électro-donneur (D) à une extrémité de l'azobenzène et un groupement électro-attracteur (A) à l'autre, cet effet « push-pull » (donneur-accepteur) déplaçant la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ vers le rouge

* les azobenzènes pontés (figure 31D), qui ont la particularité d'avoir l'isomère *cis* thermodynamiquement plus stable que l'isomère *trans* (Siewertsen et al., 2009) (Samanta et al., 2012). La photo-isomérisation a lieu dans ce cas entre l'isomère *cis*, plus stable, et l'isomère *trans* via des irradiations dans le domaine de l'UV, alors que le retour à l'isomère *cis* se fait avec des longueurs d'ondes correspondant au domaine visible.

2.5. Les mécanismes responsables de la photo-isomérisation

Il a été décrit 4 mécanismes différents possibles pour l'isomérisation des azobenzènes (figure 32), les deux prépondérants étant les mécanismes de rotation et d'inversion. Le mécanisme d'isomérisation par **rotation**, c'est-à-dire par rupture de la liaison π N=N et libre rotation autour de la liaison semble le plus communément admis et est dérivé du mécanisme d'isomérisation des stilbènes (Rodier and Myers, 1993). Le mécanisme d'**inversion**, correspondant à une variation de l'angle N=N-C qui augmente avec un état de transition avec un N hybridé sp, par analogie avec le réarrangement thermique des imines (Curtin et al., 1966), semblerait être le mécanisme prépondérant pour l'isomérisation thermique *cis*→*trans* (Crecca and

Roitberg, 2006). Cependant ces mécanismes ont montré être dépendants de la famille d'azobenzène étudié, ainsi que des solvants utilisés, du mode d'excitation (thermique ou photochimique) ainsi que de la température et de la pression (Malkin and Fischer, 1962).

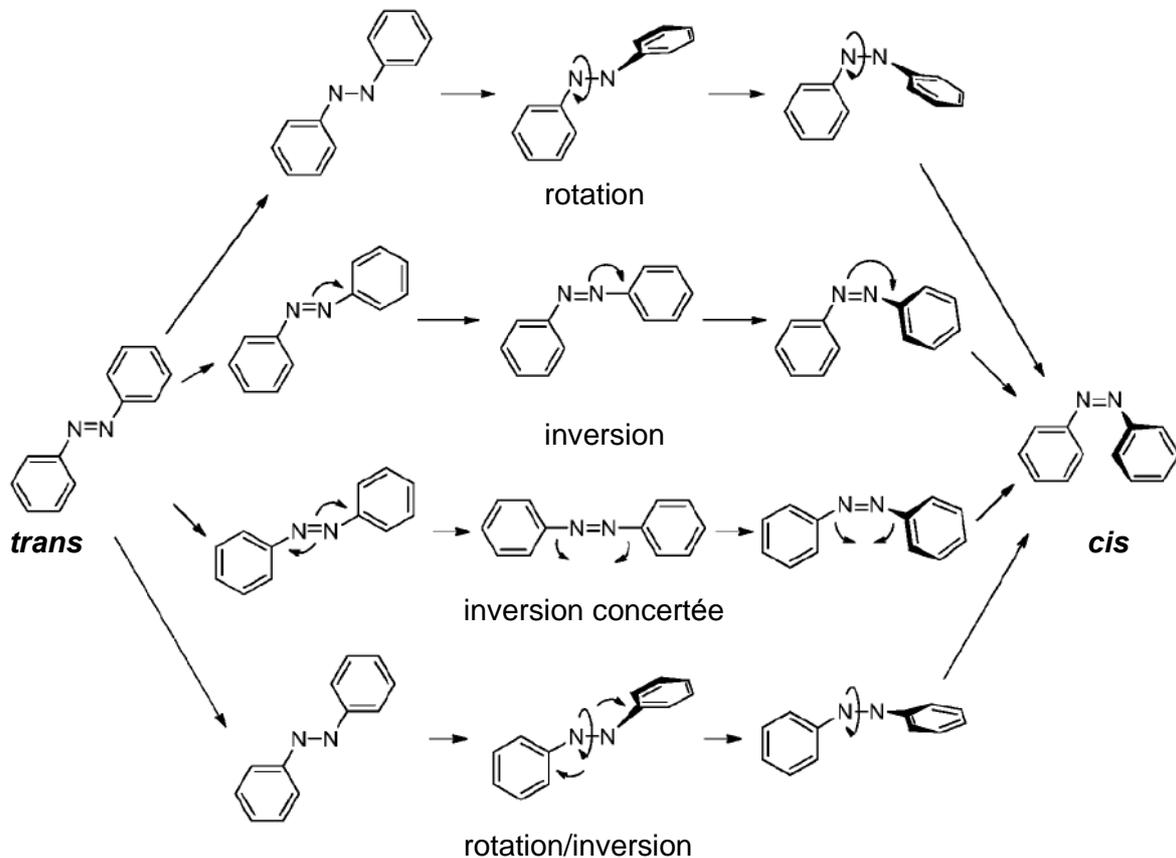


Figure 32: Mécanismes postulés pour l'isomérisation des azobenzènes (adapté de (Bandara and Burdette, 2012)).

Les états photo-stationnaires, c'est-à-dire l'équilibre des isomères durant l'irradiation, sont variables en fonction du type d'azobenzène utilisé et sont provoqués par le recouvrement des spectres d'absorption des isomères *cis* et *trans* qui peuvent être minimisés ou augmentés en fonction des types d'azobenzènes et des substitutions. L'irradiation provoque donc la photo-isomérisation en des proportions qui ne dépassent pas les 80% d'isomère *cis* et les 95 % d'isomère *trans* alors que la relaxation thermique mène à quasiment 100% de l'isomère *trans*. Pour une utilisation en biologie, il est important que les proportions d'isomères *cis* ou *trans* atteintes par

irradiation soient maximisées, afin de minimiser les effets antagonistes que pourraient avoir les isomères *cis* et *trans* sur la cible étudiée.

3. Utilisation en biologie

3.1. Avantages des azobenzènes

Les azobenzènes sont des molécules photo-isomérisables qui présentent de nombreux avantages qui légitiment leur utilisation fréquente pour le photo-contrôle d'activité biologiques (Mourot et al., 2013):

- Ces molécules ont une bonne photo-stabilité : leur utilisation engendre peu de photo-bleaching, de nombreuses isomérisations peuvent ainsi être effectuées et le système reste efficace sans générer de sous-produits toxiques.
- Elles présentent des coefficients d'extinction molaire hauts et des rendements quantiques hauts ce qui veut dire que les intensités lumineuses nécessaires à la photo-isomérisation ne sont pas élevées.
- Le processus de photo-isomérisation est rapide, de l'ordre de la femto ou pico-seconde bien plus rapide que la plupart des processus biologiques étudiés.
- La modulation des mécanismes d'isomérisation et du rendement quantique peut être effectuée en changeant les longueurs d'onde d'irradiation, le solvant, les substituants, la température ou la pression.
- Le design des propriétés photochimiques ou chimiques (solubilité etc) peut être effectué en ajoutant des substituants sur les cycles phényles via des méthodes de synthèse relativement courtes en terme d'étapes.

Depuis les travaux pionniers de l'équipe de Luis Moroder, qui a utilisé l'APB (4-(4-aminophenylazo)benzoyl) comme un mime d'acide aminé dans la synthèse d'une petite chaîne peptidique de huit acides aminés et a démontré que lors de la photo-isomérisation, ce peptide passait d'une structure hélicoïdale rigide à une structure beaucoup plus flexible (Behrendt et al., 1999) et les travaux de l'équipe de Woolley (**figure 33**), qui, de manière similaire, a photo-contrôlé la structure d'un peptide (Kumita et al., 2000), et grâce à tous ces avantages, les azobenzènes ont été utilisés avec succès dans le cadre du contrôle de la structure de peptide, notamment dans la cyclisation ainsi que dans le contrôle d'activité enzymatique et dans le contrôle d'oligonucléotides (Tang and Dmochowski, 2007) et dans le contrôle d'un grand

nombre de récepteurs et notamment de RCPG ((Levitz et al., 2013), (Pittolo et al., 2014)).

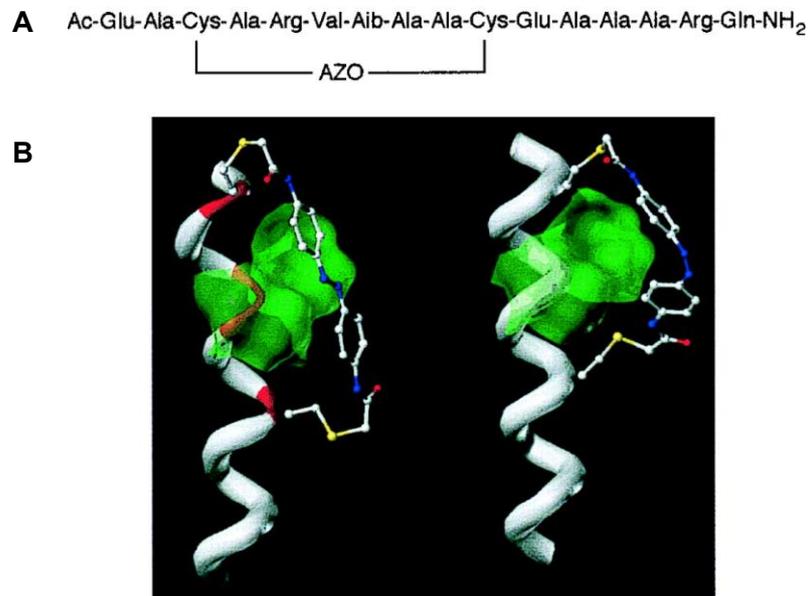


Figure 33: Photo-contrôle de la structure hélicoïdale d'un peptide à l'aide de dérivés d'azobenzènes. A. Séquence peptidique et position de l'attachement de l'azobenzène. **B.** Modèle de peptide et contrôle de la structure : à gauche l'isomère *trans*, à droite l'isomère *cis* (d'après Kumita et al., 2000).

3.2. Exemples d'utilisation sur des récepteurs canaux

Dans le contrôle de récepteurs canaux, plusieurs approches ont été utilisées :

3.2.1. Ligands photo-chromiques solubles (PCL):

Le ligand biologique est lié à une entité photo-switchable, constituant une petite molécule pouvant diffuser librement à travers les tissus jusqu'à son site d'action. Le ligand peut être un agoniste, un antagoniste, un bloquant du canal, un inhibiteur ou un modulateur allostérique sélectif de la cible étudiée. L'activité biologique de la molécule effectrice ou sa capacité de liaison à son site d'action est maintenue pour un des isomères et non pour l'autre.

Les pionniers dans ce domaine appliqué aux récepteurs canaux ont réussi à photo-contrôler des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine à l'aide d'un azobenzène possédant deux ammoniums quaternaires (**figure 34**) (Bartels et al., 1971).

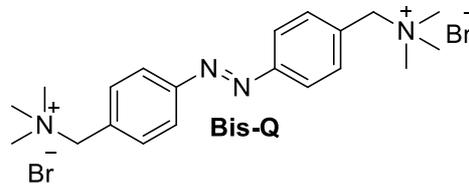


Figure 34: Structure du Bis-Q (3,3'-Bis-[alpha-(triméthylammonium)méthyl]azobenzène)

Ce dérivé, appelé Bis-Q est un activateur puissant et affiné des récepteurs dans son état *trans*, tandis qu'irradié à 330nm (passage dans l'état *cis*), il n'a presque plus aucune activité.

Plus tard, l'équipe de Dirk Trauner, Richard Kramer et Ehud Isacoff, a synthétisé et utilisé un composé nommé 4-GluAzo, activateur photo-chromique des récepteurs iGluR6 dont l'entité *trans* en permet l'ouverture (Volgraf et al., 2007). Ce composé a permis la photo-régulation dans des neurones de l'hippocampe (**figure 35**).

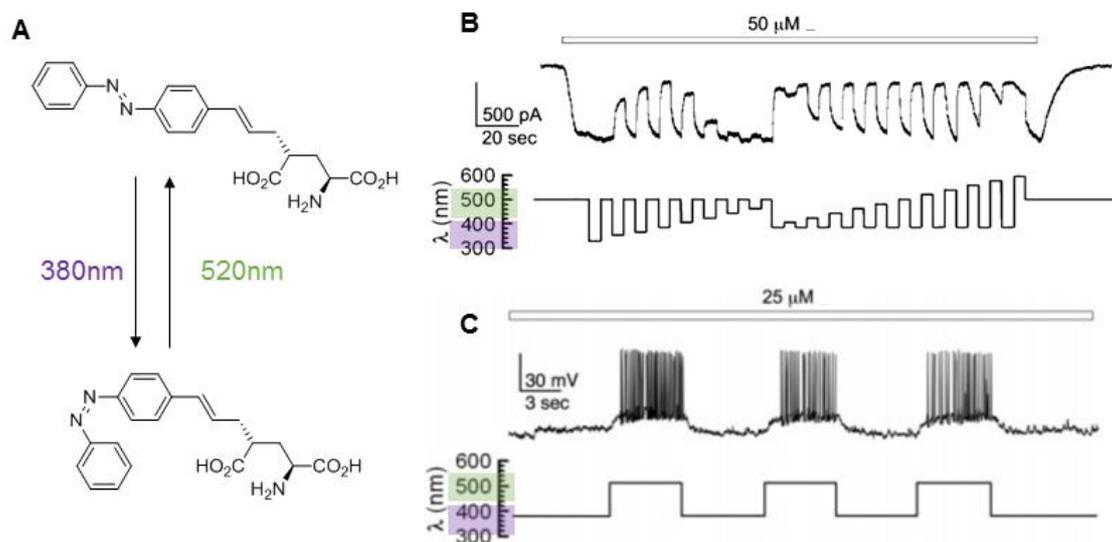


Figure 35: Photo-contrôle des récepteurs ionotropiques au glutamate à l'aide d'un ligand photo-chromique soluble. **A.** Structure du 4-GluAzo et longueurs d'ondes d'irradiation nécessaire à la photo-isomérisation. **B.** Enregistrement électrophysiologique en configuration cellule entière sur des HEK293 incubées avec le 4-GluAzo et soumises à des irradiations UV-Visible. **C.** Enregistrement électrophysiologique en configuration cellule entière sur des neurones d'hippocampe de rat incubés avec le 4-GluAzo et soumis à des irradiations de 380 et 500nm. (D'après (Volgraf et al., 2007)).

Récemment, l'équipe de Pau Gorostiza a amélioré le principe des PCL (constituant une stratégie « hybride » entre PCL (sans manipulation génétique du récepteur) et PTL (lié, à terme, covalentement)) en leur ajoutant une extrémité réactive qui va se fixer à proximité du site d'action de la molécule après que celle-ci se soit dirigée par affinité vers sa cible (Izquierdo-Serra et al., 2016). De ce fait l'ancrage de l'entité photo-isomérisable au récepteur d'intérêt n'est pas dépendant d'une mutation génétique de celui-ci. Grâce à cette méthode, hybride entre les PCL et les PTL, les récepteurs ionotropiques au glutamate GluK1 (appelés aussi récepteurs kainates) ont pu être activés et désactivés avec la lumière et les expériences effectuées dans des rétines dégénérées y ont permis la restauration de la réponse induite par la lumière (**figure 36**).

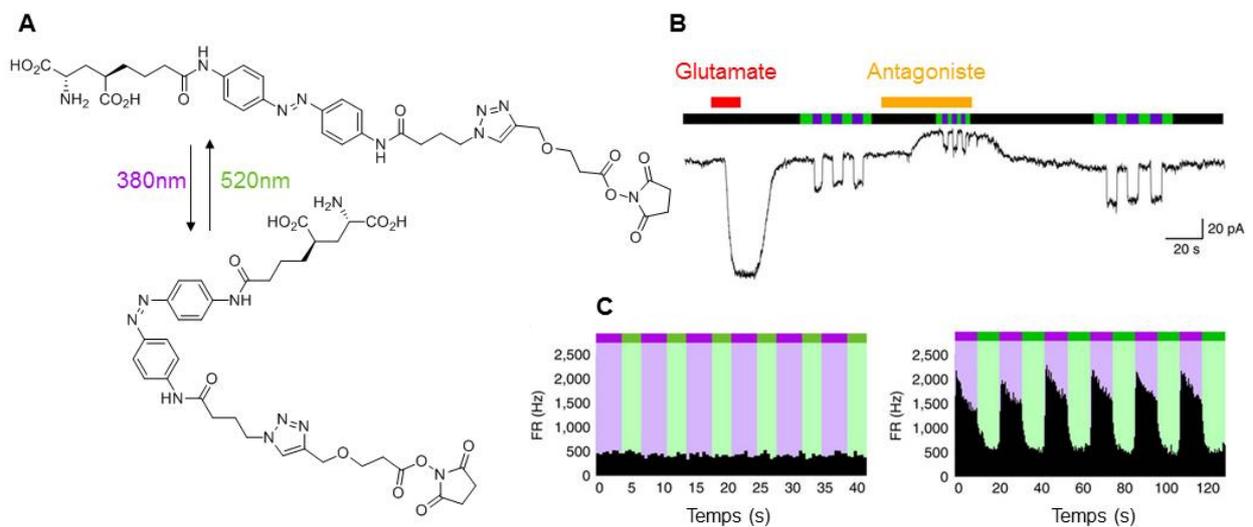


Figure 36: Photoregulation des récepteurs Kainates à l'aide d'un ligand photochromique soluble pouvant se lier covalentement à sa cible. A. Structure du ligand utilisé, possédant une extrémité glutamate, une entité photo-isomérisable azobenzène ainsi qu'une fonction électrophile susceptible de se lier covalentement avec des chaînes latérales d'acides aminés électrophiles à proximité. **B.** Courants enregistrés pour des cellules surexprimant les récepteurs GluK1 incubées avec la molécule présentée en A et avec des applications de glutamate et d'antagoniste (l'antagoniste utilisé est le DNQX qui est un antagoniste compétitif des récepteurs GluK1) et soumises à des irradiations à 380 et 520 nm. **C.** Expériences d'enregistrements multi-électrodes effectuées sur des rétines dégénérées de souris *rd10* en absence (gauche) ou en présence (droite) de la molécule présentée en A et soumises à des irradiations à 380 et 520 nm (d'après (Izquierdo-Serra et al., 2016)).

3.2.2. Ligands photo-isomérisables attachés (PTL)

Des ligands photo-isomérisables sont liés au récepteur génétiquement modifié, généralement via une cystéine, et par photo-isomérisation de l'azobenzène le ligand peut se rapprocher de son site de liaison et s'y loger, activant conséquemment le récepteur ou s'en éloigner, en provoquant la fermeture. L'avantage par rapport aux ligands photo-chromiques solubles est que la concentration du ligand est, puisque attaché, forte au site d'activation. Cette stratégie a été appliquée de manière réussie aux récepteurs ionotropiques du glutamate (Volgraf et al., 2006) ainsi qu'aux récepteurs de l'acétylcholine par l'équipe de Dirk Trauner, qui a réussi à photo-activer et photo-inhiber ces canaux ioniques en utilisant un ligand photo-isomérisable attaché (MAACh) ainsi qu'un inhibiteur photo-isomérisable attaché (MAHoCh) (**figure 37**) (Tochitsky et al., 2012).

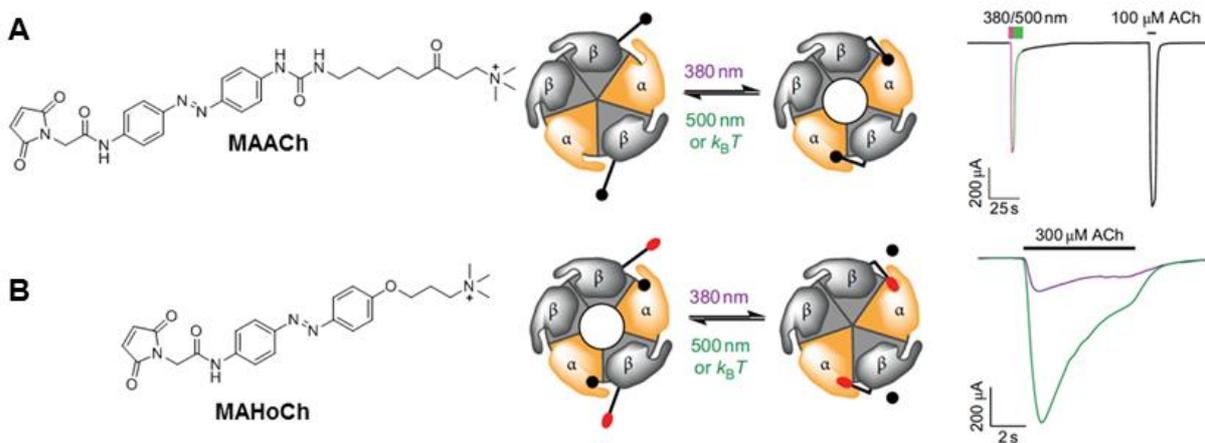


Figure 37: Photo-activation et photo-inhibition des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine à l'aide d'un ligand et d'un inhibiteur photo-isomérisables attachés. A. Photo-activation des récepteurs à l'acétylcholine : structure du MAACh, stratégie d'incorporation dans les récepteurs à l'ACh et enregistrements en cellules entières de courants obtenus par irradiation UV-Vis sur des cellules incubées au MAACh et comparaison avec une application d'acétylcholine. **B.** Photo-inhibition des récepteurs à l'acétylcholine : structure du MAHoCh, stratégie d'incorporation dans les récepteurs à l'ACh et enregistrements en cellules entières de courants obtenus par irradiation UV-Vis sur des cellules incubées au MAHoCh et comparaison avec une application d'acétylcholine (d'après (Tochitsky et al., 2012)).

Ce principe a également été adapté aux récepteurs canaux GABA_A par l'équipe de R.H. Kramer, qui a attaché un ligand de ces récepteurs sur une sous-unité des

récepteurs GABA_A modifiée avec une cystéine et ont pu générer un récepteur régulé par la lumière (LiGABA) et l'utiliser pour photoréguler des neurones de la zone de l'hippocampe (**figure 38**) (Lin et al., 2014).

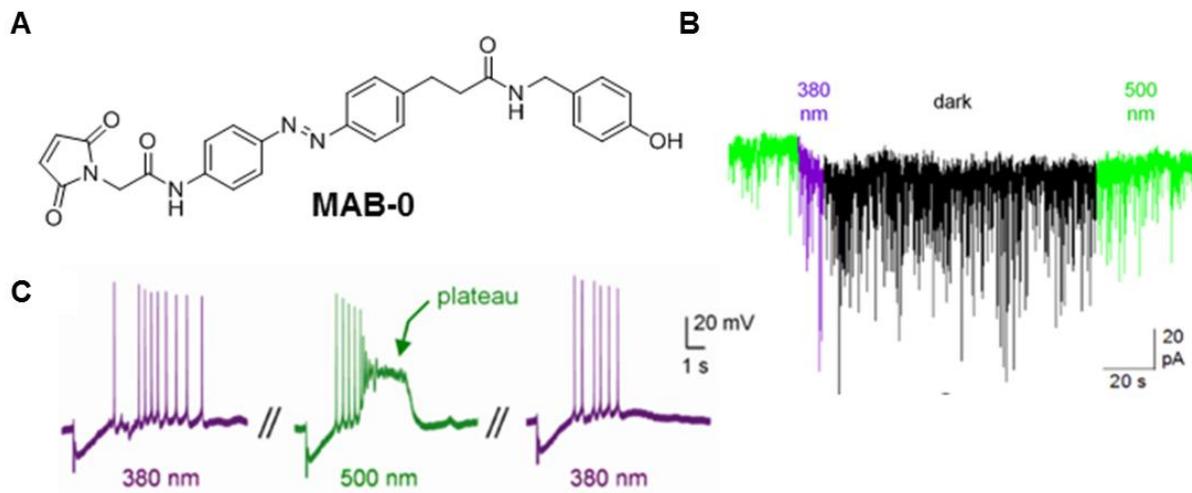


Figure 38: Photo-régulation des récepteurs GABA_A à l'aide d'une molécule photo-isomérisable **A.** Structure de la molécule utilisée (MAB-0), constituée d'un maléimide réactif vis-à-vis des cystéines, d'une fonction azobenzène photo-isomérisable reliée à la 4-hydroxybenzylamine qui agit comme un agoniste des récepteurs au GABA de type A. **B.** Enregistrements en potentiel imposé des courants induits par l'isomère *cis* du MAB-0 (après une irradiation à 380nm) sur les récepteurs α 1-LiGABA exprimés dans des neurones d'hippocampe. **C.** Enregistrements en courant imposé des potentiels induits par l'isomère *cis* du MAB-0 (après une irradiation à 380nm) et par l'isomère *trans* du MAB-0 (après une irradiation à 500nm) sur les récepteurs α 1-LiGABA exprimés dans des neurones pyramidaux CA1 sur une tranche d'hippocampe (d'après (Lin et al., 2014)).

3.2.3. Stratégie d'optogating

Cette stratégie a été conçue au laboratoire et développée pendant les thèses des docteurs Damien Lemoine et Chloé Habermacher (**figure 39**) (Lemoine et al., 2013). Elle consiste en un récepteur P2X modifié pour répondre à la lumière. Contrairement à la stratégie des ligands photo-switchables, la zone ciblée est la zone transmembranaire. Une cystéine est mutée au niveau des hélices transmembranaires et va pouvoir être liée par réaction de Michael à une molécule photo-isomérisable basée sur les azobenzènes possédant à une extrémité une fonction maléimide et à l'autre extrémité un ammonium quaternaire. L'application de lumière de longueur

d'onde appropriée permet le passage de la molécule entre les isomères *trans* et *cis*, probablement via un réarrangement des interactions entre les hélices, et provoque l'ouverture et la fermeture du récepteur. Cette méthode permet de photo-contrôler les récepteurs P2X sans en utiliser le ligand, de manière stable, robuste et réversible. De ce fait, cette méthode est un outil puissant pour des études physiologiques des processus engendrés par ces récepteurs, elle a d'ailleurs montré son efficacité dans le photo-contrôle de récepteurs P2X exprimés dans des neurones en culture de la zone de l'hippocampe, mais ne rend pas un aperçu pertinent des mécanismes moléculaires réels impliqués dans l'ouverture des récepteurs P2X.

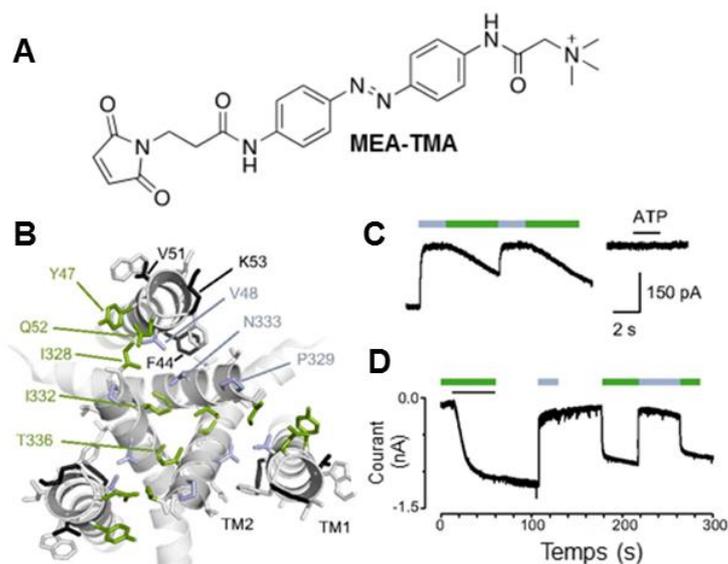


Figure 39: Optogating des récepteurs P2X **A.** Structure de la molécule utilisée dans la stratégie d'optogating: le MEA-TMA. **B.** Mutations effectuées ayant permis d'obtenir une photo-régulation des récepteurs P2X lors du passage du MEA-TMA en *trans* ou en *cis*. **C.** Photorégulation du mutant K69A/I328C non activable par l'ATP à l'aide du MEA-TMA dans des cellules HEK293. **D.** Photo-régulation du mutant K69A/I328C obtenue dans des neurones de l'hippocampe (Adapté de (Lemoine et al., 2013)).

STRATEGIE GENERALE

1. Stratégie des agrafes photo-isomérisables ou « opto-tweezers »

Cette stratégie a été adaptée au récepteur P2X au sein de notre laboratoire au même moment que par le laboratoire d'Alan North (Browne et al., 2014) et son originalité réside dans le fait que deux maléimides sont cette fois attachés aux extrémités de la molécule photo-isomérisable, la rendant susceptible de s'attacher à deux points distincts du récepteur, et ainsi d'en provoquer le rapprochement ou l'éloignement.

1.1. La structure des outils

Les outils utilisés sont constitués de trois composants (**figure 40**) : une fonction électrophile (maléimide) qui va servir à ancrer les molécules dans les récepteurs, une fonction photo-isomérisable (azobenzène) conférant les propriétés de photo-contrôle, et des bras espaceurs variables en termes de taille et de flexibilité entre ces deux fonctions.

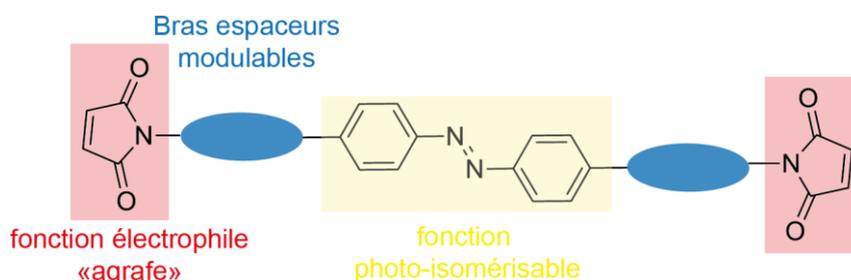


Figure 40: Structure générale des agrafes photo-isomérisables. Schéma représentant les trois parties importantes composant les outils photo-isomérisables que nous avons synthétisés.

1.2. La stratégie d'incorporation

La stratégie combine des manipulations génétiques du récepteur P2X afin d'en conférer la propriété d'être lié covalamment avec des molécules chimiques via l'introduction de cystéines, la synthèse chimique de molécules photo-isomérisables dont la taille et la rigidité sont modulées en fonction des données expérimentales sondées et l'utilisation de la lumière en tant que stimulus de notre système (**figure 41**).

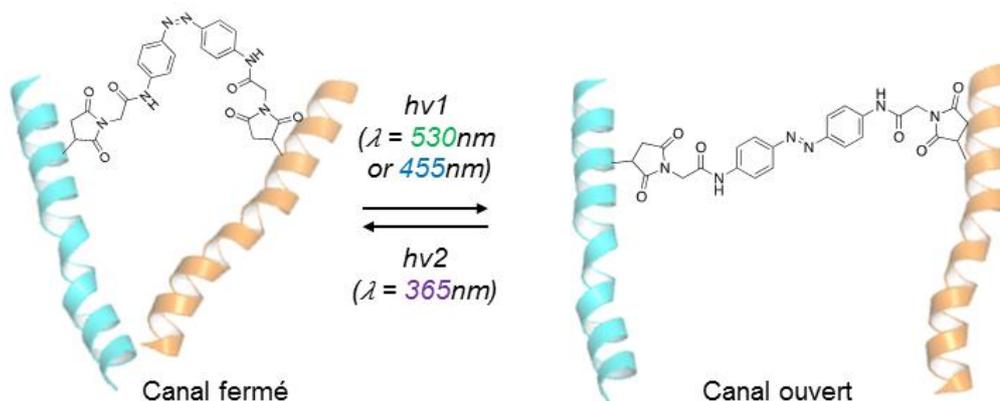


Figure 41: Stratégie globale de photo-contrôle des récepteurs P2X avec des dérivés d'azobenzènes développés au laboratoire.

Par mutagenèse dirigée des résidus stratégiques rationalisés par mesure de distance à l'aide du logiciel Pymol et d'après les modèles disponibles sont mutés en résidus cystéines (**figure 42A**). Une réaction thiol-maléimide de type addition 1,4 de Michael va avoir lieu entre les thiols et thiolates (pK_a -SH cystéine = 8.37) des cystéines et l'extrémité des agrafes moléculaires constituées de fonctions électrophiles de type maléimides.

La réaction de Michael est une addition 1,4 conjuguée entre un nucléophile de type énolate et un carbonyle α,β -insaturé (**figure 42B**). Le nucléophile va attaquer le carbone β de l'entité α,β -insaturée. Plus la double liaison est déficiente en électron, plus cette réaction est susceptible de se faire, ainsi les maléimides sont des fonctions de choix en terme de réactivité car les deux carbonyles attirent les électrons de la double liaison (Nair et al., 2014). Le choix de cette réaction est également pertinent car elle peut se passer en milieu aqueux, et possède une cinétique rapide, ce qui est donc compatible avec des études en milieu biologique. De plus, l'adduit thiol-maléimide a montré être relativement stable à pH physiologique. Cette fonction s'hydrolyse à des pH basiques (Hermanson, 2013), mais est stable dans nos conditions d'étude.

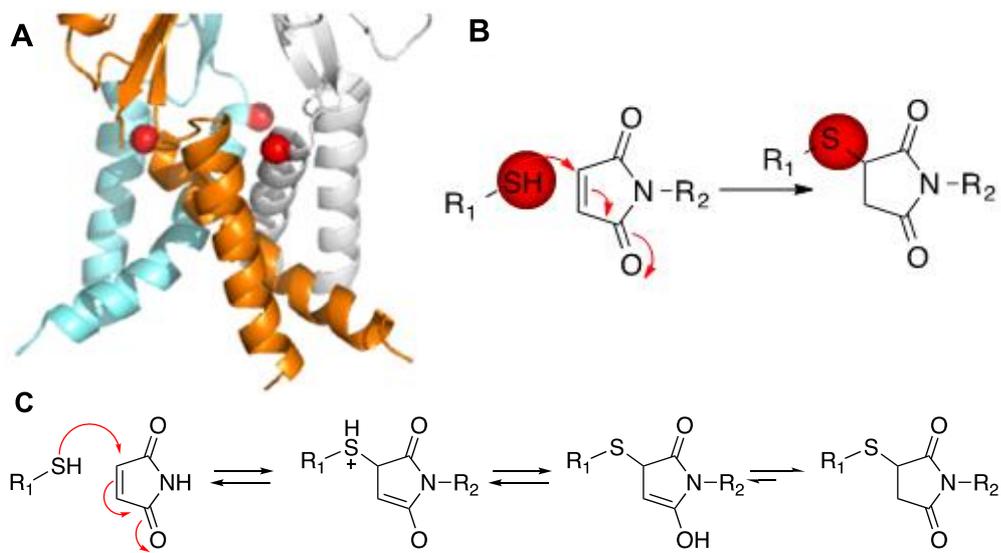


Figure 42: Méthode d'incorporation des agrafes photo-isomérisables **A.** Exemple de mutations cystéines (sphères rouges) sur les hélices transmembranaires des récepteurs canaux P2X. **B.** Réaction de Michael (addition 1,4) entre le thiol d'une cystéine et un maléimide. **C.** Mécanisme de la réaction de Michael entre un thiol et un maléimide.

Un criblage des mutants obtenus peut avoir lieu, les zones criblées dans le canal étant choisies en fonction de la problématique étudiée. Dans le cadre de l'étude du gating et de la dilatation, les zones transmembranaires TM2 ont été particulièrement ciblées, mais les hélices TM1 ont montré pouvoir être marquées et utilisées également à l'aide de cette méthode.

Les molécules choisies, appelées **MAMs** pour **Maléimide-Azobenzène-Maléimide**, vont permettre un changement de géométrie photo-induit de leur structure, propagé à la structure du mutant auquel elles sont liées. Si ce couplage du changement de distance entre les extrémités des azobenzènes résultant de l'isomérisation est associé à des changements conformationnels de la protéine, on peut ainsi mettre en évidence des mouvements moléculaires impliqués dans ces modulations structurales. De plus, correctement incorporées dans le récepteur P2X au niveau des hélices transmembranaires, le couplage du changement de géométrie des molécules induit par l'irradiation avec des mouvements des hélices transmembranaires va permettre de photo-contrôler l'ouverture et la fermeture du pore ionique.

Les enregistrements électrophysiologiques sont effectués avec des irradiations simultanées pour étudier directement les conséquences des changements de géométries des molécules sur les profils électrophysiologiques. La vérification du pontage correct de deux sous-unités des récepteurs P2X (indiquant que les deux maléimides ont bien réagit avec une cystéine) est effectué sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes et a été mené à bien par *Chloé Habermacher* et *Adeline Martz* concernant le travail sur le gating et par *Kate Dunning* et *Juline Beudez* pour le travail sur la dilatation.

PARTIE EXPERIMENTALE

Généralités : (communes au chapitre 2)

Les produits utilisés sont achetés chez Sigma-Aldrich, Fluka, Across ou Alfa Aesar à un niveau de pureté analytique.

Ont été utilisées pour les purifications : des CCM (plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 F254 Merck), des colonnes de silice pour purification par chromatographie (gel de silice 60 (230-400 mesh, 0.040-0.063 Merck). Les chromatographies Flash sont effectuées, avec un Combi Flash Rf (Teledyne isco) avec des colonnes Simply connect BP-SUP ou Redisep Rf Gold (HP silica). Les colonnes C18 utilisées sont les Biotages SNAP Cartridge KP-C18-HS.

HPLC Analytique Waters®: (pompes doubles corps Waters 600 avec détecteur à barrette de diode Dionex UVD340V ou pompe waters 1525 avec détecteur Waters 2996) avec des colonnes analytiques Phenomenex C18PolarRP 4 microns (4.6, 250mm) Thermo Betabasic 5 microns (4.6, 250mm), Agilent Zorbax SB-C18 5 microns (4.6, 250mm) et Kromasil 100-5C18 (4.6, 250mm). Les solvants éluants sont H₂O mQ (0,01% TFA) et acétonitrile et le gradient passe en 30 min à 100% d'acétonitrile.

HPLC Semi-préparative Waters®: pompes doubles corps Waters 600 avec détecteur à barrette de diode Waters 2996) équipée de colonne Phenomenex C18PolarRP 10 micron (10, 250mm), Thermo Betabasic 10 microns (10, 250mm) et kromasil 100-5C18 (10, 250mm)

Pour les analyses, nous avons effectués des RMN ¹H (400MHz) et ¹³C (100MHz) sur des spectromètres RMN 400 et 500 MHz Bruker®.

Les spectres de masse sont réalisés sur un spectromètre Agilent LC-MS RRLC 1200SL/QToF 6520.

Les spectres d'absorption UV-Visible sont effectués sur un spectromètre double faisceau UVIKON XS.

Les réactions au micro-onde sont menées à bien avec un micro-onde AntonPaar Monowave 300.

1. Synthèse des molécules : MAMs : Maléimides-Azobenzènes-Maléimides

L'(E)-4,4'-(diazene-1,2-diyl)dianiline (**1**) est commerciale (Sigma-Aldrich) et le synthon acide 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acétique a été préalablement synthétisé au laboratoire (*Dr. Damien Lemoine*) et est utilisé après séchage.

Une première gamme de taille croissante a été effectuée basée sur l'utilisation de bras espaceurs de types acides aminés (glycine ou proline) ajoutés sur la partie centrale diaminoazobenzène via la formation de liaison amide effectuées à l'aide de réactifs de couplage peptidique. Les structures électrophiles (maléimides) sont soit ajoutés via le synthon acide 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acétique ou formés directement *in situ*.

1.1. Stratégie de synthèse globale de la gamme 1

La synthèse de la première gamme de MAMs (MAM1 à 5 et MAMp5) a été basée sur la formation de liaison amides via des réactifs de couplage peptidique (**figure 43**) et sur la synthèse de la fonction maléimide (**figure 44**).

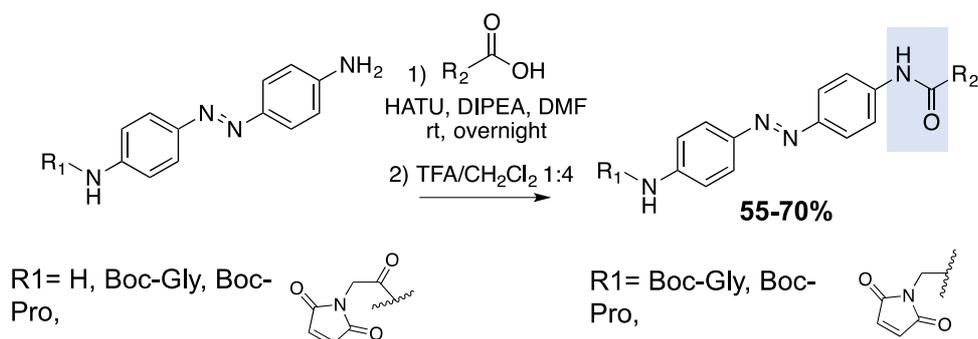


Figure 43: Réactifs et conditions utilisées pour la formation de liaisons amides

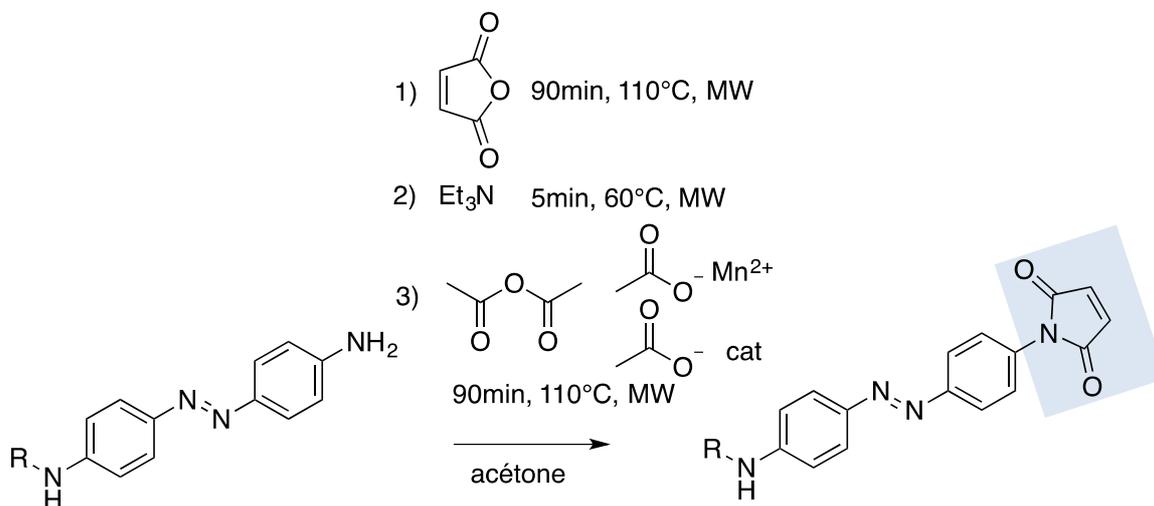
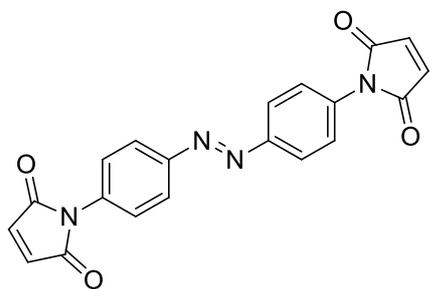


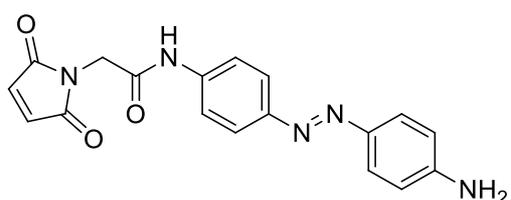
Figure 44: Réaction utilisée pour la synthèse des maléimides

1.2. Synthèse de la gamme 1 des MAMs



(E)-1,1'-(diazene-1,2-diylbis(4,1-phenylene))bis(1H-pyrrole-2,5-dione) MAM1 :

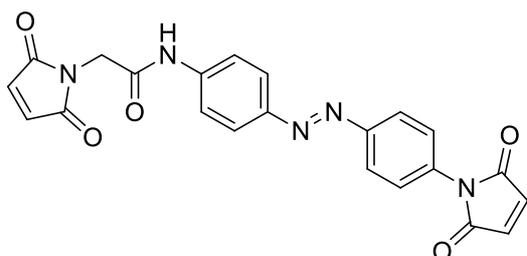
498mg (2.348mmol) de **(1)** et 462,3mg (2eq, 4.715mmol) d'anhydride maléique sont ajoutés dans 20mL de THF anhydre et laissés sous agitation 1h à 4°C. Le produit de réaction est centrifugé (4minutes, 8000g) et le précipité obtenu est resolubilisé dans 20mL de THF anhydre puis on y ajoute successivement 0,5mL (2.3eq, 5.324mmol) d'anhydride acétique et 50,2 mg d'acétate de sodium. Le mélange est soumis à un chauffage micro-ondes (20min, 110°C). Le suivi est effectué par CCM (dichlorométhane/acétate d'éthyle 95:5), Rf=0,35. Après lavage à l'eau distillée (100mL, 4°C), centrifugation (10min, 8000g), le précipité est resolubilisé dans 100 mL de méthanol et un précipité orange est obtenu en ajoutant lentement de l'eau glacée. Après filtration et séchage, la purification est effectuée par Flash-chromatographie sur colonne de silice avec comme solvants éluant le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle (gradient 100:0 => 95:5) et on obtient le **MAM1** pur (solide orange vif) avec un rendement de 36%. RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 8.01 (4H, d, J=8.8Hz), 7.545 (4H, d, J=8.8Hz), 6.883 (4H, s). RMN ¹³C (CDCl₃) : δ (ppm) 169.163, 151.230, 134.421, 133.722, 126.216, 123.701. (ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₂₀H₁₃N₄O₄⁺ : 373.09, trouvé : 373.0932.



(E)-N-(4-((4-aminophenyl)diazenyl)phenyl)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetamide

398mg (1.875mmol) de **(1)** et 726.8mg (4.7 mmol, 2.5eq) d'acide 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acétique sont solubilisés dans un mélange DMF/acétonitrile anhydre. 1,108g (4,7mmol, 2,5eq) d'HATU et 0,65mL de triéthylamine anhydre (4,7mmol, 2,5eq) sont ensuite ajoutés. Le mélange est mis sous agitation à température ambiante pendant 20h. Après extraction (NaHCO₃, 3x acétate d'éthyle), le brut est lavé à l'acétone. Le produit brun correspondant au disubstitué est éliminé et le surnageant est purifié par Flash-chromatographie sur colonne de silice avec comme solvants éluants l'acétate d'éthyle

et l'heptane (60:40). Le produit monosubstitué pur de couleur orange est obtenu avec un rendement de 51%. RMN ¹H (acétone-d₆): δ (ppm) 9.661 (1H, s), 7.779 (2H, d, J=9.3Hz), 7.756 (2H, d, J=9.3 Hz), 7.708 (2H, d, J=8.9Hz), 7.013 (2H, s), 6.777 (2H, d, J=8.9Hz), 4.407 (2H,s). RMN ¹³C (DMSO-d₆): δ (ppm) 170.640, 165.107, 152.470, 139.696, 138.549, 136.199, 134.952, 128.146, 125.903, 123.501, 122.231, 118.856, 112.854, 112.521, 68.490, 55.810, 32.083, 29.582.



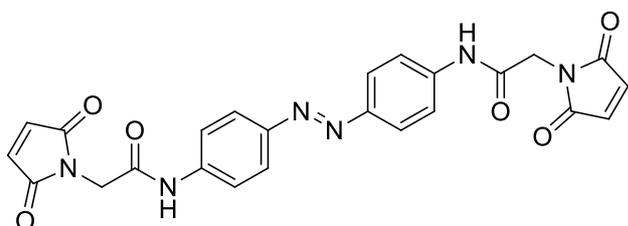
(E)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-(4-((4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl)diazenyl)phenyl)acetamide

MAM2: 200mg (0,5725 mmol) de

monosubstitué sont mis à réagir avec 112,3mg d'anhydride maléique (1,145 mmol, 2eq) lors d'un chauffage au micro-ondes (110°C, 90min) dans de l'acétone anhydre. Le précipité obtenu est filtré et resuspendu dans de l'acétone anhydre puis chauffé 5 min à 60°C avec 0,12mL de triéthylamine (0,8588mmol, 1.5eq). 0,54mL d'anhydride acétique sont ensuite ajoutés (5,725mmol, 10eq) ainsi qu'une quantité catalytique d'acétate de manganese et le mélange est chauffé au micro-ondes (90min, 110°C). Après ajout d'eau et filtration on obtient 46,1 mg du produit pur (rendement de 19%). RMN ¹H (acétone-d₆): δ (ppm) 9.369 (1H, s), 7.517 (2H, d, J=9.0Hz), 7.451 (2H, d, J=9.0Hz), 7.361 (2H, d, J=9.0Hz), 7.132 (2H, d, J=9.0Hz), 6.596 (2H, s), 6.519 (2H, s), 3.933 (2H, s).

RMN ¹³C (acétone-d₆): 171.30, 170.38, 166.17, 152.11, 149.51, 142.76, 135.71, 135.60, 135.25, 127.78, 124.83, 123.80, 120.53, 41.46.

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : 429.1073 calculé pour C₂₂H₁₅N₅O₅⁺, trouvé : 429.1069.



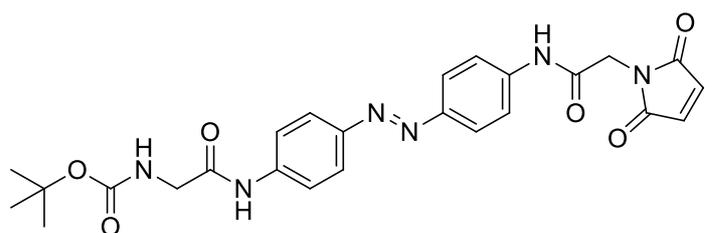
(E)-N,N'-(diazene-1,2-diylbis(4,1-phenylene))bis(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetamide)

MAM3: 200mg (0,9422mmol) de 4,4'-azoaniline et 730mg (4,7mmol, 5eq) de

N-maleoylglycine sont solubilisés dans un mélange acétonitrile/DMF anhydre avec 0,8mL (4,7mmol, 5eq) de DIPEA et 1,1g d' HATU (4,7mmol, 5eq) pendant 20 heures

sous agitation à température ambiante. Après séchage du brut, l'ajout d'acétone donne un précipité brun. Le produit pur est récupéré par filtration. Le rendement est de 55 %.

RMN ¹H (DMSO-d6): δ (ppm) 10.633 (2H, s), 7.849 (4H, d, J=8.7Hz), 7.746 (4H, d, J=8.7Hz), 7.166 (4H, s), 4.327 (4H, s). RMN ¹³C (DMSO-d6): δ (ppm) 170.816, 165.514, 148.034, 141.294, 135.154, 123.664, 119.627, 40.630. (ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₂₄H₁₉N₆O₆⁺ : 487.14, trouvé : 487.1350.

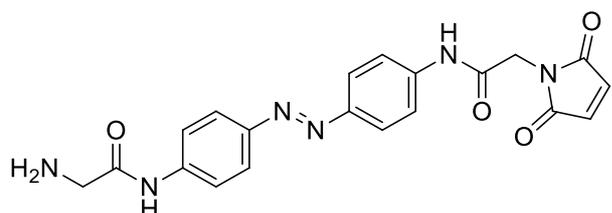


(E)-tert-butyl (2-((4-((4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-

yl)acetamido)phenyl)diazenyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)carbamate: 165mg (0.4723mmol) de (E)-N-(4-((4-aminophenyl)diazenyl)phenyl)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetamide sont solubilisés dans un mélange DMF/acétonitrile (8ml, 4ml). 107mg (0.6108mmol, 1.3eq) de N-Bocglycine, 100μL de DIPEA (0.6051mmol, 1.3eq) et 133mg (0.5653mmol, 1.2eq) d'HATU sont ajoutés. Le mélange est agité sous conditions anhydres pendant 24 heures. Le brut est séché une solution de NH₄Cl saturée est ajoutée et ce mélange est extrait trois fois à l'acétate d'éthyle (3x20mL), les fractions sont séchées sur sulfate de sodium anhydre et purifiées par chromatographie flash sur colonne de silice (heptane : acétate d'éthyle, le produit est élué à 60% d'acétate d'éthyle) et on obtient 151 mg de produit pur (63%).

RMN ¹H (DMSO-d6): δ (ppm) 9.737 (1H, s), 9.474 (1H, s), 7.855 (8H, m), 6.999 (2H, s), 4.402 (2H, s), 3.92 (2H, d, J=6.0Hz), 1.429 (9H, s).

RMN ¹³C (DMSO-d6): δ (ppm) 172.017, 169.097, 165.701, 156.345, 148.322, 148.017, 141.442, 135.351, 123.816, 119.519, 78.497, 44.341, 31.011, 30.048, 28.576, 14.444. (ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₂₅H₂₇N₆O₆⁺ : 507.1987 trouvé : 507.1993



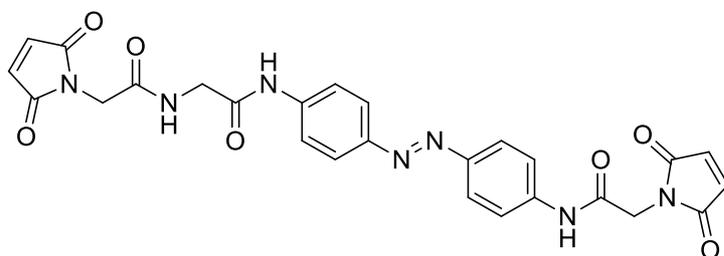
(E)-2-amino-N-(4-((4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-

yl)acetamido)phenyl)diazenyl)phenyl)acetamide :151 mg (0.2973mmol) de (*E*)-*tert*-butyl (2-((4-((4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acetamido)phenyl)diazenyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)carbamate sont mis à réagir 1h à température ambiante dans un mélange dichloromethane/TFA (5:1). Après évaporation, 113mg de produit pur sont récupérés (93%).

¹H NMR (400 MHz, dms_o-*d*) δ ppm: 9.639 (s, 1H), 9.552 (s, 1H), 7.028 (t, 2H, J=5.1Hz), 6.754 (m, 8H), 6.068 (s, 2H), 3.231 (s, 2H), 2.739 (d, 2H, J=5.1Hz).

¹³C NMR (400 MHz, dms_o-*d*) δ ppm: 203.343, 198.004, 183.295, 158.589, 134.953, 129.96, 123.49, 119.452, 57.98, 41.212

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺: calculé pour C₂₀H₁₉N₆O₄⁺: 407.1462 trouvé : 407.1473



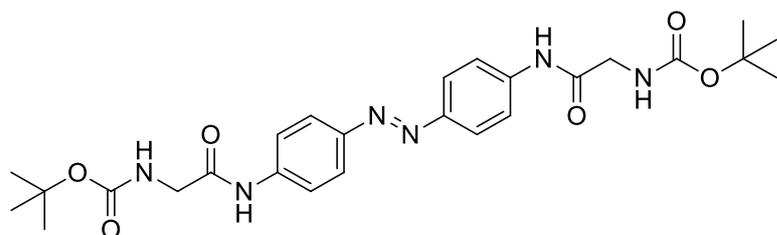
(*E*)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-(4-((4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-

yl)acetamido)acetamido)phenyl)diazenyl)phenyl)acetamide MAM4 : 112mg (0.277mmol) de (*E*)-2-amino-*N*-(4-((4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acetamido)phenyl)diazenyl)phenyl)acetamide sont mis en solution dans un mélange DMF/acétonitrile (8mL/4mL) avec 52mg (0.3325mmol, 1.2eq) de d'acide 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acétique, 78mg d'HATU (0.3325mmol, 1.2eq) et 55μL (0.3325mmol, 1.2eq) de DIPEA. Le mélange est agité 48h à température ambiante puis évaporé à sec et le produit est précipité dans de l'acétone donnant 114mg (76%) de produit pur.

¹H NMR (400 MHz, dms_o-*d*) δ ppm 10.657 (s, 1H), 10.355 (s, 1H), 8.618 (t, 1H, J=5.4Hz), 7.809 (m, 8H), 7.160 (s, 2H), 7.108 (s, 2H), 4.331 (s, 2H), 4.144 (s, 2H), 3.978 (d, 2H, J=5.4Hz)

¹³C NMR (101 MHz, dms_o-*d*) δ ppm : 170.951, 167.712, 166.638, 165.287, 147.848, 141.455, 134.924, 123.401, 119.422, 42.833, 40.416

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺: calculé pour: C₂₆H₂₂N₇O₇⁺: 544.1575, trouvé : 544.15698



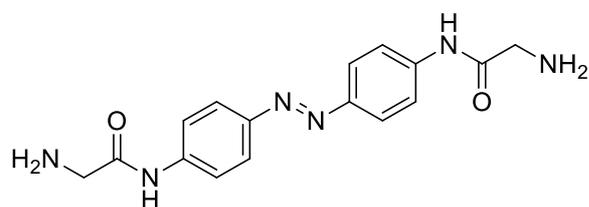
(E)-di-tert-butyl (((diazene-1,2-diyl)bis(4,1-phenylene))bis(azanediyl))bis(2-oxoethane-2,1-diyl)dicarbamate:

300mg de 4,4'-azoaniline (1,43mmol) sont mis à réagir avec 1,24g de Boc-glycine (7,1mmol, 5eq) en présence de 1,67 g d' HATU (7,1mmol, 5eq) et de 1,2mL de DIPEA (7,3mmol, 5,1eq) dans un mélange acétonitrile/DMF anhydre. Après 4 jours de réaction à température ambiante en conditions anhydres, le brut est séché et l'addition d'acétone permet l'obtention d'un précipité. Le rendement est de 69%.

RMN ¹H (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.272 (2H, s), 7.838 (8H, m), 7.102 (2H, t, J=5.8Hz), 3.76 (4H, d, J=6Hz), 1.402 (18H, s).

RMN ¹³C (DMSO-d₆): δ (ppm) 165.682, 158.922, 148.447, 141.291, 124.024, 119.898, 78.503, 41.608, 31.066, 28.611.

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₂₆H₃₅N₆O₆⁺ : 527.26, trouvé : 527.2622.



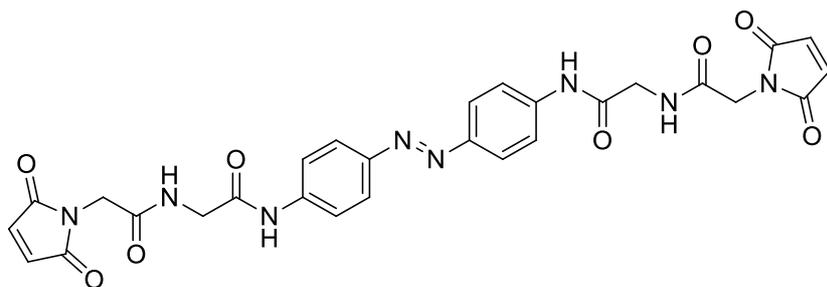
(E)-N,N'-(diazene-1,2-diyl)bis(4,1-phenylene))bis(2-aminoacetamide): le produit pur est mis dans un mélange dichlorométhane/TFA (80/20) et après une

heure de réaction, et évaporation on obtient le produit déprotégé à 99,5 % que l'on utilise directement sans purification.

RMN ¹H (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.85 (2H, s), 10.337 (2H, s), 7.845 (8H, s), 7,113 (2H, t, J=5Hz), 3.764 (4H, d, J=5.8Hz).

RMN ¹³C (DMSO-d₆): δ (ppm) 165.264, 158.415, 148.036, 140.036, 123.622, 119.485, 41.191, 30.654.

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₁₆H₁₉N₆O₂⁺ : 327.16, trouvé: 327.1569.



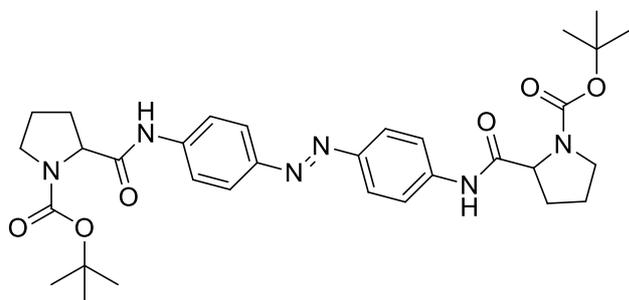
(E)-N,N-(diazene-1,2-diylbis(4,1-phenylene))bis(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-

yl)acetamido)acetamide) MAM5 : on ajoute au produit déprotégé solubilisé dans un mélange acétonitrile/DMF anhydre 140g (0,9mmol, 2,5eq) de N-maleoylglycine ainsi que 0,3mL (1,8mmol, 5eq) de DIPEA et 212mg (0,9mmol, 2,5eq) de HAUT pendant 20 heures. Après précipitation dans l'acétone et filtration, on obtient le **MAM5** (solide brun) avec un rendement de 57%.

RMN ¹H (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.355 (2H,s), 8.624 (2H, t, J=6.0Hz), 7.8215 (8H, m), 7.112 (4H, s), 4.140 (4H, s), 3.959 (4H, d, J=5.7Hz).

RMN¹³C (DMSO-d₆): δ (ppm) 170.584, 167.244, 147.690, 141.375, 134.826, 123.367, 119.316, 42.823, 37.654

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺: calculé pour C₂₈H₂₅N₈O₈⁺: 601.18, trouvé : 601.1795.

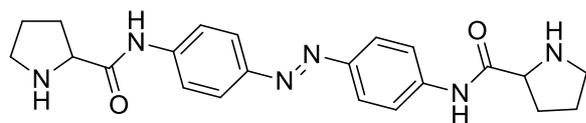


(E)-di-tert-butyl 2,2'-(((diazene-1,2-diylbis(4,1-

phenylene))bis(azanediyl))bis(carbonyl))bis(pyrrolidine-1-carboxylate) : 300mg de 1 (1.413mmol) sont mis à réagir avec 912.7mg (4.24 mmol, 3eq) de Boc-proline (racémique), 997.6mg d'HATU (4.24 mmol, 3eq) et 0.7mL de DIPEA (4.24 mmol, 3eq) sous argon pendant 48h dans un mélange DMF/acétonitrile (20mL, 10mL). Après évaporation à sec, le brut de réaction est mis en suspension dans de l'acétone, le précipité formé donne le produit pur jaune clair (250mg) avec un rendement de 29%.
RMN ¹H (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.328 (2H, d, J= 5.1Hz), 7.83 (8H, q, J= 8.8Hz et J= 4.4Hz), 4.278 (2H, m), 3.407 (4H, m), 2.23 (2H, m), 1.869 (6H, m), 1.406 (6H, s), 1.275 (12H, s).

RMN¹³C (DMSO-d₆): δ (ppm): 179.189, 172.458, 153.596, 142.235, 123.872, 119.953, 79.074, 60.989, 47.240, 31.479, 28.662, 23.901.

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₃₂H₄₃N₆O₆⁺ : 607.3239, trouvé : 607.3242



(E)-N,N'-(diazene-1,2-diylbis(4,1-phenylene))bis(pyrrolidine-2-carboxamide) : 250mg (0,3296mmol) de

(E)-di-*tert*-butyl

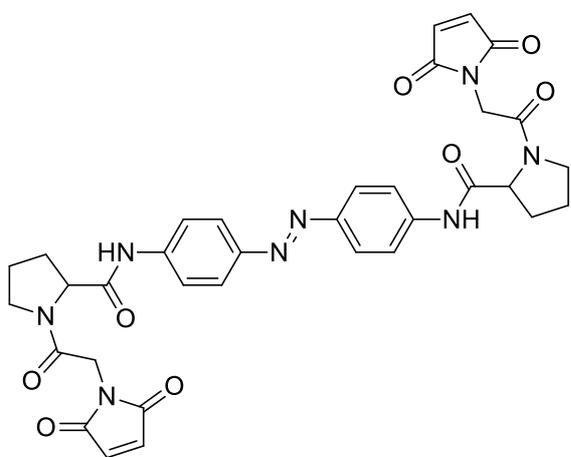
2,2'-(((diazene-1,2-diylbis(4,1-

phenylene))bis(azanediy))bis(carbonyl))bis(pyrrolidine-1-carboxylate) sont solubilisés dans 4 mL de dichloromethane et 1mL de TFA est ajouté. Le milieu est laissé 1h à température ambiante puis évaporé à sec. On obtient 121mg de produit sans purification (91%).

RMN ¹H (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.907 (s, 2H), 9.453 (m, 2H), 8.723 (m, 2H), 7.91 (d, 4H, J=8.9Hz), 7.83 (d, 4H, J=8.9Hz), 4.398 (m, 2H), 3.305 (m, 4H), 1.994 (m, 8H)

RMN¹³C (DMSO-d₆): δ (ppm) 167.259, 148.162, 140.760, 123.558, 119.865, 59.878, 45.875, 27.022, 23.515

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₂₂H₂₇N₆O₂⁺ : 406.2112, trouvé : 406.2117



(E)-N,N'-(diazene-1,2-diylbis(4,1-phenylene))bis(1-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl)pyrrolidine-2-carboxamide) MAMp5 : 122mg

(0.3mmol) de (E)-N,N'-(diazene-1,2-diylbis(4,1-phenylene))bis(pyrrolidine-2-

carboxamide) sont mis en solution dans un mélange DMF/acetonitrile (10ml, 5ml) avec 140mg (0.9mmol, 3eq) d'acide 2-(2,5-dioxo-

2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acétique, 342.2mg d'HATU (0.9mmol, 3eq) et 250 μL (1.5mmol, 5eq) de DIPEA. Le mélange est agité 48h à température ambiante. Après évaporation à sec et précipitation dans l'acétone on récupère 83,8mg de produit pur (41%).

RMN ¹H (DMSO-d₆): δ (ppm) : 10.351 (s, 2H), 7.826 (d, 4H, J=8.5Hz), 7.784 (d, 4H, J=8.5Hz), 7.098 (s, 4H), 4.442 (m, 2H), 4.334 (m, 4H), 3.683 (m, 4H), 2.168 (m, 4H), 1.956 (m, 4H)

RMN¹³C (DMSO-d₆): δ (ppm) : 173.853, 170.599, 147.590, 141.558, 137.281, 134.850, 123.282, 119.352, 60.461, 50.24, 37.676, 29.305, 24.413

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺: calculé pour C₃₄H₃₃N₆O₆⁺: 681.2416, trouvé : 681.2405

1.3. Stratégie globale de synthèse de la gamme 2 :

Une deuxième gamme de molécule a été synthétisée basée sur l'utilisation de bras espaceurs constitués de cycles phényles (**figure 45**). Le 4,4'-(diazene-1,2-diyl)diphenol est commercial (Sigma-Aldrich).

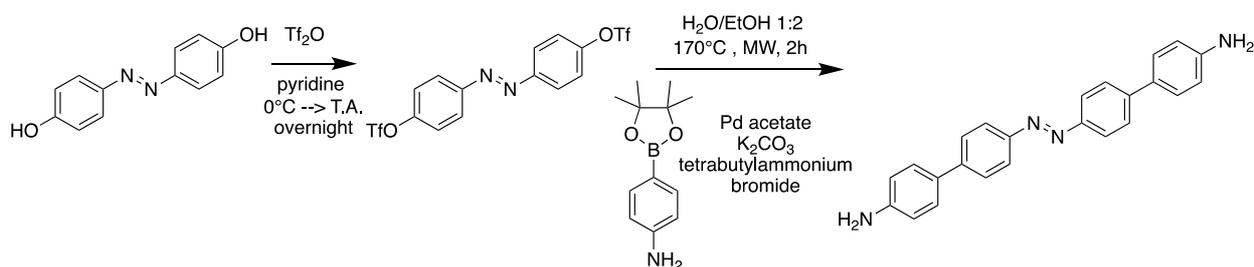
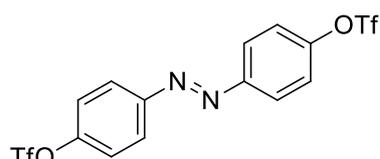


Figure 45: stratégie de synthèse de la gamme 2 des MAMs.

1.4. Synthèse de la deuxième gamme de MAMs



(E)-diazene-1,2-diylbis(4,1-phenylene)

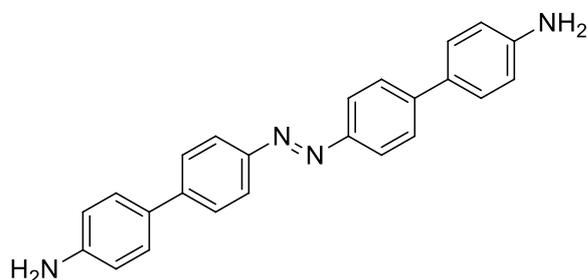
bis(trifluoromethanesulfonate): 250 mg (1.167 mmol)

de 4,4'-(diazene-1,2-diyl)diphenol sont mis en solution dans 3mL de pyridine et le mélange est refroidi à 0°C, 387 µL d'anhydride triflique (2eq, 2.334 mmol) sont ajoutés gouttes à gouttes. Le milieu est neutralisée avec de l'eau et extraite 3x avec 70mL d'acétate d'éthyle. Après évaporation et séchage, le brut est purifié sur colonne flash de silice. (90 :10 heptane : acétate d'éthyle). Un précipité orange très vif est récupéré (430mg, 77%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ ppm : 8.9 (4H, triplet dédoublé, J=8.9Hz, J=2.1Hz, J=3.2Hz), 7.44 (4H, triplet dédoublé, J=8.9Hz, J=2.1Hz, J=3.2Hz),

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d) δ ppm : 151.599, 151.421, 125.128, 122.524, 117.397

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺: calculé pour C₁₄H₉F₆N₂O₆S₂⁺: 478.9801, trouvé : 478.97918



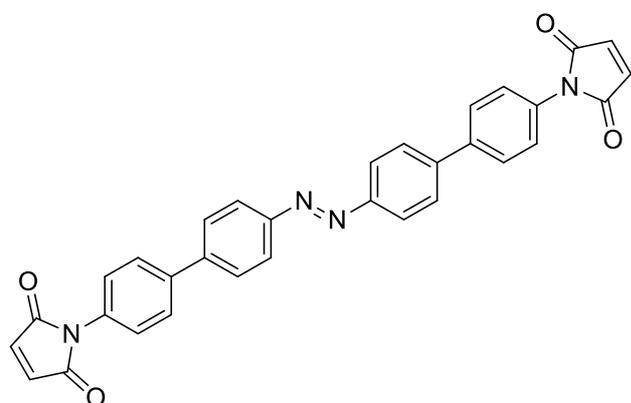
(E)-4',4'''-(diazene-1,2-diyl)bis([1,1'-biphenyl]-4-amine) : 300mg (0.6272mmol) de (E)-diazene-1,2-diylbis(4,1-phenylene) bis(trifluoromethanesulfonate) sont mis en solution dans 2mL d'eau et 4mL d'éthanol

avec 290mg d'acide 4-aminophénylboronique (1.324mmol, 2.1eq), 433mg de K₂CO₃ (3.133mmol, 5eq), 202 mg de bromure de tétrabutylammonium (0.6272mmol, 1eq). 5mg (0.03136mmol, 0.05eq) de palladium acetate sont ajoutés en conditions sans oxygène. Le mélange est chauffé 20min au micro-onde à 170°C. L'éthanol est évaporé, le mélange est quenché avec une solution de NaHCO₃ sat et extrait 3x 50mL au dichlorométhane. Le produit est purifié par chromatographie Flash sur silice (éluants : dichlorométhane/méthanol gradient 0 à 20%, le produit est élué à 5% de méthanol) et 183 mg de produit pur orange sont récupérés (0.503mmol, 80%).

¹H NMR (400 MHz, dms_o-d) δ ppm : 7.9 (4H, d, J=8.3Hz), 7.77 (4H, d, J=8.3Hz), 7.51 (4H, d, J=8.3Hz), 6.67 (4H, d, J=8.3Hz), 5.418 (4H, s)

¹³C NMR (400 MHz, dms_o-d) δ ppm : 152.857, 148.967, 143.003, 142.737, 127.181, 125.513, 125.456, 122.829

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺: calculé pour C₂₄H₂₁N₄⁺: 365.4595, trouvé : 365.1749



(E)-1,1'-(diazene-1,2-diyl)bis([1,1'-biphenyl]-4',4-diyl)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) MAMBp1: 100mg (0.2744mmol) de 4',4'''-(diazene-1,2-diyl)bis([1,1'-biphenyl]-4-amine) sont mis en solution dans 5mL d'acétone avec 107,6 mg (1.098mmol, 4eq) d'anhydride maléique et le mélange est

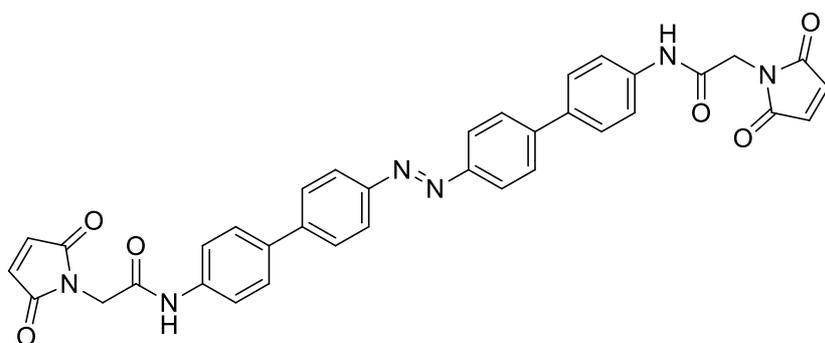
chauffé au micro-ondes (110°C, 1h30). Après refroidissement le précipité est récupéré par filtration et remis en suspension dans 5mL d'acétone avec 95 µL de triéthylamine

(0.686mmol, 2.5eq). 257 μ L (2,744mmol, 10eq) d'anhydride éthanique et une quantité catalytique d'acétate de manganèse sont ajoutés et le mélange est chauffé au micro-ondes (110°C, 1h30). Après refroidissement et ajout d'eau froide, un précipité brun se forme qui est récupéré par filtration et lavé avec de l'acétone et de l'éthanol glacé. On récupère 54 mg de produit pur (37%).

¹H NMR (400 MHz, dms o - d) δ ppm: 8.06 (d, 4H, J=8.3Hz), 7.98 (d, 4H, J=8.3Hz), 7.92 (d, 4H, J=8.3Hz), 7.5 (d, 4H, J=8.3Hz), 7.228 (s, 4H)

¹³C NMR (101 MHz, dms o - d) δ ppm : 179.672, 170.887, 162.898, 155.251, 142.810, 133.028, 127.701, 127.200, 123.205

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₃₂H₂₁N₄O₄⁺ : 525.1557, trouvé : 525.1551



(E)-N,N'-(diazene-1,2-diyl)bis([1,1'-biphenyl]-4',4'-diyl)bis(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetamide)

MAMBp2 : 63 mg
(0,1719mmol) de (E)-

4',4'''-(diazene-1,2-diyl)bis((1,1'-biphenyl)-4-amine)) sont mis en solution dans un mélange DMF (1,5mL) acetonitrile (0,5mL) anhydres. 80mg (3eq, 0.5158mmol) d'acide 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acétique, 196 mg (3eq, 0,5158mmol) d'HATU et 14 μ L (5eq, 0.8596mmol) de DIPEA sont ajoutés et le mélange est agité à température ambiante pendant 24h. Le brut est ensuite évaporé et mis à précipiter dans de l'acétone et lavé 3x à l'acétone glacé, après filtration, 41mg (0,070463mmol, 41%) de poudre brune sont récupérées correspondant au MamBp2 propre.

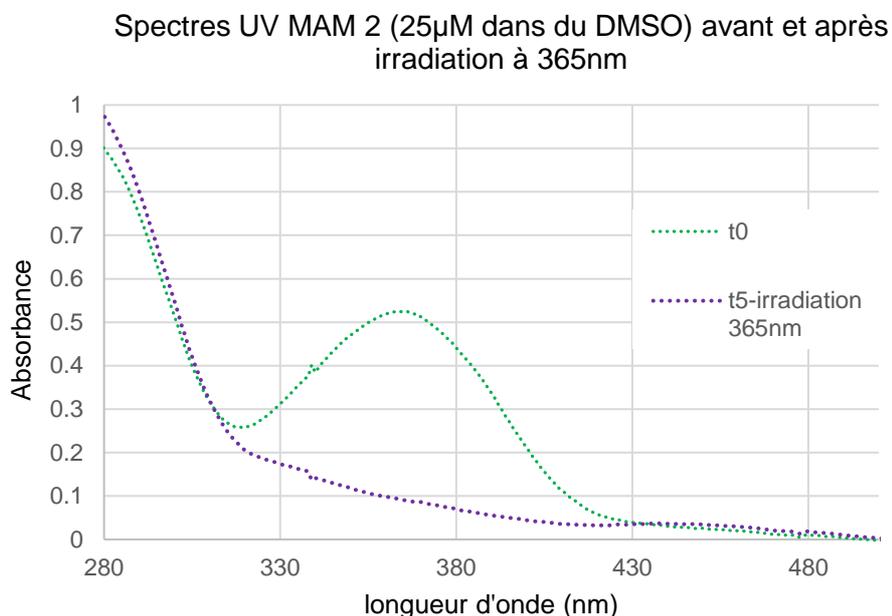
¹H NMR (400 MHz, dms o - d) δ ppm : 9.618 (2H, s), 7.15 (4H, d, J=7.8Hz), 7.07 (4H, d, J=7.8Hz), 6.94 (4H, d, J=7.8Hz), 6.85 (4H, d, J=7.8Hz), 6.319 (4H, s), 3.473 (4H, s)

¹³C NMR (101 MHz, dms o - d) δ ppm : 170.7, 165.0, 150.895, 147.6, 142.298, 138.633, 134.94, 127.298, 127.109, 123.241, 119.555, 30.641

(ESI-HR-MS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₃₆H₂₇N₆O₆⁺ : 639.1987, trouvé : 639.1965

1.5. Spectres UV

Afin d'évaluer les longueurs d'onde qui devront être utilisées pour effectuer les irradiations, des spectres UV sont effectués.



Molécule	MAM1	MAM2	MAM3	MAM4	MAM5	MAMp5	MAMbp1	MAMbp2
λ_{\max} (<i>trans</i>)	312	365	353	360	359	360	361	338

NES 1% DMSO sauf MAMbp1 ACN 1% DMSO

Les UV pour l'isomère *trans* sont obtenus à l'obscurité.

2. Partie biologie

2.1. Culture cellulaire et préparation des plaques pour l'électrophysiologie patch-clamp

Les cellules HEK 293 sont cultivées dans du DMEM supplémenté à 10% de FBS (Invitrogen), 1X Glutamax, et d'antibiotiques (100 U/mL pénicilline, 100 μ g/mL streptomycine) dans un incubateur (37°C, 5% CO₂). Après lavage au PBS, elles sont décollées à l'aide de trypsine-EDTA (Invitrogen), et séparées par des up-and-down successifs à l'aide d'une pipette. Des lamelles de verre sont déposées dans des plaques 6 puits, recouvertes de poly-L-Lysine et lavées au PBS. 2mL de milieu sont

ajoutés et une quantité de cellules préalablement préparées est ajouté, déterminé en fonction de la confluence de la boîte utilisée en fonction de la préparation et de l'expérience (whole cell ou single channel) prévue. Ces cellules sont mises à incuber (37°C, 5% CO₂) entre 1h et 24h avant d'être transfectées.

2.2. Mutagenèse dirigée

Les mutations sont effectuées sur le récepteur rP2X2-3T où les résidus C9, C348 et C430 sont mutés en thréonine, exprimé dans le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3.1 (+) contenant un gène de résistance à l'ampicilline. On effectue les mutations à l'aide du Kit de PCR KAPA HiFi HotStart (Cliniscience). Les oligonucléotides pour la PCR sont choisis pour introduire la mutation voulue et un site de restriction enzymatique ne modifiant pas la séquence protéique mais permettant de distinguer les colonies bactériennes positives. Le mélange de PCR est digéré par Dpn1 (1h, 37°C) puis dialysé (filtre Millipore 0,025µM) et intégré dans des bactéries électro-compétentes par électroporation (2,5V). Les bactéries (DH5α) sont étalées sur des boîtes de Pétri (LB-Agar et ampicilline 100µg/µL) et incubées une nuit. (37°C). On pique des colonies et on les dispose dans du milieu liquide, et ce mélange est mis à incuber et agiter la nuit à 37°C. Ce mélange est purifié à l'aide du Kit Nucleobond XtraMini (Macherey-Nagel). Une partie de l'ADN est digéré avec l'enzyme de restriction et mis à migrer sur gel. D'après le profil, la colonie sélectionnée est amplifiée une nuit et purifiée le lendemain (Nucleobond XtraMaxi (Macherey-Nagel)) puis la concentration en ADN est déterminée par absorption UV et la séquence confirmée par séquençage (GATC Biotech).

2.3. Transfections

La méthode utilisée est la précipitation calcium-phosphate de l'ADN. Les mutants rP2X2 ont été transfectés à 0,3µg pour les enregistrements whole-cell et entre 0.05 et 0,1 µg pour les enregistrements en single channel. Pour les enregistrements whole-cell rP2X7 ils ont été transfectés à 1 µg. Les mutants sont co-transfectés avec de l'EGFP (0,3µg) comme rapporteur fluorescent. Les cellules sont utilisées de 24 à 48h après transfection.

2.4. Préparation des solutions de MAMs et incubation

Les MAMs sont stockés dans du DMSO, solutions stocks de 5 mM, aliquotés et conservés à -20°C. Les MAMs 1 et 2 sont incubés 10min à 5 µM. Le MAM3 est incubé 20 min à 0.3 µM. Les autres MAMs sont incubés 20 min à 10µM. Ils sont utilisés dilués à 1% de DMSO dans du NES avec 3 µM ATP (pour P2X2) ou 30 µM ATP (pour P2X7).

2.5. Obtention des Traces électrophysiologiques – irradiations simultanées

On utilise des pipettes en verre borosilicatées (Harvard Apparatus) de résistance : 3-5 MΩ pour la configuration whole-cell et 15-25 MΩ pour la configuration single-channel, polies (Sutter p97), recouvertes avec du Sylgard 184 (Dow Corning Co.) sont remplies avec les solutions internes avant utilisation et orientées et amenées à toucher les parois membranaires à l'aide d'un micro-manipulateur. Le poste d'électrophysiologie est constitué d'un système de perfusion, d'un système d'irradiation (puissances des LEDs : 365nm : 17.7 mW/mm², 530nm : 13.3 mW/mm², 455nm : 39.5 mW/mm²), d'une cage de faraday, d'un amplificateur (EPC-10 (HEKA)), d'une table avec air comprimé, d'un microscope (Olympus IX73) et d'une caméra (ProgRes MF-cool).

Le potentiel appliqué est de -60mV pour les enregistrements (réalisés sur le logiciel Patchmaster HEKA) en cellule entière, et de -120mV pour les enregistrements en canaux uniques à l'aide d'un amplificateur EPC-10 (HEKA).

2.6. Solutions utilisées

Pour toutes les solutions, l'osmolarité est ajustée avec du glucose pour atteindre les valeurs de 290-310mOsm et les solutions sont toutes filtrées avant utilisation. Les solutions sont complétées avec de l'ATP selon les expériences.

NES-*whole cell*: 140mM NaCl, 2.8mM KCl, 2mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 10mM glucose ajustée à pH 7.3 avec une solution de NaOH.

NES-*single channel*: 132.6mM NaCl, 0.3mM KCl, 0.25mM MgCl₂, 10mM HEPES ajustée à pH 7.3 avec une solution de NaOH

NIS: 140mM KCl, 5mM MgCl₂, 5mM EGTA, 10mM HEPES ajustée à pH 7.3 avec une solution de NaOH.

NMDG_{int-*whole cell*}: 140mM NaCl, 10mM HEPES, 10mM EDTA, ajustée à pH 7.3 avec une solution de HCl.

NMDG_{int-*single channel*}: 132.6mM NMDG, 10mM EDTA, 10mM HEPES ajustée à pH 7.3 avec une solution de HF.

NMDG_{ext-*whole cell*} : 140mM NMDG, 10mM HEPES, ajustée à pH 7.3 avec du HCl.

NMDG_{ext-*single channel*} : 132.6mM NMDG, 0.3mM KCl, 0.25mM MgCl₂, 10mM HEPES ajustée à pH 7.3 avec une solution de HCl.

Na_{int-*whole cell*} : 140mM NaCl, 10mM HEPES, 10mM EDTA, ajustée à pH 7.3 avec une solution de HCl.

Na_{ext-*whole cell*} : 140mM NaCl, 10mM HEPES, ajustée à pH 7.3 avec une solution de HCl.

Na_{ext-*single channel*} : 132.6mM NaCl, 0.3mM KCl, 0.25mM MgCl₂, 10mM HEPES ajustée à pH 7.3 avec une solution de NaOH.

SPD_{int-*whole cell*} : 33mM SPD, 10mM HEPES, 10mM EDTA, ajustée à pH 7.3 avec une solution de HCl.

SPD_{int-*single channel*} : 33mM SPD, 10mM HEPES, 10mM EDTA, ajustée à pH 7.3 avec une solution de HF.

SPD_{ext-*whole cell*} : 33mM SPD, 10mM HEPES, ajustée à pH 7.3 avec une solution de HCl.

SPD_{ext-*single channel*} : 33mM SPD, 10mM HEPES, 0.3mM KCl, 0.25mM MgCl₂, ajustée à pH 7.3 avec une solution de HCl.

2.7. Analyses

Les analyses sont effectuées avec FitMaster (HEKA Electroniks, v2x73.2) et IGOR PRO (Wavemetrics, v6.37A) pour les enregistrements en cellules entières et TAC (Buxton Co.) pour les enregistrements en canal unique.

RESULTATS

1. Photorégulation des récepteurs P2X

Le premier résultat important à observer avec ces molécules, est qu'elles permettent toutes la photo-régulation des récepteurs P2X, correctement incorporées dans des zones établies par criblage. Ceci nous permet donc de manipuler les récepteurs P2X d'une manière spatio-temporelle extrêmement précise, en utilisant toutes les molécules synthétisées, sur tous les sous-types de récepteur ainsi qu'au niveau cellule entière ou canal unique.

1.1. Différentes molécules

Toutes les molécules synthétisées ont mené à une photo-régulation effective sur le récepteur rP2X2-3T, le mutant « modèle » utilisé est le mutant I328C (**figures 46 et 47**).

Gamme MAM1 à 5

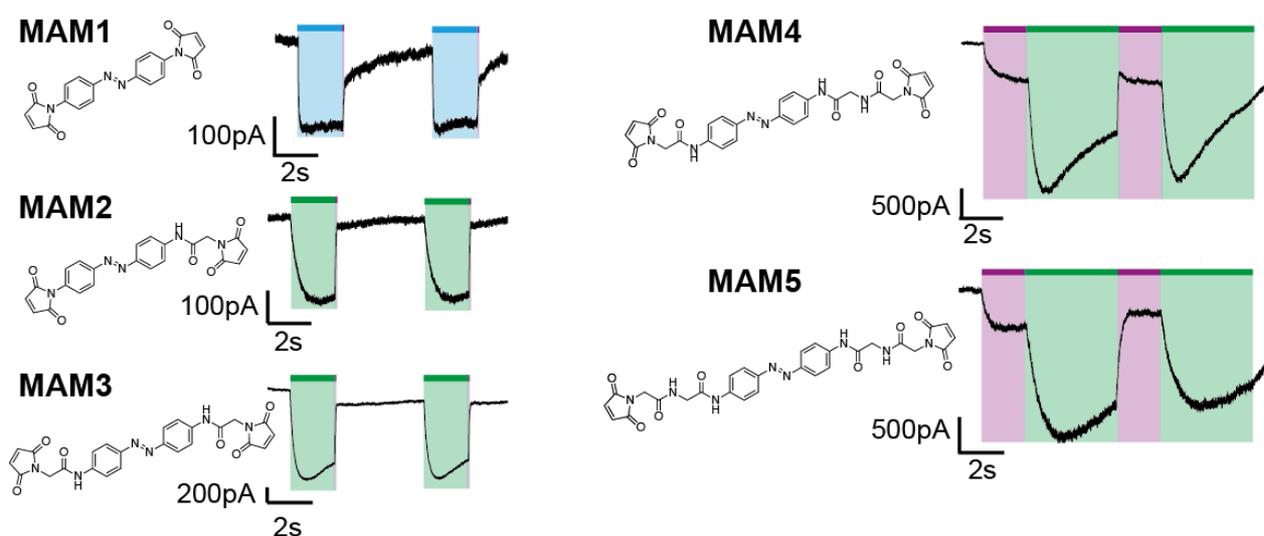


Figure 46: Traces électrophysiologiques en configuration cellule entière montrant la photo-régulation du mutant I328C (sur rP2X2-3T). Les longueurs d'ondes d'irradiation utilisées sont 365nm (UV) et 455 et 530nm (Visible).

Gamme MAM plus rigides

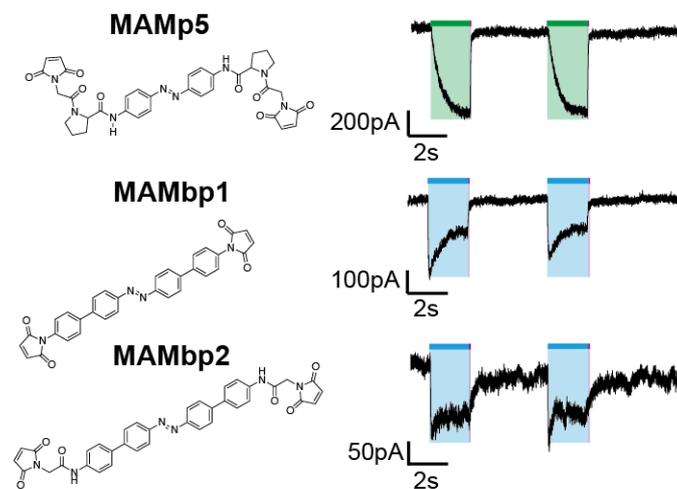


Figure 47: Traces électrophysiologiques en configuration cellule entière montrant la photo-régulation du mutant I328C (sur rP2X2-3T). Les longueurs d'ondes d'irradiation utilisées sont 365nm (UV) et 455 et 530nm (Visible).

1.2. Différents sous-types

Ces molécules ont également montré être efficaces sur différents sous-types des récepteurs P2X. Durant cette thèse, elles ont été quasiment essentiellement appliquées sur les récepteurs rP2X2 mais aussi comme preuve de principe sur les récepteurs rP2X7 (**figure 48**). Elles sont maintenant utilisées dans le cadre d'une thèse par Juline Beudez sur le récepteur hP2X2 et dans le cadre de la thèse de Kate Dunning sur tous les sous-types des récepteurs P2X.

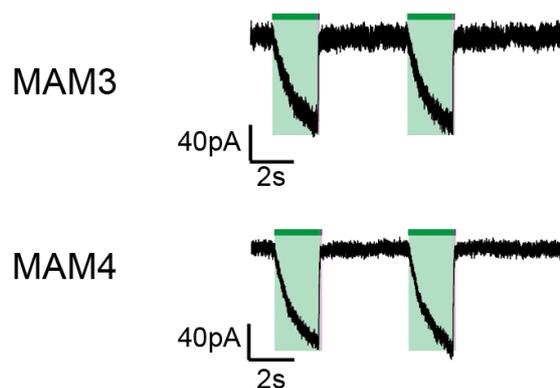


Figure 48: Traces électrophysiologiques en configuration cellule entière montrant la photo-régulation du mutant V335C (sur rP2X7). Les longueurs d'ondes d'irradiation utilisées sont 365nm (UV) et 530nm (Visible).

Il s'agit d'une perspective intéressante car les récepteurs P2X7 sont assez différents des autres sous-types et n'ont pas été photo-contrôlables via d'autres méthodes, comme l'optogating, jusqu'à maintenant.

1.3. Enregistrements en configuration cellule entière et canal unique

Durant cette thèse, j'ai essentiellement utilisé ces molécules pour effectuer des mesures de courant et de la photo-régulation en conditions « whole-cell », mais précédemment Chloé Habermacher avait publié une photo-régulation effective des récepteurs rP2X2-3T en « single-channel » (**figure 49**) à l'aide de la molécule MAM3 sur le mutant I328C (Habermacher et al., 2016).

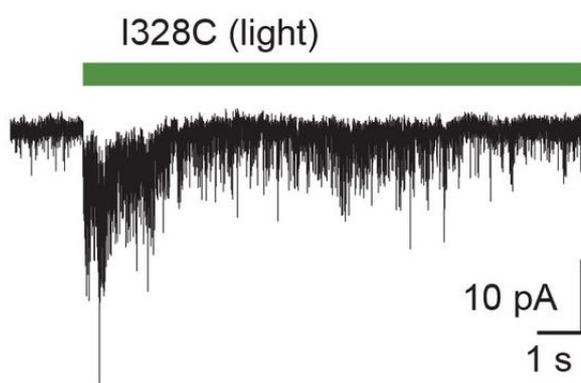


Figure 49: Enregistrement en canal unique obtenu par Chloé Habermacher sur le mutant I328C incubé avec la molécule MAM3 (Habermacher et al., 2016).

2. Elucidation de mécanismes moléculaires

2.1. L'ouverture des récepteurs P2X dans un état perméable aux « petits cations » : le gating

Une première publication concernant les MAMs a été effectuée au sein de notre laboratoire par Chloé Habermacher et est paru en 2016 (ma contribution se limite ici à la synthèse). Elle a permis la première confirmation de l'utilité de ces agrafes photo-isomérisables dans la détermination des mouvements moléculaires décisifs dans un changement allostérique ainsi que leur intérêt dans l'étude de protéines dans leur environnement natif membranaire.

Les mouvements sous-jacents à l'ouverture du pore ionique au niveau transmembranaire ont pu être disséqués (**figure 50A**). Elle a également mis en exergue un mouvement de rapprochement vertical des extrémités des hélices TM2 centré sur un coude provoqué par une glycine conservée dans les séquences P2X, qui n'était pas attendu à l'observation des structures cristallographiques (**figure 50B**).

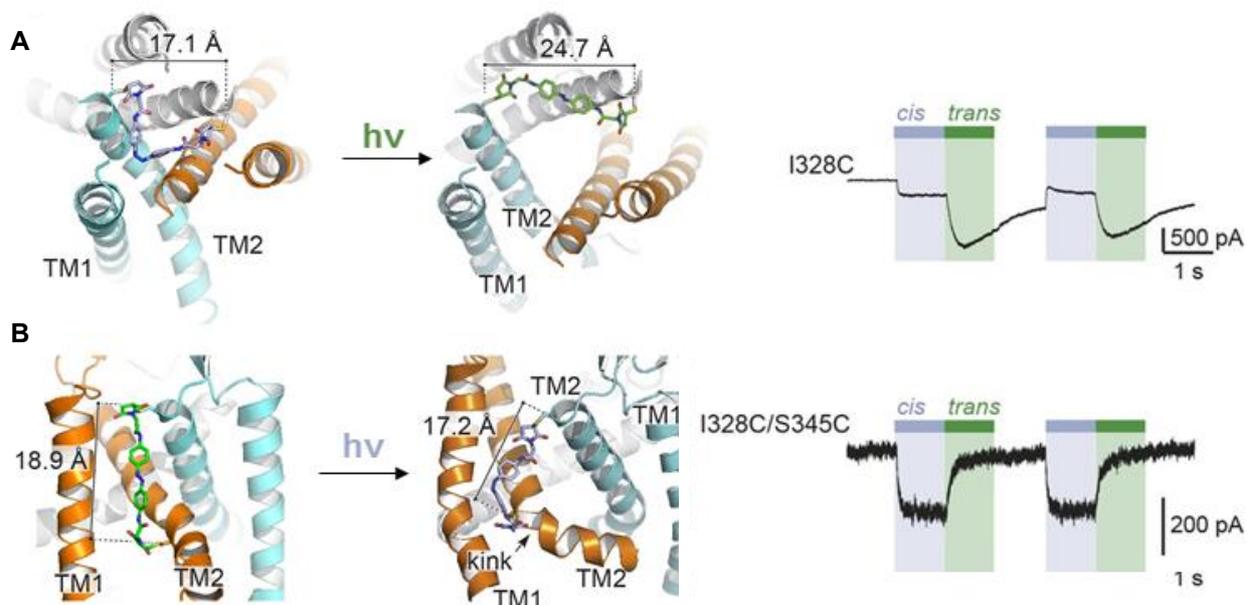


Figure 50: Mouvements moléculaires des hélices transmembranaires impliqués dans le gating des récepteurs P2X mis en évidence à l'aide de la molécule MAM3. A. Mise en évidence de mouvements horizontaux par rapport au plan de la membrane sur le mutant I328C. **B.** Mise en évidence de mouvements verticaux par rapport au plan de la membrane sur le mutant I328C/S345C (Habermacher et al., 2016).

De plus, les résultats obtenus ont été utilisés pour affiner les modèles cristallographiques disponibles (voir paragraphe **3.1. Utilisation des MAMs en tant que règles moléculaires**).

2.2. La dilatation

2.2.1. Contexte de l'étude

Une application prolongée d'ATP mène le pore des récepteurs P2X à une dilatation apparente progressive, passant d'un état perméable aux petits cations sodium potassium et calcium à un état distinct, perméable à de plus gros cations organiques tels que le NMDG⁺ et des fluorophores cationiques (Khakh et al., 1999b). Le mécanisme menant à cette dilatation n'est pas connu et activement débattu, deux hypothèses ont été formulées (voir Introduction paragraphe **3.6.3. état dilaté**). Ce phénomène n'est pas observé sur tous les sous-types des récepteurs P2X, ni dans toutes les conditions.

Nous avons décidé, pour notre nouvelle stratégie, de se mettre dans des conditions ioniques symétriques, avec une solution interne NMDG⁺. Les objectifs étaient les suivants :

- Etudier la perméabilité au NMDG⁺ en faisant un criblage de mutations et de molécules pour trouver les mouvements menant à la dilatation
- Caractériser l'état dilaté
- Trouver une molécule physiologique capable de passer le pore ionique des récepteurs P2X dans un état dilaté

2.2.2. Criblage des zones transmembranaires

13 mutations simples ou doubles, localisées dans les zones les plus mobiles des hélices transmembranaires 2 ont été associées à 3 molécules photo-isomérisables de taille croissante (MAM1-MAM2-MAM3) ce qui a mené à 54 combinaisons (**figure 51**).

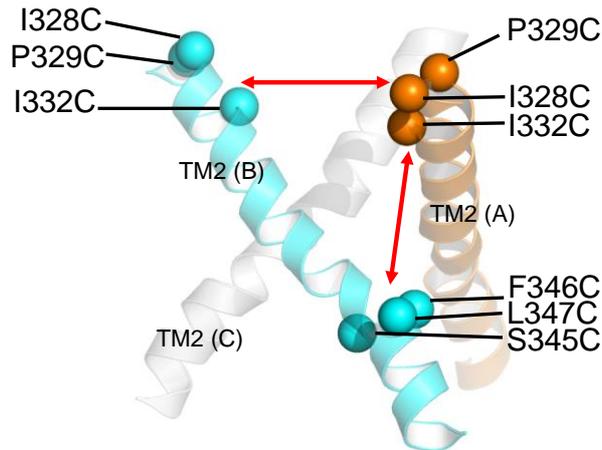


Figure 51: Vue latérale des mutants sélectionnés pour le screening dans les hélices TM2 des récepteurs P2X. Les flèches représentent les mouvements moléculaires supposés pour les mutants simples (un mouvement horizontal par rapport au plan de la membrane par exemple entre deux positions I328C) et pour les mutants doubles (un mouvement vertical par rapport au plan de la membrane par exemple entre I328C et S345C).

La perméabilité du NMDG^+ en conditions symétriques ($\text{NMDG}^+_{\text{ext}} / \text{NMDG}^+_{\text{int}}$) est comparée avec la perméabilité aux ions Na^+ engendrées par l'ouverture du récepteur P2X induite par la photo-isomérisation des MAMs. L'utilisation de molécules de tailles croissantes provient de l'hypothèse de "piéger" l'état supposé dilaté en augmentant graduellement l'amplitude de l'expansion des hélices TM2, correspondant à l'hypothèse de dilatation sur un modèle d'expansion du pore ionique (**figure 52** et **figure 53**).

Toutes ces réponses provenant des combinaisons de mutations sont comparées avec les réponses induites par l'ATP et avec le récepteur rP2X2-3T non muté, donc exempt de cystéines libres pouvant réagir avec les maléimides des MAMs, en contrôle négatif (**figure 53**).

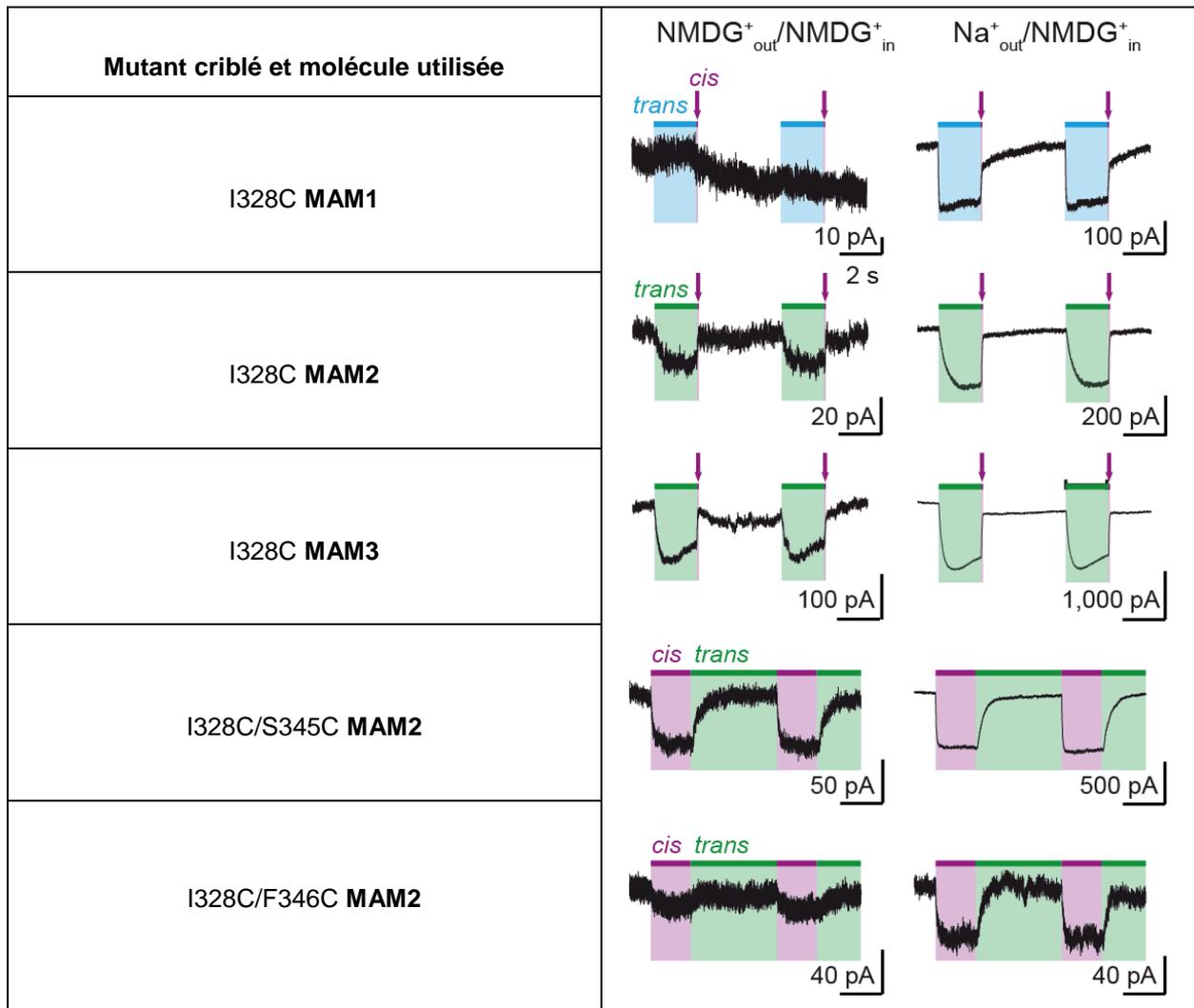


Figure 52: Traces électrophysiologiques obtenues lors du criblage des mouvements des zones transmembranaires des récepteurs P2X. Les longueurs d'onde utilisées sont 365 nm pour l'UV et 455 et 530 nm pour le visible.

On observe, en concordance avec les résultats précédents concernant le gating, que lors de l'utilisation des MAMs sur des mutants simples, montrant des mouvements horizontaux, le passage des MAMs en *trans* induit par des irradiations dans le domaine du visible provoque l'ouverture des récepteurs P2X, tandis que pour les doubles mutants situés aux extrémités hautes et basses des hélices TM2 c'est l'irradiation dans l'UV, passant les MAMs en *cis*, qui provoque un mouvement vertical responsable de l'ouverture du pore.

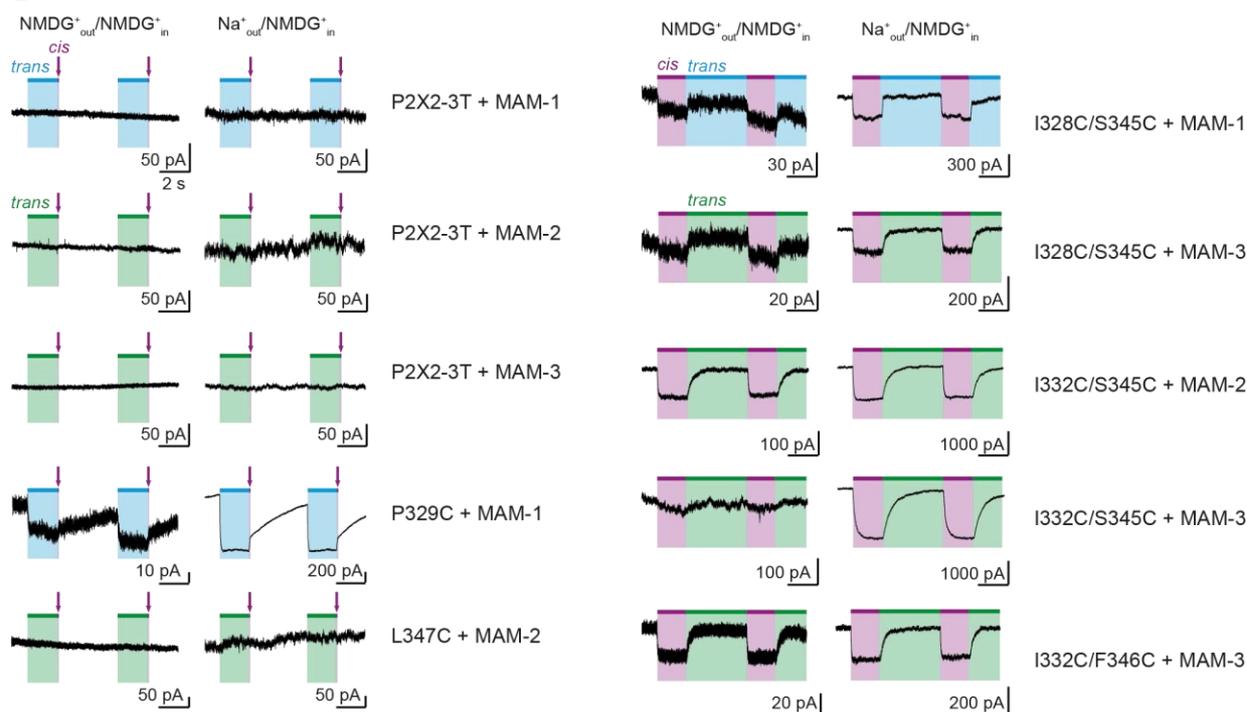


Figure 53: Enregistrements électrophysiologiques effectués lors du criblage. A gauche sur les récepteurs P2X2-3T et sur des mutants simples témoins de mouvements horizontaux, à droite sur des mutants doubles, témoins de mouvements verticaux.

Les récepteurs P2X2-3T (contrôle négatif) incubés en présence de MAMs ne montrent aucun courant consécutif à l'irradiation (**figure 53**).

Chaque mutant a été testé avec les trois molécules, et avec l'ATP en contrôle. Les résultats concernant les intensités de courant obtenus et les ratios $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$ sont consignés dans la **figure 54**.

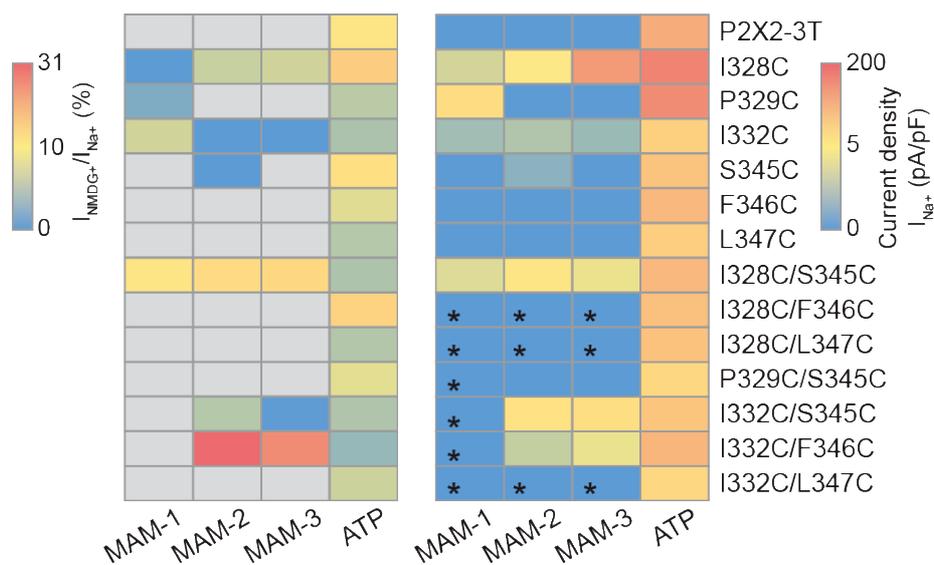


Figure 54: Criblage des mutants dont les mouvements moléculaires, induits par l'irradiation des MAMs, aboutissent à une perméation au NMDG⁺ en conditions symétriques NMDG⁺_{in}/NMDG⁺_{out}. Le tableau de gauche représente les ratios pour les courant NMDG⁺ comparés aux courants Na⁺ sur un même mutant et une même cellule (n=4-7). Le tableau de droite représente les densités de courant Na⁺ obtenus pour les différentes concentrations. Les intensités de courant NMDG⁺ dans ces conditions sont comparées aux intensités de courant Na⁺ obtenues pour la même cellule après changement rapide de la solution perfusée. Le ratio déterminé entre ces deux courants est consigné dans le tableau de gauche pour les mutants où des courants NMDG⁺ étaient enregistrables, les cases grises correspondent aux mutants où les entrées de NMDG⁺ n'étaient pas visibles. Le tableau de droite représente les densités de courant obtenues pour les différents mutants criblés. Les mutants simples montrent une ouverture lorsque les MAMs sont isomérisés en *trans*, alors que les mutants doubles montrent une ouverture photo-induite lorsque les MAMs sont isomérisés en *cis*. Les mutants doubles arborant une astérisque (*) s'ouvrent lorsque les MAMs sont isomérisés en *trans*, de la même manière que leurs homologues simples, révélant une hétérogénéité de marquage.

Les principales conclusions de ce criblage sont les suivantes :

1. Les ratios de quantité de courant provenant de l'entrée du NMDG⁺ par rapport aux quantités de courant provenant de l'entrée du Na⁺ sur la même cellule sont compris entre 0 et 30 %, et en moyenne aux alentours de 10%.
2. Les mouvements des hélices horizontaux engendrés par les simples mutations que nous avons effectuées mènent à une perméation aux gros cations avec une molécule de taille assez importante pour obtenir une ouverture robuste des récepteurs P2X. Les mouvements verticaux, symbolisés par les doubles mutations, mènent à cette perméation également. Ces mouvements étant

démontrés dans le phénomène de « gating », le mécanisme moléculaire de la perméation au NMDG⁺ en semble très proche.

3. Aucune des combinaisons testées ne mène à une perméabilité au NMDG⁺ seule, il y a toujours une perméabilité au sodium si la photo-régulation mène à une perméabilité au NMDG⁺, ce qui semble indiquer qu'il n'existe pas de mécanismes distincts pour ces deux phénomènes. Il semble cependant qu'avec certaines combinaisons et certaines molécules, une perméabilité au sodium soit observée alors qu'une perméabilité au NMDG⁺ ne l'est pas. Ceci peut s'expliquer par deux hypothèses :
 - nos molécules engendrent un état sous-conductant des récepteurs P2X qui pourrait être éventuellement l'état I1
 - la photo-régulation n'est pas assez efficace (soit le mouvement n'est pas décisif pour l'ouverture du canal, soit le marquage est peu efficace car perturbé d'un point de vue stérique) pour que l'on observe une perméabilité au NMDG⁺ ce qui est corroboré par les quantités de courant portés par les ions Na⁺ observées pour ces positions qui sont faibles.

Ce criblage nous a donc mené à l'hypothèse que l'état dilaté n'est pas un état conformationnel distinct mais que les plus gros cations tels que le NMDG⁺ semblent passer simplement de manière plus faible que les « petits cations » via le récepteur P2X. Cette hypothèse concernant la conductance de ces cations a été testée en enregistrements canal unique (voir **2.2.4**).

2.2.3. Incorporation de molécules fluorescentes

Fort de ces résultats, nous avons d'abord décidé de les confirmer via une deuxième méthode classiquement utilisée pour mettre en évidence classiquement la dilatation des récepteurs P2X (expériences effectuées par le docteur *Thierry Chataigneau* et analyses par *Tina Safdarian*). Pour cela, nous avons effectué le suivi de l'incorporation de molécules fluorescentes (**figure 55**). Le YO-PRO-1 (7Å x 8Å x19Å) est une molécule intercalant l'ADN, fluorescente lorsqu'elle complexe l'ADN, de la famille des carbocyanines et est connue ne pouvoir passer la membrane via le pore des récepteurs P2X seulement lorsque celui-ci a les dimensions du pore dilaté.

Cette expérience a lieu dans des conditions plus physiologiques que le screening puisqu'il n'y a cette fois plus de NMDG⁺ à l'intérieur de la cellule et une solution contenant du sodium en externe et nous a permis de confirmer les résultats obtenus lors du screening.

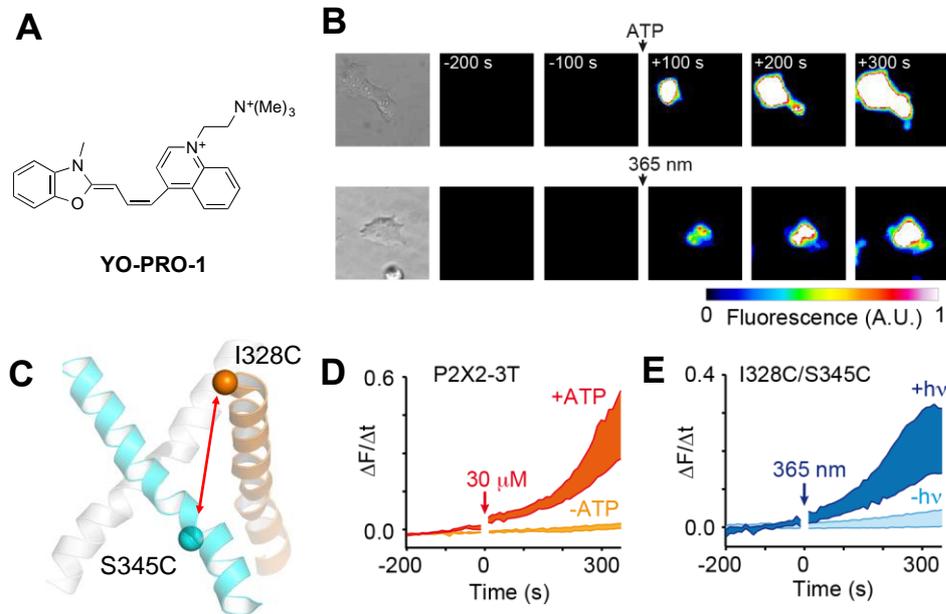


Figure 55: Incorporation de YO-PRO-1 dans les récepteurs P2X mutés exprimés dans des cellules HEK293, incubés avec les MAMs et irradiés. **A.** Structure chimique du fluorophore cationique YO-PRO-1. **B.** Séries de photographies au cours du temps montrant la fluorescence suivant l'incorporation après une application d'ATP sur les récepteurs rP2X2-3T ou après irradiation à 365nm du mutant I328C/S345C incubé avec le MAM2. **C.** Vue latérale représentant le mutant I328C/S345C localisé dans les hélices TM2. **D.** Augmentation de la fluorescence après application de YO-PRO-1 en fonction du temps pour les récepteurs rP2X2-3T en présence ou absence d'ATP. **E.** Augmentation de la fluorescence après application de YO-PRO-1 en fonction du temps pour les récepteurs mutés I328C/S345C incubés avec le MAM2 irradiés ou non irradiés à 365nm.

2.2.4. Enregistrements électrophysiologiques en canaux multiples et canal unique.

Ensuite nous avons effectués des expériences de Multi (*Mahboubi Harkat*) et « Single-channel » (*Juline Beudez et Laurie Peverini*) pour caractériser l'état dit « dilaté » en termes de conductance (flux d'ion) et de cinétique d'ouverture.

Concernant les résultats obtenus en canaux multiples, on observe que la cinétique d'ouverture lors du passage du NMDG⁺ est similaire que lors du passage du sodium. La perméabilité au NMDG⁺ a lieu quelque millisecondes après la liaison de l'ATP. De plus, les ratios obtenus en comparant les quantités de courant dans les deux conditions sur une même cellule sont encore une fois proches de 10% (**figure 56A et B**).

Nous avons effectué la première observation du passage du NMDG⁺ en configuration « single channel » et la première estimation de la conductance de celui-ci. Ceci a été possible grâce à l'utilisation de solutions de NMDGF qui ont permis de stabiliser les patchs obtenus, ainsi que par le fait de filtrer les résultats à 100Hz, ce qui révèle les ouvertures uniques des récepteurs P2X en conditions NMDG⁺ symétriques. La comparaison des conductances unitaire nous mène encore une fois à un ratio proche de 10%, ce qui confirme la pertinence des résultats obtenus lors de notre criblage (**figure 55C et D**).

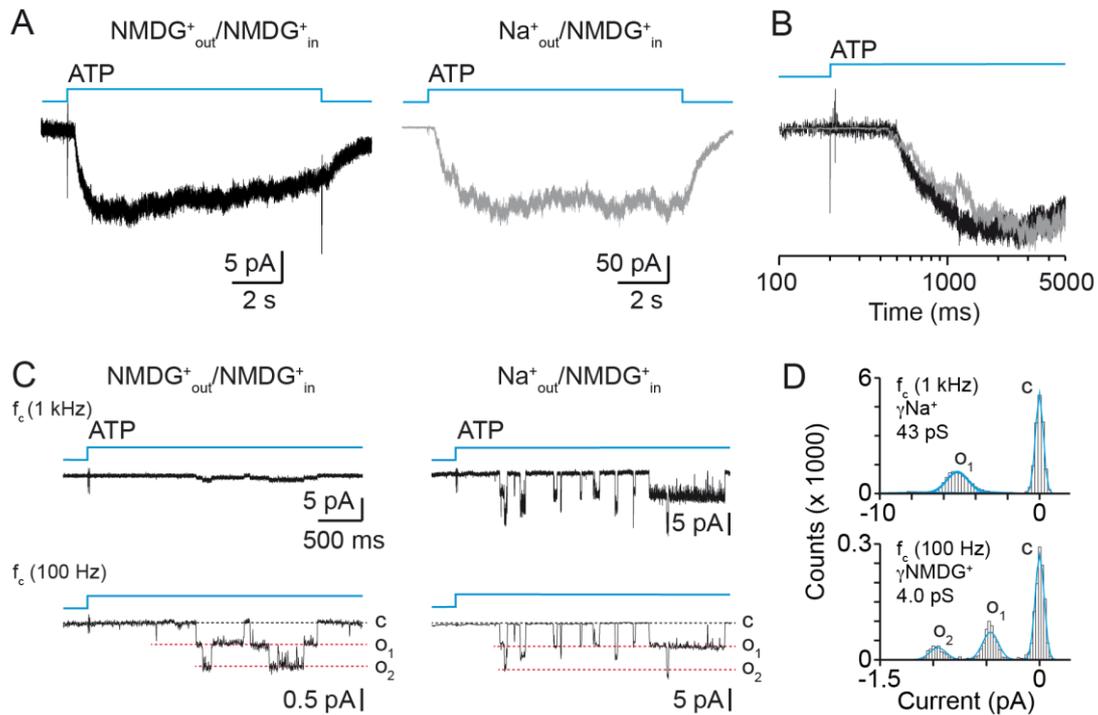


Figure 56: Enregistrements en configuration *outside-out* en multi-canaux et en canal unique de réponses ATP en conditions symétriques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{NMDG}^+_{\text{out}}$ et asymétriques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{Na}^+_{\text{out}}$ sur les récepteurs rP2X2-3T transfectées dans des cellules HEK-293. A. Enregistrements en multi-canaux sur le récepteur rP2X2-3T en conditions symétriques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{NMDG}^+_{\text{out}}$ ou asymétriques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{Na}^+_{\text{out}}$ sur le même patch. **B.** Comparaison des temps d'activation dus à l'application d'ATP, pour les conditions $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{NMDG}^+_{\text{out}}$ (en noir) $\tau=183\text{ms}$, pour les conditions $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{Na}^+_{\text{out}}$ (en gris) $\tau=123\text{ms}$. **C.** Enregistrements en canal unique obtenus en conditions symétriques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{NMDG}^+_{\text{out}}$ et asymétriques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{Na}^+_{\text{out}}$ sur le même patch. **D.** Histogrammes correspondants aux enregistrements C et conductances unitaires du NMDG^+ et du Na^+ . O₁: ouverture 1, O₂: ouverture 2, C: closed state (état fermé).

Il est important de noter que d'après ces résultats, il n'est plus question de perméabilité au NMDG^+ augmentant avec le temps mais bien d'une possibilité d'entrée simultanée du NMDG^+ et du sodium en proportions dues à leur conductance.

2.2.5. Confirmation et mécanisme de perméation du NMDG^+ à l'aide d'expérience de dynamique moléculaire.

D'après un modèle stabilisé par des molécules de MAM2, nos collaborateurs (*équipe de Mario Cecchini - ISIS - expérience d'Adrien Cerdan*) ont pu mettre en évidence que l'état ouvert-lié à l'ATP est immédiatement perméant au NMDG^+ .

L'orientation du NMDG⁺ est importante pour son passage, la molécule doit échantillonner différentes conformations afin de pouvoir passer, le passage se faisant en conformation linéaire avec l'atome d'azote orienté vers le bas (**figure 57**).

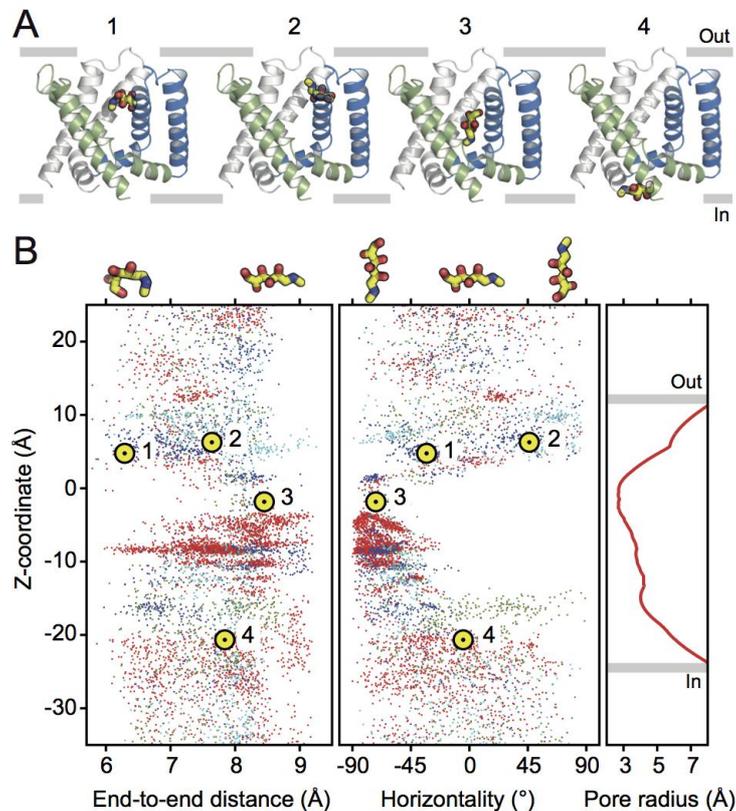


Figure 57: Importance de l'orientation dans le passage du NMDG⁺ dans les récepteurs P2X. **A.** Arrêts sur image à différents temps de l'expérience du passage du NMDG⁺ dans les zones transmembranaires. **B.** Probabilité de passage de la molécule de NMDG⁺ en fonction de sa conformation, selon la distance entre les extrémités de la molécule (gauche) ou son orientation en fonction du plan de la membrane (milieu). Les données obtenues ont été effectuées dans 4 conditions différentes : 1 M de NMDG⁺ à -1V (rouge), 0.15 M de NMDG⁺ à -1V (vert), 0.15 M de NMDG⁺ à -1.5 V (bleu), 0.15 M de NMDG⁺ à -2 V (cyan).

2.2.6. Expérience de perméation du NMDG⁺ en conditions symétriques sur les différents sous-types des récepteurs P2X.

Cette expérience, réalisée par *Mahboubi Harkat*, a permis de mettre en évidence que les sous-types rP2X4 et rP2X7 étaient également perméables immédiatement au NMDG⁺ en conditions symétriques mais aussi de manière inattendue, que les récepteurs rP2X3, sous-type désensibilisant rapidement dont la perméabilité au NMDG⁺ n'avait jamais été montrée, arboraient les mêmes propriétés (**figure 58**).

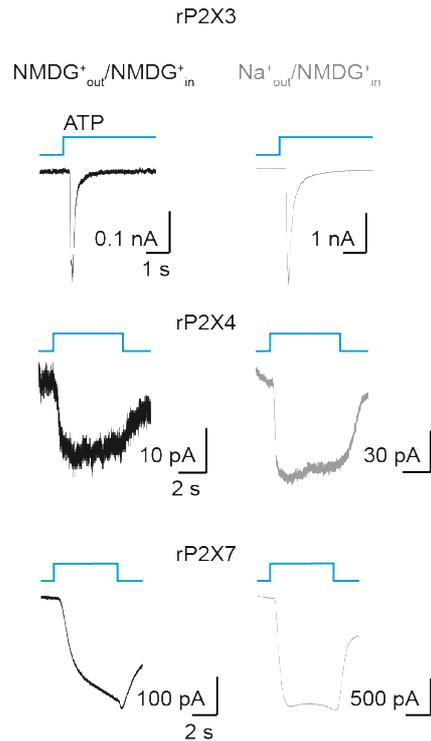


Figure 58: Expérience de perméation du NMDG^+ sur les sous-types rP2X3 , rP2X4 et rP2X7 en conditions symétriques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{NMDG}^+_{\text{out}}$ et asymétriques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{Na}^+_{\text{out}}$.

2.2.7. Expériences de perméation à la spermidine.

Les polyamines, constituées de la spermine, la spermidine (SPD), la putrescine et de la cadaverine, sont des molécules physiologiques que l'on retrouve à de fortes concentrations dans différents types cellulaires (**figure 59**). D'un point de vue chimique, ce sont des amines aliphatiques, polybasiques, protonées à pH physiologique.

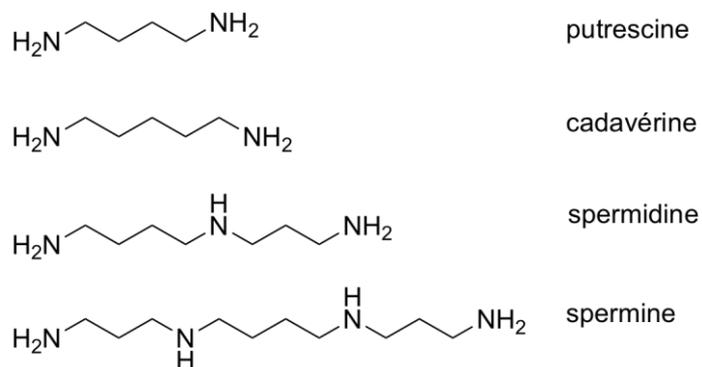


Figure 59: Structures chimiques des polyamines.

Elles-y jouent différents rôles, étant impliquées dans la division et la prolifération cellulaire ainsi que dans la modulation de différents canaux ioniques, agissant comme bloquant sur les canaux K^+ et ont montrées être impliquées dans le contrôle de la rectification sur les récepteurs AMPA et kainate (Williams, 1997) ainsi que comme potentiateurs des récepteurs NMDA (Mony et al., 2011).

Afin de vérifier si les récepteurs P2X peuvent laisser passer d'autres cations organiques plus gros, avec une importance physiologique cette fois, nous avons effectué des expériences de perméabilités en conditions symétriques SPD_{int}/SPD_{ext} . On observe que dès l'application d'ATP, un courant entrant a lieu, correspondant à une entrée de spermidine dans la cellule via les récepteurs P2X. Nous avons étudié deux sous-types différents, hP2X2 et hP2X3 et tous deux montrent une perméabilité pour la spermidine. Cette expérience ouvre la voie à des études concernant une signalisation inespérée médiée par les récepteurs P2X (**figure 60**).

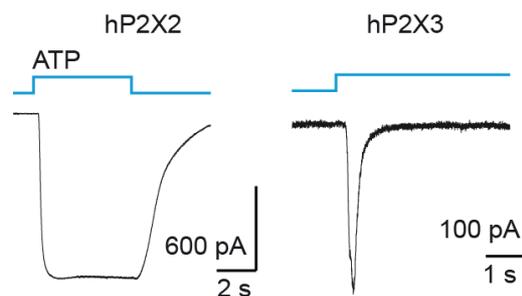


Figure 60: Perméabilité des récepteurs hP2X2 et hP2X3 à la spermidine

2.2.8. Conclusion

Nous avons pu montrer que, contrairement à ce qui avait été postulé depuis une vingtaine d'année, les récepteurs P2X ne semblent pas engendrer un état distinct dilaté correspondant à un changement de sélectivité ionique progressif mais que le pore est perméable immédiatement après une application d'ATP à des molécules cationiques de plus grande taille, avec une conductance plus faible (**tableau 7**).

	Perméabilité au sodium	Perméabilité au NMDG
Cinétiques d'ouverture des états conductants	ms	ms
Mouvements moléculaires mis en évidence à l'aide des MAMs.	Expansion horizontale hélices TM2 Rapprochement des extrémités des hélices TM2	Expansion horizontale hélices TM2 Rapprochement des extrémités des hélices TM2
Conductance	53 pS	4.0 pS

Tableau 7: Récapitulatif des données moléculaires découvertes pendant cette étude.

Nous avons également montré que ce passage de cations plus gros était généralisable aux sous-types désensibilisants des récepteurs P2X et identifié un cation organique naturel pouvant passer à travers le pore des récepteurs P2X suite à une application d'ATP.

3. Utilisation des MAMs comme règles moléculaires

Lorsque leurs distributions de taille des isomères *cis* et *trans* sont bien définies, les MAMs peuvent également servir à mesurer des distances à l'intérieur des protéines.

3.1. Affinement du modèle cristallographique

Précédemment, la molécule MAM3 nous avait permis d'affiner le modèle cristallographique disponible en mesurant des distances entre différentes positions et en les compilant dans un nouveau modèle (Habermacher et al., 2016), réduisant drastiquement la taille de crevasses situées dans les zones transmembranaires visibles sur la première structure cristallographique (**figure 61**).

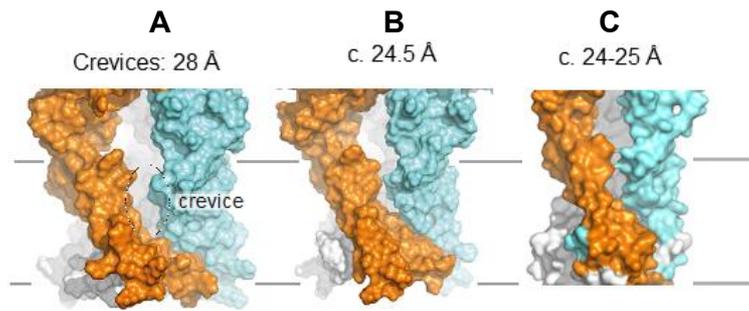


Figure 61: Exemple d'utilisation des Mams comme "règles moléculaires" dans l'affinement des modèles cristallographiques. A. Modèle cristallographique des récepteurs zfP2X4 (Kawate et al., 2009). **B.** Affinement du modèle cristallographique à l'aide des données de distance obtenues par le MAM3 (Habermacher et al., 2016). **C.** Modèle cristallographique du récepteur hP2X3 (Mansoor et al., 2016).

Ensuite nous avons formulé l'hypothèse qu'augmenter la distance graduellement des molécules nous permettrait d'obtenir des outils de mesure de taille adaptables. Cependant ces molécules, à la vue de la modélisation moléculaire, possèdent des trop larges distributions de probabilité de taille pour pouvoir donner des mesures de distances fiables. De plus, la flexibilité induite par les CH₂ réduit dramatiquement l'augmentation de distance qui avait été l'objectif premier.

3.2. Modélisation moléculaire (*équipe de Mario Cecchini – ISIS- expériences de Nicolas Calimet*)

La première idée a été d'intégrer des cycles proline comme bras espaceurs afin de rigidifier la structure, ce qui a donné naissance au MAMp5 dont la modélisation moléculaire n'a pas donné les effets escomptés (**figure 62**).

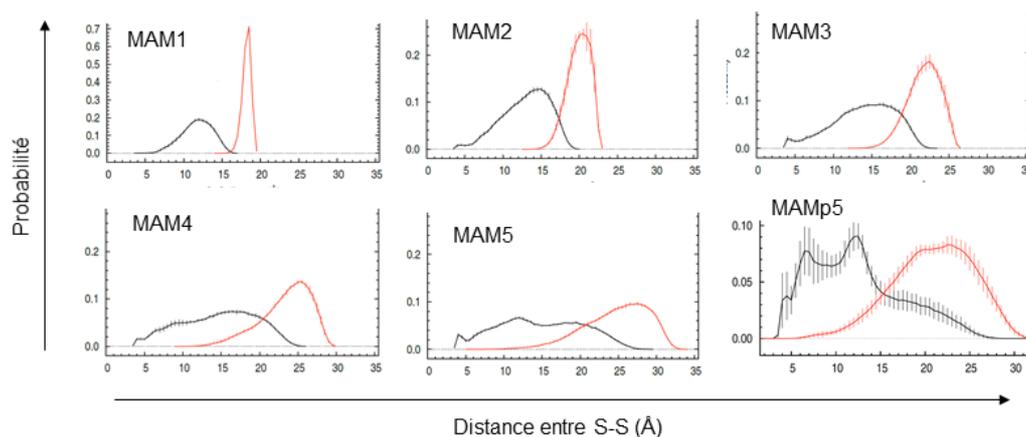


Figure 62: Probabilité de distributions de taille des isomères *cis* et *trans* des MAMs

La deuxième idée a donc été de se servir de la rigidité induite par des cycles phényle afin d'augmenter la distance entre les extrémités de la molécule sans générer des états conformationnels supplémentaires. La modélisation moléculaire a permis de mettre en évidence que la distribution de taille pour les isomères *cis* et *trans* était beaucoup plus fine et précise (**figure 63**).

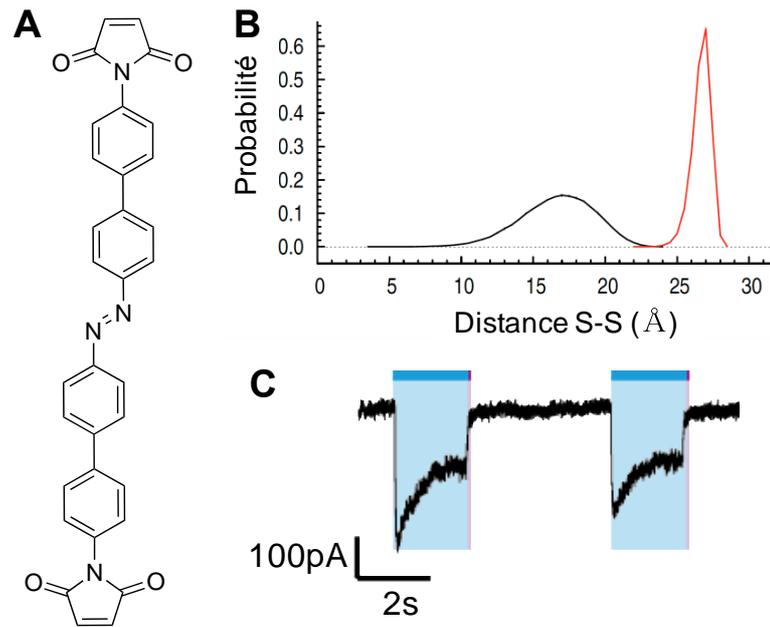


Figure 63: Utilisation potentielle du MAMBp1 comme règle moléculaire. A. Structure du MAMBp1. **B.** Probabilité de distribution de tailles des isomères *cis* et *trans* calculées entre les sulfures des cystéines liées aux malimides terminaux de la molécule (Modélisation : *Nicolas Calimet*). **C.** Photo-régulation des récepteurs rP2X2 avec le MAMBp1 sur la position I328C (longueurs d'onde d'irradiation : 365nm (UV) et 530nm (Visible)).

Une perspective intéressante pourrait donc d'utiliser ces molécules (MAMBp1 et MAMBp2) afin de mesurer des distances inter-résidus.

DISCUSSION

1. Solubilité des outils

Nous avons décidé de commencer nos synthèses avec des azobenzènes commerciaux substitués en *para* (qui est la position nous permettant de maximiser les distances entre les extrémités des molécules) au lieu de synthétiser des azobenzènes nous-même. Ces synthèses nous ont permis d'obtenir une gamme de huit molécules différentes possédant des propriétés de flexibilité et de taille intéressante pour l'étude de mouvements moléculaires et de distances interatomiques. Cependant, bien que ces outils semblent extrêmement versatiles pour la détermination de mouvements moléculaires, leur utilisation semble limitée à des zones transmembranaires probablement en raison de leur manque de solubilité dans les solvants aqueux (**tableau 8**).

	Prédicteur chemdraw	Prédicteur ACDLab
MAM1	2,69	1,56 +/-1,18
MAM2	1,54	1,74 +/-0,91
MAM3	0,39	1,91 +/-0,51
MAM4	-0,76	0,97 +/-0,63
MAM5	-1,91	0,02 +/-0,71
MAMBP	6,04	4,48 +/-0,70
MAMBP2	3,74	4,26 +/-0,57

Tableau 8: Comparaison des prédictions des LogP

Afin d'utiliser ce type d'outils dans d'autres régions, il pourrait être opportun d'en augmenter la solubilité par des substitutions sur les cycles phényles avec des groupements sulfonates ou PEGs.

2. Pertinence des états piégés avec ces molécules : vérification des propriétés biophysiques du récepteur.

Les mouvements induits semblent cohérents avec des mouvements physiologiques car les propriétés des récepteurs P2X, notamment la conductance et la sélectivité des ions sont vérifiées (Habermacher et al., 2016).

De plus, concernant les effets induits par ces molécules dans les récepteurs P2X, nous avons pu mettre en évidence que certaines zones d'ancrage (symbolisées par des mutations cystéines dans certaines positions) ne menaient pas à une photo-régulation, malgré le pontage effectif de deux sous-unités par les MAMs observé par gel d'électrophorèse SDS-PAGE, ce qui consiste en un argument appuyant le fait que ces outils n'introduiraient pas de désordre dans les récepteurs P2X dans nos conditions et seraient de véritables révélateurs de mouvements moléculaires préexistants dans les protéines.

3. Conséquences biologiques de notre étude sur la « dilatation » des récepteurs P2X

Premièrement, nous avons pu démontrer à l'aide des MAMs les mouvements moléculaires des hélices transmembranaires impliqués dans l'ouverture du pore ionique menant à la perméabilité aux cations Na^+ mais aussi aux plus gros cations tels que le NMDG^+ . Ces études nous ont permis de remettre en question l'état dit « dilaté » des récepteurs P2X et de postuler qu'il ne s'agit pas d'un état distinct mais bien d'une perméabilité accrue immédiate des récepteurs P2X. Nous avons pu également mettre en évidence un cation naturel pouvant transiter à travers le pore des récepteurs P2X, la spermidine.

Ainsi, nous pouvons postuler que les récepteurs P2X ont, dans l'état ouvert, trois possibilités d'action sur les paramètres d'une cellule :

- Changement de polarité membranaire
- Influx/efflux de cations
- Signalisation médiée par des polyamines

Cette dernière possibilité était inattendue car aucune étude n'avait, d'après nos connaissances, montrée le passage d'une molécule physiologique via ce pore ionique. Cela soulève la question de leur implication insoupçonnée dans des processus physiologiques et notamment de leur participation à la modulation d'autres canaux, induite par les polyamines.

CONCLUSION/PERSPECTIVES

1. Générales

Si on effectue un comparatif des méthodes impliquant des fonctions photo-isomérisables pour contrôler et étudier des récepteurs canaux on peut noter quelques avantages concernant la versatilité de cette méthode dans l'étude de canaux ioniques des agrafes photo-isomérisables vis-à-vis des autres méthodes optogénétiques (tableau 9).

Les stratégies opto-génétiques	Opto-génétique pharmacologique	Opto-gating	Opto-tweezers
Applications à d'autres cibles possibles ?	Spécifique d'une cible, nécessite la synthèse d'une nouvelle molécule avec le ligand adapté à chaque nouvelle cible .	Nécessite que la cible soit sensible à l'ammonium quaternaire.	Complètement non spécifique et peut en théorie être appliquée à toutes les cibles s'il est possible d'y faire des mutations cystéines sans en altérer la fonctionnalité

Tableau 9: Mise en évidence des avantages de la méthode des agrafes photo-isomérisables vis-à-vis d'autres méthodes combinant les molécules photo-isomérisables à des manipulations génétiques.

La synthèse d'un grand nombre de molécules de taille et rigidité différente permet aussi l'adaptation de la méthode à d'autres cibles, dont les mouvements moléculaires à étudier seraient, par exemple, de plus grande amplitude.

2. Perspective immédiate sur la dilatation : agrandissement potentiel du pore ionique par mutagenèse dirigée (avec *Juline Beudez*)

2.1. Stratégie et enregistrements en cellule entière

Suivant la publication de notre étude sur la dilatation, quelques questions et pistes nous ont intrigué. Puisque la vitesse et la conductance du passage des molécules plus grosses (NMDG⁺, spermidine) semble être due à une limitation structurale de la taille du pore ionique, notamment au niveau de certains acides aminés ayant l'air de « rétrécir » le canal ionique à certains endroits, est-ce que les mutations de ces acides

aminés augmenteraient physiquement la taille du pore ? en d'autres termes est-ce que si l'on cible des résidus assez gros, localisés dans les zones les plus étroites du canal et qu'on les mute en résidus plus petits on augmenterait la conductance du NMDG ?

Les mutants I328C, N333C et T336C ont montré avoir une réponse ATP inhibée par l'application de différentes tailles de MTS (méthanethiosulfonates) (Rassendren et al., 1997b). Cette accessibilité montre qu'ils sont localisés vers l'intérieur du pore. De plus, à l'observation des structures cristallographiques, le résidu T339 semble être localisé dans la partie la plus étroite du pore.

Nous avons donc décidé de cibler les acides aminés N333, T336 et T339 (**figure 64A**) et de les muter en alanine et d'effectuer des enregistrements en conditions symétriques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{NMDG}^+_{\text{out}}$ et bi-ioniques $\text{Na}^+_{\text{in}}/\text{Na}^+_{\text{out}}$ afin d'observer si les mutants d'alanine permettaient d'augmenter le ratio $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$.

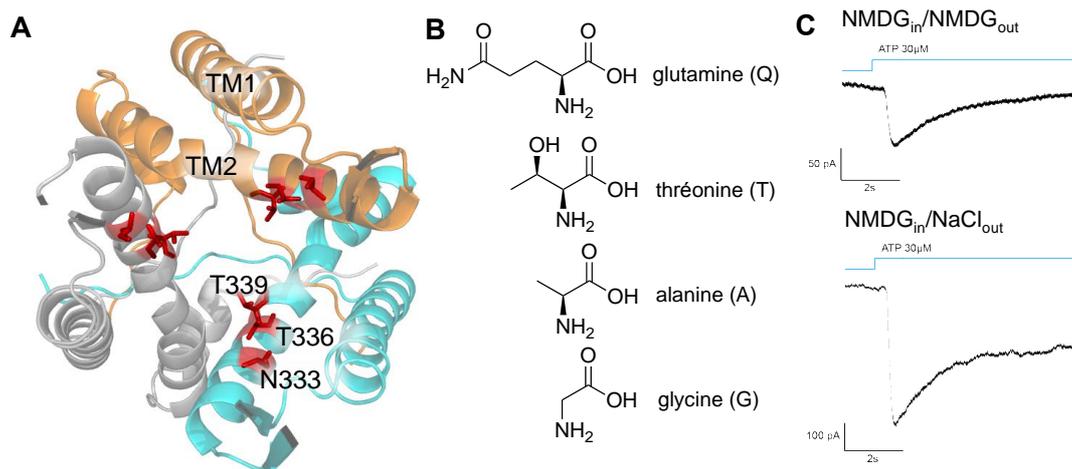


Figure 64: Stratégie d'agrandissement du pore ionique des récepteurs P2X par mutagenèse dirigée. **A.** Localisation des équivalents des acides aminés N333, T336 et T339 sur rP2X2 sur la structure des récepteurs hP2X3 (vue d'au-dessus) **B.** Structure des acides aminés choisis pour effectuer des mutations. **C.** Enregistrements électrophysiologiques en configuration whole-cell en conditions symétriques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{NMDG}^+_{\text{out}}$ et bi-ioniques $\text{NMDG}^+_{\text{in}}/\text{Na}^+_{\text{out}}$ pour le mutant T339A sur la même cellule.

Des expériences de whole-cell ont été effectuées sur les mutants N333A, T336A et T339A (**figure 63C**) et un ratio $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$ augmenté a été observé pour le mutant T339A (**tableau 10**).

Mutation	N333A <i>n</i> =3	T336A <i>n</i> =3	T339A <i>n</i> =6
Ratio (Moyenne $I_{\text{NMDG}}/I_{\text{Na}}$)	15%	16%	24%

Tableau 10: Résultats des Ratios $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$ obtenus en conditions cellule entière sur les trois mutants alanine effectués.

On a ainsi pu observer que le mutant T339A engendrait une différence de ratio par rapport au contrôle du récepteur non muté rP2X2-3T que nous avons déterminé (voir **figure 53**). Nous avons donc décidé d'explorer cette position et d'y effectuer différentes mutations (**figure 64B**) sensées augmenter ou diminuer la taille du pore et d'en observer les conséquences sur la conductance des ions sodium, du NMDG⁺ et de la spermidine en canal unique. Nous avons donc effectué des enregistrements sur les récepteurs hP2X2-GFP, rP2X2 et rP2X4 ainsi que sur les mutants T339G, T339A et T339Q (**figures 65 et 66**).

2.2. Enregistrements en canal unique sur le mutant T339A.

Nous avons commencé à explorer la position T339A (**figure 65**). Des enregistrements en canal unique en conditions spermidine symétriques ($\text{SPD}_{\text{in}}/\text{SPD}_{\text{out}}$) ont été effectués pour la première fois grâce à l'élaboration d'une solution de spermidineF (**figure 65C**), mais étant donné l'instabilité des patchs il nous a semblé plus judicieux de continuer l'étude avec des solutions de NMDG⁺.

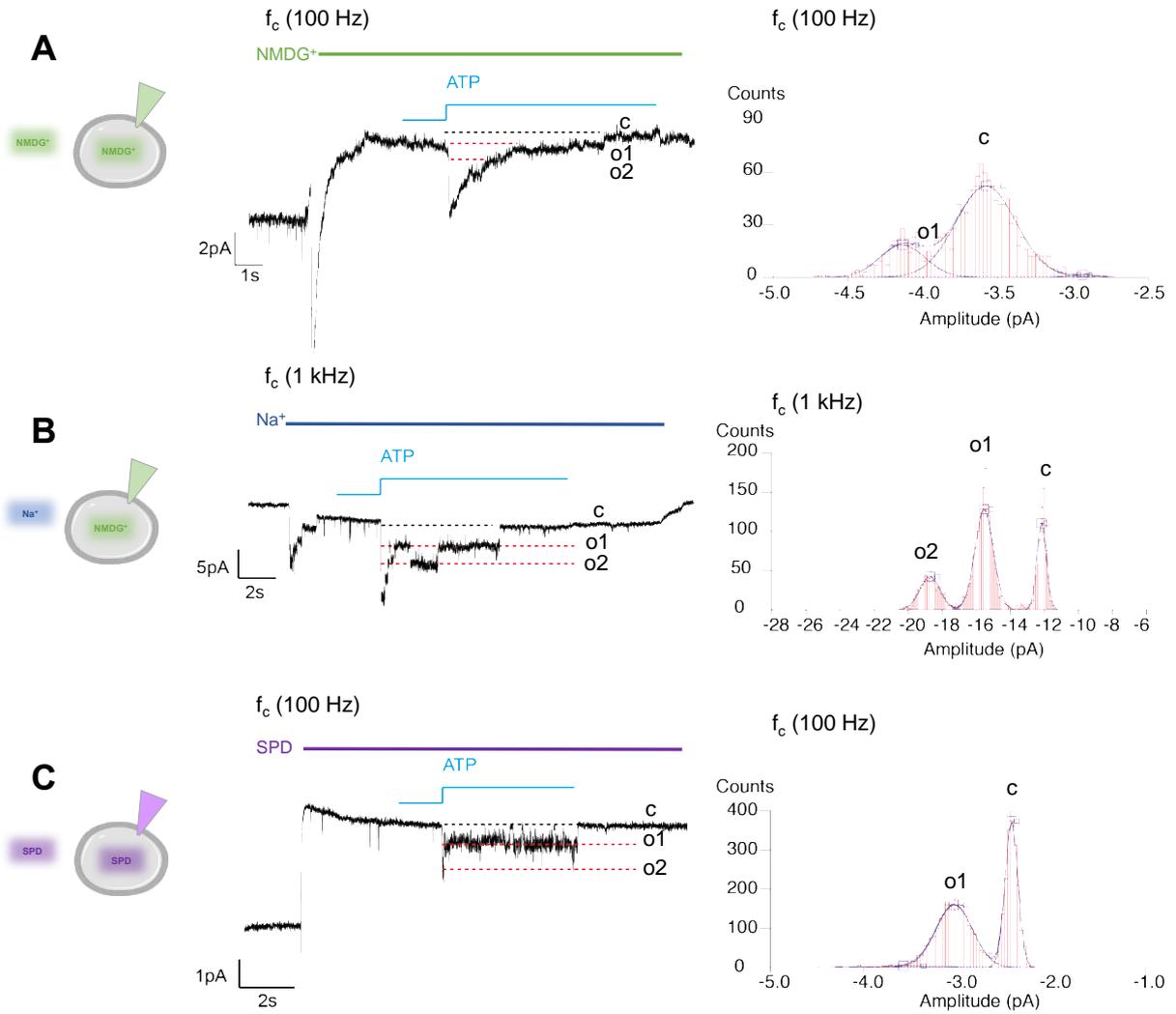


Figure 65: Enregistrements en configuration canal unique sur le mutant T339A de rP2X2-3T. A. et B. Enregistrements en conditions symétriques NMDG⁺_{in}/NMDG⁺_{out} et bi-ioniques NMDG⁺_{in}/Na⁺_{out} sur la même cellule. **C.** Enregistrement en conditions symétriques SPD_{in}/SPD_{out}

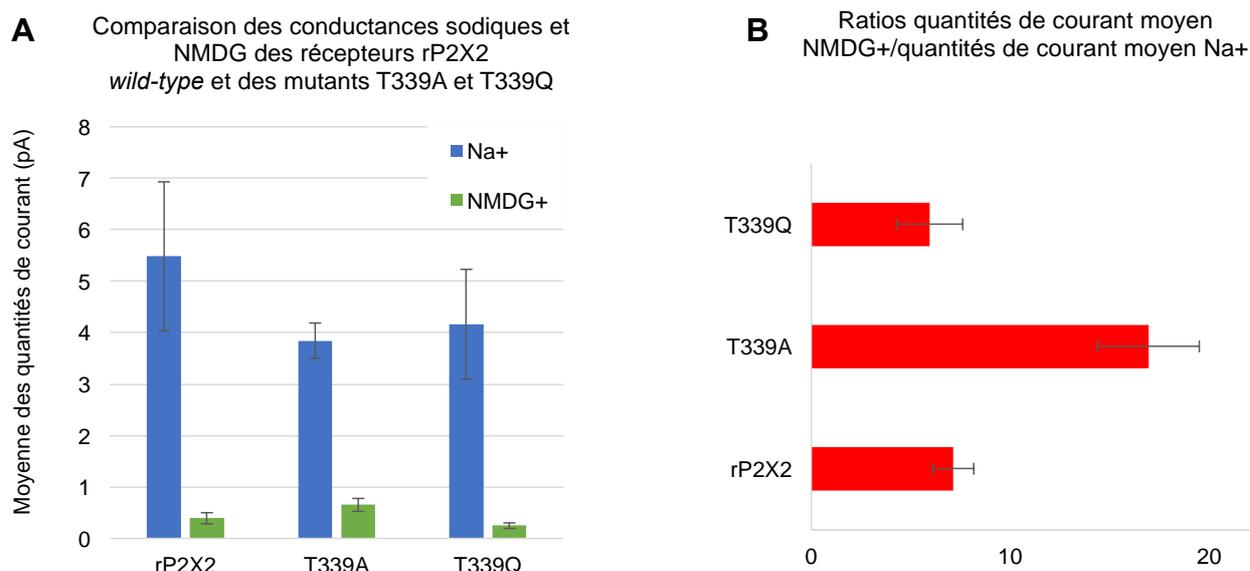


Figure 66 : comparaison des conductances moyennes obtenues sur les mutants T339A et T339Q. A. Conductances moyennes obtenues pour le NMDG⁺ (vert) et le Na⁺ (bleu). **B.** Ratios $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$

Les résultats de conductance NMDG⁺ (figures 65 et 66 et tableau 11) obtenus pour les mutants T339A et T339Q ont été évalués par un T-test et comparés aux données obtenues pour les expériences en single-channel sur le récepteur rP2X2-3T que nous avons obtenues et publiées précédemment (Harkat and Peverini et al., 2017). On obtient une valeur de **P=0.029<0.05** pour le mutant T339A, ce qui signifie que la conductance de ce mutant au NMDG⁺ est significativement différente de la conductance pour le récepteur rP2X2-3T. Concernant le mutant T339Q, on obtient **P=0.066>0.05**, ce qui implique que les résultats concernant la conductance du NMDG⁺ pour ce mutant ne sont pas significativement différents de ceux obtenus pour le récepteur rP2X2-3T.

	rP2X2 (n=3)	hP2X2 (n=4)	T339G (n=3)	T339A (n=6)	T339Q (n=5)	rP2X4 (n=4)
Conductance moyenne Na ⁺ (pA)	-5,482	-6,161	-4,467	-3,800	-4,164	-1,429
Conductance moyenne NMDG ⁺ (pA)	-0,392	-0,334	-0,348	-0,635	-0,247	-0,451
Ratio des conductances (%)	7,15	5,43	7,78	16,71	5,95	31,5

Tableau 11: comparaison des données obtenues en enregistrements canaux uniques

2.3. Enregistrements en canal unique sur deux sous-types de récepteurs P2X différents.

Pour les récepteurs rP2X4, les solutions ont été supplémentées avec 3 μM d'ivermectine (**figure 67B**), suivant une publication récente où les récepteurs P2X4 ont été étudié en « single channel » et ont montré, grâce à cette supplémentation, des courants analysables dans cette configuration (Wang et al., 2017).

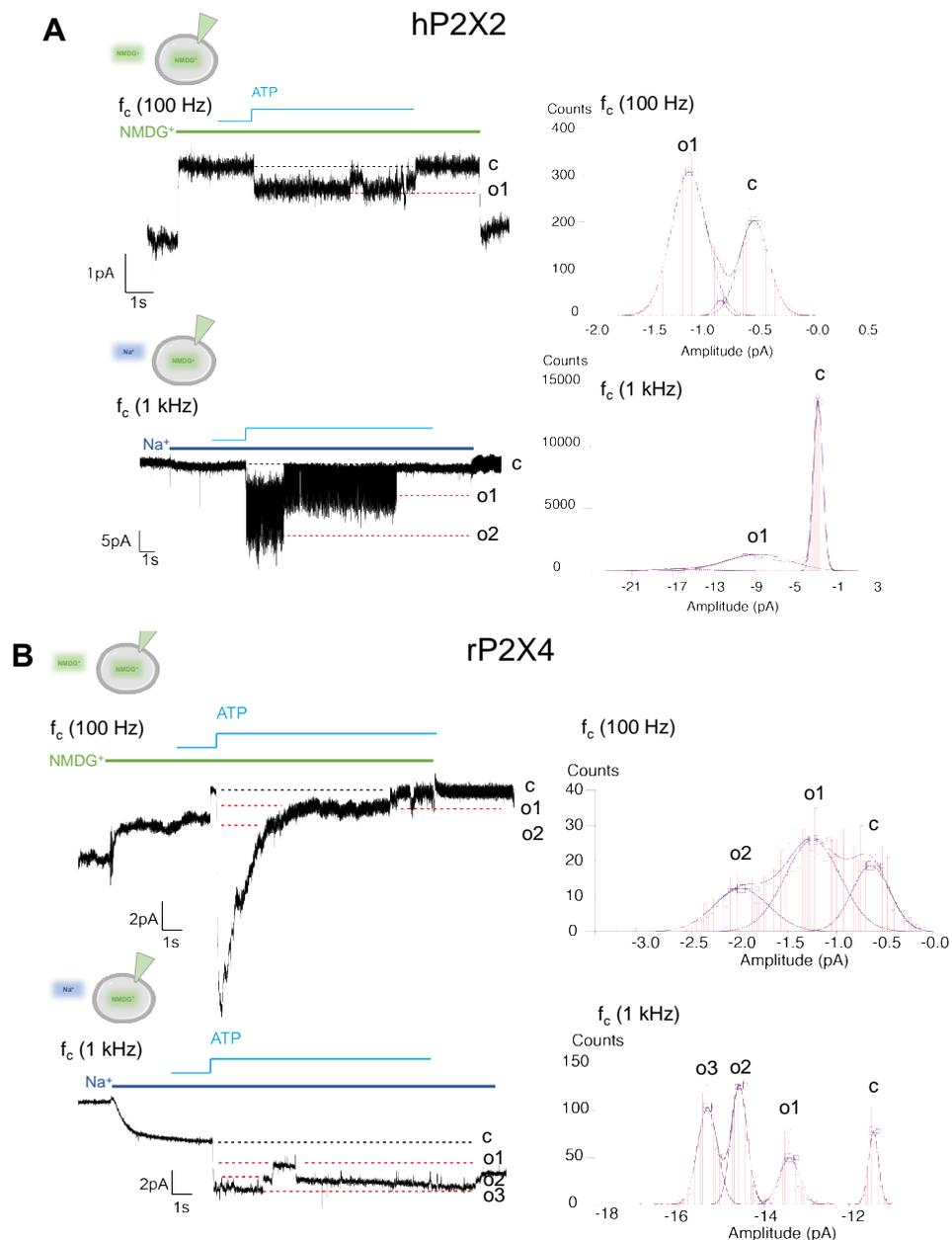


Figure 67: Enregistrements en single-channel en conditions symétriques NMDG⁺_{in}/NMDG⁺_{out} et bi-ioniques NMDG⁺_{in}/Na⁺_{out} sur la même cellule sur deux sous-types des récepteurs P2X. A. Enregistrements sur les récepteurs hP2X2. B. Enregistrements sur les récepteurs rP2X4.

Ces résultats préliminaires sont intéressants car ils montrent une différence de ratio entre les quantités de courant moyens NMDG⁺ et Na⁺ entre les deux sous-types P2X2 et P2X4 (**figure 67** et **tableau 11**), qui pourrait être lié à la différence d'acide aminé situé à cet endroit de l'hélice TM2. En effet, l'équivalent du résidu T339 pour le sous-type P2X2 est une alanine pour le sous-type P2X4 (**figure 68**). Ceci appuie la tendance que nous avons observé pour la mutation T339A (**tableau 11**).

```

I IPTMTTIGSGIGIFGVATVLC rP2X1
L P ITIINLATALTSVGVGSFLC hP2X2
L I P I I I N L A T A L T S I G V G S F L C rP2X2
I IPTIISSVAAFTSVGVGTVLC hP2X3
I IPTIISSVAAFTSVGVGTVLC rP2X3
I IPTLLNIGAGLALLGLVNVIC zfP2X4
I IPTMINVGSLALLGVATVLC rP2X4
I IPTVINIGSGLALMGAGAFFC rP2X5
L IPTAITVGTGAAWLGMVTFLC rP2X6
I IQLVVYIGSTLSYFGLATVCI rP2X7

```

Figure 68: Alignement de séquence des hélices TM2 de différents sous-types des récepteurs P2X. Les équivalents du mutants T339 (rP2X2) sont soulignés en jaune.

3. Autres perspectives actuelles développées au laboratoire à l'aide des MAMs

Le projet de *Kate Dunning*, étudiante en début de 2^{ème} année de thèse au sein du laboratoire, consiste à déterminer à l'aide des MAMs si les mouvements moléculaires observés et mis en évidence lors du gating et du passage de plus gros cations sont similaires et reproductibles pour tous les sous-types des récepteurs P2X. Elle travaille également sur la photo-régulation des récepteurs P2X7 à l'aide de molécules photo-isomérisables.

Le projet de *Juline Beudez*, étudiante en 3^{ème} année de thèse au sein du laboratoire, consiste en l'étude du mécanisme moléculaire de la désensibilisation des récepteurs P2X à l'aide des MAMs. De plus, elle étudie des mutants des récepteurs hP2X2 insensibles à l'ATP impliqués dans les pertes d'audition grâce aux MAMs.

CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE ET INCORPORATION D'ACIDES AMINÉS PHOTO-CLIVABLES

Cette deuxième stratégie est basée sur l'utilisation d'une réaction photo-lytique pour cliver une partie de la protéine fonctionnelle étudiée correctement adressée à la membrane et d'observer directement de ce fait les implications sur la fonction des récepteurs P2X de la zone clivée. Elle nécessite néanmoins l'introduction de l'entité photo-clivable dans la protéine via l'incorporation d'acides aminés non naturels.

1. Incorporation d'acides aminés non naturels- buts et méthodes

L'incorporation d'acides aminés non naturels est une méthode extrêmement flexible pour étudier et conférer de nouvelles propriétés à des protéines. Plusieurs méthodes peuvent permettre de modifier des acides aminés préexistants en nouvelles entités possédant des fonctions chimiques distinctes ou d'incorporer directement des acides aminés non naturels étant porteurs de ces nouvelles propriétés (**tableau 12**).

Incorporation d'acides aminés non naturels	Avantages/inconvénients
Synthèse de peptides	Limité aux petites protéines et peptides
Méthodes semi-synthétiques	Limité aux petites protéines et peptides
Modification chimique d'acides aminés	Limité aux acides aminés accessibles au solvant
Perte de la spécificité d'une amino-acyl ARNt-synthetase	Très limité (les acides aminés doivent être structurellement proches de l'acide aminé primaire) et peu spécifique
Génération d'une nouvelle paire tRNA/synthetase orthogonale pour la suppression de codon STOP ambre (voir chapitre 3)	Difficile à mettre en œuvre mais outil très puissant quand optimisé
Amino-acylation chimique d'un ARNt supprimeur et suppression de codon STOP ambre	Nécessite une quantité importante d'ARNt aminoacylé mais peut permettre d'incorporer en théorie tous les types d'acides aminés

Tableau 12: Méthodes de modifications et incorporations d'acides aminés et leurs limitations (d'après (Liu and Schultz, 2010)).

La synthèse chimique ou l'hémisynthèse d'une protéine ne permet que la génération de petits peptides, ces méthodes ne sont donc pas utilisables dans le cadre de l'étude des récepteurs P2X qui sont des protéines de plusieurs centaines d'acides aminés et qui de surcroît possèdent de nombreuses modifications post-traductionnelles et des structures tridimensionnelles complexes et précises.

Les récepteurs P2X étant des protéines transmembranaires, possédant des parties intracellulaires et leur partie extracellulaire étant très repliée, la modification chimique d'acides aminés n'est pas non plus une méthode stratégique pour leur étude. C'est pourquoi nous avons décidé d'essayer d'incorporer des acides aminés non naturels via une reprogrammation du code génétique en suivant la méthode de suppression de codon stop ambre.

2. Extension du code génétique : intérêt et fonctionnement

L'idée de reprogrammer le code génétique pour incorporer dans les protéines des acides aminés ne faisant pas partie des 20 acides aminés canoniques a été développée en premier lieu par Peter Schultz en 1989, grâce aux travaux pionniers de Sidney Hecht sur l'amino-acylation chimique des ARNt (Hecht et al., 1978). Cette méthode permet de conférer de nouvelles fonctionnalités aux acides aminés et ainsi de s'en servir comme d'outils puissants pour étudier les protéines. L'avantage le plus décisif de cette méthode est qu'elle permet d'introduire à un site spécifique toutes ces propriétés en perturbant le moins possible la structure native de la protéine étudiée. Une croissance exponentielle des travaux sur cette méthode a eu lieu et permet maintenant d'incorporer spécifiquement des acides aminés non naturels au niveau de cellules vivantes, et même d'organismes entiers.

Les possibilités apportées par cette méthode sont nombreuses. Cela a permis, entre autre, de contrôler l'activité de protéines, de disséquer et mettre en évidence, au niveau atomique, les interactions entre résidus, d'explorer des mouvements de protéines, des changements conformationnels, des interactions avec d'autres protéines et d'évaluer des relations structure-fonction et même de générer de nouvelles propriétés dans les protéines ((Pless and Ahern, 2013), (Beene et al., 2003), (Neumann-Staubitz and Neumann, 2016)).

Il existe deux méthodes pour incorporer génétiquement ces acides aminés non naturels via une reprogrammation du code génétique :

- La suppression de codon stop ambre intégré dans le gène d'intérêt par une paire orthogonale amino-acylARNt-synthétase/ARNt suppresseur co-evoluée pour incorporer spécifiquement l'acide aminé non naturel – cette méthode est développée dans le **chapitre 3**
- La suppression d'un codon stop ambre par un ARNt suppresseur orthogonal préalablement chargé par ligation chimique avec l'acide aminé non naturel choisi.

A l'aide de cette deuxième méthode, virtuellement toutes les fonctions chimiques sont tolérées et une grande diversité d'acides aminés a pu être incorporée :

- acides aminés fluorescents, utiles en imagerie (Pantoja et al., 2009)
- acides aminés contenant des fonctions bio-orthogonales pouvant être marqués spécifiquement et facilitant l'incorporation de sondes pour l'étude biophysique de protéines (Lang et al., 2015)
- acides aminés modifiant les squelettes protéiques (Koh et al., 1997)
- acides aminés avec des propriétés photochimiques :
 - « cagés » pour créer des protéines photo-activables (Miller et al., 1998)
 - photo-clivables : pour désactiver des protéines ou effectuer des relations structure-fonction (voir partie sur les acides aminés photo-clivables)
 - photo-réactifs : pour piéger des interactions entre protéines ou des mouvements au sein d'une structure (voir **chapitre 3**)

Cette liste est bien évidemment non exhaustive, ainsi que les utilisations qui sont faites de ces acides aminés, ce domaine étant en constante expansion (Dougherty and Van Arnam, 2014).

2.1. L'aminocyclation chimique des tRNA

Cette méthode bio-synthétique a été développée au sein du laboratoire de Peter Schultz (Noren et al., 1989) sur la base des travaux pionniers de Sidney Hecht (Hecht et al., 1978). Le codon représentant l'acide aminé que l'on veut modifier est muté en codon stop ambre (qui n'est pas reconnu par les facteurs de terminaison chez les eucaryotes).

Un ARNt suppresseur possédant un anti-codon complémentaire au codon stop ambre, va être chargé de manière semi-synthétique : premièrement l'acide aminé, après avoir été protégé sur sa fonction aminé, et activé sur sa fonction acide, va être chargé sur un dinucléotide dCA via une réaction d'estérification. Ensuite une ligase, la T4 ARN ligase, va accrocher le dCA chargé à l'ARNt tronqué.

Cet ARNt, après avoir reconnu son codon, va pouvoir être utilisé par la machinerie cellulaire et l'acide aminé être correctement incorporé au sein de la séquence protéique (figure 69).

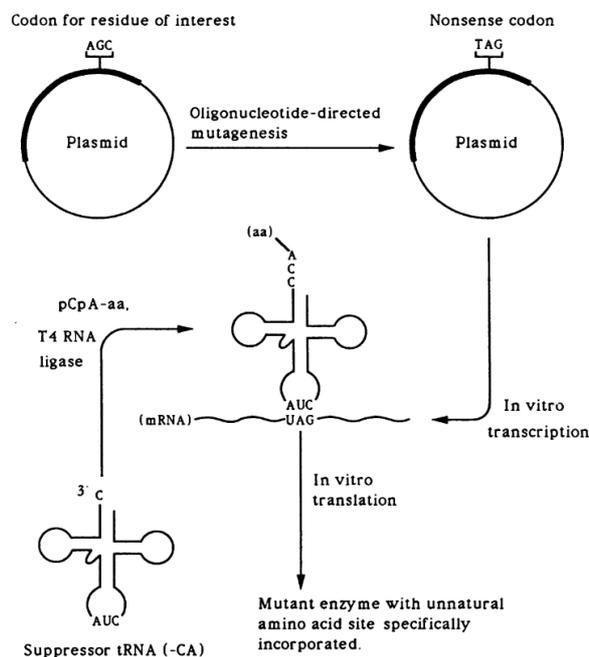


Figure 69: Principe de l'amino-acylation semi-synthétique des ARNt tronqués avec des acides aminés non naturels (Noren et al., 1989).

3. Synthèse et incorporation de nouveaux acides aminés photo-clivables

3.1. La photo-protéolyse

La photo-protéolyse suppose un photo-clivage à un site spécifique, au niveau d'un acide aminé spécifique, libérant des morceaux de chaînes protéiques sans simplement les dégrader (**figure 70**).

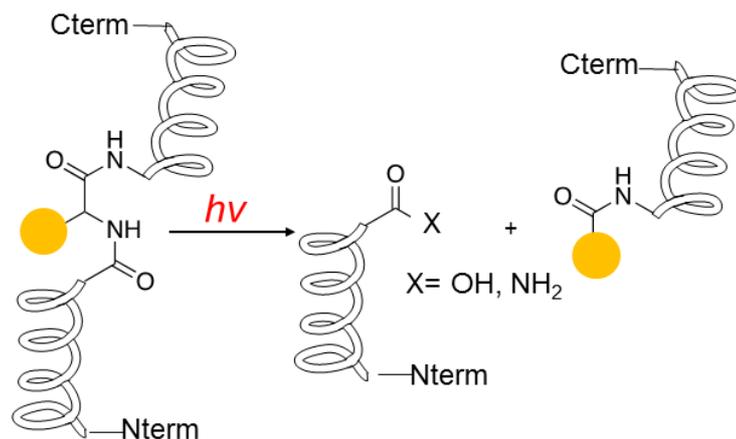


Figure 70: Principe général de la photo-protéolyse. L'incorporation d'un acide aminé photo-clivable dans la chaîne peptidique doit pouvoir cliver, après irradiation, au site spécifique d'incorporation, la protéine, sans en abîmer la structure, pour donner deux polypeptides.

Il s'agit d'un outil puissant pour étudier les relations structures fonctions des protéines. En effet, incorporé dans la structure protéique, un acide aminé permettrait, après photo-clivage, d'évaluer l'importance de la zone ou partie clivée sur la fonctionnalité du récepteur correctement adressé à la membrane et sous sa forme la plus proche de sa structure native. Le clivage « direct » par mutagenèse dirigée par exemple, aurait des effets directs sur l'adressage de la protéine à la membrane.

3.2. Les groupements photo-clivables utilisés pour « cager » des biomolécules

3.2.1. Historique

A la fin des années 1970, Kaplan et ses collègues ont pour la première fois utilisé un précurseur photolytique d'une molécule biologique, il s'agissait de l'ATP et celui-ci a

pu être relargué à partir de précurseurs de la famille des ortho-nitrobenzyle (**figure 71**), et a été utilisé pour étudier la pompe Na/K (Kaplan et al., 1978).

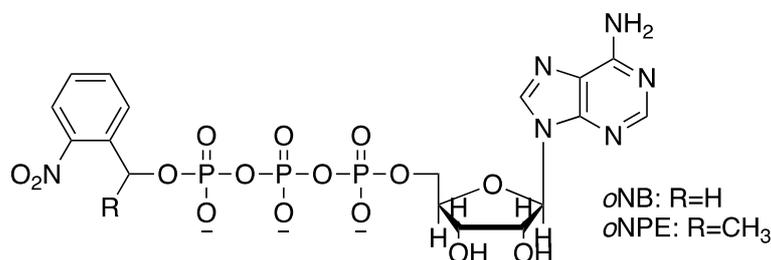


Figure 71: ATP « cagé » à l'aide de groupements ortho-nitrobenzyles (Kaplan et al., 1978).

Depuis des années, les réactions photo-lytiques sont très utilisées dans l'étude de phénomènes biologiques, notamment dans le cadre de composés dit « cagés ». Il s'agit de molécules effectrices (agonistes, antagonistes, modulateurs...) rendues inactives par la liaison d'un groupement protecteur photo-clivable qui va temporairement masquer leur activité. Après une irradiation de longueur d'onde appropriée, la molécule effectrice est libérée et peut agir sur sa cible biologique, engendrant l'effet biologique étudié.

3.2.2. Les caractéristiques d'un bon groupement protecteur photolabile et les principaux GPP

Cette stratégie d'étude nécessite donc l'utilisation d'un bon groupement protecteur photolabile (GPP), qui doit remplir le plus possible les critères suivants (Pelliccioli and Wirz, 2002) :

- Procéder via une réaction propre et avec un bon rendement quantique ϕ
- Avoir un ϵ (coefficient d'absorption molaire) élevé
- Ses sous-produits de réaction doivent être inertes dans le milieu d'étude
- Il doit être soluble dans le milieu d'étude choisi
- Il doit être inerte avant d'être irradié

Plusieurs familles de GPP existent, remplissant plusieurs de ces critères, étant choisi pour s'adapter à la cible étudiée (**tableau 13**).

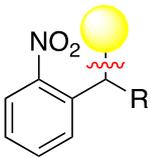
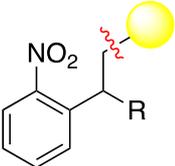
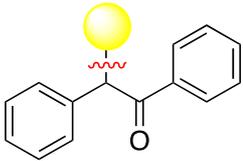
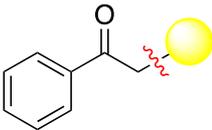
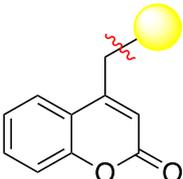
GPP	Structure	Avantages	Inconvénients	Types de liaison clivées
o-NB		GPP le plus communément utilisé, une gamme importante est commerciale petit	Sous-produits fréquemment toxiques efficace surtout dans l'UV	Phosphates, carboxylates, alcools, éthers, amines, amides
o-NPE		Petit Efficaces dans le proche Visible	Mécanisme photochimique complexe	Phosphates, carboxylates, alcools, éthers, amines, amides
Benzoyne		Bons rendements quantiques et taux de relargage	Absorbance forte à 300nm Fluorescence forte du sous-produit (benzofurane)	Phosphates, carboxylates, alcools, amines
Phénacyle		Stable et soluble dans l'eau et les milieux biologiques Précurseurs commerciaux et synthèse rapide Relargage rapide Sous-produits non toxiques	Efficace surtout dans l'UV	Phosphates, carboxylates, sulfates,
Coumarine		ε et vitesse de relargage hautes Propriétés modulables par la substitution	Trop hydrophobes	Phosphates, carboxylates, alcools,

Tableau 13: Les groupements photolabiles les plus courants, d'après (Brieke et al., 2012) et (Klán et al., 2013).

3.2.3. Contrôle de récepteurs canaux via des réactions photo-lytiques

Des récepteurs ionotropiques au GABA (GABA_A) ont été activés après irradiation bi-photonique d'un précurseur photo-clivable de ce neurotransmetteur (**figure 72**) (Donato et al., 2012).

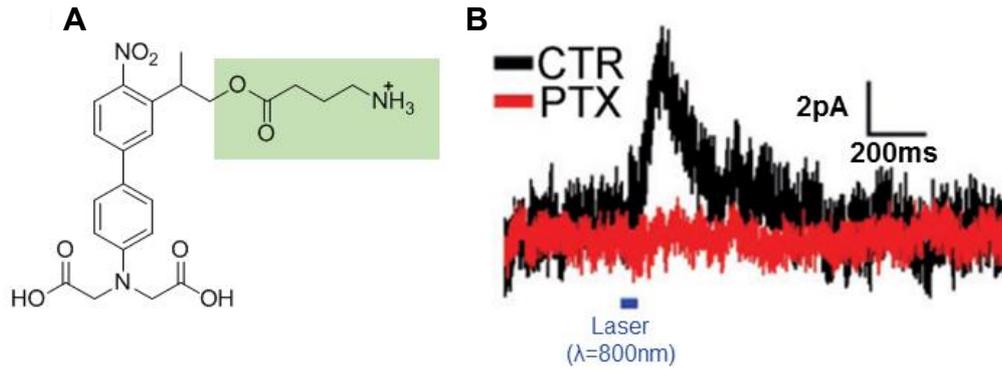


Figure 72: Photoactivation des récepteurs du GABA_A à l'aide d'un précurseur photolabile. **A.** Structure du précurseur photolabile, composé d'un « cage » CANBP lié à une molécule de GABA. **B.** Application du composé A sur des tranches de cerveau de rat (PTX= picrotoxine, antagoniste des récepteurs GABA_A)

Le contrôle de l'activité des récepteurs au NMDA a pu être effectué à partir de β -o-DNB-NMDA (**figure 73**) (Gee et al., 1999).

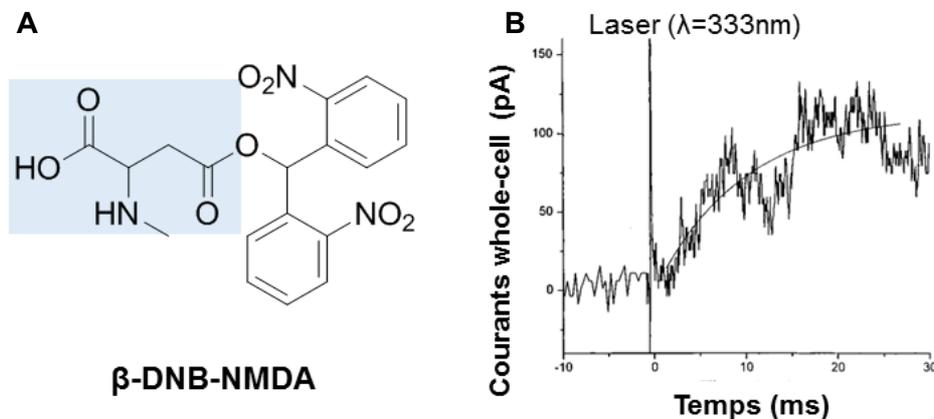


Figure 73: Photo-activation des récepteurs au NMDA par un précurseur photolabile de NMDA. **A.** Structure du composé. **B.** Activation des récepteurs au NMDA, enregistrement whole-cell d'un neurone d'hippocampe de rat incubé avec la molécule après irradiation laser.

De l'ATP cagé a été utilisé dans l'activation des récepteurs P2X2 en 2003 (**figure 74**) (Zemelman et al., 2003).

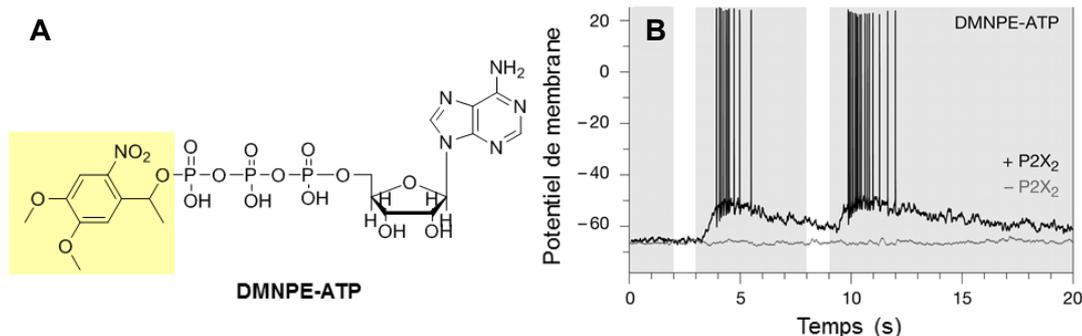


Figure 74: Photo-activation des récepteurs canaux P2X par le DMNPE-ATP. A. Structure de la molécule cagée. **B.** Activation des récepteurs P2X2 par le DMNPE-ATP.

3.3. Libération de composés lié via des fonctions amides

Il existe peu de groupements photo-clivables efficaces attachés via des liaisons amides. Jusqu'à présent, deux exemples ont seulement été publiés d'acides aminés photo-clivables.

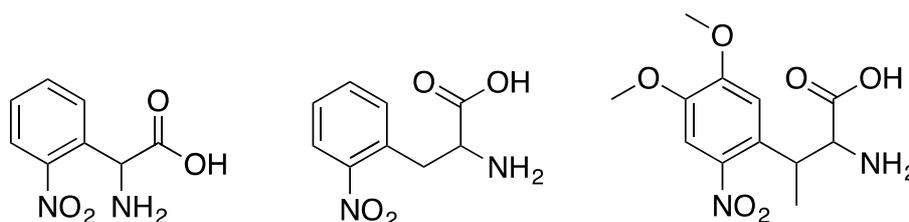


Figure 75: Structures chimiques des acides aminés photo-clivables publiés précédemment. De gauche à droite : *o*-NPG (England et al., 1997), *o*-NPA (Peters et al., 2009), CH₃-DMNPA.

1. Le premier acide aminé est la 2-nitrophénylglycine (*o*-NPG), basée sur le groupement *ortho*-nitrobenzyle, développé par l'équipe de Dennis Dougherty (England et al., 1997) et qui a été correctement incorporé dans des ovocytes de Xénopes via amino-acylation chimique d'un ARNt suppresseur et a mené à un photo-clivage site-dépendant sur différentes cibles. Quoiqu'efficace, et utile pour mettre en évidence certaines relations structures fonctions, et photo-activer les cibles étudiées, les performances de cet acide aminé sont limitées : 50% de clivage après 4h à $\lambda_{excitation}$: 300nm. Cet acide aminé a permis cependant la photo-régulation des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine et

des canaux potassiques Shaker B K⁺ de Drosophile et de contrôler *in vitro* une caspase (England et al., 1997).

2. La 2-nitrophénylalanine (o-Npa) développée par l'équipe de Peter Schultz a montré 22(+/-5)% de clivage après 1h à λ excitation de 300nm mais a pu être incorporé via suppression d'un codon stop ambre avec une paire orthogonale évoluée de *Methanococcus jannaschii* ARNt^{Tyr}_{CUA}-TyrosylARNt synthétase dans le lysozyme T4 de E. Coli (Peters et al., 2009).
3. β -Methyl-[4,5-dimethoxy-2-nitro]phenylalanine (CH₃-DMNPA) : (synthétisé au laboratoire par le docteur *Portia Duodu*, non publié) a montré, après 40min irradiation à 365nm, un clivage spécifique de 10 à 25%.

Globalement, ces longueurs d'onde d'irradiation sont incompatibles avec des études dans des cellules. Plus les longueurs d'ondes d'irradiation sont supérieures à 300nm moins elles sont susceptibles d'être absorbées par les composants biologiques et de causer des dommages.

De plus, les rendements de photo-clivage sont faibles : on peut se demander si l'influence sur la fonction biologique éventuellement observée suite à la photo-protéolyse est bien due au clivage.

3.4. La famille des ortho-nitrophénétyles : choix et mécanisme de photo-clivage

Les ortho-phénétyles, partageant avec les ortho-nitrobenzyle une structure de petite taille, ont un avantage important par rapport à cette famille. Après photo-clivage, ils n'induisent pas de formation de nitrosoaldéhyde pouvant être délétère pour les milieux biologiques. De plus, ils ont montré être plus efficace en termes de quantité de photoclivage.

Le mécanisme menant au clivage de cette famille de composé a été étudié en détails par le groupe de Pfeleiderer par des expériences de spectroscopie infra-rouge en temps résolu (**figure 76**). La première étape du clivage passe par la formation d'un composé

aci-nitro via un transfert intramoléculaire d'hydrogène, qui semble être l'étape limitante du photo-clivage. Celui-ci peut mener après un réarrangement à une β -élimination aboutissant au clivage effectif de la liaison (**figure 75A**), ou mener à un dérivé nitroso (**figure 75B**). Les deux mécanismes ont montré être en compétition, la β -élimination advenant après dissociation d'un proton de l'intermédiaire *aci-nitro*, alors que le composé non dissocié aura plus tendance à emprunter la deuxième voie photochimique menant au composé nitroso pouvant se réarranger ou non en fonction des conditions (Walbert et al., 2001).

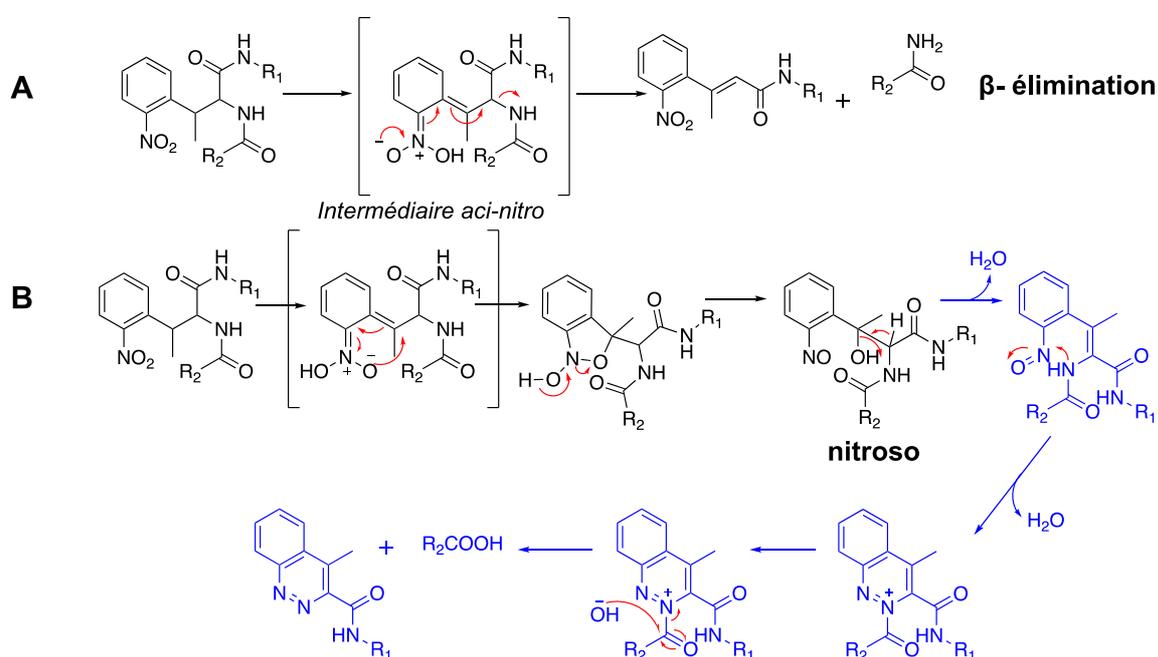


Figure 76: Mécanismes généraux de photo-clivage des ortho-nitrophénylés. **A.** La première voie photochimique est adaptée de (Walbert et al., 2001) et provient d'études mécanistiques sur le groupement ortho-nitrophenyle et mène à une β -élimination. **B.** La seconde voie, notamment le réarrangement du nitroso (partie bleue) a été proposée par l'équipe de Peter Schultz pour expliquer les observations qu'ils ont fait sur la 2-nitrophénylalanine (Peters et al., 2009). La partie bleue correspond à une voie non observée pour le photo-clivage du CH_3 -DMNPA dont le mécanisme s'était arrêté à l'obtention du composé nitroso.

STRATEGIE GENERALE

1. Choix de nouvelles structures

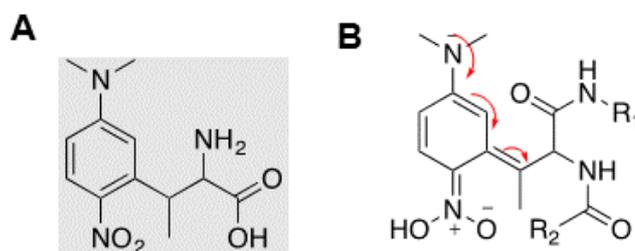
Les nouvelles structures ont été conçues pour répondre à certains critères :

1. Taille la plus réduite possible pour minimiser le plus possible la perturbation de la structure protéique,
2. Ajout de groupements pour favoriser la β -élimination ou pour défavoriser la formation du nitroso,
3. Essayer d'augmenter les longueurs d'ondes d'absorbance maximales.

Trois structures ont ainsi été proposée :

Acide aminé 1 : le doublet libre de l'azote affaiblit par mésomérie le centre électrophile responsable de l'attaque de l'oxygène et de la cyclisation menant au composé nitroso.

Figure 77: Structure de l'acide aminé 1. A. Structure finale souhaitée. **B.** Explication mécanistique de l'affaiblissement du centre électrophile.



Acide aminé 2 : les groupements CF₃ stabilisent les carbanions par effet inductif

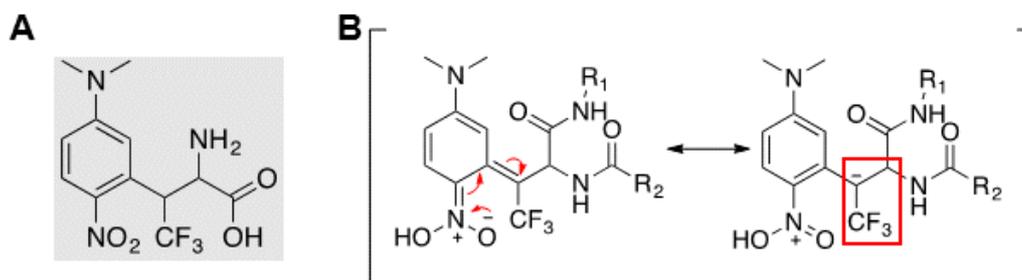


Figure 78: Structure de l'acide aminé 2. A. Structure finale souhaitée. **B.** Formes mésomères expliquant l'affaiblissement du centre électrophile.

Acide aminé 3: cette structure est adaptée d'un groupement étudié en détail au laboratoire, et qui quoique volumineuse (pour un acide aminé), montre de bonnes propriétés de photolyse vis-à-vis d'autres types de liaisons (notamment les liaisons esters) à des longueurs d'ondes intéressantes pour l'étude du vivant, λ_{max} (monophoton) = 397nm. (Donato et al., 2012)

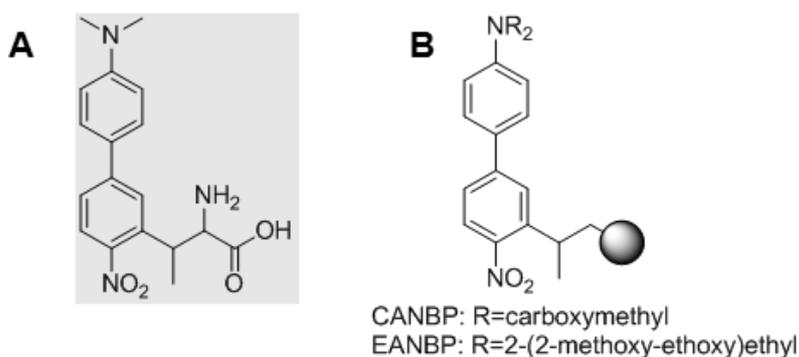


Figure 79: Structure de l'acide aminé 3. A. Structure finale. **B.** Groupements protecteurs photolabiles sur lesquels est basée la structure de l'acide aminé 3.

2. Stratégie globale de synthèse : Synthèse d'acides α -aminés de O'Donnell.

La stratégie a été d'élaborer la construction de l'acide aminé non naturel via l'alkylation de dérivés de glycine protégés sous forme d'imine benzophénone sur le groupement aminé, et par un ester de *tert*-butyle sur la partie acide carboxylique. Ce dérivé, mis au point par Martin J. O'Donnell (O'Donnell et al., 1978), constitue une base de Schiff stable, précurseur d'anion α de glycine, pouvant être alkylée en conditions basiques en présence de catalyseur de transfert de phase (O'Donnell, 2004). La réussite de la stratégie est basée sur le fait que la protection sous forme d'imine augmente l'acidité des protons en α de l'azote (le pKa a été déterminé de 18,7 pour le dérivé ester d'éthyle (O'Donnell et al., 1988)) et que la double liaison C=N stabilise ensuite le carbanion ainsi formé par arrachage de ce proton avec une base (**figure 80**).

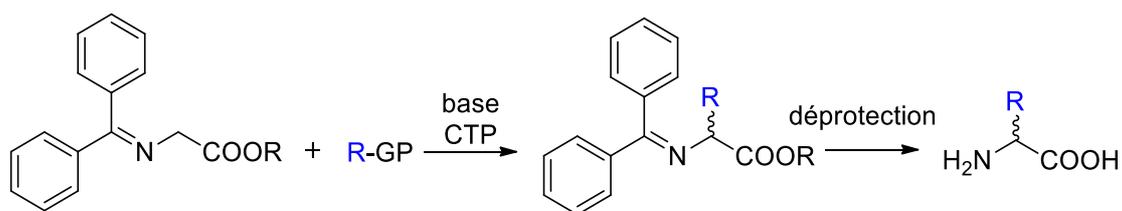


Figure 80: Stratégie globale de la synthèse d'acides aminés d' O'Donnell. CTP: catalyseur de transfert de phase.

Nous avons donc préparé des précurseurs d'acides aminés possédant de bons groupements partants afin d'alkyler le dérivé de glycine de O'Donnell. Un précurseur d'acide aminé, dont la synthèse a été développée, a pu être alkylé avec succès, deux autres précurseurs ont été synthétisés mais, pour le moment, leur alkylation n'a pas encore été effective.

Nous avons choisi de développer des synthèses menant à des composés racémiques. En effet, l'ARNt ne peut être chargé qu'avec un acide aminé L, ce qui fait que l'acide aminé dont la stéréochimie n'est pas souhaitée sera simplement éliminé à ce niveau de l'étude.

3. Evaluation des propriétés photochimiques

Afin de pouvoir étudier les caractéristiques photochimiques des acides aminés photo-clivables nous avons décidé de les incorporer chimiquement dans des tripeptides ou mimes de tripeptides et ainsi d'évaluer l'efficacité de photolyse de nos composés.

4. Incorporation d'un composé photo-clivable dans des cibles biologiques

Pour pouvoir insérer ces acides aminés dans des cibles biologiques nous avons choisi la méthode de suppression de codon STOP ambre par un ARNt supprimeur amino-acylé chimiquement.

PARTIE EXPERIMENTALE ET RESULTATS

1. Synthèse et caractérisation photochimique des acides aminés

1.1. Acide aminé 1

La synthèse de l'acide aminé 1 commence avec la 3'-fluoroacétophénone qui est commerciale et est suivie par une nitration (substitution électrophile aromatique) puis d'une substitution nucléophile aromatique qui permet d'ajouter le groupement diméthyle amine. Une réduction permet de générer un alcool qui va être bromé via une réaction d'Appel. Ce résidu va subir une substitution nucléophile avec la glycine d'O' Donnell pour former l'acide aminé protégé qui sera ensuite déprotégé.

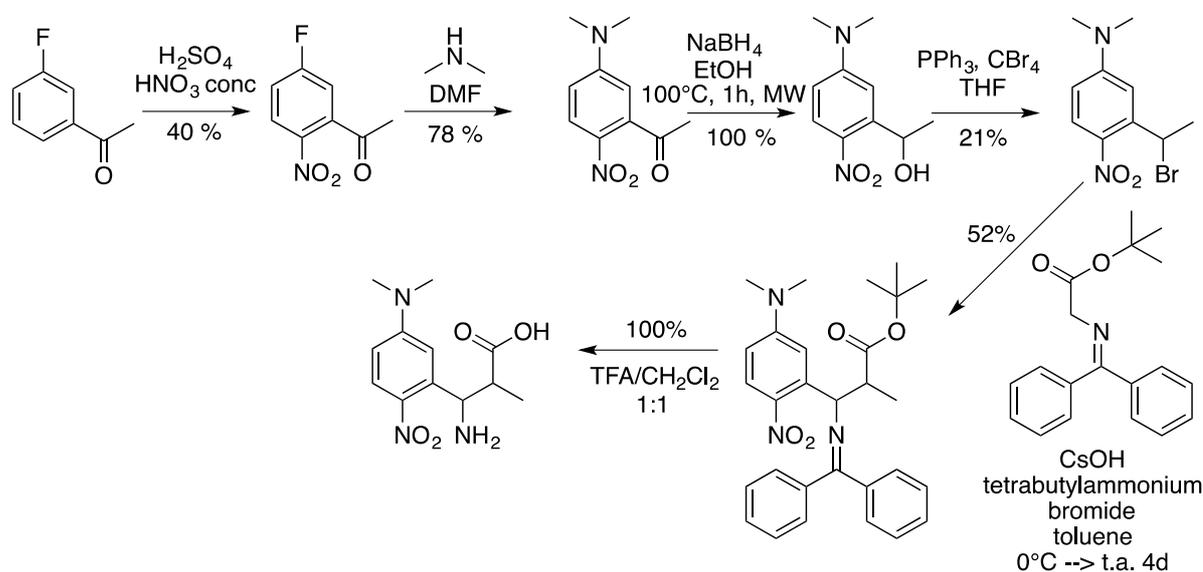
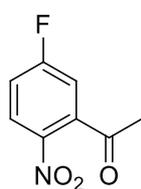


Figure 81: Schéma général de la synthèse de l'acide aminé 1



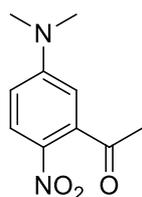
1-(5-fluoro-2-nitrophenyl)ethan-1-one : à une solution de 3'-fluoroacétophénone (2mL, 16.2 mmol) dans de l'acide sulfurique (40mL) refroidie à 0°C est ajouté gouttes-à-gouttes de l'acide nitrique concentré (812 μL , 19.46 mmol). La réaction est agitée pendant 1h. Après neutralisation avec 200mL d'eau distillée, le mélange est extrait avec 3x150mL de dichlorométhane. Les fractions organiques sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de

silice (10% d'acétate d'éthyle dans l'heptane) pour donner le composé huileux jaune (1.2g, 6.554mmol, 40%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3-d) δ ppm: 8.1705 (q, 1H, $J=4.6\text{Hz}$), 7.247 (triplet dédoublé, 1H, $J=8.1\text{Hz}$, $j=2.8\text{Hz}$), 7.063 (dd, 1H, $J=8.1\text{Hz}$, $J=2.8\text{Hz}$)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3-d) δ ppm: 198.658, 167.329, 164.737, 141.809, 128.053, 117.767, 115.269, 30.610

(ESI-HRMS): (m/z, $M+H$)⁺ : calculé pour $\text{C}_8\text{H}_7\text{FNO}_3^+$: 184.0404, trouvé : 184.04076



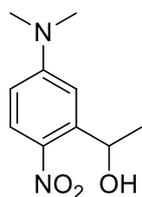
1-[5-(diméthylamino)-2-nitrophenyl]éthan-1-one :

1,2 g de 1-(5-fluoro-2-nitrophenyl)éthan-1-one (6.552mmol) sont dilués dans de la DMF (20mL). Ensuite, 6,552 mL (13.1 mmol) de diméthylamine sont ajoutés. Un changement de couleur a lieu Presque instantanément, donnant une solution jaune vif et le mélange est laissé agiter 10 minutes supplémentaires. Après évaporation de la DMF, le produit est purifié par recristallisation dans le méthanol donnant des cristaux brillants jaunes de texture fibreuse (1.064g, 5.111mmol, 78%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3-d) δ ppm: 8.06 (d, 1H, $J=9.5\text{Hz}$), 6.6 (dd, 1H, $J=9.5\text{Hz}$, $J=2.7\text{Hz}$), 6.336 (d, 1H, $J=2.7\text{Hz}$), 3.105 (s, 6H), 2.478 (s, 3H)

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3-d) δ ppm: 201.818, 154.209, 142.135, 132.358, 127.414, 111.066, 107.973, 40.528, 30.768

(ESI-HRMS): (m/z, $M+H$)⁺ : calculé pour $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3^+$: 209.0921, trouvé : 209.0924



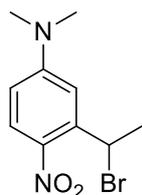
1-[5-(diméthylamino)-2-nitrophenyl]éthan-1-ol : à une solution de 1-[5-(diméthylamino)-2-nitrophenyl]éthan-1-one (850mg, 4.082mmol) dans de l'éthanol (14mL) est ajouté du borohydrure de sodium (170mg, 4.493mmol). le mélange est chauffé à 100°C pendant une heure au micro-

ondes. Après évaporation de l'alcool, le brut est dissous dans 100 mL de dichlorométhane et ajouté à une solution aqueuse de NH_4Cl . Il est ensuite extrait avec 2x100mL de dichlorométhane. Les fractions organiques sont combinées et séchées sur du Na_2SO_4 , filtrées et concentrées par évaporation sous pression réduite, aboutissant au composé pur (841.6mg, 4.003mmol, 98%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 -*d*) δ ppm: 8.069 (d, 1H, $J=9.5\text{Hz}$), 6.946 (d, 1H, $J=2.7\text{Hz}$), 6.506 (dd, 1H, $J=9.5\text{Hz}$, $J=2.7\text{Hz}$), 5.589 (m, 1H), 3.104 (s, 6H), 2.537 (s, 1H), 1.544 (d, 3H, $J=6.4\text{Hz}$)

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 -*d*) δ ppm: 153.958, 144.931, 135.757, 128.497, 109.461, 108.337, 66.818, 40.191, 23.927

(ESI-HRMS): (m/z , $M+H$) $^+$: calculé pour $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$ $^+$: 211.1077, trouvé : 211.1083

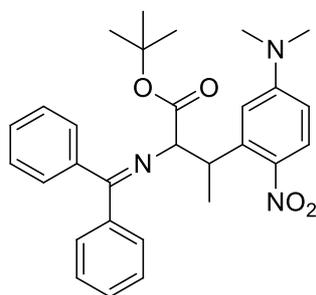


3-(1-bromoethyl)-N,N-dimethyl-4-nitroaniline : le 1-[5-(dimethylamino)-2-nitrophenyl]ethan-1-ol (700mg, 3.33mmol) est solubilisé dans du THF (15mL) et agité à température ambiante, du CBr_4 (1.656g, 4.995mmol) et PPh_3 (1.309g, 4.995mmol) sont ajoutés. Le mélange est laissé réagir toute

la nuit. Après avoir évaporé le solvant, 50mL d'une solution de NaHCO_3 saturée sont ajoutés, et ce mélange est extrait 3x50mL par de l' AcOEt. Les fractions organiques sont combinées et séchées sur du Na_2SO_4 , filtrées et concentrées par évaporation sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie Flash sur colonne de silice (gradient de 20% à 50% acétate d'éthyle dans l'heptane) pour donner un solide brun-vert très instable. (188mg, 0.6883mmol, 21%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 -*d*) δ ppm: 8.002 (d, 1H, $J=9.3\text{Hz}$), 7.012 (d, 1H, $J=2.8\text{Hz}$), 6.548 (dd, 1H, $J=9.3\text{Hz}$, $J=2.8\text{Hz}$), 6.234 (q, 1H, $J=7.0\text{Hz}$), 3.115 (s, 6H), 2.05 (d, 3H, $J=7.0\text{Hz}$)

Le composé étant instable et se dégradant rapidement il n'a pas été réalisé de RMN ^{13}C ni d'analyses de masse.



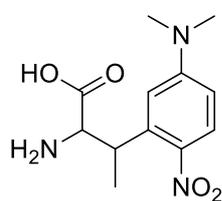
Tert-butyl 3-[5-(dimethylamino)-2-nitrophenyl]-2-[(diphenylmethylidene)amino]butanoate : à une solution de 3-(1-bromoethyl)-N,N-dimethyl-4-nitroaniline (180mg, 0.659mmol) dans du toluène, (6mL) refroidie à 0°C , est ajoutée de l'ester de N-(diphenylmethylene)glycerine tert-butyle (233mg, 0.791mmol), CsOH , H_2O (443mg, 2.636

mmol) et du bromure de tétrabutylammonium (255mg, 0.791 mmol). Le mélange est agité 4 jours à température ambiante. Le résidu est purifié par chromatographie Flash sur colonne de silice (20% EtOAc dans l' heptane) pour donner un solide jaune. (167mg, 0.3435 mmol, 52%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 -*d*) δ ppm: 7.921 (d, 1H, $J=9.3\text{Hz}$), 7.651 (d, 2H, $J=7.4\text{Hz}$), 7.284 (m, 6H), 6.666 (d, 2H, $J=7.4\text{Hz}$), 6.482 (d, 1H, $J=2.6\text{Hz}$), 6.426 (dd, 1H, $J=9.3\text{Hz}$, $J=2.6\text{Hz}$), 4.506 (triplet dédoublé, 1H, $J=7.0\text{Hz}$, $J=4.4\text{Hz}$, $J=2.4\text{Hz}$), 4.308 (d, 1H, $J=4.4\text{Hz}$), 2.874 (s, 6H), 1.501 (d, 3H, $J=7.0\text{Hz}$), 1.377 (s, 9H)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 -*d*) δ ppm: 170.656, 170.173, 152.611, 142.146, 139.539, 132.423, 130.171, 128.743, 128.356, 128.183, 127.917, 127.410, 111.671, 108.679, 87.047, 69.020, 39.929, 37.471, 27.955, 16.081

(ESI-HRMS): (m/z, $\text{M}+\text{H}^+$): calculé pour $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4^+$: 488.2544, trouvé : 488.2558



2-amino-3-(5-(dimethylamino)-2-nitrophenyl)butanoic acid: 50 mg (0.1025mmol) de l'acide aminé protégé sont mis en solution dans 2mL de dichloromethane et 2mL de TFA sont ajoutés. Le mélange est agité une nuit entière et la déprotection est suivie par HPLC.

Après évaporation, la purification est effectuée par HPLC semi préparative (tr=12.130min, rendement quantitatif).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 -*d*) δ ppm : 7.979 (d, 1H, $J=9.5\text{Hz}$), 6.592 (d, 1H, $J=2.4\text{Hz}$), 6.469 (dd, 1H, $J=9.5\text{Hz}$, $J=2.4\text{Hz}$), 4.519 (m, 1H), 4.466 (m, 1H), 3.055 (s, 6H), 1.406 (d, 3H, $J=7.2\text{Hz}$)

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 -*d*) δ ppm : 191.638, 180.362, 154.203, 110.133, 88.607, 84.550, 65.979, 40.200, 27.122, 14.569.

(ESI-HRMS): (m/z, $\text{M}+\text{H}^+$): calculé pour: $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4^+$: 268.1292, trouvé : 268.1285

Détermination du ϵ

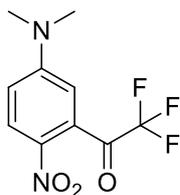
Le coefficient d'absorption molaire du chromophore de l'acide aminé 1 est déterminé à l'aide l'acide aminé protégé. Les mesures sont effectuées dans un mélange acétonitrile/PBS 1x (1:1). Les échantillons proviennent de trois pesées et trois dilutions différentes.

$\epsilon_{\text{moyen}} = 10537 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($n=3$)

Longueur d'onde abs max : 420nm

50 μM (PBS 1x/acétonitrile 1:1)

1.2. Précurseur Aa 2



1-(5-(diméthylamino)-2-nitrophenyl)-2,2,2-trifluoroéthan-1-one : 3g

(17.14mmol) de 1-bromo-3-fluorobenzène sont solubilisés dans 30mL d'éther anhydre et 10,7 mL (1eq, 17.14mmol) de nBuLi sont ajoutés gouttes à gouttes à -78°C. Cette solution est laissée à agiter 1h tout en contrôlant la température. Ensuite, 2mL de trifluoroacétate de méthyle (1.2eq, 20.57mmol) en solution dans 20mL d'éther anhydre sont ajoutés gouttes à gouttes et laissé 15 minutes supplémentaires à -78°C. Le mélange est ensuite laissé 1h à température ambiante. Le milieu est ensuite quenché avec un grand volume d'eau et extrait à l'éther. La phase organique est séchée et évaporée avec précaution à cause de la volatilité du composé voulu. De ce fait, le brut est directement remis à réagir pour la réaction suivante.

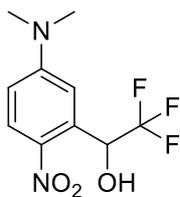
Le brut est solubilisé dans 30mL d'acide sulfurique, et 680 µL d'acide nitrique concentré sont ajoutés gouttes à gouttes à 0°C. Le milieu est laissé 1h puis quenché avec une solution de NaHCO₃ saturée glacée et extraite avec 3x 100mL de dichlorométhane.

Le brut étant encore volatile il est resolubilisé dans 20 mL de DMF et 7,9mL de diméthylamine sont ajoutés à température ambiante et laissés à réagir 10 minutes. Le milieu réactionnel prend instantanément une coloration jaune. Après évaporation, une recristallisation dans le méthanol est effectuée.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ ppm 3.18 (s, 6 H) 6.47 (d, *J*=2.76 Hz, 1 H) 6.75 (dd, *J*=9.41, 2.64 Hz, 1 H) 8.10 (d, *J*=9.41 Hz, 1 H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d) δ ppm 40.20 67.59 67.90 110.74 110.77 128.67 132.30 153.50 179.51

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺: C₁₀H₁₀F₃N₂O₃⁺ calculé pour: 263,06380, trouvé : 263,06411



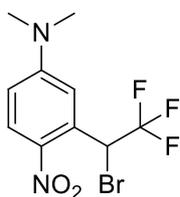
1-(5-(dimethylamino)-2-nitrophenyl)-2,2,2-trifluoroethan-1-ol :

724,5 mg (2.763mmol) de 1-[5-(diméthylamino)-2-nitrophenyl]-2,2,2-trifluoroéthan-1-one sont solubilisés dans 10 mL d'éthanol et 115 mg (1.1eq, 3.04mmol) de borohydrure de sodium sont ajoutés et le

mélange est chauffé 1h au micro-onde à 100°C. le produit est purifié par colonne de silice flash et est élué avec 100% de dichlorométhane. 562.4 mg sont obtenus (77%)
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ ppm 3.15 (s, 6 H) 6.45 (m, 1H) 6.66 (dd, J=9.29, 2.76 Hz, 1 H) 6.86 (q, J=7.11 Hz, 1 H) 8.13 (d, J=9.54 Hz, 1 H)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ ppm 40.40 67.95 110.95 122.94 125.75 128.89 132.50 136.40 153.71

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : C₁₀H₁₂F₃N₂O₃⁺calculé pour: 265,07945, trouvé : 265,07881



3-(1-bromo-2,2,2-trifluoroethyl)-N,N-dimethyl-4-nitroaniline:

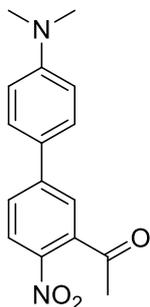
518mg (1.961mmol) de 1-(5-(diméthylamino)-2-nitrophenyl)-2,2,2-trifluoroéthan-1-ol sont solubilisés dans 10mL de toluène. 975mg de CBr₄ (1.5eq, 2.941mmol) et 771mg de triphénylphosphine (1.5eq, 2.941mmol) sont ajoutés et le milieu est chauffé 3h au micro-onde à 60°C. Après évaporation du toluène, le milieu est solubilisé dans une solution de NaHCO₃ saturée et extrait 2 fois avec 50mL de dichlorométhane. Après séchage et évaporation, une colonne de silice est effectuée et le produit pur est élué à 100% de dichlorométhane. On obtient 492 mg (aspect: poudre orange, 77%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ ppm 3.15 (s, 6 H) 6.65 (dd, J=9.41, 2.89 Hz, 1 H) 6.86 (q, J=7.45 Hz, 1 H) 8.12 (d, J=9.54 Hz, 1 H)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ ppm 40.18 41.20 111.52 122.15 124.91 128.62 130.55 135.79 153.26

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : C₁₀H₁₁BrF₃N₂O₂⁺calculé pour: 326,99505, trouvé : 326,99422

1.3. Précurseur Aa 3



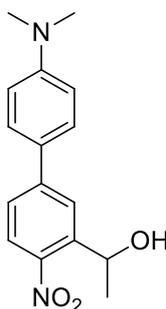
1-(4'-(diméthylamino)-4-nitro-[1,1'-biphényl]-3-yl)éthanone: 500mg (2.049mmol) de 1-(5-bromo-2-nitrophényl)éthanone sont solubilisés dans 10mL d'un mélange éthanol/eau (7 :3) avec 507,1 mg (1.5eq, 3.073mmol) d'acide 4-(diméthylamino)phénylboronique, 660.5 mg (1eq, 2.049mmol) de bromure de tetrabutylammonium, 707.9mg de carbonate de potassium (2.5eq, 5.122mmol) en absence d'oxygène et 13.8mg de palladium

acétate (0.03eq, 0.06mmol) sont ajoutés. Le mélange est chauffé 15min à 170°C au micro-onde. La réaction est quenchée avec une solution aqueuse de NH₄Cl saturée, l'éthanol est évaporé et la phase aqueuse restante est extraite avec 3x 20mL d'acétate d'éthyle. Une colonne de silice manuelle est effectuée en commençant à 100% d'heptane pour arriver progressivement jusqu'à 90 :10 heptane: acetate d'éthyle où le produit élue. Un précipité rouge-orangé est obtenu correspondant au produit voulu. (489,3mg, 1.721mmol, 84%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ ppm : 8.127 (d, 2H, J=8.6Hz), 7.696 (d, 2H, J=8.6Hz), 7.528 (d, 2H, J=8.6Hz), 7.471 (s, 1H), 6,763 (d, 2H, J=8.6Hz), 3.025 (s, 6H), 2.552 (s, 3H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d) δ ppm : 200.970, 151.457, 147.994, 142.842, 139.584, 128.392, 126.943, 125.397, 124.914, 123.923, 112.688, 40.430

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₁₆H₁₇N₂O₃⁺ : 285.1234, trouvé : 285.1231



1-(4'-(diméthylamino)-4-nitro-[1,1'-biphényl]-3-yl)éthanol : 250mg () de 1-(4'-(diméthylamino)-4-nitro-[1,1'-biphényl]-3-yl)éthanone sont solubilisés dans 6 mL d'eau avec 33mg () de borohydrure de sodium et chauffé 1h à 100°C au micro-onde.

Après avoir quenché avec une solution aqueuse de NH₄Cl saturée, l'éthanol est évaporé et la phase aqueuse restante est extraite avec 3x 20mL d'acétate d'éthyle, on obtient 261mg de produit pur après séchage.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ ppm : 7.994 (d, 2H, J=8.5Hz), 7.564 (m, 3H), 6.783 (d, 2H, J=8.5Hz), 5.552 (q, 1H, J=6.4Hz), 3.021 (s, 6H), 1.603 (d, 2H, J=6.4Hz)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃-d) δ ppm : 151.123, 147.020, 145.323, 142.206, 128.306, 126.164, 125.748, 125.105, 124.579, 112.704, 66.194, 40.510, 24.371

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₁₆H₁₉N₂O₃⁺ : 287.1390, trouvé : 287.13915

2. Synthèse des deux mimes de tripeptide, irradiations et caractérisations photo-chimiques, évaluation de l'efficacité du photo-clivage

2.1. Tripeptide 1 avec un chromophore lié par une liaison amide

Ce mime de tripeptide permet d'évaluer l'efficacité de son photo-clivage par un dosage UV par HPLC immédiat (**figure 82**).

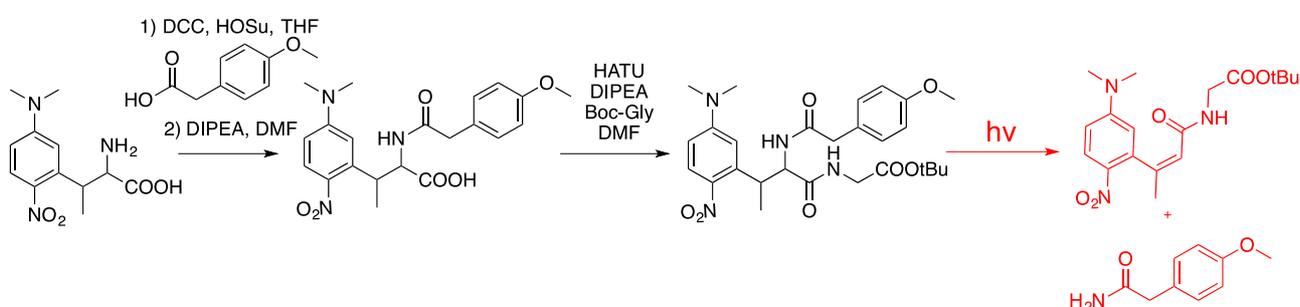
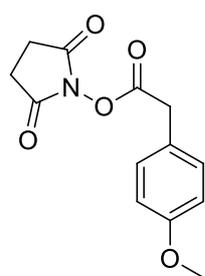


Figure 82: Synthèse et clivage du tripeptide 1



Formation de l'ester activé de l'acide 4-méthoxyphénacétique :

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 2-(4-méthoxyphényl)acetate : 450mg (6,018mmol) d'acide phénacétique sont dissous dans 10mL de THF, 407mg (1.3eq, 7.823mmol) d'*N*-hydroxysuccinimide et 900mg (1.6eq, 9.628mmol) de DCC sont ajoutés et le mélange est laissé à agiter overnight. Une filtration est effectuée pour éliminer la cyclohexylurée,

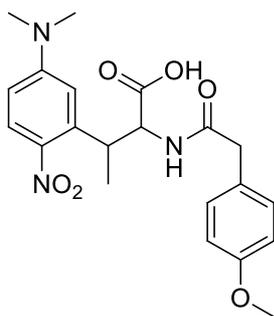
et le mélange est purifié par colonne de silice Flash.

On obtient 267 mg (1.015mmol, 37%) d'un solide blanc.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ ppm : 7.227 (d, 2H, J=8.8Hz), 6.881(d, 2H, J=8.8Hz), 3.855 (s, 2H), 3.781 (s, 3H), 2.809 (s, 4H)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ ppm: 168.994, 167.017, 159.194, 130.386, 130.080, 123.392, 114.284, 55.279, 36.804, 25.587

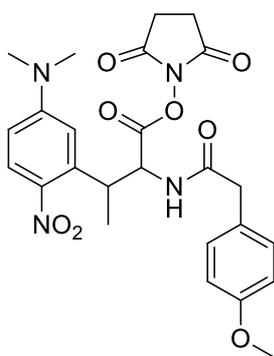
(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour C₁₃H₁₃NNaO₅⁺ : 286.0686, trouvé : 286.0674



Acide 3-(5-(diméthylamino)-2-nitrophenyl)-2-(2-(4-méthoxyphényl)acétamido)butanoïque: 24 mg (0.8979mmol) d'acide 2-amino-3-(5-(diméthylamino)-2-nitrophényl)butanoïque (acide aminé 1) sont solubilisés dans 500µL de DMF. 26mg (1.1eq, 0.9877mmol) de 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 2-(4-méthoxyphényl)acétate et 15 µL de DIPEA sont ajoutés à 0°C. le

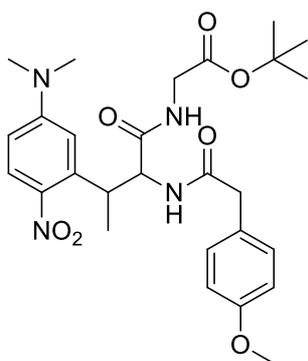
produit est purifié par HPLC $t_r=20,01$ min, on obtient 18,4 mg (0.0443mmol, 49%).

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺: calculé pour C₂₁H₂₆N₃O₆⁺: 416.1816, trouvé: 416.1814



2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(5-(diméthylamino)-2-nitrophenyl)-2-(2-(4-méthoxyphényl)acétamido)butanoate : 18 mg (0.04333mmol) de 3-(5-(diméthylamino)-2-nitrophényl)-2-(2-(4-méthoxyphényl)acétamido)butanoic acid sont solubilisés dans 1mL de dichlorométhane. 6.5mg (0.056mmol, 1.3eq) de HOSu et 14mg (0.069mmol, 1.6eq) de DCC sont ajoutés à 0°C, le mélange est agité, laisse revenir à température ambiante. La

DCU est ensuite filtrée, le mélange est évaporé et le brut est mis à réagir directement pour l'étape suivante.



tert-butyl 2-(3-(5-(diméthylamino)-2-nitrophényl)-2-(2-(4-méthoxyphényl)acétamido)butanamido)acétate: 22 mg (0.0423mmol) de 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(5-(diméthylamino)-2-nitrophényl)-2-(2-(4-méthoxyphényl)acétamido)butanoate sont solubilisés dans 1mL de DMF. 14mg de glycine sous forme tert-butyl ester (0.08585mmol, 2eq) et 15 microL de DIPEA (0.08585mmol, 2eq) sont ajoutés et le milieu est agité à température ambiante. Au bout de 12h un

suivi HPLC est effectué et 2 équivalents des réactifs sont ajoutés et la réaction est continuée jusqu'à complète conversion.

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺: calculé pour: C₂₇H₃₇N₄O₇⁺: 529.2657, trouvé : 529.2645.

Détermination de l'efficacité du photo-clivage

Une droite d'étalonnage HPLC est effectuée avec des solutions de concentrations connues de 2-4-méthoxyphénylacétamide (**tableau 14**). (PBS:acétonitrile / 1:1). 20µL sont injectés de manière précise et chaque concentration est effectuée deux fois (**figure 83**).

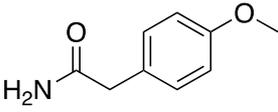
Concentration en 2-4-méthoxyphénylacétamide (µM)	aire 1	aire 2	moyenne
			
100	94600	94825	94712,5
75	74507	81587	78047
50	40596	40595	40595,5
25	21951	24347	23149

Tableau 14: Concentrations de 2-4-méthoxyacétamide utilisée pour effectuer l'étalonnage nécessaire à la quantification de photo-clivage du tripeptide 1.

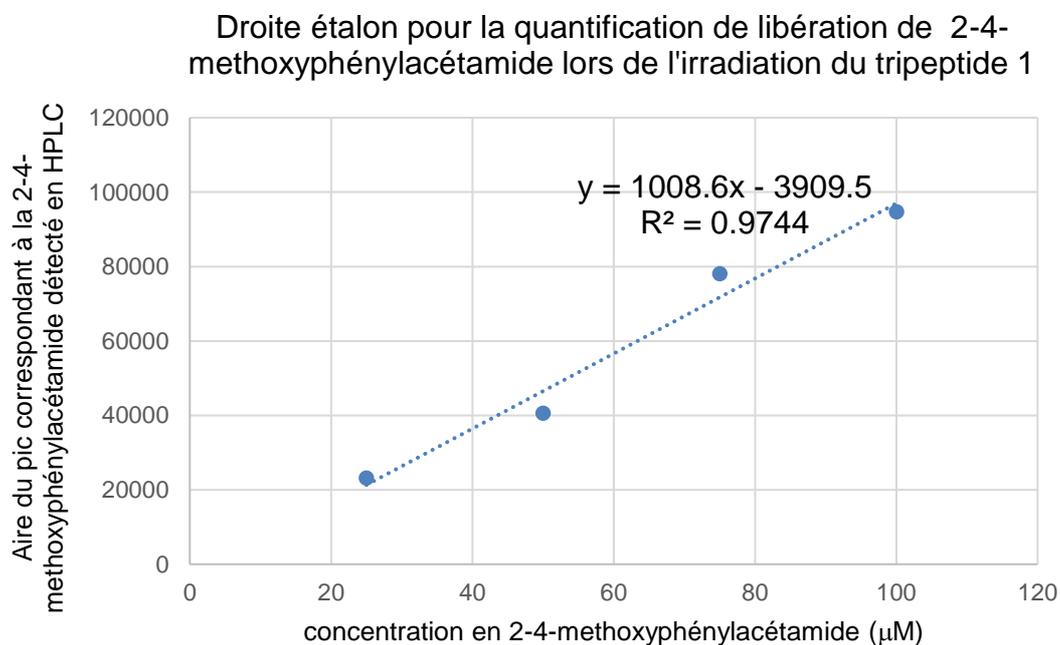


Figure 83: Etalonnage pour le dosage HPLC à l'aide de concentrations connues de 2-4-méthoxyacétamide

Une solution stock du tripeptide est ensuite effectuée dans de l'acétonitrile (à environ 2.5mM). Une dilution 1/50^{ème} est ensuite effectuée en mettant 20µL de la solution stock avec 480µL d'acétonitrile et 500µL de PBS. La concentration de cette solution est re-attestée précisément grâce à l'UV et est de 50.65µM.

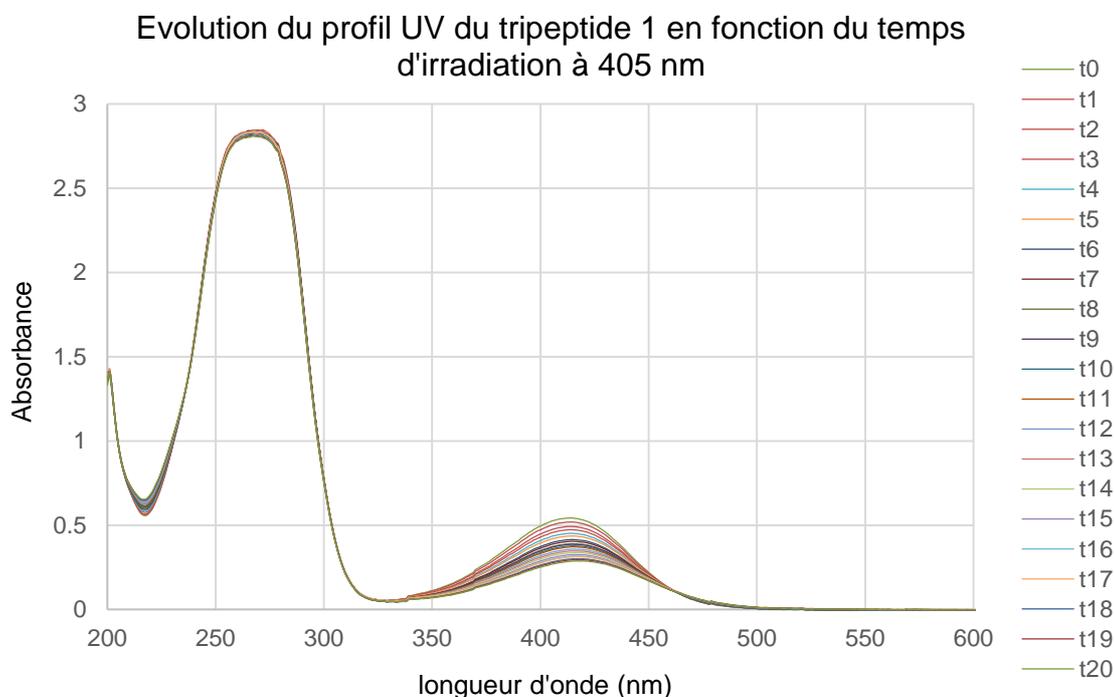


Figure 84: Evolution du profil UV du tripeptide 1. Les mesures UV sont effectuées toutes les minutes.

En effectuant un suivi HPLC, on observe qu'après 20 min, 80% de produit de départ a disparu. Pour obtenir la valeur de l'efficacité de photo-clivage, on note l'aire du pic correspondant à la 2-4-méthoxyacétamide (qui est un fragment relargué lors du clivage du tripeptide 1 et que l'on a préalablement étalonné). En reportant l'aire obtenue dans l'équation de la droite d'étalonnage, on peut évaluer l'efficacité du photo-clivage.

L'efficacité calculée à l'aide de l'étalonnage effectué correspond à **34 %** à PH 7.
De manière intéressante, effectuée dans un tampon pH 10, l'irradiation du tripeptide 1 mène à **50 %** de photoclivage.

2.2. Tripeptide 2 avec l'iso-glutamine

Ce tripeptide (**figure 85**) nécessite la dérivation du fragment clivé (iso-glutamine) avec de l'OPA (orthophtaldéhyde) afin d'en faire le dosage UV par HPLC.

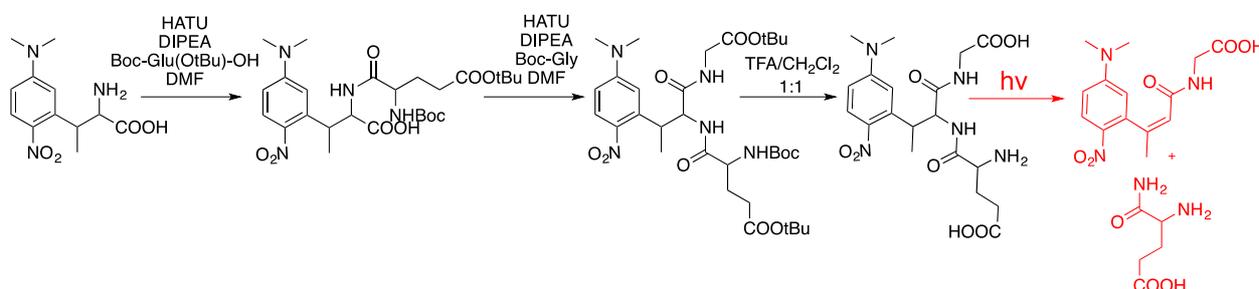
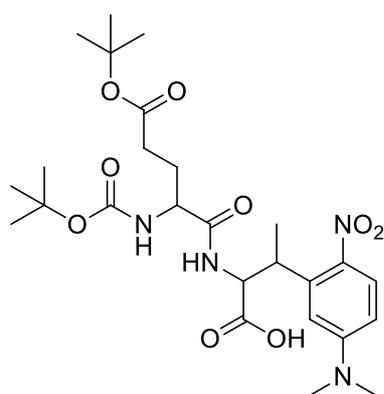


Figure 85: Stratégie de synthèse et clivage du tripeptide 2

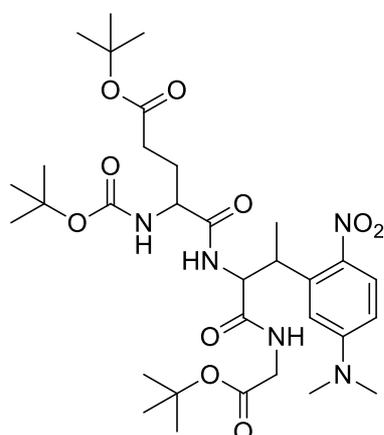


Acide 2-(5-(tert-butoxy)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-3-(5-(dimethylamino)-2-nitrophenyl)butanoïque: 10mg

(1.1eq, 32.9 μ mol) de boc-isoglutamine sont activés avec 12,5mg d'HATU (1.1eq, 32.9 μ mol) dans 500 μ L de DMF. Le mélange est ajouté dans un ballon contenant 8mg de l'acide aminé 1(29.9 μ mol) dans 500 μ L de DMF avec 5 μ L (1.1eq, 32.9 μ mol) de DIPEA. La purification est

effectuée par HPLC (tr=22,7min) et 16mg de poudre jaune (quant.) sont récupérés après lyophilisation.

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour: C₂₆H₄₁N₄O₉⁺ : 553.2868, trouvé : 553.2862.



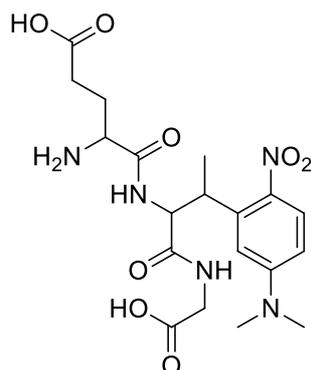
tert-butyl 6-(3-(tert-butoxy)-3-oxopropyl)-9-(1-(5-(dimethylamino)-2-nitrophenyl)ethyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate :

16mg (0.029mmol) de 2-(5-(tert-butoxy)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanamido)-3-(5-(dimethylamino)-2-nitrophenyl)butanoic acid

sont mis à agiter dans 500 μ L de DMF avec 6mg de glycine tert butyle sous forme sel d'HCl (0.0358mmol,

1.2eq), 5 microL de DIPEA et 12,1 mg d'HATU (0.032mmol, 1.1eq). Après 48h de réaction un suivi HPLC est effectué et 1 équivalent des réactifs est ajouté. La conversion est suivie par HPLC jusqu'à ce qu'elle soit complète. Le produit est purifié par HPLC semi-préparative (tr=26.8min).

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour: C₃₂H₅₂N₅O₁₁⁺ : 666.3709, trouvé : 666.3702.



4-amino-5-((1-((carboxymethyl)amino)-3-(5-(dimethylamino)-2-nitrophenyl)-1-oxobutan-2-yl)amino)-5-oxopentanoic acid

18mg du produit précédent sont mis en solution dans 1mL de TFA et 1mL de dichloromethane et agité à température ambiante jusqu'à complète déprotection (suivi HPLC) puis évaporé à sec (rendement quantitatif).

(ESI-HRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour: C₁₉H₂₈N₅O₈⁺ : 454.1932, trouvé : 454.1911.

Tests quantification photo-libération d'iso-glutamine. Préparation des irradiations et dérivatisation.

Préparation solutions

- HCl 0,1 M : 8,569 mL d'HCl à 37% (11,67M) dans 1L d'eau mQ.
- Borax 0,05M : 19,0685g de borax (Na₂B₄O₇*10H₂O) dans 1L d'eau mQ.
- Tampon pH 7,8 : 53,4mL solution borax dans fiole jaugée 100mL complétée avec solution HCl
- Tampon pH 9,0 : 85,6mL solution borax dans fiole jaugée 100mL complétée avec solution HCl

Les solutions sont ajustées au pHmètre.

Ajout de l'étalon interne dans la solution de tampon borate pH 9,0

Dans le tampon borate pH=9 est ajouté 1,7mg de 5-iodouracile et il est injecté 100µL de cette solution tampon sur HPLC.

Etalonnage

Dans deux fioles jaugées de 10mL on met 15,4 mg et on complète avec du tampon borate pH 9 (Solutions mères A et A'). On met 20 µL des solutions A et A' avec 1,980mL de tampon pH=9 (solution B et B').

1/1' : 50 µL B + 50 µL ACN + 400 µL tampon pH=9

2/2' : 125 µL B + 50 µL ACN + 325 µL tampon pH=9

3/3' : 250 µL B + 50 µL ACN + 200 µL tampon pH=9

4/4' : 375 µL B + 50 µL ACN + 75 µL tampon pH=9

On ajoute ensuite 16µL d'OPA, 30min sont attendues à température ambiante et 100 µL de chaque solution sont injectés sur HPLC.

Mesures de la qté d'iso glutamine libérée après 30min d'irradiation à 405nm.

Des échantillons de 100µM de tripeptide 2 de 1mL en faisant 50/50 ACN/tampon pH 7 et ACN/tampon pH 9 sont préparés. 100µL sont injectés en HPLC puis l'échantillon est irradié 30min à 405nm et des mesures UV sont effectuées toutes les minutes. On prélève ensuite 100 µL de la solution irradiée, y ajouter 400 µL de solution tampon pH 9 puis 16 µL d'OPA et on laisse incuber 30min à température ambiante. On effectue ensuite une injection HPLC et grâce à cette dérivatisation (**figure 86**), on peut effectuer un dosage HPLC ($\lambda=332\text{nm}$) (**tableau 15**).

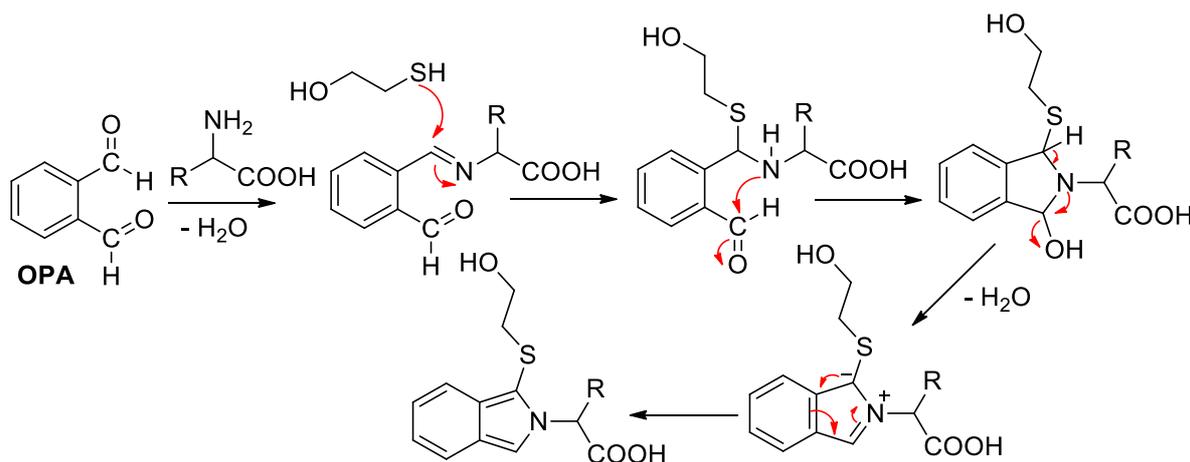


Figure 86: Principe de la dérivatisation des acides aminés avec l'OPA.

Echantillon	Concentration en iso-glutamine (μM)	Aire pic
1	2,48033	2940608
1'	2,48033	3724088
2	4,96066	6896132
2'	4,96066	7004909
3	7,44099	9779229
3'	7,44099	9912288

Tableau 15: Aires obtenues avec des concentrations connues d'iso-glutamine dérivatisée à l'OPA.

Comme précédemment, ces aires ont permis de tracer une droite d'étalonnage (**figure 87**).

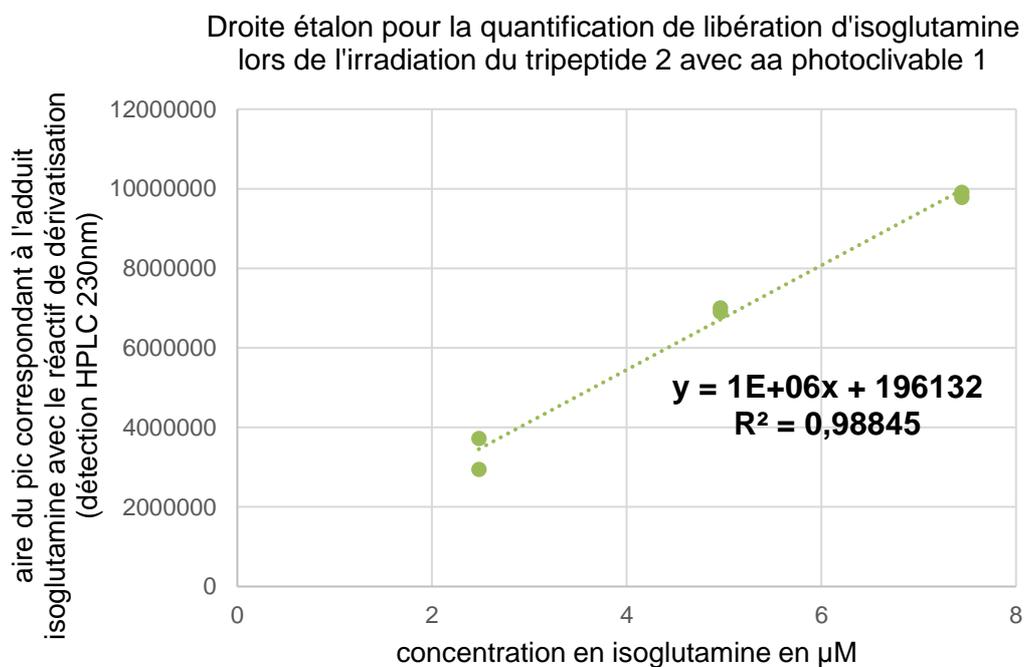


Figure 87: Droite d'étalonnage obtenue pour évaluer l'efficacité du tripeptide 2.

Evolution du profil UV du tripeptide 2 suivant une irradiation à 405nm (zoom sur les zones de 305 à 500 nm)

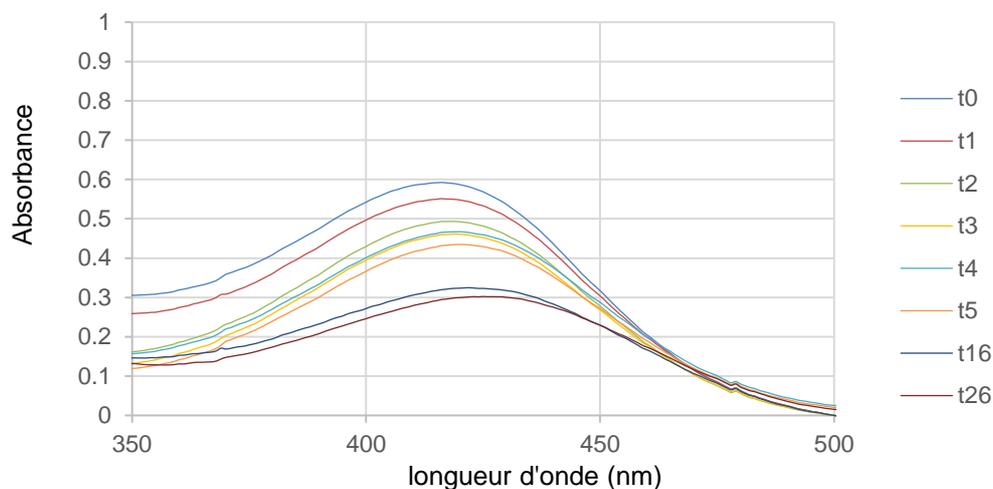


Figure 88: Suivi de l'évolution UV du tripeptide 2 irradié à 405nm. (Zoom sur les zones de 350 à 500nm).

Grâce à cette méthode de quantification, on arrive à la conclusion que notre acide aminé engendre dans le tripeptide 2 après irradiation **41%** de clivage spécifique.

3. Synthèse du CA-aa pour l'incorporation sur l'ARNt tronqué

La synthèse du CA (Cytosine-Adénosine) couplé à l'acide aminé commence avec une étape de protection de la fonction amine. L'acide carboxylique est ensuite activé en ester de cyanométhyle pour permettre le couplage avec la fonction hydroxyle libre du CA (**figure 89**).

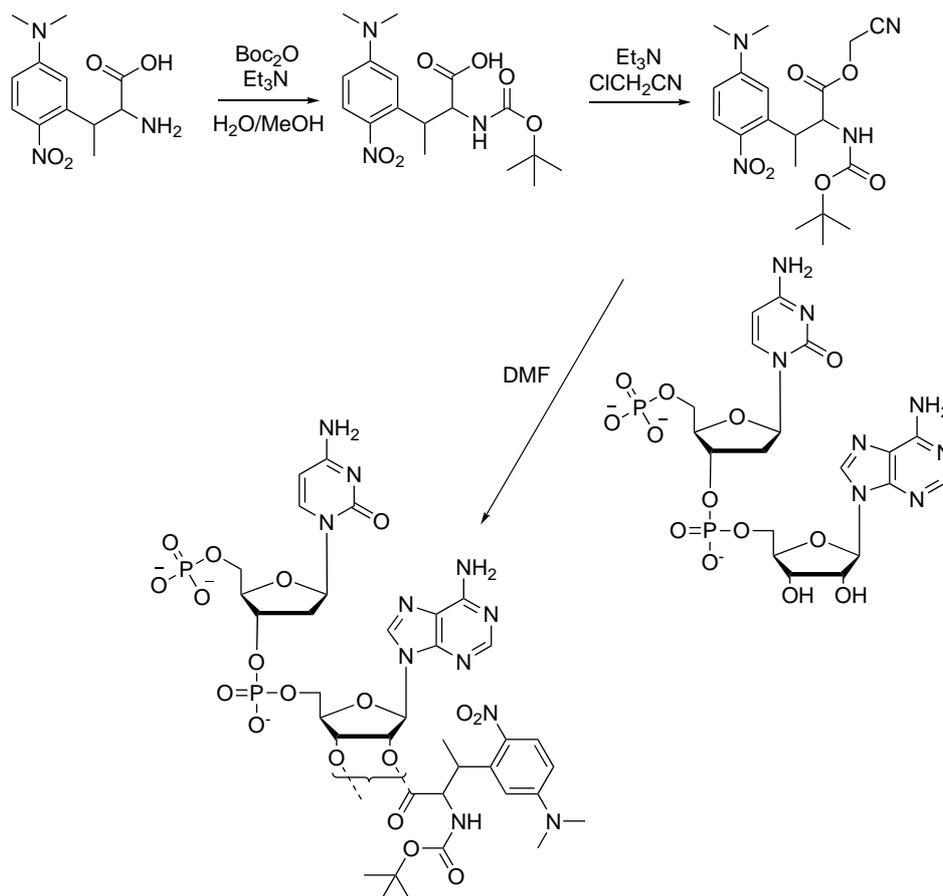
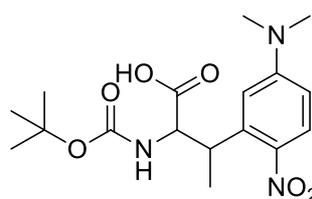


Figure 89: Stratégie de synthèse générale de l'acido-acylation chimique de l'acide aminé 1 sur le dinucléotide dCA.



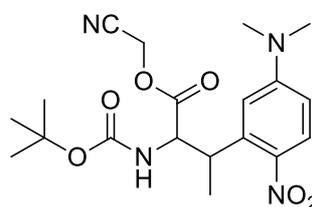
Acide **2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(5-(diméthylamino)-2-nitrophenyl)butanoïque :** 25mg

(0.09353mmol) de l'acide aminé 1 sont solubilisés dans 1mL de dichlorométhane avec 19µL de DIPEA (1.2eq, 0.1122mmol). Le mélange est refroidi à 0°C et 24 µL (1.2eq, 0.1122mmol) de Boc₂O et 1,1 mg de DMAP (0.1eq, 0,00935mmol) sont ajoutés. Le milieu est agité et laissé revenir à température ambiante. Un suivi HPLC est effectué et lorsque la réaction est complétée une extraction est effectuée (H₂O / AcOEt). Après extraction on obtient 24,3mg de produit pur. (71%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ ppm : 7.948 (1H, m), 6.586 (1H, m), 6.427 (1H, m), 3.616 (1H, m), 3.049 (6H, s), 2.146 (1H, m), 1.360 (3H, m), 1.229 (9H, s).

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d$) δ ppm : 192.635, 174.717, 174.250, 153.155, 142.816, 138.467, 127.978, 108.843, 53.119, 40.294, 28.500, 18.290.

(ESI-BRMS): (m/z, M+H) $^+$: calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{NaO}_6^+$: 390.1636, trouvé : 390.096.

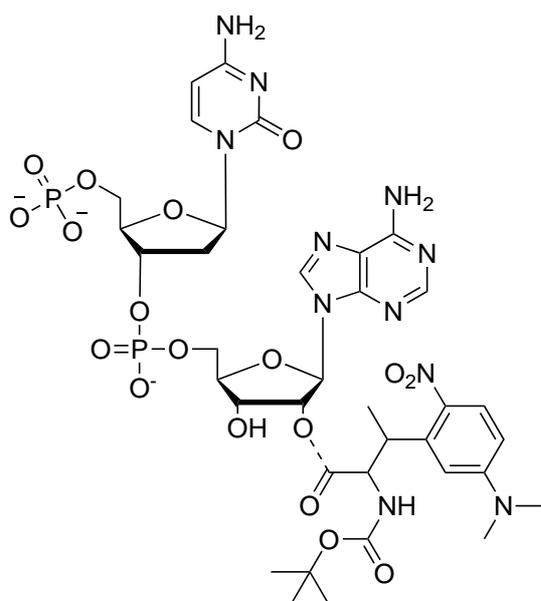


Cyanomethyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(5-(dimethylamino)-2-nitrophenyl)butanoate: 23mg

(0,0626mmol) sont solubilisés dans 1mL de chloroacetonitrile, 13 microL (0,939mmol, 15eq) de triéthylamine sont ajoutés et

la réaction est suivie jusqu'à conversion totale par HPLC. Le brut est ensuite évaporé à sec, dissous dans une solution de NaHCO_3 saturée et extrait 3 fois avec 10 mL de dichlorométhane et utilisé dans la réaction suivante sans purification.

(ESI-HRMS): (m/z, M+H) $^+$: calculé pour: $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_6^+$: 407.1925, trouvé : 407.1827.



Couplage au CA

Echange du contre-ion de l'entité dCA : une colonne Dowex[®] 50WX8 forme acide est préparée et lavée à l'éthanol. De la soude 0,1M est ensuite éluée lentement sur la colonne, celle-ci est ensuite lavée à l'eau mQ jusqu'à ce que le pH soit neutre, puis une solution de HCl 0,1N est éluée. La colonne est de nouveau lavée à l'eau mQ jusqu'à ce que le pH soit neutre. La colonne est ensuite conditionnée avec une solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium. (La solution est éluée 4x lentement sur la colonne).

La solution est éluée 4x lentement sur la colonne). La colonne est de nouveau lavée avec de l'eau mQ jusqu'à ce que le pH soit neutre. Une solution de CA dans l'eau est ensuite éluée sur la colonne ainsi préparée et on récupère des fractions éluées par de l'eau mQ. Celles-ci sont évaluées sur CCM et celles présentant de l'UV sont combinées, extraites au dichlorométhane et séchées.

Réaction : Le dCA (34mg, 0.053mmol, 1.1eq) est associé à l'acide aminé activé (20mg, 0.049mmol) et protégé dans 500 μL de DMF anhydre. La réaction est mise à chauffer à 40°C et laissée réagir 12h.

L'acide aminé couplé, attesté par masse, est purifié par HPLC semi-préparative (tr=14min). On obtient 21.1mg de dCA couplé (41%).

(ESI-BRMS): (m/z, M+H)⁺ : calculé pour: C₃₆H₄₈N₁₁O₁₈P₂⁺ : 984.2660, trouvé : 984.147

4. Incorporation de l'acide aminé dans une cible biologique.

Le dCA couplé est solubilisé à 3mM dans du DMSO. Ensuite, il va être relié au reste de l'ARNt à l'aide d'une enzyme, la T4 ligase. Celui-ci va ensuite être micro-injecté dans des ovocytes de Xénope. Cette étape va être réalisée au sein du laboratoire de Stephan Pless à l'université de Copenhague (Centre de biopharmaceutique, département de drug design et pharmacologie).

DISCUSSION

1. A propos de l'acide aminé 1

L'acide aminé 1 montre une absorbance à des longueurs d'ondes supérieures à 420nm, avec de forts coefficients d'extinction molaire, ce qui est compatible avec des études dans des cellules et est le premier acide aminé photo-clivable synthétisé à notre connaissance efficace à ces longueurs d'onde.

Cependant l'efficacité du photo-clivage, quoique supérieure à ces longueurs d'onde à tous les acides aminés photo-clivables de la littérature, n'est pas optimale.

Il a été montré dans l'étude des groupements ortho-nitrophénetyles que l'efficacité du photo-clivage était modulable avec le pH (**figure 90**) (Walbert et al., 2001). Nous avons pu démontrer ce fait également à l'aide de nos résultats, en changeant le pH de la solution dans laquelle est irradié notre tripeptide on augmente de manière non négligeable l'efficacité du clivage de celui-ci (passant de 34-41% à 50%).

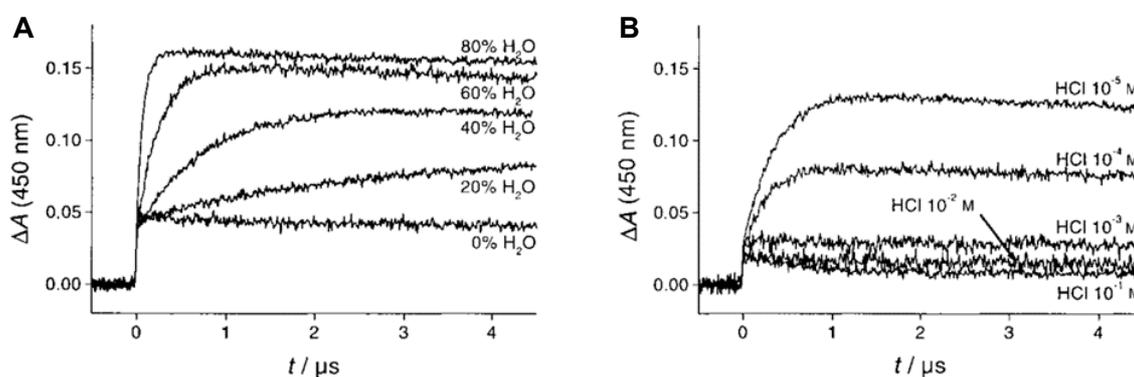


Figure 90: Formation de l'anion aci-nitro en fonction de la quantité en eau (A) et du pH (B) (Walbert et al., 2001).

La β -élimination est donc favorisée dans les conditions où la dissociation protolytique de l'aci-nitro sont favorisée. Cependant, les conditions expérimentales en termes de solvant et de pH ne sont pas toujours modulables, en effet pour des études en milieu

biologique le pH est fixé à 7,34 et le solvant est souvent du NES ou autre tampon physiologique.

Comment moduler alors les propriétés pour maximiser les chances d'obtenir un composé *aci-nitro* déprotonné et augmenter l'efficacité de clivage de notre acide aminé photo-clivable ? Est-ce que l'efficacité est modulable avec un groupement assistant la déprotonation de l'*aci-nitro*? Une étude a récemment démontré qu'en faisant varier les groupements environnant le groupement photo-clivable avec des fonctions permettant une variation locale du pKa, la β -élimination pouvait être favorisée et devenir la voie photochimique majoritaire (**figure 91**) (Carling et al., 2015).

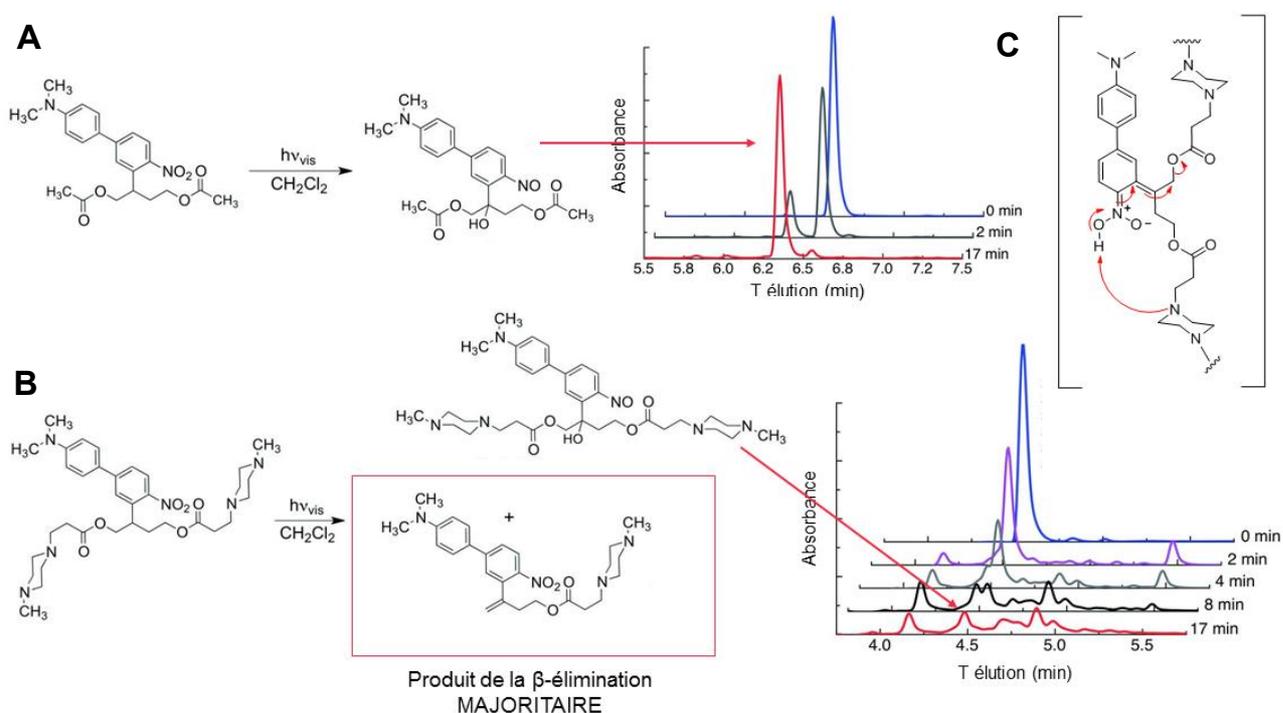


Figure 91: Influence d'un groupement basique, situé à proximité d'un groupement photo-clivable, sur la β -élimination. A. Photo-clivage d'un groupement ortho-nitrobiphényléthyle. B. Photo-clivage du même groupement avec ajout de fonctions basiques de type méthyl-pipérazine à proximité. C. Mécanisme suggéré pour la déprotonation facilitée de l'intermédiaire *aci-nitro* (schémas adaptés de (Carling et al., 2015)).

À la vue de ces données, il serait judicieux d'incorporer notre acide aminé non naturel photo-clivable à proximité d'un acide aminé basique pour en optimiser l'efficacité de photo-clivage.

2. Perspectives concernant les synthèses des acides aminés 2 et 3

Les acides aminés 2 et 3 n'ont pas pu être synthétisés lors de cette thèse car l'utilisation d'un dérivé bromé n'a pas permis d'arriver à effectuer la substitution nucléophile sur la glycine d'O'Donnell. Néanmoins, l'utilisation d'autres groupements partants, de type -iodure, -tosylate, -mesylate et -triflate a permis d'obtenir des traces des acides aminés 2 et 3.

C'est pourquoi nous avons décidé de nous intéresser à une autre réaction, nous permettant de générer un groupement partant *in situ* sur les alcools correspondants et d'effectuer la substitution via une réaction de Mitsunobu-Tsunoda.

La réaction de Mitsunobu permet en effet de créer des liaisons C-C entre un alcool et un acide (ou électrophile) dont le pKa est inférieur à 11, grâce à l'utilisation de DEAD (diethylazodicarboxylate) et de triphenylphosphine (TPP) (Mitsunobu, 1981). Le développement de nouveaux réactifs en 1995 par Tsunoda (Tsunoda et al., 1995) a permis d'élargir l'application de cette réaction à des acides possédant un pKa jusqu'à 23. La glycine d'O'Donnell que nous utilisons comme précurseur du squelette acide aminé possède deux protons ayant un pKa d'environ 18,7 nous avons donc décidé d'essayer le réactif CMBP sur notre système. Nous avons été guidés pour cela par une publication récente qui reportait la formation d'acides aminés divers via cette stratégie en utilisant le CMBP mais non en utilisant le CMPP (**figure 92A**) (Noisier et al., 2013). Malheureusement cette méthode n'a mené à l'obtention que de traces des acides aminés 2 et 3, difficilement isolables et de même le temps a manqué pour effectuer des optimisations de cette réaction (**figure 92B**).

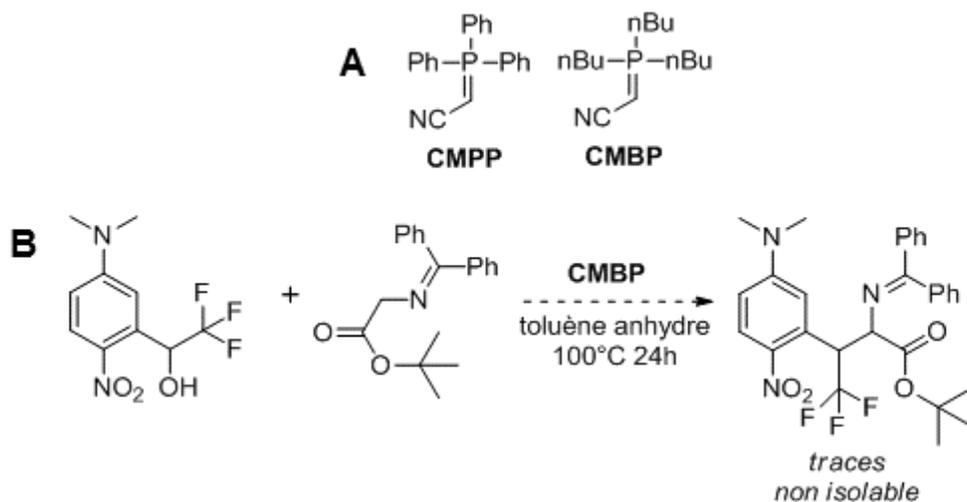


Figure 92: Réaction de Mitsunobu-Tsunoda. A. Nouveaux réactifs de type phosphorane développées par Tsunoda. **B.** Utilisation dans la synthèse de l'acide aminé 2 au cours de cette thèse.

PERSPECTIVES

L'injection de l'ARNt amino-acylé dans les ovocytes et les mesures électrophysiologiques vont être réalisées au laboratoire du Dr. Stephan Pless à l'université de Copenhague (Centre de biopharmaceutique, département de drug design et pharmacologie). Cet ARNt amino-acylé va pouvoir supprimer, via la méthode de suppression de codon STOP ambre, un codon STOP localisé sur l'ARNm correspondant à la cible biologique d'intérêt également injecté dans les ovocytes (figure 93).

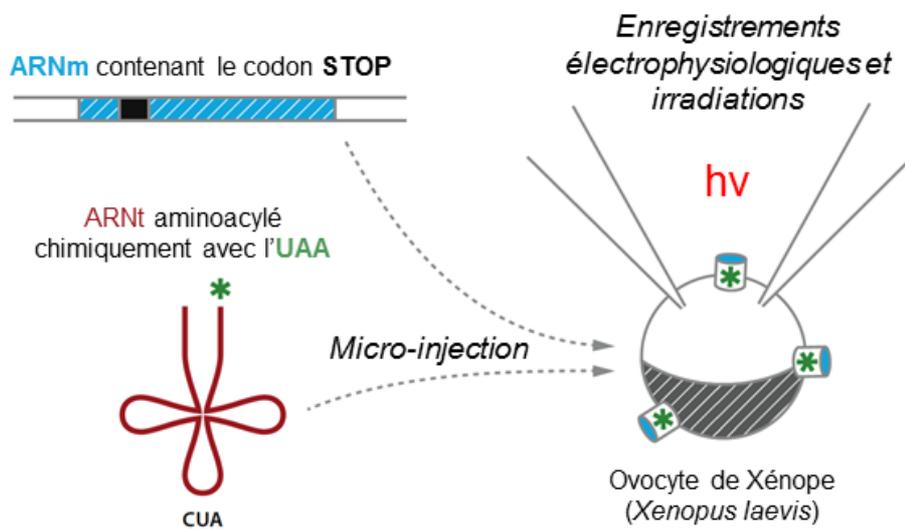


Figure 93: Stratégie d'incorporation des UAA en micro-injectant l'ARNt amino-acylé chimiquement et l'ARNm du gène d'intérêt possédant un codon STOP, d'après (Pless and Ahern, 2013).

Premièrement, pour preuve de principe, cet ARNt, couplé à l'acide-aminé photo-clivable, va être essayé sur les canaux Shaker au potassium, qui avaient été étudiés avec l'acide aminé *ortho*-nitrophénylgylicine par l'équipe de Dennis Dougherty (England et al., 1997).

Dans un deuxième temps, dans le cadre de l'étude des récepteurs P2X, il serait intéressant d'essayer d'incorporer cet acide aminé au niveau d'acides aminés localisés dans les parties Nterm et Cterm, qui sont difficilement étudiables avec d'autres méthodes.

CHAPITRE 3 : INCORPORATION D'ACIDES AMINES NON NATURELS PHOTO-REACTIFS SUJETS AU PHOTO-CROSSLINKING

Le chapitre précédent était consacré à l'incorporation via la méthode de suppression de codon stop ambre par un ARNt supprimeur amino-acylé chimiquement. Celui-ci concernera l'incorporation via une paire aminoacyl-ARNt synthétase/ARNt supprimeur co-évoluée pour reconnaître l'acide aminé non naturel et être orthogonale au système.

1. Incorporation d'acides aminés non naturels : les différentes méthodes de suppression de codon STOP ambre

Les codons Stop sont au nombre de trois, TAG ou ambre, TAA ou ochre et TGA ou opale, étant plus ou moins utilisés selon les espèces pour signaler la fin du processus de traduction par le ribosome. Le moins utilisé est le codon STOP ambre, c'est pourquoi il a été choisi pour être utilisé comme point d'incorporation pour des acides aminés non naturels (**tableau 16**).

Codon STOP	TAG (ambre)	TAA (ochre)	TGA (opale)
Fréquence d'utilisation chez <i>Homo Sapiens</i>	23%	30%	47%

Tableau 16: Fréquence d'utilisation des codons STOP chez l'humain

Afin de recoder ce codon stop ambre en un acide aminé non naturel choisi, deux méthodes existent (**tableau 17**).

- La première consiste en la lecture d'un codon stop ambre de l'ARNm par un ARNt supprimeur possédant un anti-codon complémentaire à ce codon STOP intégré par mutagenèse dirigée en un site d'intérêt et étant reconnu sélectivement par une amino-acyl ARNt synthétase qui va y charger l'acide aminé non naturel. Ces composants vont pouvoir être reconnus par le ribosome et les facteurs de traduction et la formation de liaison peptidique entre l'acide aminé non naturel et la chaîne polypeptidique en formation va être effectuée.
- La deuxième méthode est l'acido-acylation chimique d'un ARNt supprimeur qui a été développée au **chapitre 2** de cette thèse.

Incorporation méthode 1	Incorporation méthode 2
<ul style="list-style-type: none"> • Nécessite une aminoacyl-ARNt synthétase et un ARNt co-évolués réclamant un processus d'évolution dirigé complexe et demandant du temps • Nécessite un nouveau couple pour chaque nouvel acide aminé et donc des étapes d'évolution dirigée à chaque nouvel acide aminé • Problème de spécificité de la méthode et tolérance des groupements fonctionnels portés par l'UAA • Nécessite simplement l'équipement pour la culture cellulaire et la transfection 	<ul style="list-style-type: none"> • L' amino-acylation chimique de l'ARNt est peu efficace, méthode qui consomme beaucoup de produit car l'acide aminé doit être injecté dans des proportions stœchiométriques avec l'ARNt • Quasiment tous les acides aminés non naturels peuvent être incorporés avec cette méthode, toutes les fonctionnalités sont tolérées • Nécessite incorporation in vitro ou système de micro-injection ou d'électroporation

Tableau 17: Comparaison des deux méthodes d'incorporation d'UAA via la suppression d'un codon STOP ambre

1. Génération des paires orthogonales ARNt suppresseur/aminoacyl-ARNt synthétase par évolution dirigée

Les paires orthogonales ARNt suppresseur/aminoacyl-ARNt synthétase sont générées par évolution dirigée et exprimées par transfection dans le système étudié. Ainsi, près d'une centaine d'acides aminés non naturels différents ont pu être incorporés dans des cellules bactériennes et eucaryotes.

L'orthogonalité est primordiale, ce qui signifie que les synthétases ne doivent pas pouvoir reconnaître d'ARNt endogènes et l'ARNt suppresseur ne doit pas pouvoir être chargé par des synthétases endogènes mais ces deux composants doivent quand même pouvoir fonctionner avec la machinerie de traduction de l'organisme hôte. Ainsi, des paires aaRS/ARNt ont été dérivées de paires d'autres organismes. Par exemple pour l'incorporation d'UAA chez *E. coli*, des paires provenant d'archées ou d'organismes eucaryotes ont été évoluées, de même pour l'incorporation chez des cellules de mammifères des paires ont été dérivées de *E. coli* ou de levures.

Ainsi, la paire *Methanococcus jannaschii* TyrRS-ARNt^{Tyr}, qui est la première à avoir été conçue en 2000 dans le laboratoire de Peter Schultz (Wang et al., 2000), est orthogonale chez *E. Coli*, tandis que la paire *E. Coli* TyrRS-*Bacillus stearothermophilus* ARNt^{Tyr} est orthogonale aux systèmes de mammifères (Liu et al., 2007). Cela est possible car les modes de reconnaissance des ARNt sont différents entre les TyrRS de différentes espèces. Ceux-ci sont basés sur des déterminants d'identité qui vont varier selon l'espèce (**tableau 18**).

Bactéries	Eucaryotes et Archées
<ul style="list-style-type: none"> • anti-codon • paire G1-C72 • A73 • Longueur du bras variable 	<ul style="list-style-type: none"> • anti-codon • paire C1-G72 • A73

Tableau 18: Déterminants d'identité des ARN de transfert responsables de la reconnaissance par les aaRS.

Les couples ARNt/aaRS sont systématiquement mutés en concordance avec les structures et subissent deux types de sélection différente, constitués d'une étape positive et d'une étape négative d'abord pour attester l'orthogonalité de l'ARNt suppresseur, puis l'amino-acyl ARNt synthétase subit le même processus afin de ne reconnaître que l'acide aminé non naturel choisi.

Ce système de sélection positive et négative étant plus difficile à mettre en place dans les cellules de mammifères, des couples synthétase/ARNt sont souvent co-évolués dans des cellules bactériennes ou des levures et ensuite transférées dans les cellules de mammifères sans, normalement, perdre leur orthogonalité.

L'aminoacyl-ARNt synthétase générée est ensuite capable de catalyser la réaction d'estérification entre l'ARNt suppresseur et l'acide aminé non naturel pour lesquels elle a été optimisée.

1.1. Evolution et utilisation de la paire *E. coli* TyrRS/*E. coli* tRNA^{Tyr} pour incorporation dans un génome eucaryote (Chin, 2003) :

Cette paire a été évoluée dans *Saccharomyces cerevisiae* qui a été choisi comme modèle eucaryote pour adapter le système. La synthétase TyrRS d'*E. coli* a été choisie car elle n' amino-acyle pas les ARNt endogènes de *S. cerevisiae* et l'ARNt d'*E. coli* est également un mauvais substrat pour les synthétases endogènes de *S. cerevisiae*.

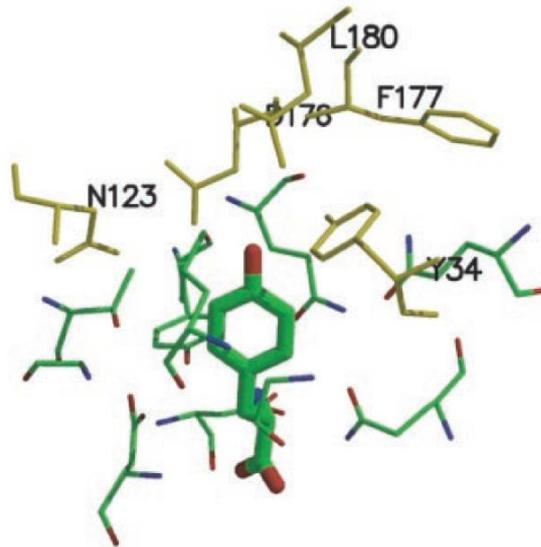


Figure 94: Site actif de la tyrosyl-ARNt synthetase de *B. Stearothermophilus* et représentations des acides aminés qui ont été mutés chez *E. coli* (Chin, 2003).

Des mutations sur TyrRS ont été effectuées, basées sur les structures de l'homologue TyrRS de *Bacillus stearothermophilus*. En faisant varier 5 positions, les auteurs ont obtenus une librairie de 10^8 mutants (**figure 94**). Ceux-ci ont ensuite été soumis à des sélections positives et négatives.

Sélection positive : deux codons stop ambre sont incorporés dans le gène codant pour l'activateur de transcription GAL4. La suppression de ces codons par un système de paire synthétase/ARNt efficace (c'est-à-dire que la synthétase reconnaît bien l'acide aminé non naturel et l' amino-acyle correctement sur l'ARNt et donc le reconnaît bien également) donne une expression efficace de l'activateur GAL4 qui va mener à l'expression des gènes HIS3, URA3 et LacZ. Le milieu de croissance des levures est déplété en uracile ou contient un inhibiteur de la protéine HIS3 (3-aminotriazole) et est

complété avec l'UAA choisi. Les clones qui survivent, possédant donc une paire synthétase/ARNt efficace, sont sélectionnés et menés à l'étape de sélection négative.

Sélection négative : Le but ici est de supprimer les clones de levure ayant survécu car ils possèdent une paire synthétase/ARNt efficace mais ayant incorporé des acides aminés endogènes à la place de l'UAA. Les levures poussent sur du milieu supplémenté avec 0,1% d'acide fluoro-orotique sans l'UAA. Les cellules qui vont exprimer URA3 (grâce à la suppression des codons stop ambre de GAL4) vont convertir cet acide en produit toxique qui va les tuer. Ainsi les clones de levure survivant sont encore une fois sélectionnés.

1.2. Etablissement et utilisation de la paire *E. coli* TyrRS/*Bacillus stearothermophilus* tRNA^{Tyr}

Chez les mammifères cependant, les paires dérivées de *E. coli* TyrRS/*E. coli* tRNA^{Tyr} ne semblent pas pouvoir fonctionner car les ARNt dérivés de *E. coli* ne s'expriment pas dans ces cellules, malgré des mutations pour adapter les régions promotrices internes (Sakamoto et al., 2002). C'est pourquoi l'équipe de Shigeyuki Yokoyama a décidé d'utiliser l'ARNt provenant de *Bacillus stearothermophilus* qui contient naturellement les séquences promotrices nécessaires à son expression dans des cellules de mammifères (**figure 95**).

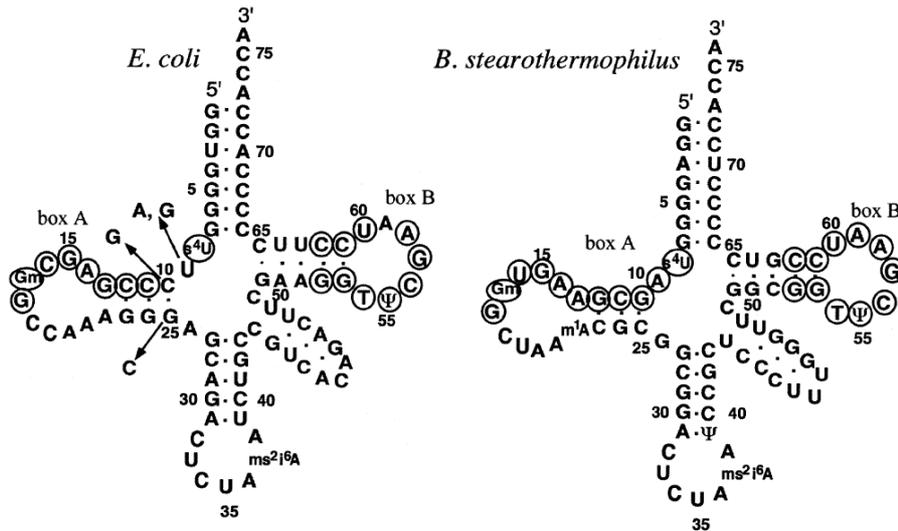


Figure 95: Différences structurales entre les ARNt d' *E. coli* et de *B. stearothermophilus* (d'après (Sakamoto et al., 2002)).

L'établissement de *Bst*ARNt^{Tyr}_{CUA} a été effectué de cette manière :

1. Mutation de l'anticodon en CUA
2. Ajout d'une séquence flanquante provenant de l'ARNt^{Tyr} humain pour en augmenter la transcription
3. Construction d'un plasmide contenant neuf copies du gène codant pour *Bst*ARNt^{Tyr}_{CUA}

Ainsi, ils ont été capables d'incorporer l'UAA 3-L-iodo-tyrosine dans la protéine Ras en réponse à la suppression d'un codon stop ambre incorporé dans son gène.

Cette méthode a aussi été évaluée sur l'incorporation d'UAA dans des protéines membranaires et a permis notamment l'incorporation de *p*-acetyl-L-phenylalanine et *p*-benzoyl-L-phenylalanine dans un RCPG, le récepteur CCR5 et dans la rhodopsine par l'équipe de Thomas P. Sakmar (Ye et al., 2008) ainsi que l'incorporation de *p*-azido-L-phenylalanine dans la rhodopsine (Ye et al., 2009).

2. L'incorporation de composants photosensibles dans les protéines

Il s'agit d'une approche puissante pour étudier les mécanismes moléculaires, les fonctions biologiques, les interactions, les relations structure-fonction avec un stimulus orthogonal à la plupart des cellules avec un niveau de contrôle spatial et temporel élevé.

Pour cela on utilise un acide aminé contenant une fonction agissant comme une sonde de photo-marquage : lorsque l'entité est activée par une irradiation lumineuse de longueur d'onde appropriée, une espèce hautement réactive va se former qui va permettre d'effectuer des réactions pouvant mener à des liaisons covalentes avec des régions ou d'autres molécules proches de la zone de réaction.

L'incorporation d'un acide aminé non naturel photo-réactif nécessite donc d'effectuer un criblage de sites d'introduction afin de trouver une zone du récepteur qui est potentiellement sensible aux changements conformationnels.

2.1. Les fonctions utilisées comme sondes de photo-marquage et exemples d'acides aminés qui en sont dérivés

Ces entités sont très utilisées pour effectuer des relations structure-fonction car elles vont permettre de vérifier directement et rapidement la proximité spatiale des composants moléculaires d'une biomolécule, ou de visualiser des interactions. Elles doivent cependant répondre à certains critères : être inerte quand il n'y a pas d'irradiation, pouvoir être activées en milieu physiologique et que l'espèce réactive induite par la lumière puissent réagir plus rapidement que les mouvements de la biomolécule étudiée (Vodovozova, 2007).

Les fonctions les plus utilisées sont (**figure 96**), (Brunner, 1993) :

- les aryl-azides : dont l'application de lumière UV (ils absorbent à des $\lambda < 280\text{nm}$ mais peuvent également être photolysés à des $\lambda > 300\text{nm}$) va créer une espèce hautement réactive, le nitrène, à durée de vie très courte (environ 1ns) pouvant réagir pour former

des liaisons covalentes avec des résidus à proximité spatiale. Ces composés sont de petites tailles et une gamme importante est commerciale.

- les diazirines qui vont former des carbènes hautement réactifs via des irradiations à des longueurs d'ondes proches des 350nm et réagir avec les liaisons C-C, C-H, O-H, X-H (X étant un hétéroatome) (Dubinsky et al., 2012)

- les benzophénones : cette fonction va réagir préférentiellement avec les liaisons C-H et se montre plus stable à la lumière ambiante car possède des longueurs d'onde d'absorbance plus grande, cependant elle est plus volumineuse. Le **p-benzoyl-L-phenylalanine** (Bpa) est un acide aminé qui a été correctement incorporé dans différents organismes, notamment chez *E. coli* (Chin et al., 2002a).

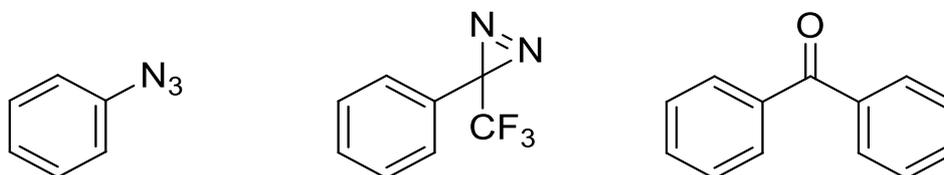


Figure 96: Les principaux groupements utilisés comme sondes de photo-marquage. De gauche à droite : groupements aryl-azides, diazirines et benzophénones.

2.2. Photolyse des aryl-azides

L'irradiation (mais aussi la thermolyse) va provoquer la transition vers un état excité, et la dissociation d'une molécule de N₂, ce qui va engendrer la formation d'une espèce nitrène hautement réactive qui peut réagir avec des liaisons C-H et s'y incorporer mais qui peut également se réarranger en intermédiaire azacyclotetraène (**figure 97**), molécule très électrophile, capable de réagir avec des -NH₂, =NH, -SH, -OH pour former des liaisons covalentes (Turro, 1980).

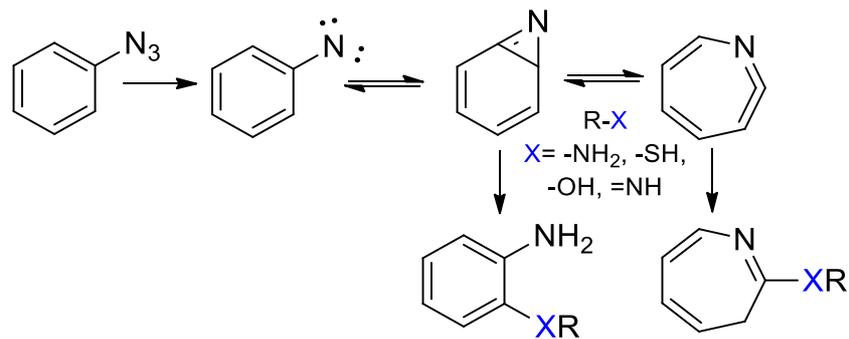


Figure 97: Mécanisme de photo-réaction de la fonction phényl-azide

2.3. Acide aminé choisi AzF : *p*-azido-L-phenylalanine (AzF)

L'acide aminé que nous avons choisi d'incorporer a été largement utilisé pour étudier différentes protéines.

La première incorporation de cet acide aminé a été effectuée dans le génome d'*E. coli*. A cet effet des TyrRS dérivées de *Methanococcus jannaschii* dont 5 résidus ont été variés ont été soumises aux étapes de sélection positive et négative (voir paragraphe 1.1.) jusqu'à ce qu'une synthétase montre une efficacité et fidélité satisfaisante, permettant l'incorporation de l'AzF dans le gène de la myoglobine et un photo-crosslinking efficace (Chin et al., 2002b).

Dans le cadre du contrôle de récepteurs canaux, cet acide aminé a montré son utilisation pour le photo-contrôle des récepteurs ionotropiques au glutamate (Zhu et al., 2014). Les récepteurs NMDA sont des hétéro-tétramères faisant partie de la famille des récepteurs canaux. Ils sont constitués de deux sous-unités qui lient la glycine appelées GluN1, et de deux sous-unités qui lient le glutamate appelées GluN2 mais qui peuvent être de 4 sous-types différents : de GluN2A à D. Incorporé à l'interface entre deux dimères, l'AzF a engendré une inhibition irréversible de l'activité des récepteurs après une irradiation UV entre GLuN1/GLuN2B alors qu'aucune inhibition de l'activité des récepteurs après une irradiation UV entre GLuN1/GLuN2A n'avait lieu. Ainsi, cela montre les différences d'interactions que font ces sous-unités. L'incorporation a été effective dans les ovocytes de Xénope (Ye et al., 2013a) et

cellules de mammifères HEK, ainsi que dans des neurones en culture de la zone de l'hippocampe (**figure 98**).

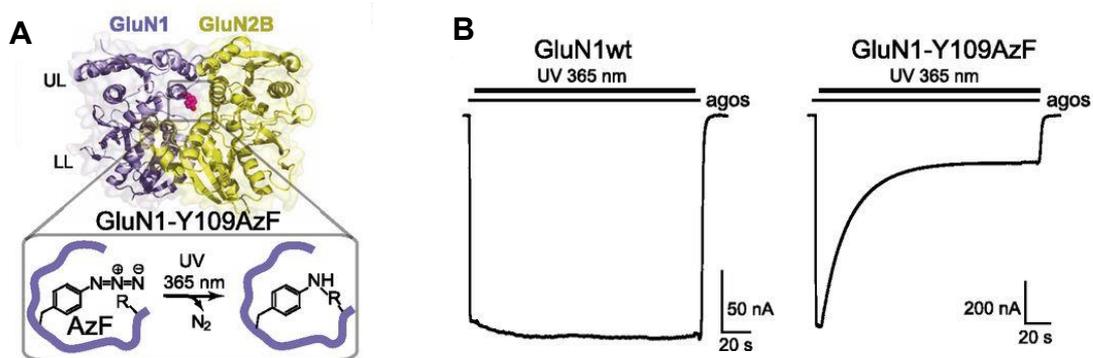


Figure 98: Utilisation d'azido-L-phenylalanine dans l'étude des récepteurs ionotropiques au glutamate. A. Incorporation d'AzF par suppression de codon STOP ambré à l'interface entre deux sous-unités des récepteurs NMDA. **B.** Comparaison des courants des récepteurs wild-type et mutés vis-à-vis d'une irradiation UV à 365nm.

STRATEGIE GENERALE

Nous avons choisi d'incorporer l'AzF dans la séquence des récepteurs P2X. Pour cela nous avons décidé d'utiliser le récepteur rP2X2 (sous type P2X2 de *rat*) qui est un sous-type montrant des courants robustes et peu de désensibilisation.

Afin de visualiser l'efficacité de l'incorporation, une fusion de la séquence codant pour une protéine fluorescente (GFP) à l'extrémité 3' de la séquence codant pour le rP2X2 a été effectuée.

1. Composants de la méthode choisie pour l'incorporation de l'acide aminé photo-marquable.

Les composants de la méthode sont les suivants (**figure 99**):

1. Le gène d'intérêt : rP2X2-GFP dont un acide aminé de la séquence a été muté en codon stop ambre par mutagenèse dirigée, sous-cloné sur pcDNA3.1 et lié à la GFP comme système rapporteur.
2. AzF-RS : qui est l'aminoacyl-ARNt-synthétase développée pour l'incorporation d'AzF
3. Yam : dérivé du tRNA^{tyr} de *Bacillus stearothermophilus* et qui reconnaît le codon stop ambre
4. L'acide aminé non naturel : AzF qui va être simplement ajouté au milieu de culture des cellules.

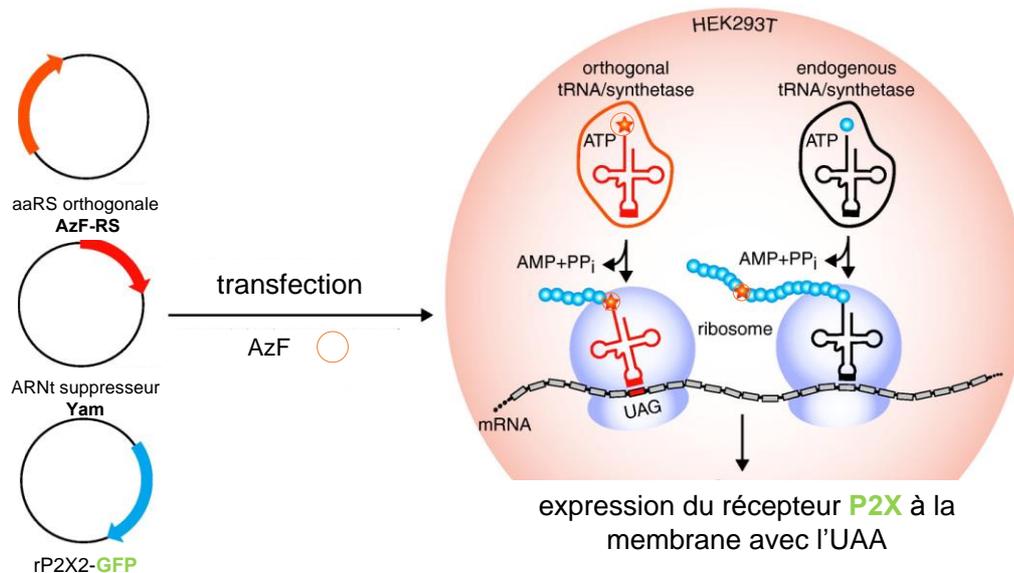


Figure 99: Stratégie générale d'incorporation d'AzF dans les récepteurs rP2X2-GFP (d'après (Daggett and Sakmar, 2011)).

Le récepteur rP2X2-GFP muté ponctuellement en mutant stop ambre est transfecté en présence de l'ARNt suppresseur, de l'aaRS et de l'acide aminé dissous dans le milieu de culture des cellules. Le fait d'obtenir des cellules fluorescentes est censé être le premier argument en la faveur d'une incorporation correcte de l'acide aminé non naturel. Après incorporation, les cellules choisies sont celles qui présentent de la fluorescence. On observe leurs réponses électrophysiologiques en enregistrements « whole-cell ». Le fait de répondre à l'ATP est censé être le deuxième argument confirmant l'incorporation correcte de l'acide aminé. Puis les cellules sont irradiées en présence ou absence d'ATP et l'effet de l'irradiation est évalué, consistant la troisième preuve d'incorporation ainsi que le moyen d'étude de mouvements moléculaires éventuels.

2. Choix des mutations STOP effectuées.

Des mutations (**figure 101**) ont été incorporées dans la séquence du récepteur, elles ont été choisies de la manière suivante :

- Acides aminés de taille proche à l'azido-phénylalanine (**figure 100**): les tyrosines sont des isostères de cet acide aminé et ont donc été favorisées dans notre choix.

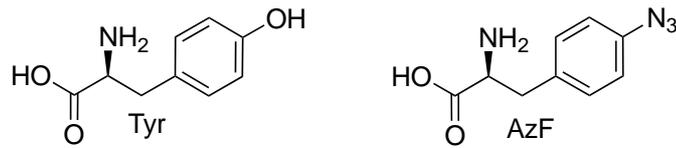


Figure 100: Structures chimiques de la tyrosine (Tyr) et de la para-azido-L-phénylalanine (AzF)

- Dérivés situés à des sites sensibles aux changements conformationnels afin de vérifier l'incorporation.

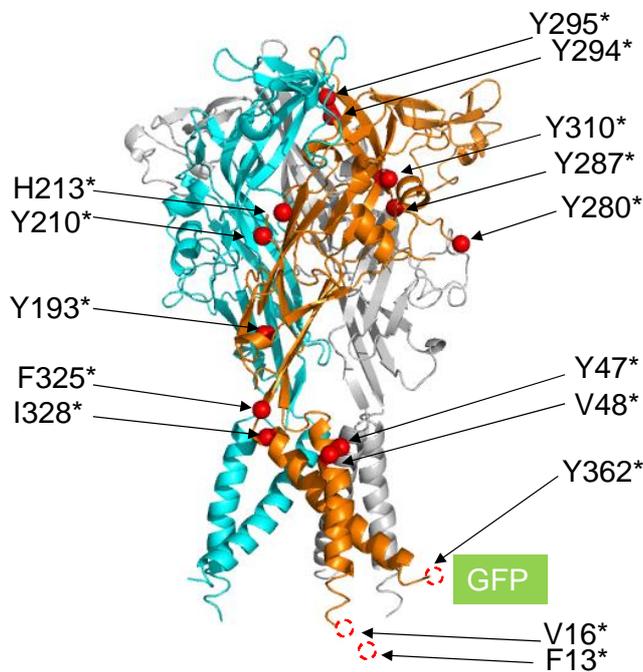


Figure 101: Mutations STOP effectuées par mutagenèse dirigée sur le récepteur rP2X2-GFP lors de ce projet, représentées sur le modèle dérivé de la structure cristallographique.

Des mutants ont d'abord été choisis, satisfaisants les critères précédents, étant connus pour être à proximité spatiale lors de certaines circonstances conformationnelles des récepteurs P2X afin de servir de vérification de notre système. Dans ce cadre nous avons choisi les mutants **V48*** et **I328*** car pour la paire V48C/I328C l'équipe d'Alan North a montré la formation d'un pont disulfure entre ces

deux résidus, résultant d'une interaction qui stabilise l'état fermé (**figure 102**). On peut donc émettre l'hypothèse que ceux-ci sont donc à proximité spatiale suffisante lors de l'état fermé pour créer une liaison covalente photo-induite après l'incorporation de l'AzF à l'une ou l'autre position suivie d'une irradiation ((Stelmashenko et al., 2014) et (Khakh and Egan, 2005)). Nous avons également créé le mutant **Y47*** qui est très proche de ces résidus.

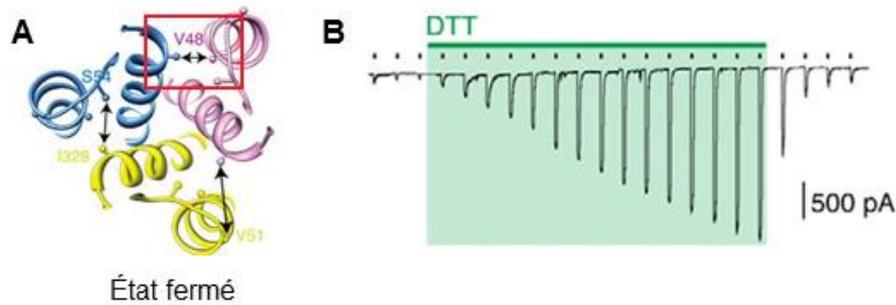


Figure 102: Interaction V48C/I328C montrées par réduction induite par le DTT de la liaison S-S formée (adapté de (Stelmashenko et al., 2014)).

Une deuxième paire de résidus intéressantes est constituée des histidines 120 et 213. En effet, mutés en cystéines H120C et H213C forment également un pont disulfure, preuve de leur proximité (Nagaya et al., 2005), c'est pourquoi nous avons créé le mutant **H213***.

Ensuite, les autres mutations nous avons formulé des hypothèses concernant les mouvements moléculaires que nous pourrions mettre en évidence : des mutations ont été effectuées dans les parties intracellulaires (**F13***, **V16***, **Y362***) pour pouvoir y observer des interactions, d'autres mutations ont été localisées à l'interface entre deux sous-unités (**Y210***, **Y294***, **Y295***) afin d'en observer les rapprochements et éloignements durant les changements fonctionnels, et enfin des mutants situés à la surface des récepteurs dans différentes zones (**F325***, **Y310***, **Y287***, **Y280***) ont postulés pouvoir être marqués ultérieurement par des fluorophores (voir **perspectives**).

3. Stratégie alternative face aux difficultés rencontrées.

Face aux difficultés rencontrés face à l'incorporation de l'AzF dans les récepteurs P2X nous avons décidé d'utiliser un système connu et publié, la luciférase. Cette enzyme va permettre l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine, en relarguant un photon (**figure 103**). Si le codon STOP d'un mutant de la luciférase est remplacé par l'acide aminé non naturel choisi, celle-ci s'exprimera correctement et pourra catalyser la réaction d'oxydation de la luciférine, on pourra donc détecter de la luminescence. En revanche, si le codon STOP n'est pas remplacé, la luciférase ne sera pas correctement exprimée, et ainsi aucune luminescence ne sera détectée.

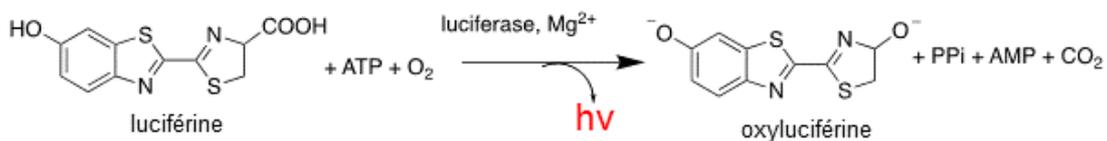


Figure 103: Réaction d'oxydation de la luciférine par la luciférase menant à l'obtention d'oxyluciférine et d'un photon.

PARTIE EXPERIMENTALE

AzF est commercial et a été acheté chez Bachem pour le racémique et chez ChemImpex pour le composé optiquement pur (L). La Lipofectamine® provient de chez Thermo Fischer Scientific.

1. Biologie Moléculaire

1.1. Ligation rP2X2-GFP

Le fragment EGFP, correspondant à l'insert, est amplifié par PCR (KAPA2G Robust) puis est digéré par BamH1 et Xho 1. rP2X2-Cmyc sur pcDNA3.1, correspondant au vecteur, est digéré par les mêmes enzymes. Le vecteur est déphosphorylé par l'enzyme CIP. Les ADN sont ensuite purifiés (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Naegel) et l'ADN est quantifié sur gel d'agarose avec 1% de BET. L'insert est mis en proportion deux fois plus grande que le vecteur et l'échantillon est mis à incuber une nuit avec la T4 ADN ligase (16°C). L'échantillon est ensuite dialysé, l'eau est évaporée et l'ADN est électroporé dans des bactéries électro-compétentes. Après incubation (1h, 37°C) et étalement des bactéries sur boîtes d'agarose (1 nuit, 37°C), l'ADN est purifié (Kit Nucleobond XtraMini de Macherey-Nagel), digéré avec des enzymes de restriction et les tubes possédant les bons profils de restriction sont amplifiés (1h, 37°C). Cet ADN est également purifié (Kit Nucleobond XtraMaxi de Macherey-Nagel), et sa séquence est contrôlée par séquençage (GATC-Biotech).

1.2. Gènes et plasmides utilisés

Les plasmides contenant Yam et AzF-RS nous ont été envoyés par le docteur Shixin Ye (*Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure-Paris*), Yam est porté par le plasmide pSVB et AzF-RS par le plasmide pcDNA3.1, et ont été utilisés après amplification sans modifications.

1.3. Mutagenèse dirigée

Les mutants ont été effectués sur le récepteur rP2X2-GFP exprimé dans le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3.1 (+) contenant un gène de résistance à l'ampicilline. La procédure est la même que pour les mutants effectués au **chapitre 1**.

2. Transfections

Les cellules transfectées sont des HEK293T et les quantités d'ADN testées sont consignées dans le **tableau 19**. Les transfections au phosphate de calcium sont effectuées de la même manière que la procédure décrite au **chapitre 1**.

Procédure générale pour les transfections à la Lipofectamine : les cellules HEK 293 sont cultivées dans du DMEM supplémenté à 10% de FBS (Invitrogen), 1X Glutamax, et d'antibiotiques (100 U/mL pénicilline, 100µg/mL streptomycine) dans un incubateur (37°C, 5% CO₂). Avant la transfection, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont lavées deux fois au PBS. Les quantités de Lipofectamine sont ajustées en fonction des indications du fournisseur et de la quantité d'ADN utilisée. Les transfections sont effectuées dans du milieu non supplémenté et six heures après la transfection le milieu est supplémenté comme à l'accoutumée.

Concentration en mutant STOP (µg)	Yam (µg)	AzF-RS (µg)
1	1	1
1	1	0,1
1	1	0,01
1	3	0,1
0,3	0.3	0,03
0,3	0.03	0.003
0.3	0.01	0.001
0,3	0,03	0,01
0.3	0.005	0.0005
0.3	0.005	0.005
0.3	0.001	0.001
0.3	0.0005	0.0005
0.3	0.005	0.3
0.3	0.005	0.05
0.2	0.3	0.02

Tableau 19: Quantités d'ADN utilisées des composants du système pour réaliser l'incorporation d'AzF dans des cellules HEK

3. Préparation des solutions d'AzF

Les solutions ont été testées filtrées et non filtrées pour écarter la possibilité que les filtres retiennent des particules d'AzF non solubles. Les solutions qui ont été testées sont les suivantes :

*DMEM 1mM AzF sonication

*DMEM 1mM AzF sonication, pH ajusté avec HCL

*AzF dans NaOH dans DMEM puis pH ajusté avec HCl

*AzF dans KOH dans DMEM puis pH ajusté avec HCl

*DMEM 1mM AzF, 1% DMSO

*DMEM 1mM AzF, 1% ACN

*DMEM sans sérum 1mM AzF

*DMEM 10mM AzF ajouté pour arriver à 0,5 ; 1 ; 2 ou 3mM avant transfection, directement après transfection, 3h après transfection ou 6h après transfection.

4. Tests d'incorporation dans le gène de la luciférase

Les plasmides contenant les gènes pour la luciférase wild-type (Fluc-Wt) et le mutant ambre de celle-ci (Fluc-70amb) nous ont été envoyés par Shixin Ye.

Nous avons utilisé le kit Pierce firefly Luc one-step glow assay de ThermoScientific en suivant les instructions fournies.

Procédure générale : les cellules sont cultivées dans du DMEM supplémenté (pour la transfection au phosphate de calcium) ou non (pour la Lipofectamine) en FBS 10% (Invitrogen), 1X Glutamax, et d'antibiotiques (100 U/mL pénicilline, 100µg/mL streptomycine). Les plaques sont laissées revenir à température ambiante. Le milieu est aspiré et les cellules sont rincées au PBS. Le réactif luciférine est dilué 100 fois dans le tampon prévu à cet effet, et 100µL de ce mélange sont déposés dans chaque puit (plaques 96 puits). Les plaques sont incubées 15min à température ambiante sous agitation. La lecture de la luminescence est effectuée au luminomètre (Amersham Imager 600).

5. Enregistrements électrophysiologiques

Les enregistrements électrophysiologiques ont été effectués dans la configuration whole-cell. Les protocoles d'irradiation utilisés contiennent des séquences d'irradiation en présence et en absence d'ATP, de différentes longueurs, avec une λ irradiation de 365nm.

RESULTATS

1. rP2X2-GFP

Les récepteurs rP2X2-GFP après transfection dans des cellules HEK arborent une fluorescence majoritairement localisée à la membrane (**figure 104A**) et montrent des réponses robustes à des applications d'ATP (**figure 104B**).

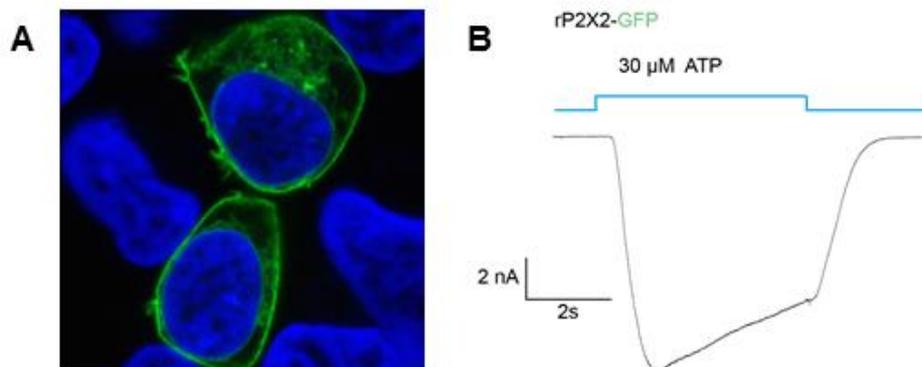


Figure 104: Analyses des récepteurs rP2X2-GFP transfectées dans des cellules HEK293T. A. Image en microscopie confocale (marquage des noyaux au Hoechst). **B.** Enregistrement électrophysiologique en configuration whole-cell avec application d'ATP.

2. Expérience d'incorporation d'AzF dans la luciférase

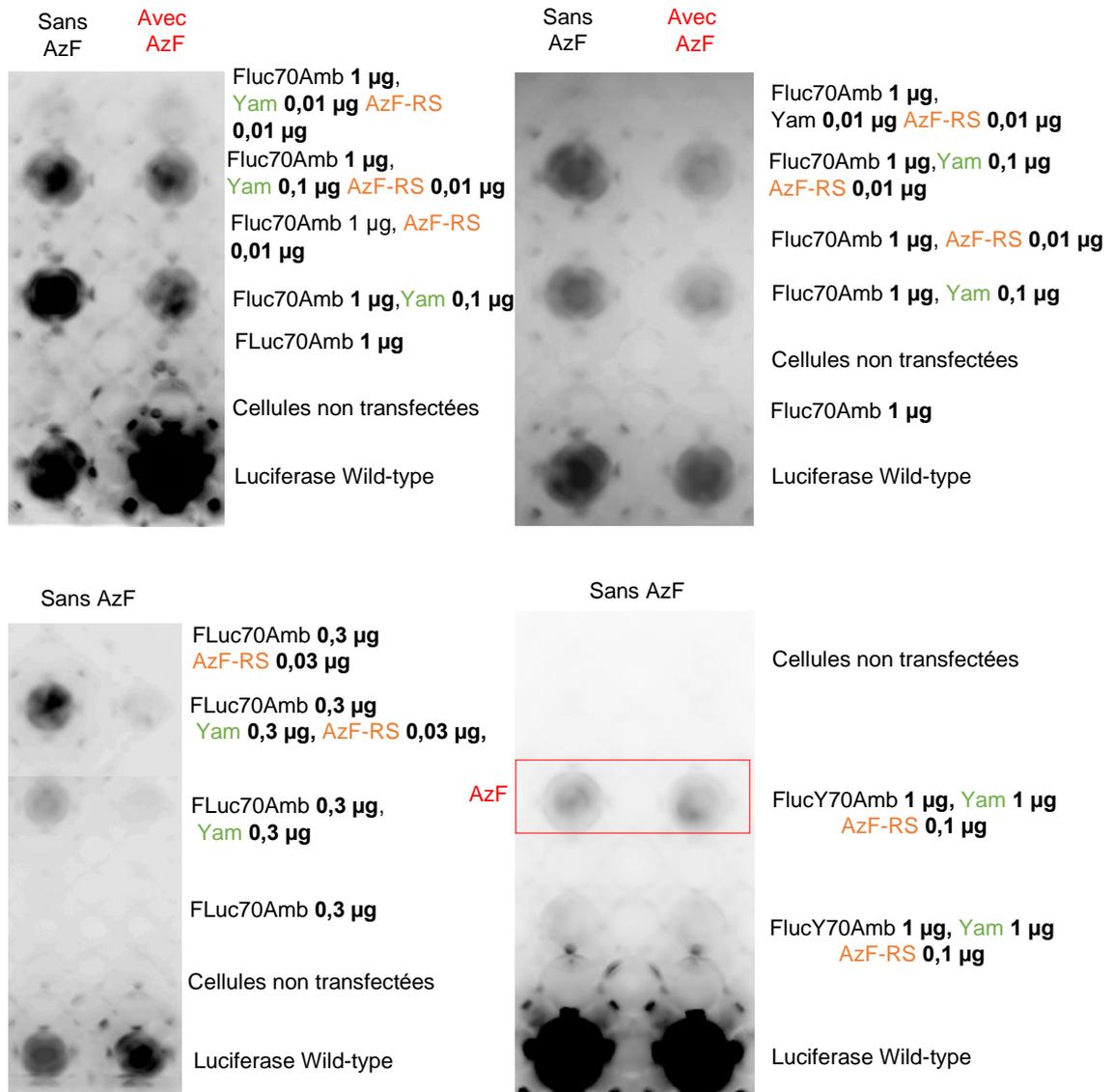


Figure 105: Plaques 96 puits transfectées avec la luciférase wild-type et son mutant ambre (Fluc70Amb) et différentes concentrations des composants du système d'incorporation, AzF-RS et Yam en présence ou absence d'AzF, révélées au luminomètre.

Ces expériences ont permis de mettre en évidence plusieurs choses dans nos conditions. Tout d'abord, quel que soit le système utilisé (avec/sans synthétase, avec/sans ARNt suppresseur) et quelles que soient les concentrations utilisées, l'ajout d'AzF au milieu de culture des cellules ne résulte pas en une augmentation visible de la luminescence. Le faible effet observé en 4 peut résulter d'une hétérogénéité

d'étalement des cellules dans les puits, puisqu'il n'a pas été reproductible. Ensuite, si on observe les puits ne contenant pas de milieu supplémenté en AzF exprimant le mutant stop de la luciférase, on observe que dans certaines conditions, ceux-ci arborent une forte luminescence. Ceci signifie qu'un acide aminé endogène a nécessairement été incorporé pour remplacer le codon STOP, menant à une traduction complète de la luciférase.

Deux hypothèses peuvent expliquer cette réparation :

- AzF-RS peut reconnaître des acides aminés endogènes et les charger sur Yam
- Yam peut être reconnu par des synthétases endogènes et être chargé de ce fait par des acides aminés endogènes

Puisque la réparation a lieu même en absence d'AzF-RS mais ne semble pas avoir lieu en absence de Yam, on peut en déduire que la deuxième hypothèse semble plus proche de la réalité.

3. Expériences d'incorporation d'AzF dans les récepteurs P2X

Les mutants Y47*, V48* et Y280* montrent une nette fluorescence lorsqu'ils sont transfectés seuls (**tableau 20**). On peut en conclure que le codon stop n'a pas été correctement lu puisque la GFP fusionnée en Cterminal s'exprime. Ils ne sont donc pas de bons candidats à l'incorporation d'un acide aminé non naturel.

Mutation	F13*	V16*	Y47*	V48*	Y193*	Y210*	H213*	I328*	F325*	Y280*	Y287*	Y294*	Y295*	Y310*	Y362*
----------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Tableau 20: Récapitulatif des mutations effectuées sur le récepteurs rP2X2-GFP et fluorescence en absence du système d'incorporation à 48h de transfection. Les cases vertes correspondant aux mutations menant à l'expression d'une GFP fonctionnelle dans les cellules transfectées au bout de 48h.

Concernant les autres mutants, n'arborant pas de fluorescence lorsque transfectés seuls, ils ont été transfectés en présence d'AzF-RS, de Yam et d'AzF dans le milieu de culture, les concentrations et les conditions étant décrites dans la partie expérimentale. Ces tests n'ont mené à aucun résultat concluant, les contrôles négatifs dans AzF étant toujours positifs (fluorescence et réponse ATP).

4. Analyse de AzF

Afin d'éliminer la possibilité que notre acide aminé soit simplement dégradé nous avons effectué une analyse de masse.

(HR-MS) calculé pour : $C_9H_{11}N_4O_2^+$: 207.0877, trouvé : 207.08771.

DISCUSSION

1. Résultats obtenus dans d'autres publications

En 2009, Shixin Ye et l'équipe de Thomas Sakmar ont réussi l'incorporation d'AzF dans la rhodopsine. Afin de déterminer quelle synthétase serait la plus efficace à cet effet, ils ont testé préalablement six mutants évolués pour reconnaître l'azido-L-phénylalanine et l'ARNt Yam sur la luciférase mutée en position Y70 en codon STOP ambre (Ye et al., 2009).

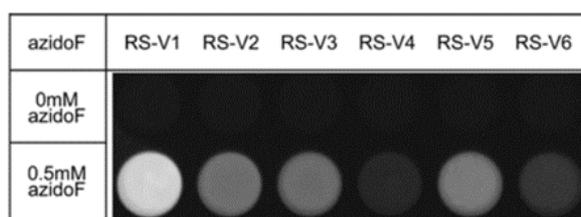


Figure 106: Incorporation d'AzF dans le gène de la luciférase mutée en Y70Amb avec six mutants de synthétase différents.

Ces résultats montrent que, lorsque l'AzF est ajouté au milieu, de la luminescence, correspondant à un remplacement du codon STOP et la synthèse d'une luciférase complète par le ribosome, est visualisée. Quand le milieu ne contient pas l'AzF, comme attendu, la luminescence n'est pas observée (**figure 106**).

Etant donné l'incapacité de faire fonctionner cette méthode entre nos mains nous avons réfléchi à toutes les sources possibles de non adaptabilité de celle-ci.

2. Compétition avec une réparation endogène

Premièrement, pour les mutants présentant une fluorescence après transfection sans aucun composant du système d'incorporation et en absence d'acide aminé naturel, il est évident que le codon STOP n'a pas été lu comme tel par la machinerie de traduction de la cellule (**figure 107**).

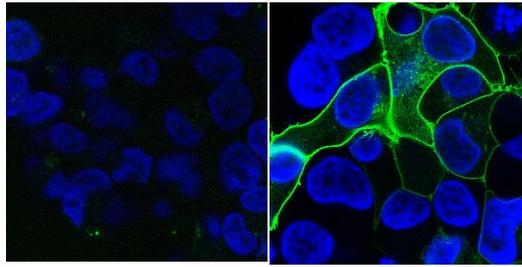


Figure 107: Visualisation par microscopie confocale de la différence de réparation entre deux mutants effectués dans des zones différentes des récepteurs rP2X2-GFP. Les cellules HEK-293 sont transfectées avec deux mutants différents (Y210* à gauche et Y47* à droite) sans le système d'incorporation de l'UAA, ni l'UAA. Les noyaux sont marqués au Hoechst et on observe que les cellules exprimant le mutant Y210* n'ont pas de fluorescence ce qui signifie que le mutant STOP s'exprime correctement, alors que le mutant Y47* semble être réparé au niveau de son codon STOP car il exprime la GFP.

Ceci pourrait être dû à une éventuelle compétition entre Yam et les facteurs de terminaison (eRF1, eRF3) (Rospert et al., 2005).

3. Compétition avec une réparation médiée par l'ARNt Yam

D'après nos résultats dans l'incorporation d'AzF dans la luciférase, Yam peut être reconnu et chargé par des aaRS endogènes. Ceci a également été montré par le docteur Shixin Ye (**figure 108**) qui a mis en évidence que, lors de l'expression dans des ovocytes de Xénopes, Yam pouvait être reconnu par la Tyr-RS (Ye et al., 2013b).

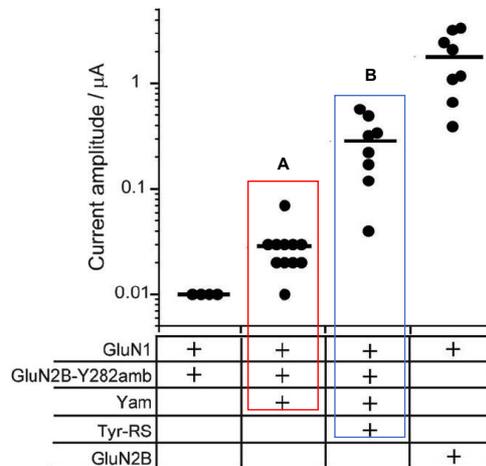


Figure 106: Tests des composants du système d'incorporation pour en évaluer l'efficacité et la fidélité dans des ovocytes de Xénope transfectés avec des récepteurs ionotropiques au glutamate contenant des codons STOP ambre (Ye et al., 2013b). A. En absence de Tyr-RS. B. En présence de Tyr-RS.

4. Compétition avec réparation AzF-RS

Des acides aminés canoniques peuvent également être susceptibles d'être chargés sur Yam. Comme le montrent les intensités de courant robustes, en absence d'AzF, AzF-RS et Yam permettent une réparation des sous-unités des récepteurs ionotropiques au glutamate mutés en ambre (**figure 109**), probablement par l'incorporation de tyrosine (Ye et al., 2013b).

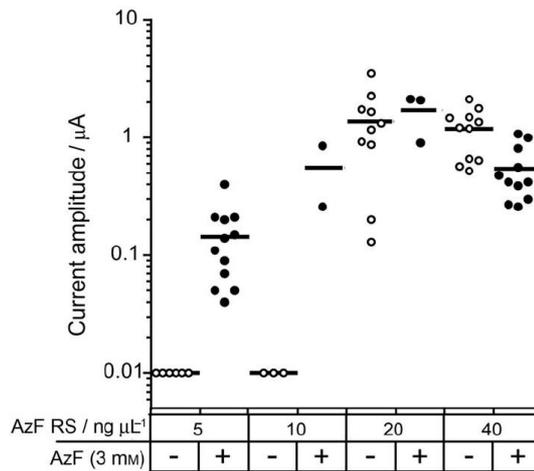


Figure 109: Amplitudes de courant obtenus dans des ovocytes de Xénopes transfectés avec des plasmides contenant GluN1 et GluN2B-Y282amb en présence de Yam et d’AzF-RS avec AzF ou non dans le milieu de transfection (Ye et al., 2013).

Il est important de noter d’après cette figure que lorsque l’AzF-RS est transfectée avec un ratio 6 :1 par rapport au mutant STOP elle semble ne catalyser la réaction d’aminoacylation qu’avec l’acide aminé non naturel. Dans notre cas, afin d’essayer de reproduire ces résultats sur les récepteurs P2X muets, nous avons utilisé un ratio 10 :1 entre le mutant STOP et l’AzF-RS, mais nous avons quand même pu observer une réponse ATP considérable en absence de l’acide aminé non naturel sur les mutants transfectés en présence de l’ARNt et de l’aaRS (**figure 110**).

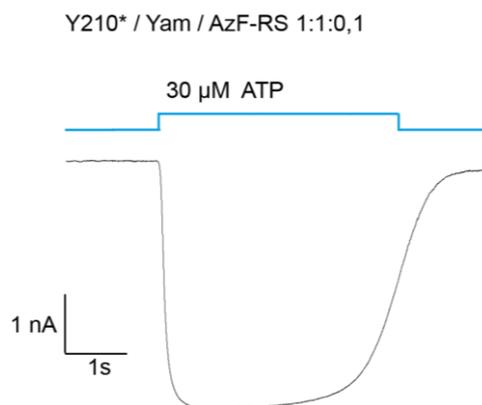


Figure 107: Réponse ATP enregistrée en configuration whole-cell du mutant Y210* en absence d’AzF mais en présence de Yam et AzF-RS.

5. Problème avec la cible choisie

En 1983 (Bossi, 1983), une étude sur l'efficacité de lecture du codon STOP ambre UAG sur 42 sites différents du gène *LacI* a montré que celle-ci dépend du contexte dans lequel se trouve le codon. Les effets sont produits par les résidus situés en 3' du codon, et les plus marqués sont engendrés par la base suivant immédiatement le codon stop, les purines étant plus efficacement supprimées que les pyrimidines. De plus les effets de sensibilité au contexte ont montré également être dépendants de l'ARNt utilisé, certains étant plus sujets que d'autres à des lectures fautives dues au contexte. Ainsi, les structures secondaires de l'ARNm codant pour les récepteurs P2X sont peut-être impliquées dans la lecture non efficace de certains codon STOP incorporé dans la protéine.

6. Problème avec l'acide aminé AzF ?

L'acide aminé étant directement solubilisé dans le milieu de culture des cellules, il doit pouvoir traverser la membrane plasmique afin d'être incorporé. Afin d'éliminer la possibilité que cet acide aminé ne soit pas stable dans les conditions que l'on utilise, une nouvelle solution a été effectuée avant chaque transfection et est gardée à l'abri de la lumière. Nous avons également effectué une analyse de masse, et il n'était pas dégradé mais peut-être l'est-il par des enzymes ?

Afin de tester la possibilité que les problèmes observés dans ces expériences sont dus à l'acide aminé, il pourrait être judicieux d'essayer d'incorporer un autre acide aminé non naturel.

PERSPECTIVES

Les particularités de l'acide aminé choisi, bien que n'ayant pas pu être incorporé dans les récepteurs P2X, en font une plateforme versatile utilisable pour différentes applications. La fonction $-N_3$ permet en effet d'effectuer outre le marquage de photo-affinité d'effectuer des réactions bio-orthogonales, et ainsi de servir de point d'ancrage à l'incorporation d'autres molécules (sondes fluorescentes, marqueurs etc.).

1. Ligation de Staudinger-Bertozzi (Köhn and Breinbauer, 2004)

Cette réaction est dérivée de la réaction de Staudinger, qui consiste en la formation d'un iminophosphorane par addition nucléophile d'une fonction phosphine sur une fonction azide (Staudinger and Meyer, 1919). Si le phosphorane possède un groupement acyle adjacent, l'aza-ylide formé par l'addition nucléophile entre le phosphorane et l'azide va pouvoir attaquer le centre électrophile qu'est le carbonyle du groupe acyle. Ce produit réarrangé s'hydrolyse ensuite pour former une liaison amide. (Saxon et al., 2000)

Cette réaction a été utilisée pour réaliser des marquages fluorescents spécifiques (Chakraborty et al., 2010), ou du marquage de surface cellulaire avec des dérivés de biotine (Saxon and Bertozzi, 2000).

2. Cycloaddition [3+2] avec des alcynes terminaux, catalysée par des sels de Cu^I (CuAAC)

En 2002, la cycloaddition 1,3 dipolaire entre un azide et un alcyne terminal manant à un 1,2,3-triazole, décrite par Rolf Huisgen (Huisgen, 1976), a été modifiée dans une version catalysée par le cuivre (I) conjointement par les équipes de Morten Meldal (Tornøe et al., 2002) et de Karl B. Sharpless (Rostovtsev et al., 2002). Cette réaction, extrêmement utile pour former des liaisons covalentes entre deux édifices moléculaires, a depuis été utilisée dans un nombre impressionnant de domaines, allant de la synthèse organique, à la chimie médicinale, la chimie des polymères et la formation de bio-conjugués (Hein and Fokin, 2010).

Cette réaction implique l'utilisation de deux fonctions bio-orthogonales, la première étant la fonction azide, que l'on retrouve sur l'acide aminé AzF et la seconde, un alcyne terminal. Il serait donc possible d'effectuer cette réaction, après une correcte incorporation de la fonctionnalité azide par le biais de l'incorporation d'acide aminé non naturel, avec des molécules arborant une fonction alcyne. Ceci pourrait permettre par exemple d'incorporer des sondes fluorescentes.

Le cuivre étant potentiellement toxique pour des cellules vivantes, l'utilisation de fluorophores possédant une fonction alcyne contrainte (comme les cyclo-octynes) pourrait être également envisagée (Jewett and Bertozzi, 2010), (Huber et al., 2013).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES GENERALES

Ce travail de thèse a permis de montrer qu'avec des méthodes synthétiques et de la photochimie couplées à des modifications génétiques ponctuelles on peut contrôler la fonction de protéines membranaires, et étudier les mécanismes moléculaires responsables des transitions fonctionnels de ceux-ci dans des cellules vivantes.

1. A propos des techniques.

Trois différentes techniques ont été développées et adaptées lors de cette thèse aux récepteurs P2X, avec des résultats et perspectives différentes (**tableau 21**). En effet, la première méthode présentée (**chapitre 1**), correspondant à la conception et l'application d'agrafes photo-isomérisables a été appliquée avec succès à ces récepteurs et a donné lieu à des études très informatives concernant les mouvements moléculaires impliqués dans certaines transitions allostériques de ces protéines. La synthèse et la caractérisation d'un acide aminé photo-clivable a également été réalisée, montrant des propriétés photo-chimiques inédites (efficacité en termes de photo-clivage à des longueurs d'ondes supérieures à 400nm) et des perspectives d'amélioration de cet outil ont été évoquées (**chapitre 2**). L'application biologique de cet acide aminé va maintenant être effectuée au sein du laboratoire du Dr. Stephan Pless à Copenhague. La dernière méthode que nous avons essayé de mettre au point sur ces récepteurs, à savoir, incorporer un acide aminé photo-réactif via une expansion du code génétique (**chapitre 3**), n'a pas fonctionné dans nos conditions mais nous avons pu suggérer des hypothèses concernant ces résultats et exprimer des perspectives explorables ultérieurement.

	“AGRAFES” PHOTO-ISOMÉRISABLES: MAMs	SYNTHESE ET INCORPORATION D’UN ACIDE AMINE PHOTO-CLIVABLE	INCORPORATION D’UN ACIDE AMINE PHOTO-REACTIF
Synthèses	Relativement rapide (quelques étapes), mais purifications difficiles	Synthèse délicate, plusieurs stratégies différentes ont été testées	Commercial
Propriétés chimiques de l’outil	Utilisation “facile” mais problèmes de solubilités (1% dmso) Réutilisable après incorporation “gros” (ne peut pas être toléré sur toutes les positions) Limité aux zones transmembranaires, probablement → solubilité	Bonne solubilité dans les milieux aqueux	Cet acide aminé pose des problèmes de solubilité dans le milieu de culture cellulaire.
Incorporation dans le récepteur P2X	Nécessite de muter des acides aminés en résidus cystéine, et de muter les cystéines endogènes	Nécessite système de micro-injection dans les ovocytes	N’a pas fonctionné dans nos conditions
Propriétés photochimiques	La photo-isomérisation est effective pour toutes les molécules et mène à une photo-régulation des récepteurs P2X dans tous les cas.	Les longueurs d’ondes d’irradiation sont prometteuses. (>400nm)	/
Résultats	Mise en évidence de mouvements moléculaires impliqués dans l’ouverture des récepteurs P2X et dans la perméabilité aux gros cations organiques	Synthèse et caractérisation d’un acide amine photoclivable à des longueurs d’ondes supérieures à 400nm. Résultats de l’incorporation dans une cible biologique à voir ultérieurement.	/
Perspectives	Utilisation des MAMs pour photo-réguler d’autres sous-types de récepteurs P2X et pour étudier les mouvements moléculaires impliqués dans d’autres changements conformationnels des récepteurs P2X, comme la désensibilisation.	Evaluer l’efficacité de l’acide aminé 1 incorporé dans une cible biologique et s’en servir dans l’étude moléculaire des récepteurs P2X. (Dr. Stephan Pless) Améliorer l’outil à l’aide des deux précurseurs d’acides aminés synthétisés.	Comprendre pourquoi dans nos conditions cet acide aminé n’a pas pu être incorporé. Utiliser un autre acide aminé.
Adaptabilité de la méthode	Facile et rapide à utiliser sur d’autres cibles (limite : solubilité) Polyvalent	Nécessite le système adéquat mais en théorie applicable à d’autres cibles. Couteux en quantité de molécules utilisées.	Semble difficile à mettre en œuvre et long à adapter pour chaque cible

Tableau 21 : Récapitulatif critique des méthodes testées pour étudier les récepteurs P2X durant cette thèse.

Les MAMs (**chapitre 1**) vont maintenant être utilisés pour photo-contrôler les récepteurs P2X7 et mettre en évidence des mouvements moléculaires impliqués dans d'autres transitions allostériques des récepteurs P2X, notamment dans l'étude de la désensibilisation.

Concernant l'acide aminé photo-clivable (**chapitre 2**), des résultats ultérieurs de son incorporation dans les récepteurs P2X pourront mener à des relations structure-fonction.

2. À propos des récepteurs P2X.

Concernant l'étude mécanistique moléculaire des récepteurs P2X, nous avons été capable de photo-contrôler les différents sous-types avec les MAMs. Outre la capacité de photo-induire l'ouverture et la fermeture des récepteurs P2X, nous avons pu étudier différents mouvements moléculaires impliquant les hélices transmembranaires. Ces mouvements ont montré être impliqués dans les phénomènes d'ouverture des récepteurs P2X et dans les phénomènes de perméabilités étendues que ces récepteurs arborent.

Nous avons ainsi montré que le fameux phénomène de « dilatation » des récepteurs P2X, mis en évidence par la perméabilité au NMDG⁺, ne provenait pas d'un changement conformationnel lent induit par une application prolongé d'ATP mais que le récepteur P2X pouvait laisser passer de plus gros cations organiques directement après l'application d'ATP. De plus, nous avons mis en évidence des mouvements responsables de ce passage et pu observer qu'ils étaient similaires que les mouvements impliqués dans le passage des cations sodium, potassium et calcium, ce qui suggère que l'état ouvert et l'état appelé dilaté seraient en fait un seul et même état ouvert. De plus, nous avons pu montrer que dans cet état ouvert, un cation organique physiologique, la spermidine, pouvait transiter à travers le pore. Cette découverte est particulièrement intéressante d'un point de vue physiologique car elle démontre la possibilité des récepteurs P2X à engendrer dans leur état ouvert des voies de signalisation sensibles à de plus gros cations organiques, ce qui pourrait être le signe d'implications physio-pathologiques plus étendues pour les récepteurs P2X que celles précédemment décrites.

ANNEXES

Publications:

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.

Dans cette publication, j'ai effectué la synthèse et les analyses de la molécule MAM3.

Harkat, M.*, **Peverini, L.***, Cerdan, A.H., Dunning, K., Beudez, J., Martz, A., Calimet, N., Specht, A., Cecchini, M., Chataigneau, T., et al. (2017). On the permeation of large organic cations through the pore of ATP-gated P2X receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E3786–E3795.

*co-auteurs

Dans cette publication, j'ai effectué la totalité des synthèses et des analyses de la partie chimie. J'ai effectué l'expérience de screening en totalité ainsi que ses analyses, ainsi que les expériences de single-channel et également les analyses (50/50 avec Juline Beudez) et la totalité de l'expérience de perméation à la spermidine et de ses analyses.

Photo-switchable tweezers illuminate pore-opening motions of an ATP-gated P2X ion channel

Chloé Habermacher^{1,2}, Adeline Martz^{1,2}, Nicolas Calimet³, Damien Lemoine^{1,2}, Laurie Peverini^{1,2}, Alexandre Specht^{1,2}, Marco Cecchini³, Thomas Grutter^{1,2*}

¹Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France; ²Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, Unité Mixte de Recherche 7199, Équipe de Chimie et Neurobiologie Moléculaire, Illkirch, France; ³ISIS, Unité Mixte de Recherche 7006, Laboratoire d'Ingénierie des Fonctions Moléculaires, Strasbourg, France

Abstract P2X receptors function by opening a transmembrane pore in response to extracellular ATP. Recent crystal structures solved in apo and ATP-bound states revealed molecular motions of the extracellular domain following agonist binding. However, the mechanism of pore opening still remains controversial. Here we use photo-switchable cross-linkers as 'molecular tweezers' to monitor a series of inter-residue distances in the transmembrane domain of the P2X2 receptor during activation. These experimentally based structural constraints combined with computational studies provide high-resolution models of the channel in the open and closed states. We show that the extent of the outer pore expansion is significantly reduced compared to the ATP-bound structure. Our data further reveal that the inner and outer ends of adjacent pore-lining helices come closer during opening, likely through a hinge-bending motion. These results provide new insight into the gating mechanism of P2X receptors and establish a versatile strategy applicable to other membrane proteins.

DOI: [10.7554/eLife.11050.001](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.001)

*For correspondence: grutter@unistra.fr

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 19

Received: 21 August 2015
Accepted: 27 October 2015
Published: 25 January 2016

Reviewing editor: David E Clapham, Howard Hughes Medical Institute, Boston Children's Hospital, United States

© Copyright Habermacher et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Introduction

The family of P2X receptors encompasses seven subtypes in mammals (termed P2X1-7) that are widely expressed in many cells, including neurons (*Khakh and North, 2006*). These receptors are trimeric ion channels that switch rapidly between closed and opened conformations in response to extracellular ATP (*Browne et al., 2010; Jiang et al., 2013*). Once opened, a flow of ions (sodium, potassium and calcium) transit through the transmembrane (TM) pore and initiates signal transduction. Depending on the P2X subtype, gating is followed by desensitization, a temporary inactivation that terminates the ion flow. ATP-gated P2X receptors are also involved in a wide range of pathological disorders, including chronic and inflammatory pain (*Khakh and North, 2006; Abbracchio et al., 2009*). A detailed understanding of the molecular mechanisms underlying the gating process is thus of fundamental importance and may open new therapeutic avenues.

Recent X-ray structures of the zebrafish P2X4 (zFP2X4) receptor in its apo and ATP-bound states have provided a molecular understanding of how ATP binding triggers channel opening (*Kawate et al., 2009; Hattori and Gouaux, 2012*). There are three interfacial ATP-binding pockets in the extracellular domain (ECD) that protrude ~40 Å outside of the membrane. The transmembrane domain (TMD) comprises six TM spanning α -helices, two from each subunit termed TM1 and TM2, which are arranged around the threefold axis of symmetry, with TM1 positioned peripheral to TM2. The pore-lining TM2 helices are steeply angled nearly 45° from the membrane plane and

eLife digest Protein receptors in the cell membrane play an important role transmitting signals from outside to inside the cell. Members of the P2X family of receptors are ion channels that form pores through the membrane. When a molecule of ATP binds to the external region of the receptor, it activates it and causes the receptor to change from a closed to an open shape. Once opened, ions flow through the channel's pore and trigger a response inside the cell. P2X receptors are found on most animal cells (including nerve cells) and are involved in both normal cellular activity and processes linked to disease, including inflammation and chronic pain.

The P2X receptor has three parts or subunits, and each contributes to the channel's pore. Recent research using a technique called X-ray crystallography has revealed how ATP binding causes shape changes in the external region of the receptor. But these three-dimensional structures did not reveal details of how the subunits move to open or close the channel's pore.

Habermacher et al. have now added light-sensitive linkers onto the P2X receptor in a way that meant that different colors of light could be used to force parts of the receptor to come closer together or move apart. This allowed the pore to be opened and closed in response to changes in light. Habermacher et al. then studied the behavior of these modified receptors within a natural membrane and found that the light stimulated movements were similar to those seen with ATP. When the behavior of the receptor and light-sensitive linkers was studied using computer simulations, it led to new models of the P2X pore in the open and closed state. In these models, the open channel was more tightly packed than in the previous structure and an unexpected hinge-bending movement was seen to accompany the opening of the channel. It is hoped that this new approach will also be useful for probing how other membrane proteins change their shape when activated.

DOI: [10.7554/eLife.11050.002](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.002)

they form, in the apo state, a gate in the middle of the membrane that is thought to control the flux of ions. For this reason, the apo form is believed to represent a resting, closed state of the receptor (Kawate et al., 2009).

Structural and functional work has suggested that binding of ATP induces closure of the three interfacial pockets in the ECD that is accompanied by a rearrangement of the subunit-subunit interfaces (Jiang et al., 2003; 2010; 2012; Nagaya et al., 2005; Marquez-Klaka et al., 2007; Du et al., 2012; Hattori and Gouaux, 2012; Lorinczi et al., 2012; Roberts et al., 2012; Hausmann et al., 2013; Huang et al., 2014; Stelmashenko et al., 2014; Zhao et al., 2014). As a result, the lower region of the ECD undergoes a flexing motion that pulls apart the outer ends of the six TM helices (Hattori and Gouaux, 2012). This lateral displacement, in turn, enlarges through an iris-like opening the narrowest part of the channel, creating a wide entryway of 7 Å in diameter, which allows ions to flow through the open pore (Hattori and Gouaux, 2012).

The mechanism of gating based on the crystal structures is largely consistent with previous functional and modeling data obtained on the ECD (Jiang et al., 2010; 2012; Du et al., 2012; Lorinczi et al., 2012; Roberts et al., 2012; Hausmann et al., 2013; Huang et al., 2014; Stelmashenko et al., 2014; Zhao et al., 2014). However, there are areas of discordance between the X-ray structures and the available data at the level of the TM pore. Although the location of the gate (Samways et al., 2014), the relative position and gating motion of TM1 and TM2 within the individual subunits (Li et al., 2008; Heymann et al., 2013) and the movement of the outer ends of the TM helices (Li et al., 2008; 2010; Kracun et al., 2010; Heymann et al., 2013; Browne et al., 2014) inferred from experimental data are in qualitative agreement with the crystal structures, there are reasons to question whether the ATP-bound structure provides an accurate blueprint of a native open-channel pore. First, the proposed mechanism of gating implies a great radial outward movement of the TM helices away from the threefold axis, which creates large 'crevices' between the TM helices of adjacent subunits. As a result, the TMD appears loosely packed. Although endogenous lipids have been suggested to occupy these gaps (Hattori and Gouaux, 2012), recent modeling supported by experimental data has suggested that these crevices are not present in membrane-embedded receptors (Heymann et al., 2013). Second, metal bridging experiments suggest that the inner portion of TM2 helices narrows as the channel opens (Kracun et al., 2010; Li et al., 2010), a

feature that is not visible from the ATP-bound structure (*Hattori and Gouaux, 2012*). Third, to obtain diffracting crystals, proteins were extensively truncated at both the amino and carboxy termini and solubilized with detergents (*Hattori and Gouaux, 2012*). Although the truncated receptor was functional, the lack of the intracellular domains, which critically control the function of the receptor (*Chaumont et al., 2004; Allsopp and Evans, 2011; Robinson and Murrell-Lagnado, 2013*), may distort somewhat the structure of the pore, raising the possibility that the X-ray structure may represent a non-native, open-channel state. Hence, additional data are needed to understand the gating mechanism of a full-length, membrane-embedded P2X receptor.

In this study, we present a new chemical-based method to explore the gating motion of the rat P2X2 (rP2X2) receptor by cross-linking engineered cysteine residues in the TMD with photo-switchable azobenzene tweezers, for which the end-to-end distance can be controlled by light. A set of structural constraints combined with Molecular Dynamics (MD) provided high-resolution models of the channel both in the open and closed states in their physiological environment. These results provide unprecedented insight into the pore-opening motions of this major class of ligand-gated ion channels.

Results

Designing the photo-switchable tweezers strategy

To collect structural constraints related to channel gating, we synthesized 4,4'-bis(maleimido-glycine) azobenzene (MAM), a semi-rigid photo-switchable azobenzene cross-linker carrying two sulfhydryl-reactive maleimides known to cross-link pairs of engineered cysteine residues (*Figure 1A* and *Figure 1—figure supplement 1A*). In solution, MAM rapidly isomerizes from *trans* to *cis* configuration at 365 nm and reversibly switches back to the *trans* isomer at 525 nm (*Figure 1—figure supplement 1B*) or slowly by thermal relaxation ($\tau = 388 \pm 28$ min, $n = 4$ in DMSO). As a consequence, the end-to-end distance of MAM can be changed by light from 21.7 ± 2.0 Å in the *trans* state to 16.0 ± 4.6 Å ($n = 100000$ conformers) in the *cis* state, as measured from the distribution of the S–S distance in explicit-water MD simulations (*Table 1* and *Figure 1—figure supplement 1C*, thin dashed lines); see Experimental Procedures for computational details.

Horizontal cross-linking provides a direct measurement of the outward expansion of the TM2 helices during activation

Guided by P2X2 homology models (*Lemoine et al., 2013*) built from zfp2X4 X-ray structures of the apo (PDB code: 4DW0) (*Hattori and Gouaux, 2012*) and the ATP-bound states (4DW1) (*Hattori and Gouaux, 2012*), we selected pairs of residues within the TMD to be mutated into cysteine. We chose residues from the extracellular apex of the TM helices for which the interatomic distances of the C β -atoms of at least one of the X-ray structures closely matched the end-to-end distance of MAM (*Figure 1—source data 1*). Furthermore, to limit all possible combinations, only single cysteine mutations per subunit were designed, and, therefore, only one MAM photo-linker is expected to cross-link two adjacent subunits within a receptor. As pairwise positions are considered, horizontal cross-linking relative to the membrane plane is expected. With these criteria, we identified 10 residues in TM1 and TM2 (*Figure 1B*) and substituted each of them with a cysteine into the P2X2-3T background, a functional receptor in which the three native cysteines were mutated to threonine (*Li et al., 2008*), and expressed the single mutants in HEK cells. All cysteine mutants responded robustly to ATP, as assayed by whole-cell patch-clamp electrophysiology, and displayed half-maximal effective concentrations (EC₅₀) of ATP that were similar to those determined previously (*Figure 1—source data 2*) (*Li et al., 2008; Lemoine et al., 2013*).

We screened each mutant by recording currents in response to light irradiation from cells treated with MAM for 20 min in the dark. Because MAM is expected to open the channel in *trans*, cells were illuminated at 365 nm prior to 525 nm. No light-gated currents were observed for the P2X2-3T, Q52C, and P329C mutants (*Figure 1C, D* and *Figure 1—figure supplement 2A*). However, for all remaining mutants, channels reversibly opened at 525 nm light and closed at 365 nm light, except for N333C, which responded weakly in the opposite sense to these wavelengths (*Figure 1C, D* and *Figure 1—figure supplement 2A*).

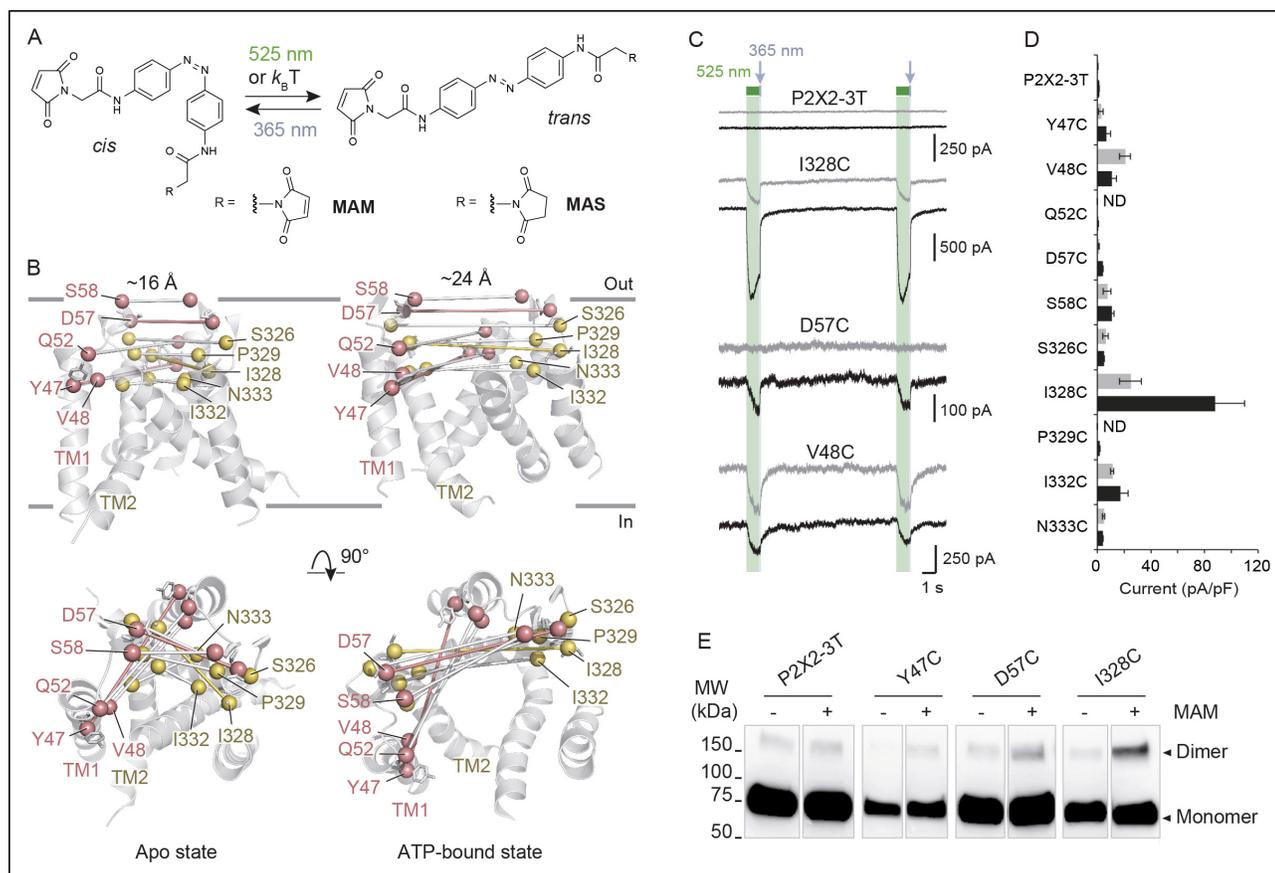


Figure 1. Lateral expansion between TM1 and TM2 helices drives channel opening. **(A)** Chemical structures of MAM and MAS in the *cis* and *trans* states. **(B)** Cartoon representation of the TMD of a P2X2 homology model viewed parallel (upper) and perpendicular (lower) to the membrane plane in an apo (left) and ATP-bound state (right). $C\beta$ atoms of residues selected for cysteine substitutions are shown as red and yellow spheres in TM1 and TM2 helices, respectively. Indicated values are the average distances separating pairwise β -atoms from two adjacent subunits (grey bridges). Highlighted bridges indicate actual MAM cross-linking. **(C)** Whole-cell currents recorded during and after illumination at 525 nm (green bars, 1 s) and 365 nm (violet arrows, 80 ms) in HEK cells expressing the P2X2-3T receptor or the indicated cysteine-substituted mutants after treatment with MAM (black traces) or MAS (gray traces). Just before recordings, cells were irradiated for 85 ms with a light pulse of 365 nm. **(D)** Screening for all constructs showing light-gated currents following MAM (filled bars) or MAS (gray bars) treatment. All light-gated mutants were activated at 525 nm and inactivated at 365 nm, except for N333C, which responded in the opposite sense to these wavelengths. ND stands for not determined ($n = 4-5$ cells; mean \pm s.e.m.). **(E)** Western blot analysis of cell-surface cross-linking of the indicated P2X2-3T constructs expressed in TSA-201 cells after treatment (+) or without treatment (-) with MAM. Monomer and dimer are indicated. Uncut gel image is shown in **Figure 1—figure supplement 2B**. MAM: 4,4'-bis(maleimido-glycine)azobenzene; MAS: 4-(maleimido-glycine)-4'-(succinimido-glycine)azobenzene; MW: Molecular weight; TMD: Transmembrane domain.

DOI: [10.7554/eLife.11050.003](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.003)

The following source data and figure supplements are available for figure 1:

Source data 1. Interatomic distances between pairwise residues.

DOI: [10.7554/eLife.11050.004](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.004)

Source data 2. Estimated EC_{50} and Hill coefficients for ATP activation.

DOI: [10.7554/eLife.11050.005](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.005)

Figure supplement 1. Chemical synthesis and physico-chemical properties of azobenzene derivatives.

DOI: [10.7554/eLife.11050.006](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.006)

Figure supplement 2. Horizontal screening confirms an outward expansion of the TM helices.

DOI: [10.7554/eLife.11050.007](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.007)

Figure supplement 3. Characterization of currents induced by the isomerization of azobenzene compounds attached at the I328C or Y47C mutant.

DOI: [10.7554/eLife.11050.008](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.008)

Figure supplement 4. 1H and ^{13}C NMR of MAM (1).

DOI: [10.7554/eLife.11050.009](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.009)

Figure supplement 5. 1H and ^{13}C NMR of 2.

DOI: [10.7554/eLife.11050.010](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.010)

Figure 1 continued on next page

Figure 1 continued

Figure supplement 6. ^1H and ^{13}C NMR of MAS (3).

DOI: 10.7554/eLife.11050.011

To confirm that these currents originated from successful cross-linking of two adjacent cysteines, we synthesized another azobenzene derivative, named MAS (4-(maleimido-glycine)-4'-(succinidoglycine)azobenzene), in which one of the two maleimides was replaced by the isosteric, sulfhydryl non-reactive succinimide (**Figure 1A** and **Figure 1—figure supplement 1A**). In these conditions, MAS is expected to react with a single cysteine without cross-linking. Control experiments with MAS revealed that the majority of the light-gated currents were indistinguishable from those originating from MAM treatment (**Figure 1C, D** and **Figure 1—figure supplement 2A**), suggesting that in these experiments MAM actually does not cross-link adjacent subunits. However, for three mutants (Y47C, D57C, and I328C) there was clear evidence for MAM cross-linking. For the D57C mutant, there was no light-gated current following MAS treatment, whereas the response of the Y47C and I328C mutants to MAM exhibited clear differences relative to MAS in current amplitudes (**Figure 1D**), on-rate kinetics and stability in the dark (**Figure 1—figure supplement 3A–D**). Moreover, biochemical experiments clearly showed that the I328C-mutated protein, and not P2X2-3T, migrated on sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) at the position expected for dimeric cross-linked subunits only after MAM treatment (**Figure 1E**). Similar results were also obtained for the Y47C and D57C mutants (**Figure 1E**), although the extent of cross-linking was lower than that of I328C. The reason for the relatively low extent of cross-linking is unclear, but the currents elicited by light were also consistently small for these mutants compared to the I328C mutant, suggesting that the kinetics of cross-linking are not complete. Alternatively, a fraction of the cell-surface mutant receptors might not be reactive to MAM fusion (possibly due to protein misfolding), thus decreasing the cross-linking efficiency. Finally, we cannot rule out the possibility that the dimer band transfers less efficiently in Western blotting. Overall, because the Y47, D57, and I328 residues are located at the outer ends of the TMD, these cross-linking data provide direct evidence that a lateral outward motion of both TM1 and TM2 is involved in channel gating.

Quantification of the cross-linking results reveals that the average value from MD simulations of the end-to-end distance of the free *cis* isomer in solution closely matches the average C β –C β distance between I336 residues (equivalent to I328 in rP2X2) in the X-ray structure of the closed state zfp2X4 (**Table 1**). By contrast, the average value of the *trans* isomer in solution is 6 Å shorter than the C β –C β distance measured between the same pairs of residues in the structure of the open state. Thus, the crystallographic structure of the channel in the open state appears to be inconsistent with the present cross-linking experiments.

An interesting behavior of the azobenzene fused horizontally between two I328C mutant subunits was revealed when channels previously turned off by a brief illumination at 365 nm were still able to respond to the same wavelength of light, although currents were smaller than those elicited at 525 nm light (**Figure 1—figure supplement 3E**). As these results were only observed with MAM, they suggest that the channel acts as a ‘lever’ to maintain in its resting state the cross-linked azobenzene in the high-energy *cis* state. Consistent with photostationary states, we propose that a small but significant proportion of *trans* state is formed at 365 nm besides the large proportion of *cis* state, causing the observed small inward currents.

Light-gated motions as mimicry of ATP-gated motions

To evaluate the physiological relevance of the light-driven motions, we determined key biophysical features of the light-gated channels and compared them to those of channels activated by ATP. We focused on the I328C mutant because it gave the most robust currents. First, we found that the rate of activation by light (time constant $\tau = 131 \pm 9$ ms, $n = 8$, **Figure 2A**) closely resembled that induced by a saturating concentration of ATP for the wild-type (WT) P2X2 receptor (300 μM ; $\tau = 128 \pm 11$ ms, $n = 4$) (**Trujillo et al., 2006**). This result suggests that light and ATP open the channel with similar kinetics, although light source intensity and conditions of ATP application were not optimal. Second, increasing time treatment with MAM from 5 to 40 min increased the relative amount of light-gated currents relative to maximal ATP-gated currents from 20 ± 7 to $60 \pm 5\%$ ($n = 7–9$), demonstrating that light promotes gating motions that are nearly as efficient as those induced by ATP

Table 1. Comparison of the C β –C β distances (in Å) in the crystal structures of the closed and open states and after MD relaxation with fused MAM, along with the end-to-end distances for the free MAM in solution^a.

State/isomer	Horizontal cross-linking		Vertical cross-linking	
	closed/cis	open/trans	closed/trans	open/cis
X-Ray	16.1	27.7	20.8	23.2
Free MAM MD Δ from X-Ray	16.0 \pm 4.6 -0.1 ^b	21.7 \pm 2.0 -6.0	21.7 \pm 2.0 0.9	16.0 \pm 4.6 -7.2
Fused MAM MD Δ from X-Ray	17.1 \pm 0.5 +1.0	24.7 \pm 0.6 -3.0	18.9 \pm 0.9 -1.9	17.2 \pm 1.0 -6.0

^aThe distances are measured between the C β atoms of the native or cysteine-cross-linked residues, that is, I336(C) for horizontal cross-linking and I336(C)/N353(C) for vertical cross-linking, or between the S atoms for the free MAM. ^bNote that in this case, Δ gives only an estimate of the difference because it was determined from the S–S distances of free MAM and C β –C β distances of the X-ray data.

MD: Molecular dynamics; MAM: 4,4'-bis(maleimido-glycine)azobenzene.

DOI: [10.7554/eLife.11050.012](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.012)

(**Figure 2—figure supplement 1A–C**). Third, light-gated currents rapidly inactivated in the dark, and currents were recovered from inactivation by switching back to the *cis*-isomer (**Figure 2—figure supplement 2**), two processes that are reminiscent of P2X desensitization and resensitization, respectively. Fourth, channels opened by light at 525 nm increased by twofold the maximal ATP response without changing ATP sensitivity relative to control. Given that ATP is a partial agonist on the rP2X2 receptor (**Ding and Sachs, 1999**), this suggests that MAM-induced motions are functionally linked to ATP function (**Figure 2—figure supplement 1D, E** and **Figure 1—source data 2**). Fifth, we found that light-gated channels remained selective to cations (**Figure 2—source data 1**) and showed calcium permeability that was somewhat lower (by 1.6-fold) than that of the ATP-gated P2X2-3T (**Figure 2B** and **Figure 2—source data 2**) (**Lemoine et al., 2013**). In addition, as P2X2 receptors are known to undergo ‘pore dilation’ during prolonged ATP application (**Khakh et al., 1999; Virginio et al., 1999; Rokic and Stojilkovic, 2013**), which is defined by a progressive increase in permeability to large organic cations such as *N*-methyl-d-glucamine (NMDG), we tested the ability of NMDG to permeate light-gated channels. No NMDG current was detected after 525 nm light switching (**Figure 2—source data 3**), suggesting that the open state reached by MAM fused horizontally between two I328C mutant subunits in the *trans* configuration is not trapped in a dilated, open-channel state (**Figure 2B**). Last, to determine the unitary conductance of the light-gated receptors, we carried out single-channel recordings in the outside-out configuration (**Figure 2C**). Control experiments showed that the main conductance state (O) of channels opened by ATP in patches excised from cells expressing the P2X2-3T channel was somewhat higher than that previously determined for the WT P2X2 receptor (**Jiang et al., 2011; Rothwell et al., 2014**). This increased ATP unitary current enabled us to detect an additional low-conductance substate (S), a feature that has already been reported to occur occasionally for the WT P2X2 receptor (**Figure 2C** and **Figure 2—source data 4**) (**Ding and Sachs, 1999**). In agreement with the macroscopic recordings, illumination at 525 nm of patches excised from MAM-treated cells expressing the I328C mutant induced a peak current that rapidly declined to a steady-state level of activity, where individual openings and closings can be detected (**Figure 2C**). Compared to the P2X2-3T receptor, currents opened and closed much more frequently and were highly flickery. Due to this flickery behavior, accurate determination of the open and shut times could not be made. This finding is in agreement with a recent report showing that unitary currents of the I328C channels were also flickery and that receptors exhibit a degree of activity in the absence of exogenously applied ATP (**Rothwell et al., 2014**). However, analysis of the all-points histograms showed that channels appeared to open to multiple conducting levels, as observed for the ATP-gated P2X2-3T receptor. These conductance states (full (O) and low-conductance substates (S)) were comparable, albeit lower (~35%) than those of the P2X2-3T receptor (**Figure 2—source data 4**), suggesting that the open states reached by MAM under light illumination are not fundamentally dissimilar to those naturally populated by ATP.

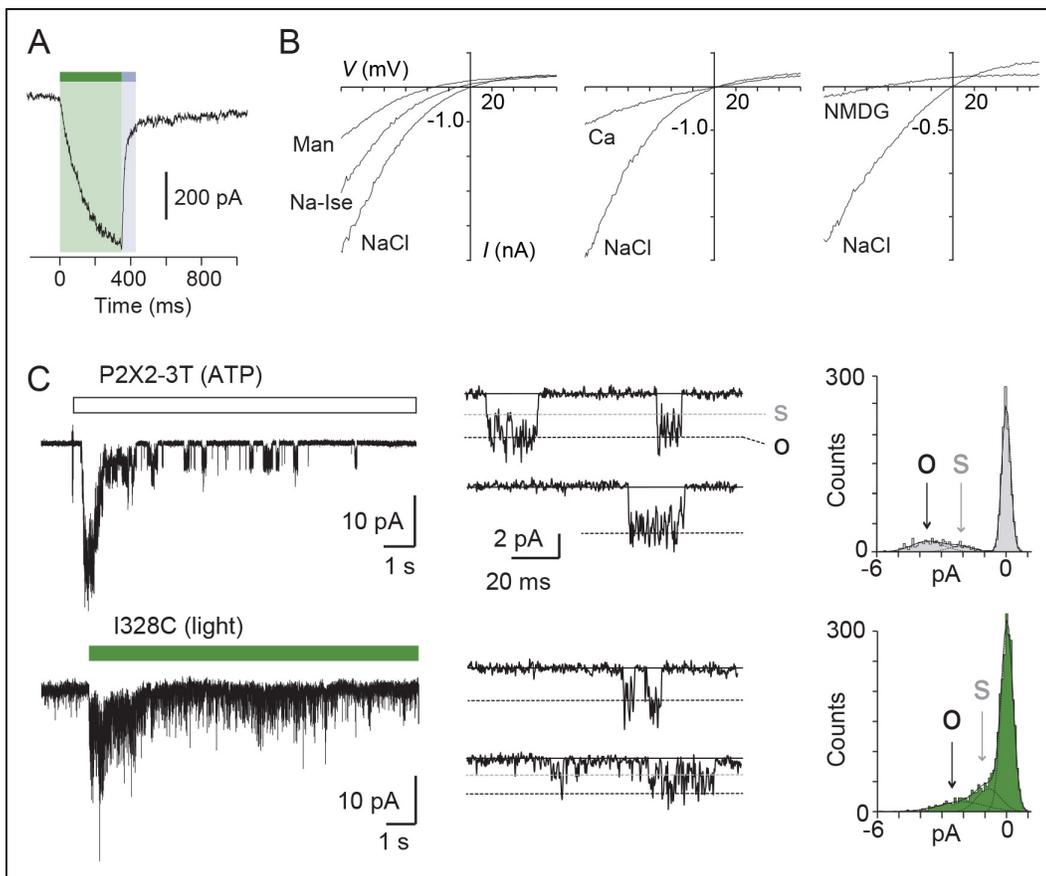


Figure 2. Light-driven open states are similar to those induced by ATP in the I328C mutant. (A) Optimized illumination times at 525 nm (green bar, 350 ms, 4.1 mW/mm^2) and 365 nm (violet bar, 80 ms, 8.1 mW/mm^2) of I328C mutant treated with MAM to observe maximal opening and closing. (B) Current-voltage curves recorded in different extracellular solutions (Man, mannitol; Na-Ise, sodium isethionate; Ca, calcium; NaCl, symmetrical NaCl external solution; NMDG, *N*-methyl-D-glucamine). Shown are light-gated currents obtained after subtracting peak photocurrents recorded at 525 nm light to those obtained in the dark after switching to 365 nm light. (C) Left, single-channel currents recorded from outside-out patches at -120 mV in response to ATP for the P2X2-3T ($10 \mu\text{M}$, upper panel) or to 525 nm illumination for I328C mutant treated with MAM (4.1 mW/mm^2 , lower panel). In these conditions, both ATP- and light-gated currents correspond to $\sim 30\%$ of a maximal ATP response. Middle, unitary currents shown on an expanded scale. Full (O) and sublevel (S) openings are indicated by dashed black and gray lines, respectively. Black lines indicate closed channels. Right, corresponding all-points histograms, fitted to the sum of three Gaussians. Full and sublevel openings are also indicated.

DOI: [10.7554/eLife.11050.013](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.013)

The following source data and figure supplements are available for figure 2:

Source data 1. Relative ion permeability for chloride.

DOI: [10.7554/eLife.11050.014](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.014)

Source data 2. Relative ion permeability for calcium.

DOI: [10.7554/eLife.11050.015](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.015)

Source data 3. Relative ion permeability for NMDG.

DOI: [10.7554/eLife.11050.016](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.016)

Source data 4. Single-channel properties of light-gated and ATP-gated receptors.

DOI: [10.7554/eLife.11050.017](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.017)

Figure supplement 1. Kinetics of MAM labeling and effect of light on ATP currents in cells expressing the I328C mutant.

DOI: [10.7554/eLife.11050.018](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.018)

Figure supplement 2. Exploration of desensitization and resensitization of the I328C mutant treated with MAM.

DOI: [10.7554/eLife.11050.019](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.019)

Vertical cross-linking indicates shortening of the distance separating the inner and outer ends of adjacent TM2 helices during activation

We next investigated movements of the pore that occur during activation along an axis perpendicular to the membrane plane (i.e. vertical motion). We paired the mutation I328C located at the

extracellular apex of one TM2 with other cysteine substitutions located at the intracellular side of another TM2 (from V343 to W350; **Figure 3A**), thus designing double-cysteine mutants. To distinguish vertical MAM cross-linking from either horizontal cross-linking or MAM reactions involving only one I328C residue (i.e. such as with MAS), light-gated currents were systematically compared with those originating from the I328C mutant alone. All single and double mutants gave robust ATP currents, except for I328C/D349C, which was not functional and D349C, which gave unstable currents (**Figure 1—source data 2**). These latter two mutants were not further analyzed. Following MAM treatment, none of the single internal pore mutants responded to light (**Figure 3B** and **Figure 3—figure supplement 1A**). In contrast, all the functional double mutants were light sensitive, although for most of them activation at 525 nm was very similar to that of the I328C mutant, suggesting that cross-linking occurs horizontally between two adjacent I328C-mutant subunits (**Figure 3B**).

The situation was reversed for the I328C/S345C mutant (and to a lesser extent I328C/F346C), whose channel opened in the *cis* configuration and closed in the *trans* configuration of the photo-linker (**Figure 3B**). In control experiments, the same mutant treated by MAS responded to the opposite senses of these wavelengths (**Figure 3—figure supplement 1B**), and no light-gated current was recorded when the serine mutant I328S/S345C was treated with MAM (**Figure 3B**). Biochemical experiments firmly demonstrated inter-subunit vertical cross-linking as visualized by the expected presence of dimeric and trimeric cross-linked species (**Figure 3C**).

Next, we show that light-gated channels exhibit biophysical features of WT receptors activated by ATP. First, light-gated motions were nearly as effective as those induced by ATP, as evidenced by the fact that light activated channels at $60 \pm 7\%$ ($n = 13$ cells, preincubation time of 20 min) of the maximal whole-cell ATP response. This value was higher than that obtained from I328C measured at the same preincubation time ($31 \pm 4\%$), suggesting that rates of vertical cross-linking between I328C and S345C are higher than those observed horizontally involving two I328C-mutated subunits. Furthermore, in contrast to the single I328C mutant, light-gated currents were stable in the dark for I328C/S345C double mutant, suggesting that these light-driven motions did not induce apparent desensitization of the receptor (**Figure 3—figure supplement 2A**). Second, engineered I328C/S345C channels opened by *cis*-MAM were still largely selective for sodium over chloride ions (**Figure 2—source data 1**), and displayed calcium permeability that was higher than that of the I328C mutant, but slightly lower than that of the P2X2-3T receptor (**Figure 3—figure supplement 2B** and **Figure 2—source data 2**). Third, a small but substantial NMDG permeability (around 15%) was recorded (**Figure 2—source data 3**), which suggests that *cis*-MAM traps a partially dilated state, revealing that the MAM photo-linker has the ability to trap different ion permeability states. Last, in outside-out patches, channels opened stepwise after 365 nm illumination to discrete levels of conductance with no apparent decline of activity, in agreement with macroscopic recordings (**Figure 3D**). Unitary currents of the highest conducting level (O_1 in **Figure 3E**) were higher than those of the I328C mutant cross-linked horizontally by MAM and resembled those of the P2X2-3T receptor activated by ATP, although the probability of occurrence was extremely low (**Figure 2—source data 4**). Two additional low-conductance substates (S_1 and S_2) were also detected in relatively abundant amounts that may correspond to a mixture of cross-linked species (**Figure 3E**). Because currents were also highly flickery, they were not analyzed further. Overall, these data indicate that shortening the distance between the inner and outer ends of adjacent TM2 helices drives channel opening, a motion that was not anticipated by X-ray structures.

Quantification of the cross-linking results showed that although the distance between the C β atoms of the vertical anchor points in the X-ray structure of the closed state zfP2X4 (equivalent to I328 and S345 in rP2X2) matches the average end-to-end distance of free MAM in *trans*, the same is not true in the structure of the open state, where the C β -C β distance is considerably larger (~ 7 Å) than the average end-to-end distance in free MAM in *cis* (**Table 1**). Consistent with the horizontal cross-linking results, these data support the conclusion that the X-ray structure of the channel in the ATP-bound zfP2X4 may represent a non-native, open-channel state.

Light-induced decreasing of the distance between TM2 ends, on at least two subunit interfaces, increases ATP function

We next addressed the contribution of the vertical shortening of TM2 ends to the ATP response. We found that MAM cross-linking increased the time constants (τ) of ATP washout by twofold from 0.580 ± 0.092 ($n = 4$, before treatment) to 1.062 ± 0.090 s ($n = 7$, after MAM treatment, **Figure 4A**).

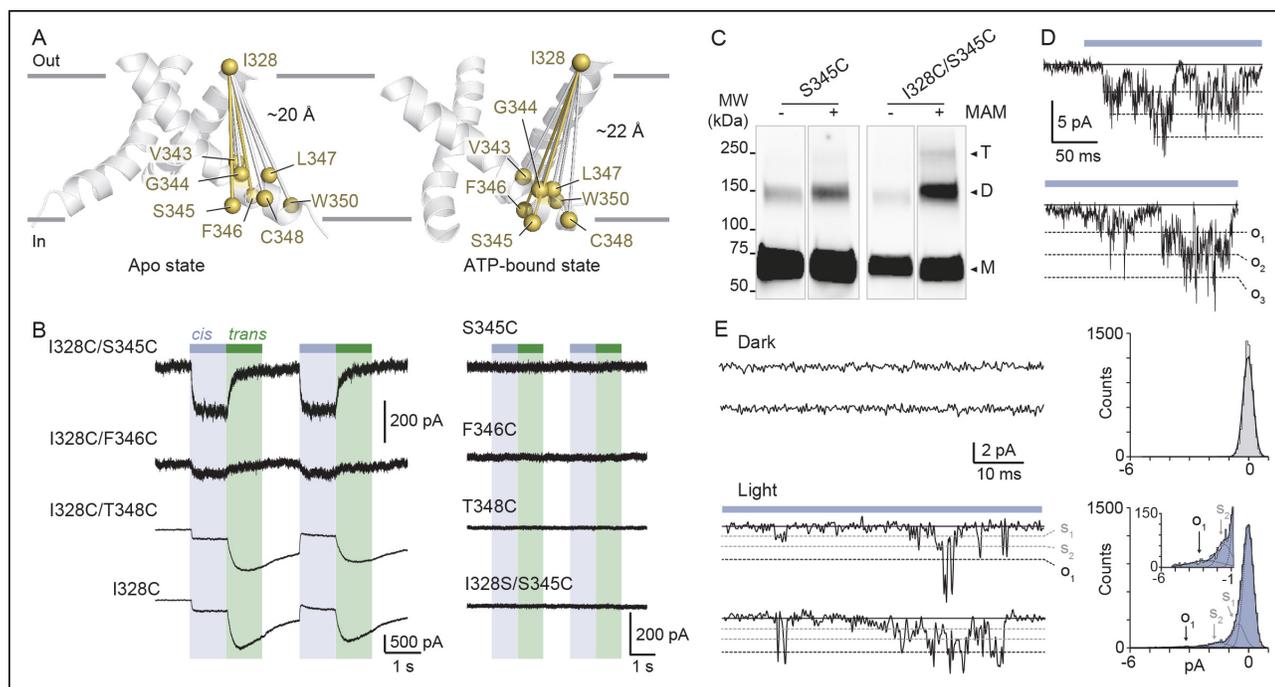


Figure 3. Shortening of the vertical distance separating adjacent TM2 ends drives channel openings. **(A)** Side views of TM2 helices of a P2X2 homology model in the apo state (left) and ATP-bound state (right). The β -atoms of residues selected for cysteine substitutions are shown as yellow spheres. Indicated values are the average distances separating pairwise β -atoms from two adjacent TM2 helices (grey bridges). Highlighted bridges between residues indicate actual MAM cross-linking. For clarity, TM1 helices are omitted. **(B)** Whole-cell currents evoked by light at 365 nm (*cis*) or 525 nm (*trans*) in HEK cells expressing the indicated cysteine-substituted mutants treated with MAM. **(C)** Western blot analysis of cell-surface cross-linking of the indicated mutated subunits expressed in TSA-201 cells after treatment (+) or without treatment (-) with MAM. Monomer (M), dimer (D), and trimer (T) are indicated. Uncut gel image is shown in **Figure 3—figure supplement 1C**. MW, Molecular weight. **(D)** Single-channel currents recorded from an outside-out patch expressing the I328C/S345C mutant at -120 mV in response to 365 nm illumination. Three simultaneous openings (O) indicated by dashed black lines were detected. Black lines indicate closed channels. **(E)** Unitary currents (left) and corresponding all-points histograms (right) recorded before (upper) and during 365 nm illumination (lower) from the same patch expressing the I328C/S345C mutant. Sublevel openings (S1 and S2) are indicated by dotted gray lines. Inset shows expanded scale. All-points histograms were fitted to one Gaussian (upper) or to the sum of four Gaussians (lower).

DOI: [10.7554/eLife.11050.020](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.020)

The following figure supplements are available for figure 3:

Figure supplement 1. Vertical screening identifies a shortening of the distance separating adjacent TM2 ends during activation.

DOI: [10.7554/eLife.11050.021](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.021)

Figure supplement 2. Biophysical properties of the I328C/S345C mutant.

DOI: [10.7554/eLife.11050.022](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.022)

Figure supplement 3. Concatenated P2X2-3T receptors are gated by UV light with only two cross-linked MAM.

DOI: [10.7554/eLife.11050.023](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.023)

Noteworthy is that toggling bound azobenzene in the *cis* state both increased maximal current by 1.4-fold (**Figure 4B**) and ATP sensitivity by fourfold ($n = 4$ cells) (**Figure 4C** and **Figure 1—source data 2**) compared to currents measured in the *trans* state. This demonstrates that the light-driven motions of the TM pore are cooperatively transmitted to the distant, extracellular ATP-binding sites.

To identify the minimal number of bound MAM that is necessary to open the pore, we designed concatenated cDNAs that encoded three joint P2X2-3T subunits, which had the I328C and/or S345C mutation(s) in one, two, or three subunits (**Figure 3—figure supplement 3A**). There are potential caveats concerning the use of concatemers (**Stelmashenko et al., 2012**), but we provide evidence that currents recorded after expression of the different constructs result from channels formed by the intact concatenated proteins. All tested concatemers responded robustly to ATP, and no apparent protein breakdown was detected by SDS-PAGE (**Figure 3—figure supplement 3B and 3D**). Concatemers that allow MAM cross-linking at one of the three interfaces (denoted OO/CO/OC or OC/OO/CO, where C and O stands for cysteine mutation and WT residue, respectively) or within

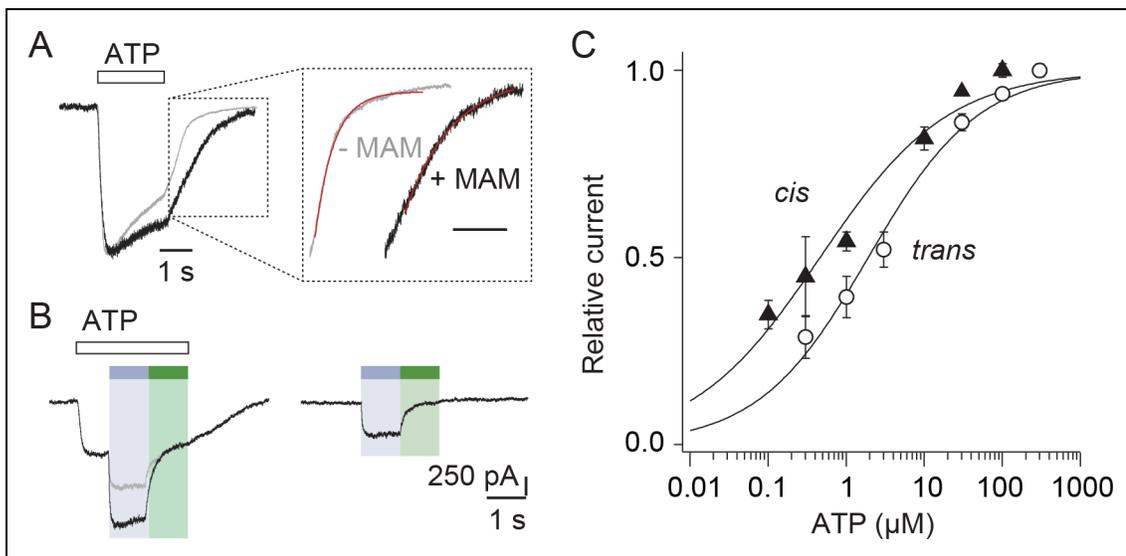


Figure 4. Vertical motions induced by *cis*-MAM at the I328C/S345C mutant increase ATP function. (A) Normalized whole-cell currents evoked by a saturating concentration of ATP (100 μM) recorded before (gray trace) and after (black trace) treatment with MAM. Inset highlights part of the currents upon ATP washout, fitted to single exponential decay functions (red traces). (B) Whole-cell light-gated currents recorded from the same cell in the presence (left) or absence (right) of ATP (100 μM). Gray trace indicates the predicted current if ATP-gated and light-gated currents at 365 nm were additive. (C) Concentration–response relationships for ATP at 525 nm (open circle, *trans* state) or in the dark immediately after illumination at 365 nm (filled triangle, *cis* state) ($n = 4\text{--}8$ cells; mean \pm s.e.m.). Currents were normalized to 100 μM ATP at 365 nm and 300 μM ATP at 525 nm. The Hill equation was fit to the data.

DOI: 10.7554/eLife.11050.024

one subunit (intra helix cross-linking; OO/OO/CC) showed no light-gated currents (**Figure 3—figure supplement 3A–C**). However, a gradual increase of the ratio of the currents elicited by UV light to those gated by ATP was observed for concatemers that allow MAM cross-linking at two and three interfaces assuming a clockwise orientation of the subunits (OC/CO/CC and CC/CC/CC, **Figure 3—figure supplement 3A–C**), demonstrating that two MAM linkers are sufficient to gate the channel (the alternative counterclockwise orientation was inconsistent with the data). No or negligible light-gated currents were recorded in cells expressing concatemers harboring cysteine mutations in other combinations, as would be expected if there were alternative patterns of cross-linking (**Figure 3—figure supplement 3A–C**).

Improved model of the open-channel state

To provide a structural interpretation of the light-gating experiments, we produced atomistic models of the closed and open states by explicitly incorporating MAM photo-linkers in the apo and the ATP-bound X-ray structures of the zfp2X4 receptor (**Hattori and Gouaux, 2012**). For this purpose, homologous cysteine mutations were introduced (I336C and N353C equivalent to rP2X2 I328C and S345C, respectively) and the mutants were fused with MAM photo-linkers in both *cis* and *trans* isoforms. The resulting constructs were then relaxed by short MD simulations in explicit water and membrane.

In both vertical and horizontal crosslinking simulations, the structural restraints imposed by MAM had little effect on the structure of the closed-channel state relative to the X-ray structure of apo zfp2X4 (**Figure 5A**). In sharp contrast, the MD relaxation of the open state with fused MAM produced a significant contraction of the TMD, as compared to the X-ray structure of the ATP-bound state with the anchor points distances shortening from 27.7 to 24.7 \AA upon horizontal cross-linking (C β of I336C) and from 23.2 to 17.2 \AA upon vertical cross-linking (C β of I336C and N353C); see **Figure 5B** and **Table 1**. Consistent with a recent modeling study (**Heymann et al., 2013**), this structural rearrangement results in the disappearance of the large crevices observed in the X-ray structure of the open state (**Figure 5D**). In addition, the cross-linking simulations of the open state produce a more compact structure of the inner TMD, with an open channel stabilized by a new interface between the pore-lining TM2 helices (note that for the simulations of the open state, the TM1-TM2

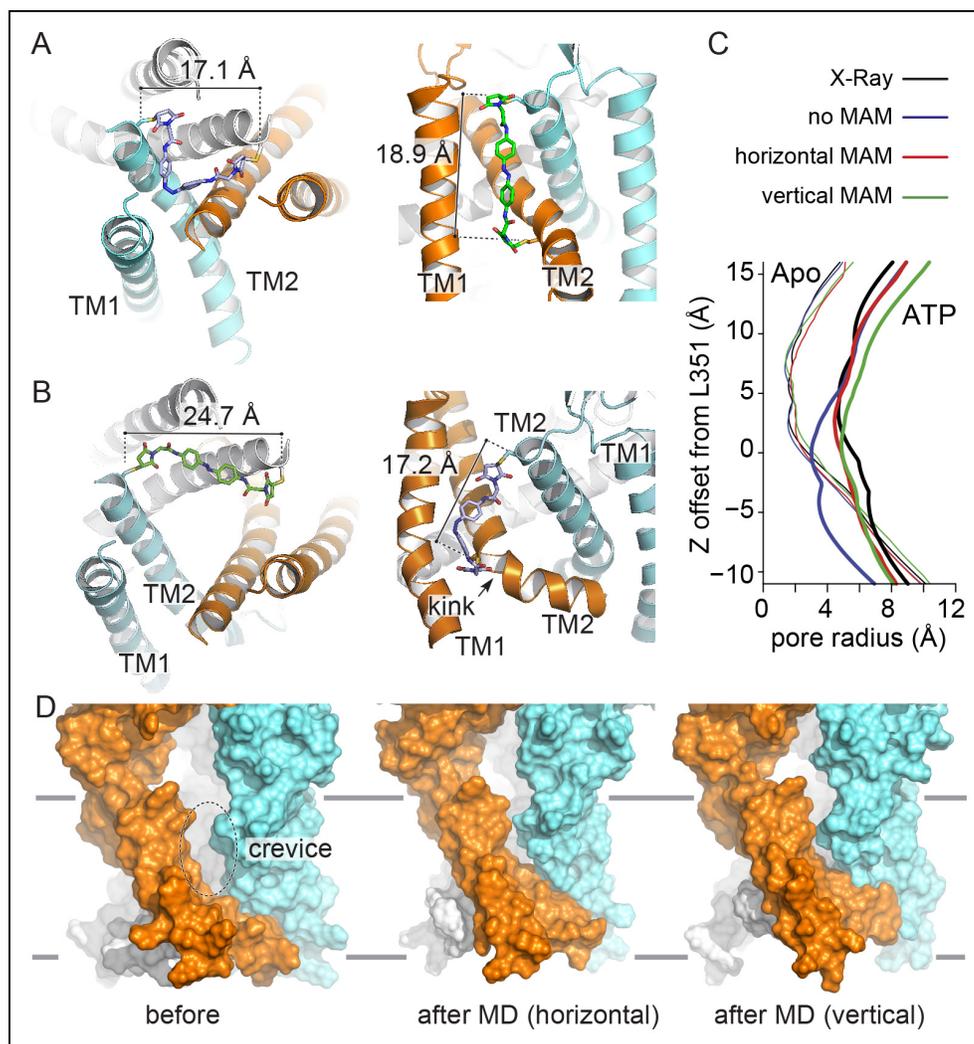


Figure 5. Molecular dynamics of zFP2X4 open-channel state cross-linked by MAM reduce inter-subunit interface in the TMD. (A) Cartoon representation of the TMD of zFP2X4 receptor simulated in the closed state after MD, in which MAM (in stick representation) is conjugated horizontally between two I336C (*cis* configuration, left) or vertically between I336C and N353C (*trans* configuration, right). For clarity, only one MAM is shown vertically. Distances separating C β atoms of engineered cysteines are $17.1 \pm 0.5 \text{ \AA}$ ($n = 800$) and $18.9 \pm 0.9 \text{ \AA}$ ($n = 2400$). (B) Same views of the TMD simulated in the open state. Distances separating C β atoms are $24.7 \pm 0.6 \text{ \AA}$ ($n = 800$) and $17.2 \pm 1.0 \text{ \AA}$ ($n = 2400$). TM1 and TM2 helices and the location of a kink in one of the three TM2 helices are also shown. (C) Transmembrane pore radius along the axis of the ion channel for the apo (thin lines) and ATP-bound (thick lines) states. The profiles were calculated considering the backbone atoms only (see Materials and methods) and were derived from the X-ray structures (black) or models obtained after MD relaxation computed with (red and green) or without MAM (blue) as indicated. In the absence of MAM, the open state rapidly closes in MD simulations near L351 (rP2X2: V343). (D) Lateral view of the channel displayed in surface representation before (left) and after MD following MAM attachment between two I336C (middle) or between I336C and N353C (right). MAM: 4,4'-bis(maleimido-glycine)azobenzene; MD: Molecular dynamics; TMD: Transmembrane domain.

DOI: [10.7554/eLife.11050.025](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.025)

The following figure supplement is available for figure 5:

Figure supplement 1. Comparison between the ATP-bound crystal structure and the new model of the open state.

DOI: [10.7554/eLife.11050.026](https://doi.org/10.7554/eLife.11050.026)

interface was stabilized by incorporating structural information obtained from recent intra-subunit Cd $^{2+}$ bridging essays [Heymann et al., 2013]). This new interface involves the side chain of L351 (rP2X2: V343) on one subunit and G343 (A335) and/or that of A347 (T339) on the adjacent subunit. The restructuring of the TMD in simulation is driven by a significant conformational change of the upper region of the TM2 helices, which straighten, pack closer together around the region of L351 and lock the ion channel in an open-pore conformation (Figure 5—figure supplement 1). The

immediate structural consequences are: (1) an upward shift of the constriction point, which moves from L351 or W358 (upon reconstruction of the unresolved side chains in 4DW1) to A347 and (2) a significant kinking of the TM2 helices at residues V354-I355. Most importantly, the structural reorganization of the TMD occurs while keeping the ion pore open (**Figure 5C**). In this respect, it is important to stress that in all simulations of the open state carried out in the absence of MAM, the ion pore systematically shut under the effect of thermal fluctuations (**Figure 5C**; see 'Materials and methods').

Finally, the analysis of the end-to-end distance distributions of MAM sampled by the simulations of vertically and horizontally fused receptors provides additional information on the nature of the cross-linking experiments reported here. The comparison of the distributions of fused *versus* free MAM (**Figure 1—figure supplement 1C**) makes it clear that: (1) cross-linking reduces the configurational freedom of the photo-switcher quite significantly; (2) the end-to-end distance distributions of fused MAM overlap significantly with those of free MAM; (3) there is a significant shift of the *cis versus trans* distributions when the photo-linker is bound. Overall, these observations indicate that our cross-linking experiments provide evidence of a well-defined structural change of the TM2 helices during activation. Additionally, the comparison of the end-to-end distributions of free MAM and fused MAM indicates that cross-linking is 'soft', such that the structural stability of the open-channel state must be an intrinsic property of the protein; that is, it is not a rare open state stabilized by MAM-cross-linking, but rather the native active state which has been elicited by photoswitching.

Bending of TM2 at a critical 'hinge' is essential for activation

Finally, our model of the open state trapped vertically by MAM predicted near its attachment site a striking kink in the middle of TM2 (**Figure 5B**). Although a similar kink has been previously described in X-ray structures (**Hattori and Gouaux, 2012**) in proximity of a highly conserved glycine residue (zfP2X4 G350; rP2X2 G342), its functional role in channel opening remains unclear (**Li et al., 2004; Khakh and North, 2012**). We hypothesized that bending of TM2 helices around this glycine would facilitate the inner and outer ends of adjacent TM2 helices to come closer together in the open state.

To test this assumption, we mutated this residue into proline (G342P), which is known to facilitate bending of α -helices, and found a dramatic 25-fold increase in ATP sensitivity compared to the WT P2X2 (**Figure 6A and B** and **Figure 1—source data 2**). By contrast, a 2.4-fold decrease of ATP sensitivity was observed for the G342A mutant, which is consistent with the fact that alanine residue rigidifies α -helices. These data demonstrate that TM2 helices in the P2X2 receptor contain a critical 'hinge', which facilitates their vertical bending, allowing the inner and outer ends of adjacent TM2 helices to come closer during activation.

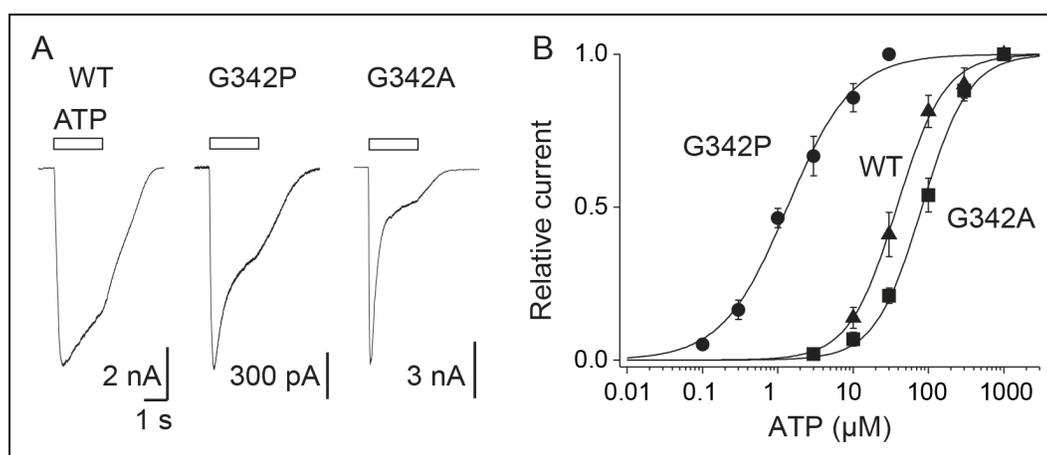


Figure 6. Proline mutation supports bending of the TM2 helices during P2X activation. (A) Whole-cell currents evoked by ATP (at saturating concentrations) from HEK cells expressing the wild-type (WT) P2X2 receptor (1000 μ M), G342P (100 μ M) or G342A (1000 μ M) mutant. (B) Concentration-response relationships for ATP at WT P2X2 receptor and mutant receptors, as indicated ($n = 4-6$ cells; mean \pm s.e.m.). The Hill equation was fit to the normalized data.

DOI: 10.7554/eLife.11050.027

Discussion

In this study, we report on the use of molecular photo-switchable tweezers in conjunction with MD simulations to explore the function of a trimeric ion channel. We show that a vertical decrease of the distance separating the inner and outer ends of adjacent pore-lining TM2 helices, likely through bending at a critical 'gating hinge', is essential for activation of the P2X2 receptor.

Tethered molecular photo-switches have been already employed for the optical control of many receptors and ion channels (Volgraf et al., 2006; Fehrentz et al., 2011; Tochitsky et al., 2012; Levitz et al., 2013), including the trimeric acid-sensing ion channels (ASICs) (Browne et al., 2014) and ATP-gated P2X receptors (Lemoine et al., 2013; Browne et al., 2014), mainly to achieve an optogenetic mimicry of neuronal signaling. They were also developed as biophysical tools to control conformational changes of peptides, proteins, or other biomolecules (Beharry and Woolley, 2011; Szymanski et al., 2013), but probing ion-channel activation or desensitization processes using such photo-switches still remains very limited (Browne et al., 2014; Reiner and Isacoff, 2014). Therefore, the photo-switchable tweezers strategy presented here is distinct from the optogating approach described previously (Lemoine et al., 2013), and provides distance restraints related to gating at physiological conditions. Introducing them as input in MD studies of P2X receptors allowed us to stabilize the open-channel state for the first time in simulation. Interestingly, the resulting model differs substantially from the X-ray structure of the ATP-bound state of zP2X4, particularly in the TMD.

There are at least three major issues that may arise from the photo-switchable tweezers strategy. The first one is related to the flexibility of the photo-linker (Beharry and Woolley, 2011), as we showed that free MAM in solution is not completely rigid, in particular the *cis* isomer, whose end-to-end distance distribution spans from 4 to 22 Å. However, when cross-linked to the TMD of the receptor, we provide evidence that the end-to-end distance distribution shrinks considerably due to the steric constraints imposed by the surrounding protein and membrane. Thus, cross-linked MAM can be considered as a photo-switchable molecular ruler. The second point is the physiological relevance of the light-gated motions. We show here that light-gated channels exhibit biophysical features of the WT receptor activated by ATP, suggesting that the discrete conformational states elicited by light closely resemble those populated by ATP. Most importantly, we found that light-induced motions of the TMD positively modulate ATP function, thus indicating an efficient crosstalk between the ion pore and the distant neurotransmitter-binding sites, a mechanism that is reminiscent of the action of positive allosteric modulators. It remains to be determined, however, whether or not pathways elicited by light that lead to channel opening and closing are similar to those triggered by ATP. The third potential shortcoming is the uncertainties of the extent of 'mixed channels' formed from a heterogeneous population of cross-linked subunits. Although we cannot formerly rule out this possibility, experiments with concatemers rather suggest that mixed channels, if present, occur insignificantly. In particular, the experiments using the OC/CO/CC construct that, in principle, allows cross-linking of either two (vertical) MAM molecules between I328C and S345C or only one (horizontal) MAM molecule between two adjacent I328C subunits, but does not allow both horizontal and vertical cross-linking reactions within the same channel, supports the hypothesis that the currents induced by UV light originate mostly from a homogeneous population bearing two vertical MAM cross-linkers (Figure 3—figure supplement 3). In addition it should be stressed that intrinsic formation of disulfide bridges may restrict the extent of cross-linking, but the formation of such disulfides was rather low in our conditions. Our approach thus offers a simple and unique strategy to probe directly in physiological conditions the large-scale functional motions of membrane-embedded proteins.

The first main finding of this study is a set of interatomic distances probed within the TMD both in the resting and the active state of the receptor (Figure 5A and B). Our data confirm the lateral expansion of the outer ends of the TM helices (Li et al., 2008; 2010), which was observed in the X-ray structure of the ATP-bound state (Hattori and Gouaux, 2012), and functionally probed recently by the shorter photo-linker 4,4'-bis(maleimido)azobenzene (BMA) (Browne et al., 2014). However, our findings provide evidence that the simulated end-to-end distance of *trans*-MAM when cross-linked horizontally (~25 Å) is substantially shorter than the distance separating the β -carbons of two adjacent I328 residues in the X-ray structure of the ATP-bound state (~28 Å). The same holds true for the vertical distance probed by *cis*-MAM between the β -carbons of I328 and S345 from adjacent subunits, which appears as overstretched in the X-ray structure of the open channel. Importantly, no

light-gated currents were recorded at P329C, a mutant for which the distance separating the β -carbons of two adjacent P329 in the X-ray structure of the ATP-bound state (~ 23 Å) was expected to match the end-to-end distance of *trans*-MAM, while the shorter photo-linker BMA was recently shown to optically control the channel activity of this mutant (Browne et al., 2014). Incorporating all these structural restraints in the new model of the active state provides compelling evidence that the extent of the outward expansion is reduced by ~ 3 Å relative to the ATP-bound X-ray structure (Hattori and Gouaux, 2012). As a direct consequence, the large inter-subunit crevices visualized by the crystals in the middle of the TMD disappear, and the TMD becomes more tightly packed. The existence of these crevices represents a matter of controversy and recent modeling supported by experimental bridging data has suggested that lipids would be able to cross these gaps and block ion conduction in the bound ATP state (Heymann et al., 2013). Our data provide evidence that these crevices are likely artifacts of crystal environment, although we do not rule out the possibility that lipid binding to these interfaces may modulate receptor activity (Rothwell et al., 2014).

The second main finding of this study is that the inner and outer ends of adjacent TM2 helices come closer in the open state, most likely through the vertical bending of these helices at a critical gating hinge. This conclusion is supported by the relaxation of the ATP-bound state of zfp2X4 by explicit water/membrane MD with fused MAM, which produced a significant reorganization of the TMD with an open pore stabilized by a new TM2-TM2 interface formed by L351 (V343 in rP2X2) of one subunit and G343 and A347 (A335 and T339 in rP2X2, respectively) of another. The simulations suggest that the new interface is produced by a conformational change of the extracellular end of the pore-lining helices TM2, which straighten relative to the X-ray structure, pack closer together around the region of L351 and lock the channel in a stable, open-pore state. The immediate structural consequences are: i) an upward shift of the constriction point to A347 that is equivalent to T339 in rP2X2, a residue shown to be critically involved in channel gating (Cao et al., 2007), and, ii) a significant kinking of the TM2 helices at residues V354-I355. Consistent with this observation, we found that mutating the nearby residue G350 (G342 in rP2X2) into proline, which is expected to promote α -helical bending, dramatically increases the ATP sensitivity in rP2X2. Residue G342 is highly conserved in the P2X family and was shown to be critically involved in ion pore dilation (Khakh et al., 1999). A recent work has reported that a missense mutation at this position in the human P2X2 receptor is associated with hereditary hearing loss, suggesting a vital role for this particular conserved glycine residue (Faletra et al., 2014). Additionally, G342 is located in proximity to G344, another critical residue for gating (Fujiwara et al., 2009). Our data thus demonstrate that during activation the TM2 helices bend through a critical 'gating hinge', a mechanism that is reminiscent of the conformational change involved in K^+ channels gating (del Camino and Yellen, 2001; Jiang et al., 2002).

The emerging model of the open state trapped vertically by MAM is generally consistent with previous experimental and modeling work (Kracun et al., 2010; Li et al., 2010; Heymann et al., 2013). A closer comparison with the model of Heymann et al. (2013) shows, however, significant changes in the tertiary structure of the TM2 helices as well as the quaternary organization of the TMD. In our open-state model, the upper region of the TM2 helices is straight and the open-pore conformation is stabilized by the new TM2-TM2 interface. These structural features are different to those of the model of Heymann et al., which displays no tertiary change of the helices compared to the ATP-bound X-ray structure and shows a distinct TM2/TM2 interface that is located below the characteristic kink at residue G350, although some of these interfacial residues (L351 and A347) are common with those of the present model. In addition, the new model of the open state appears to be inconsistent with the Cd^{2+} bridging experiment at position 343 in rP2X2 (L351 in zfp2X4) (Li et al., 2010). In fact, the distances between the $C\beta$ atoms of the L351 residues, which correspond to Cd^{2+} coordinating residues (V343C) in rP2X2 (Li et al., 2010), are too far apart (11.6 Å) to make a successful metal-coordination site in our model of the open state, even in alternative rotameric states where the $C\gamma$ atoms of L351 lie approximately 9 Å apart (full coordination occurs when this distance falls to approximately 6 Å). This said, the side chains of L351 are facing the ion pore lumen in proximity to one another, and it could well be that, when mutated into cysteines, they form an inter-subunit Cd^{2+} coordination site through a major rearrangement of the TM2 helices, perhaps driven by electrostatic interactions with the metal ion. Even though the experimental data support the hypothesis that Cd^{2+} binding occurs in the open state of the receptor (Li et al., 2010), this constraint was not included in our model because it would cause sufficient narrowing of the internal

pore that would be incompatible with an open-conducting state. Whether or not the disagreement between our new model of the open state and the inter-subunit Cd^{2+} binding site would be sufficient to disprove its structural details is questionable and further (crosslinking) experiments are required.

Depending on the cross-linking location, MAM is able to trap (at least) two distinct open-channel conformations, as evidenced by differences in desensitization kinetics and NMDG permeability. Although NMDG permeability was insignificant in one case (horizontal cross-linking) and partial in the other (vertical cross-linking), our data support the idea that the P2X pore fluctuates between distinct open conformations, and that these photo-switchable tweezers may be useful to investigate the controversial molecular mechanism of pore dilation.

Finally, we found that the vertical rearrangement of two TM2-TM2 interfaces is sufficient to drive channel gating, which is fully consistent with the recent finding that binding of two ATP molecules is sufficient to open the channel (*Stelmashenko et al., 2012; Keceli and Kubo, 2014*). However, the situation is different for the lateral separation of the outer ends of TM2 helices, for which we (present study) and others (*Browne et al., 2014*) have shown that breaking of one TM2-TM2 interface is sufficient for gating. As there is no evidence that this movement alters the sensitivity for ATP, the light-induced outward expansion of a single TM2-TM2 interface is likely a local rearrangement of the TMD.

In conclusion, this study provides the first application of photo-switchable derivatives to investigate the mechanism of pore gating in P2X receptors. By incorporating photo-switchable tweezers at engineered sites at the outer ends (horizontal cross-linking) or between the inner and outer ends (vertical cross-linking) of adjacent TM2 helices, we demonstrate that these tools can be used as molecular rulers to probe structural changes involved in activation. The versatility of the strategy makes it a promising approach for dissecting the allosteric mechanisms of other membrane proteins.

Materials and methods

Chemical synthesis

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Acros Organics or Alfa Aesar in analytical grade. An Agilent MM-ESI-ACI-SQ MSD 1200 SL spectrometer or an Agilent LC-MS Agilent RRLC 1200SL/ESI QToF 6520 was used for ESI analysis. ^1H NMR and ^{13}C NMR were run at 400 and 100 MHz, respectively. Coupling constants (J) are quoted in Hz and chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm) using the residue solvent peaks as reference relative to TMS.

(*E*)-*N,N'*-(diazene-1,2-diylbis(4,1-phenylene))bis(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acetamide) (1)

1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) (1100 mg, 4.7 mmol) was added to a solution of 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acetic acid (730 mg, 4.7 mmol) (obtained as described [*Allen et al., 2010*]), 4-[(*E*)-2-(4-aminophenyl)diazene-1-yl]aniline (200 mg, 0.942 mmol) and diisopropylethylamine (0.800 ml, 4.7 mmol) in 10 ml of acetonitrile/DMF: 2/1. The reaction was carried out for 20 hr under argon atmosphere at room temperature. The solution was concentrated *in vacuo*. The crude product was dissolved in a small volume of DMF and the product was precipitated using acetone. The precipitate was recovered by filtration, leading to the desired orange solid (252 mg, 0.518 mmol, 55%). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 10.64 (s, 2H), 7.85 (d, 4H, J = 8.7 Hz), 7.75 (d, 4H, J = 8.7 Hz), 7.16 (s, 4H), 4.33 (s, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 170.62, 165.31, 148.83, 141.10, 134.95, 123.46, 119.42, 40.43 (**Figure 1—figure supplement 4**); MS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_6^+$ 487.1361, found, 487.1350.

(*E*)-*N*-(4-((4-aminophenyl)diazanyl)phenyl)-2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)acetamide (2)

N,N,N',N'-Tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU) (429 mg, 1.13 mmol) was added to a solution of 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)acetic acid (177 mg, 1.13 mmol) (obtained as described [*Bansode et al., 2009*]), 4-[(*E*)-2-(4-aminophenyl)diazene-1-yl]aniline (200 mg, 0.942 mmol) and diisopropylethylamine (0.192 ml, 1.13 mmol) in 10 ml of acetonitrile/DMF: 2/1. The reaction was carried out for 20 hr under argon atmosphere at room temperature. The solution was concentrated *in vacuo*, dissolved in AcOEt (150 ml), quenched with 150 ml of saturated NaHCO_3 aq., then extracted with AcOEt (2 \times 150 ml). The crude product was purified by column chromatography

on silica (Heptane / EtOAc: 1/1 to 2/8 in vol.), resulting in the desired orange solid (221 mg, 0.63 mmol, 67%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.47 (s, 1H), 7.73 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.68 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.62 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.65 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.03 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 2.75 (s, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 177.14, 165.53, 152.47, 148.29, 142.82, 139.59, 124.82, 122.50, 119.41, 113.36, 41.12, 28.06 (**Figure 1—figure supplement 5**); MS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3^+$ 352.1410, found, 352.1408.

(*E*)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-(4-((4-(2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)acetamido)phenyl)diazanyl)phenyl)acetamide (3)

1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) (380 mg, 0.62 mmol) was added to a solution of 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)acetic acid (96 mg, 0.62 mmol) (obtained as described [**Allen et al., 2010**]), (*E*)-*N*-(4-((4-aminophenyl)diazanyl)phenyl)-2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)acetamide (180 mg, 0.52 mmol) and diisopropylethylamine (0.105 ml, 0.62 mmol) in 10 ml of acetonitrile/DMF: 2/1. The reaction was carried out for 19 hr under argon atmosphere at room temperature. The solution was concentrated *in vacuo*, dissolved in AcOEt (150 ml), quenched with 150 ml of saturated NaHCO_3 aq., then extracted with AcOEt (2 \times 150 ml). The crude product was dissolved in a small volume of DMF, and the product was precipitated using acetone. The precipitate was recovered by filtration, leading to the desired orange solid (486 mg, 0.31 mmol, 60%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.62 (s, 1H), 10.59 (s, 1H), 7.86 (d, 4H, J = 8,7 Hz), 7.75 (d, 4H, J = 8,7 Hz), 7.16 (s, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.26 (s, 2H), 2.76 (s, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 177.80, 171.04, 165.75, 165.49, 148.24, 141.32, 135.26, 123.85, 119.91, 41.46, 40.79, 28.41 (**Figure 1—figure supplement 6**); MS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_6^+$ 489.1, found, 489.0.

MAM and MAS were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Euromedex) to make stock solutions (0.1–5 mM) and diluted in standard extracellular solution to 1–50 μM for labeling.

Molecular biology

Site-directed mutations were introduced into the rat P2X2 cDNA in the pcDNA3.1(+) using KAPA HiFi HotStart PCR kit (Cliniscience, France) as described previously (**Jiang et al., 2010**). All mutations were confirmed by DNA sequencing.

The WT trimeric P2X2 concatemer was obtained in three steps as described (**Browne et al., 2011**) and ligated into pcDNA3.1(+) vector. A C-terminal EE-epitope tag was also included in each subunit. To introduce mutations into the concatemer, each sequence encoding a monomer was cut from the concatemer at the according restriction sites and ligated into a shuttle vector. Site-directed mutagenesis was performed on the cDNA encoding individual subunit using KAPA HiFi HotStart PCR kit (Cliniscience, France), and confirmed by DNA sequencing. This product was then ligated back into the concatemer, and correct insertion was controlled by restriction enzyme digestion. The trimeric P2X2-3T concatemer was first obtained (OO/OO/OO), in which the three native cysteines (C9, C348 and C430) of each subunit were mutated to threonine (**Li et al., 2008**). Cysteine mutations at I328 and/or S345 were then introduced into this concatenated P2X2-3T background as indicated in **Figure 3—figure supplement 3**.

Gene expression in cultured cells

HEK-293 and TSA-201 cells were cultured and transiently transfected with the pcDNA3.1(+) vectors (0.05–2 μg) and a green fluorescent protein cDNA construct (0.3 μg) as previously described (**Jiang et al., 2010**).

Biochemistry

Cell-surface expression of concatemers was determined using the thiol-cleavable, membrane-impermeant reagent sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate (Sulfo-NHS-SS-Biotin, ThermoFisher Scientific, France). TSA-201 cells were transfected with the pcDNA3.1(+) vectors containing the concatenated constructs (5 μg) and used 1 day after. Cells were solubilized in lysis buffer and the supernatant was incubated overnight with neutravidin-agarose beads (ThermoFisher Scientific, France) as previously described (**Jiang et al., 2010**). Protein samples were run on a 4–15% SDS-PAGE in Tris/Glycine/SDS running buffer (Bio-Rad, France). Samples were transferred to a nitrocellulose membrane as described (**Jiang et al., 2010**), which was then incubated in TPBS (PBS

supplemented with 1% nonfat dry milk, 0.5% bovine serum albumin, and 0.05% Tween 20) containing a peroxidase-conjugated Glu-Glu Tag Rabbit Polyclonal antibody (EYMPME) for 2 hr (dilution 1:5000) at room temperature. Blots were developed with the Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent (Dominique Dutscher, France).

Cross-linking of cell-surface receptors was performed as follows. Adherent intact TSA-201 cells in dishes were incubated for 20 min under gentle agitation with 30 μ M MAM in the presence of 3 μ M ATP in ice-cold PBS containing 154 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 4.2 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , pH 7.0, supplemented with 1 mM MgCl_2 and 0.4 mM CaCl_2 . Dishes were rapidly washed with PBS and incubated with Sulfo-NHS-SS-Biotin in PBS pH 8.0 as described above. The nitrocellulose membrane was incubated in TPBS buffer overnight at 4°C with mouse anti-c-Myc antibody (ThermoFisher Scientific, France) diluted at 1:2500. After three washes with TPBS, the blot was incubated with peroxidase-conjugated sheep anti-mouse antibody for 2 hr (dilution 1:10,000; GE Healthcare life Sciences, France) at room temperature and further washed three times with TPBS, and developed with the Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent (Dominique Dutscher, France).

Patch-clamp electrophysiology

Whole-cell recordings were performed 24–48 hr after transfection. Before recordings, cells were incubated for 20 min with MAM (unless stated otherwise) or for 40 min with MAS in standard extracellular solution (50 μ M MAM for the horizontal screening, 1–15 μ M MAM for the vertical screening, 1–15 μ M MAS) and 3 μ M ATP (to increase the accessibility of residues) in the dark at room temperature. After treatment, cells were extensively washed out. Patch pipettes (3–5 M Ω) contained 140 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH. The standard extracellular solution contained 140 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM glucose, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH. All solutions were maintained approximately at 300 mOsm. Cells were voltage-clamped to -60 mV using the EPC10 (HEKA) amplifier, and data were recorded with PATCHMASTER software.

For relative permeability measurements, an agar bridge containing 3 M KCl connected the bath and indifferent electrode. The intracellular solution comprised 147 mM NaCl, 10 mM EGTA, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH, or 140 mM CsCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with CsOH. The standard extracellular solution was changed to symmetrical NaCl external solution and a voltage ramp pulse (from -120 to 80 mV; 165 ms duration) was applied. The solution was then exchanged with one of the following solutions, and another voltage ramp was applied: mannitol (Man) solution, sodium isethionate solution (Na-Ise), CaCl_2 (Ca) solution and NMDG solution. Composition of these solutions was described elsewhere (Lemoine et al., 2013) except for glucose, which was 10 mM. Voltage ramps were applied 300 ms after light switching. For light-gated currents, we calculated reversed potential (E_{rev} , mV) from voltage ramps after subtracting photocurrents to those recorded in the dark.

Single-channel recordings using outside-out configuration were carried out using HEK-293 cells at room temperature 24 hr after transfection. Recording pipettes pulled from borosilicate glass (Harvard Apparatus) were coated with Sylgard 184 (Dow Corning Co.) and fire polished to yield resistances of 6–20 M Ω . The holding potential was -120 mV. The extracellular solution contained 147 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes, and 13 mM glucose, pH 7.3. The intracellular solution contained 147 mM NaF, 10 mM Hepes, and 10 mM EGTA, pH 7.3. Data were sampled at 4–10 kHz, and low-pass filtered at 2.9 kHz. For off-line analysis, data were refiltered to give a cascaded filter cutoff frequency of 1–2 kHz (Jiang et al., 2011).

Illumination of cells was achieved as described previously (Lemoine et al., 2013) with LEDs directly coupled to the microscope. The measured output intensities for wavelengths for 365 and 525 nm were 8.1 and 4.1 mW/mm², respectively. Drug applications were carried out as described previously (Jiang et al., 2010).

Molecular modeling

Models of the P2X trimers with or without attached MAM photo-switchable tweezers were produced starting from the crystal structures of the zfp2X4 receptor in the apo, closed-channel (PDB ID: 4DW0) and ATP-bound, open-channel (4DW1) states (Hattori and Gouaux, 2012). Unresolved side

chains were modeled in CHARMM (*Brooks et al., 2009*) as well as the missing terminal residues (modeled as α -helical extensions of TM1 and TM2) corresponding to the 28–365 residue range of the experimental truncated zFP2X4 construct (*Hattori and Gouaux, 2012*). The protonation state of the ionizable residues was accessed by pK_a calculations following the multiple-site titration approach based on continuum electrostatics (*Bashford and Karplus, 1990; Bashford and Karplus, 1991*). The results obtained using APBS (*Baker et al., 2001*) and Karlsberg (*Rabenstein and Knapp, 2001*) indicated that all residues are in their standard protonation state at pH 7, independently of the ATP agonist. Cysteine residues were introduced at positions I336 (rP2X2: I328) or I336/N353 (S345) to incorporate the MAM molecule by fusing the reactive maleimide moieties with the thiol group of the engineered cysteines. All R/R, R/S, S/R, and S/S stereoisomers of the protein-fused MAM were treated simultaneously using four non-interacting copies (*Roitberg and Elber, 1991*) of the photo-switchable cross-linker. Either one horizontal (I336C/I336C) or three vertical (I336C/N353C) MAM molecules were incorporated in both the closed and the open-channel models. The protein trimers were then embedded in a pre-equilibrated 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-phosphatidylcholine (POPC) bilayer and fully solvated (including the open pore) with modified TIP3P (*Durell et al., 1994*) water molecules using VMD (*Humphrey et al., 1996*). The net charge of the system was neutralized by adding a 150 mM equivalent of sodium and chloride ions. The resulting all-atom constructs (~138000 atoms each) were modeled using the CHARMM force-field version 36 (*Best et al., 2012*) with MAM parameters obtained from the CHARMM general force-field (*Vanommeslaeghe et al., 2010*).

The molecular systems were then subjected to energy minimization (5000 steps) followed by short MD equilibrations with periodic boundary conditions and Particle Mesh Ewald long-range electrostatics. Harmonic restraints were set on the positions of the phosphorus and adenosine heavy atoms (1 kcal/mol/Å²) of the ATP agonists and of the C α and C β atoms (1.0 and 0.5 kcal/mol/Å², respectively) of the protein except for the TM2 helices, the cross-linked Cys residues, and the added terminal residues. Following a short thermalization (600 ps), a 2-ns MD relaxation was performed in the NPT ensemble at 310 K and 1 atm with vanishing positional restraints. Because in the absence of MAM the open-state conformation captured in the crystal was unstable in simulation, that is, spontaneous shut of the ion pore within a few (<5) nanoseconds of equilibration independently of the initial setups (i.e. equilibration procedure, protonation state of residues, membrane composition, etc.), for the simulations of the open state, the TM1-TM2 interface was stabilized by incorporating structural information obtained from recent intra-subunit Cd²⁺ bridging essays (*Heymann et al., 2013*). Specifically, the trigonal-planar Cd²⁺ coordination between the side chains of N35 (C γ), N353C (S γ), and C356 (S γ) was mimicked by introducing harmonic distance restraints (reference distance 4.2 Å, force constant 1 kcal/mol/Å²). Structural information related to the inter-subunit Cd²⁺ coordination site of *Li et al., (2010)*, which involves the side chains of L351 (rP2X2: V343), was not included in the modeling.

All MD simulations of P2X were performed using NAMD (*Phillips et al., 2005*) version 2.10. Six independent 50 ns-long unrestrained MD simulations of the free MAM molecule in solution (~10,000 atoms) were performed using ACEMD (*Harvey et al., 2009*) in the NVT ensemble at 310 K for the *cis* and *trans* configurations and for the R/R, S/R, and S/S stereoisomers. Trajectories were analyzed using VMD and Wordom (*Seeber et al., 2007*), and molecular snapshots were rendered using PyMOL (Schrödinger, LLC). Profiles of the TM pore radius along the axis were calculated using the program HOLE (*Smart et al., 1996*) for backbone atoms only to emphasize global TM2 displacements. The mean distances between the S–S atoms (free MAM) obtained along the MD simulations were computed by averaging over the R/R and S/S stereoisomers (25,000 snapshots each) and twice the R/S (resp. S/R) stereoisomer (2 × 25,000 snapshots) for a total of $n = 100000$ for both the *cis* and *trans* configurations. The mean distances between the C β –C β of the cross-linked Cys residues were obtained for all four stereoisomers per MAM over the 200 snapshots saved along the 2 ns-long MD simulation, that is, $n = 800$ or 2400 for one or three MAM molecule(s), respectively. The normalized probability distributions of the S–S or C β –C β distances were obtained by clustering all distance values using a bin width of 0.2 Å. For the free MAM simulations, the peak probability was then selected as the mean of the distribution, and the standard deviation was obtained after performing a least-square fit with a normal distribution over the full dataset of probabilities using a modified Levenberg-Marquardt algorithm (*Kelley, 1999*). For the simulations with MAM fused to the protein, both the mean and the standard deviation were obtained from the gaussian least-square fit.

Data analysis

For data analyses, FitMaster (HEKA Electronics, v2x69) and IGOR PRO (WaveMetrics, v6.32A) software were used. Experiments were repeated several times after, at least, two independent transfections. Data from dose–response relationships were fit to the Hill equation as described previously (Jiang *et al.*, 2010). For determining ATP dose–response relationship for the I328C mutant at visible light, we subtracted $I_{(ATP+light)}$ from $I_{(light)}$, where $I_{(ATP+light)}$ is the maximal current evoked by ATP (at a given concentration) during light irradiation, $I_{(light)}$ is the maximal light-gated current recorded in the absence of ATP.

Increase of ATP maximal current was determined by the following equation: $(I_{(ATP+light)} - I_{(light)}) / I_{(ATP)}$, where $I_{(ATP+light)}$ is the maximal current evoked by a saturating concentration of ATP during light irradiation, and $I_{(ATP)}$ is the maximal current evoked by a saturating concentration of ATP in the dark. Apparent ATP desensitization of the I328C/S345C mutant was determined by calculating the ratio of the remaining current recorded just before the end of the ATP application and the peak current during the same application.

Fitting procedures to access the time constant were based on the single-exponential decay equation function: $I_t = I_0 + A \exp(-t/\tau)$, where I_0 and A are the residual current and maximal amplitude, respectively, t is the time in seconds, and τ is the time constant in seconds.

Channel events were detected by using TAC software (Bruxton Co.) and conductance levels were measured by all-points amplitude histograms fit to Gaussian distributions. For relative permeability measurements, values of E_{rev} were corrected for liquid junction potentials, which were calculated using IGOR PRO, and used to determine the permeability ratios ($P_X/P_{cations}$) as described previously (Lemoine *et al.*, 2013).

Acknowledgements

The authors thank Pr. M Goeldner and K Dunning for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the International Center for Frontier Research in Chemistry (icFRC) and grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV5-001-01 and ANR-11-BSV5-001-02). This work was granted access to the HPC resources of CCRT under the allocation 2014-[076644] made by GENCI (Grand Equipement National de Calcul Intensif). We acknowledge the Partnership for Advanced Computing in Europe (PRACE) for awarding us access to resources at the SuperMUC center in Leibniz (Germany). HPC resources from the Mesocentre at the University of Strasbourg are also acknowledged. CH was supported by a doctoral fellowship from the icFRC (CONV/2011/01/CIRFR-N°157). DL was supported by a postdoctoral fellowship from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV5-001-01). NC received support from IdEx Projet Interdisciplinaire (Grant No. RIDEX04).

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Centre International de Recherches aux Frontières de la Chimie	CONV/2011/01/CIRFR-No. 157	Chloé Habermacher Thomas Grutter
Agence Nationale de la Recherche	ANR-11-BSV5-001	Damien Lemoine Alexandre Specht Thomas Grutter
Université de Strasbourg	RIDEX04	Nicolas Calimet Marco Cecchini Thomas Grutter

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

CH, NC, AS, Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data; AM, DL, LP, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data; MC, TG, Conception and design, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article

References

- Abbracchio MP**, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences* **32**:19–29. doi: [10.1016/j.tins.2008.10.001](https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001)
- Allen VC**, Robertson CC, Turega SM, Philp D. 2010. A simple network of synthetic replicators can perform the logical or operation. *Organic Letters* **12**:1920–1923. doi: [10.1021/ol100404g](https://doi.org/10.1021/ol100404g)
- Allsopp RC**, Evans RJ. 2011. The intracellular amino terminus plays a dominant role in desensitization of ATP-gated P2X receptor ion channels. *The Journal of Biological Chemistry* **286**:44691–44701. doi: [10.1074/jbc.M111.303917](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.303917)
- Baker NA**, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:10037–10041. doi: [10.1073/pnas.181342398](https://doi.org/10.1073/pnas.181342398)
- Bansode TN**, Shelke JV, Dongre VG. 2009. Synthesis and antimicrobial activity of some new n-acyl substituted phenothiazines. *European Journal of Medicinal Chemistry* **44**:5094–5098. doi: [10.1016/j.ejmech.2009.07.006](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.07.006)
- Bashford D**, Karplus M. 1990. PKa's of ionizable groups in proteins: atomic detail from a continuum electrostatic model. *Biochemistry* **29**:10219–10225. doi: [10.1021/bi00496a010](https://doi.org/10.1021/bi00496a010)
- Bashford D**, Karplus M. 1991. Multiple-site titration curves of proteins: an analysis of exact and approximate methods for their calculation. *The Journal of Physical Chemistry* **95**:9556–9561. doi: [10.1021/j100176a093](https://doi.org/10.1021/j100176a093)
- Beharry AA**, Woolley GA. 2011. Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chemical Society Reviews* **40**:4422–4437. doi: [10.1039/c1cs15023e](https://doi.org/10.1039/c1cs15023e)
- Best RB**, Zhu X, Shim J, Lopes PE, Mittal J, Feig M, Mackerell AD. 2012. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone φ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles. *Journal of Chemical Theory and Computation* **8**:3257–3273. doi: [10.1021/ct300400x](https://doi.org/10.1021/ct300400x)
- Brooks BR**, Brooks CL, Mackerell AD, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, Won Y, Archontis G, Bartels C, Boresch S, Cafilisch A, Cavas L, Cui Q, Dinner AR, Feig M, Fischer S, Gao J, Hodosek M, Im W, Kuczera K, Lazaridis T, Ma J, Ovchinnikov V, Paci E, Pastor RW, Post CB, Pu JZ, Schaefer M, Tidor B, Venable RM, Woodcock HL, Wu X, Yang W, York DM, Karplus M. 2009. CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry* **30**:1545–1614. doi: [10.1002/jcc.21287](https://doi.org/10.1002/jcc.21287)
- Browne LE**, Cao L, Broomhead HE, Bragg L, Wilkinson WJ, North RA. 2011. P2X receptor channels show threefold symmetry in ionic charge selectivity and unitary conductance. *Nature Neuroscience* **14**:17–18. doi: [10.1038/nn.2705](https://doi.org/10.1038/nn.2705)
- Browne LE**, Jiang LH, North RA. 2010. New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **31**:229–237. doi: [10.1016/j.tips.2010.02.004](https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.02.004)
- Browne LE**, Nunes JP, Sim JA, Chudasama V, Bragg L, Caddick S, North RA. 2014. Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**:521–526. doi: [10.1073/pnas.1318582111](https://doi.org/10.1073/pnas.1318582111)
- Cao L**, Young MT, Broomhead HE, Fountain SJ, North RA. 2007. Thr339-to-serine substitution in rat P2X2 receptor second transmembrane domain causes constitutive opening and indicates a gating role for Lys308. *Journal of Neuroscience* **27**:12916–12923. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4036-07.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4036-07.2007)
- Chaumont S**, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F. 2004. Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **279**:29628–29638. doi: [10.1074/jbc.M403940200](https://doi.org/10.1074/jbc.M403940200)
- del Camino D**, Yellen G. 2001. Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K⁺ channel. *Neuron* **32**:649–656. doi: [10.1016/S0896-6273\(01\)00487-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00487-1)
- Ding S**, Sachs F. 1999. Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *The Journal of General Physiology* **113**:695–720. doi: [10.1085/jgp.113.5.695](https://doi.org/10.1085/jgp.113.5.695)
- Du J**, Dong H, Zhou HX. 2012. Gating mechanism of a P2X4 receptor developed from normal mode analysis and molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:4140–4145. doi: [10.1073/pnas.1119546109](https://doi.org/10.1073/pnas.1119546109)
- Durell SR**, Brooks BR, Bennaim A. 1994. Solvent-induced forces between 2 hydrophilic groups. *Journal of Physical Chemistry* **98**:2198–2202.
- Faletta F**, Giroto G, D'Adamo AP, Vozzi D, Morgan A, Gasparini P. 2014. A novel P2RX2 mutation in an Italian family affected by autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Gene* **534**:236–239. doi: [10.1016/j.gene.2013.10.052](https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.052)
- Fehrentz T**, Schönberger M, Trauner D. 2011. Optochemical genetics. *Angewandte Chemie (International Ed. In English)*. 12.; 12156–12182. doi: [10.1002/anie.201103236](https://doi.org/10.1002/anie.201103236)
- Fujiwara Y**, Keceli B, Nakajo K, Kubo Y. 2009. Voltage- and [ATP]-dependent gating of the P2X(2) ATP receptor channel. *The Journal of General Physiology* **133**:93–109. doi: [10.1085/jgp.200810002](https://doi.org/10.1085/jgp.200810002)
- Harvey MJ**, Giupponi G, Fabritiis GD. 2009. ACEMD: accelerating biomolecular dynamics in the microsecond time scale. *Journal of Chemical Theory and Computation* **5**:1632–1639. doi: [10.1021/ct9000685](https://doi.org/10.1021/ct9000685)

- Hattori M, Gouaux E. 2012. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485**:207–212. doi: [10.1038/nature11010](https://doi.org/10.1038/nature11010)
- Hausmann R, Günther J, Kless A, Kuhlmann D, Kassack MU, Bahrenberg G, Markwardt F, Schmalzing G. 2013. Salt bridge switching from Arg290/Glu167 to Arg290/ATP promotes the closed-to-open transition of the P2X2 receptor. *Molecular Pharmacology* **83**:73–84. doi: [10.1124/mol.112.081489](https://doi.org/10.1124/mol.112.081489)
- Heymann G, Dai J, Li M, Silberberg SD, Zhou HX, Swartz KJ. 2013. Inter- and intrasubunit interactions between transmembrane helices in the open state of P2X receptor channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**:E4045–4054. doi: [10.1073/pnas.1311071110](https://doi.org/10.1073/pnas.1311071110)
- Huang LD, Fan YZ, Tian Y, Yang Y, Liu Y, Wang J, Zhao WS, Zhou WC, Cheng XY, Cao P, Lu XY, Yu Y. 2014. Inherent dynamics of head domain correlates with ATP-recognition of P2X4 receptors: insights gained from molecular simulations. *PloS One* **9**:e97528. doi: [10.1371/journal.pone.0097528](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097528)
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **14**:33–38. doi: [10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Jiang LH, Kim M, Spelta V, Bo X, Surprenant A, North RA. 2003. Subunit arrangement in P2X receptors. *Journal of Neuroscience* **23**:8903–8910.
- Jiang R, Lemoine D, Martz A, Taly A, Gonin S, Prado de Carvalho L, Specht A, Grutter T. 2011. Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:9066–9071. doi: [10.1073/pnas.1102170108](https://doi.org/10.1073/pnas.1102170108)
- Jiang R, Martz A, Gonin S, Taly A, de Carvalho LP, Grutter T. 2010. A putative extracellular salt bridge at the subunit interface contributes to the ion channel function of the ATP-gated P2X2 receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **285**:15805–15815. doi: [10.1074/jbc.M110.101980](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.101980)
- Jiang R, Taly A, Grutter T. 2013. Moving through the gate in ATP-activated P2X receptors. *Trends in Biochemical Sciences* **38**:20–29. doi: [10.1016/j.tibs.2012.10.006](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.10.006)
- Jiang R, Taly A, Lemoine D, Martz A, Cunrath O, Grutter T. 2012. Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels. *The EMBO Journal* **31**:2134–2143. doi: [10.1038/emboj.2012.75](https://doi.org/10.1038/emboj.2012.75)
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417**:523–526. doi: [10.1038/417523a](https://doi.org/10.1038/417523a)
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* **460**:592–598. doi: [10.1038/nature08198](https://doi.org/10.1038/nature08198)
- Keceli B, Kubo Y. 2014. Signal transmission within the P2X2 trimeric receptor. *The Journal of General Physiology* **143**:761–782. doi: [10.1085/jgp.201411166](https://doi.org/10.1085/jgp.201411166)
- Kelley CT. 1999. Iterative methods for optimization. In *SIAM Frontiers in Applied Mathematics* **18**. doi: [10.1137/1.9781611970920](https://doi.org/10.1137/1.9781611970920)
- Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA. 1999. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nature Neuroscience* **2**:322–330. doi: [10.1038/7233](https://doi.org/10.1038/7233)
- Khakh BS, North RA. 2006. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* **442**:527–532. doi: [10.1038/nature04886](https://doi.org/10.1038/nature04886)
- Khakh BS, North RA. 2012. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* **76**:51–69. doi: [10.1016/j.neuron.2012.09.024](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.024)
- Kracun S, Chaptal V, Abramson J, Khakh BS. 2010. Gated access to the pore of a P2X receptor: structural implications for closed-open transitions. *The Journal of Biological Chemistry* **285**:10110–10121. doi: [10.1074/jbc.M109.089185](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.089185)
- Lemoine D, Habermacher C, Martz A, Méry PF, Bouquier N, Diverchy F, Taly A, Rassendren F, Specht A, Grutter T. 2013. Optical control of an ion channel gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**:20813–20818. doi: [10.1073/pnas.1318715110](https://doi.org/10.1073/pnas.1318715110)
- Levitz J, Pantoja C, Gaub B, Janovjak H, Reiner A, Hoagland A, Schoppik D, Kane B, Stawski P, Schier AF, Trauner D, Isacoff EY. 2013. Optical control of metabotropic glutamate receptors. *Nature Neuroscience* **16**:507–516. doi: [10.1038/nn.3346](https://doi.org/10.1038/nn.3346)
- Li M, Chang TH, Silberberg SD, Swartz KJ. 2008. Gating the pore of P2X receptor channels. *Nature Neuroscience* **11**:883–887. doi: [10.1038/nn.2151](https://doi.org/10.1038/nn.2151)
- Li M, Kawate T, Silberberg SD, Swartz KJ. 2010. Pore-opening mechanism in trimeric P2X receptor channels. *Nature Communications* **1**:44. doi: [10.1038/ncomms1048](https://doi.org/10.1038/ncomms1048)
- Li Z, Migita K, Samways DS, Voigt MM, Egan TM. 2004. Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor. *Journal of Neuroscience* **24**:7378–7386. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1423-04.2004](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1423-04.2004)
- Lörinczi É, Bhargava Y, Marino SF, Taly A, Kaczmarek-Hájek K, Barrantes-Freer A, Dutertre S, Grutter T, Rettinger J, Nicke A. 2012. Involvement of the cysteine-rich head domain in activation and desensitization of the P2X1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:11396–11401. doi: [10.1073/pnas.1118759109](https://doi.org/10.1073/pnas.1118759109)
- Marquez-Klaka B, Rettinger J, Bhargava Y, Eisele T, Nicke A. 2007. Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. *Journal of Neuroscience* **27**:1456–1466. doi: [10.1523/JNEUROSCI.3105-06.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3105-06.2007)
- Nagaya N, Tittle RK, Saar N, Dellal SS, Hume RI. 2005. An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **280**:25982–25993. doi: [10.1074/jbc.M504545200](https://doi.org/10.1074/jbc.M504545200)
- Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kalé L, Schulten K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* **26**:1781–1802. doi: [10.1002/jcc.20289](https://doi.org/10.1002/jcc.20289)

- Rabenstein B**, Knapp EW. 2001. Calculated pH-dependent population and protonation of carbon-monoxide-myoglobin conformers. *Biophysical Journal* **80**:1141–1150. doi: [10.1016/S0006-3495\(01\)76091-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76091-2)
- Reiner A**, Isacoff EY. 2014. Tethered ligands reveal glutamate receptor desensitization depends on subunit occupancy. *Nature Chemical Biology* **10**:273–280. doi: [10.1038/nchembio.1458](https://doi.org/10.1038/nchembio.1458)
- Roberts JA**, Allsopp RC, El Ajouz S, Vial C, Schmid R, Young MT, Evans RJ. 2012. Agonist binding evokes extensive conformational changes in the extracellular domain of the ATP-gated human P2X1 receptor ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:4663–4667. doi: [10.1073/pnas.1201872109](https://doi.org/10.1073/pnas.1201872109)
- Robinson LE**, Murrell-Lagnado RD. 2013. The trafficking and targeting of P2X receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **7**:233. doi: [10.3389/fncel.2013.00233](https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00233)
- Roitberg A**, Elber R. 1991. Modeling side chains in peptides and proteins: application of the locally enhanced sampling and the simulated annealing methods to find minimum energy conformations. *The Journal of Chemical Physics* **95**:9277–9287. doi: [10.1063/1.461157](https://doi.org/10.1063/1.461157)
- Rokic MB**, Stojilkovic SS. 2013. Two open states of P2X receptor channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **7**:215. doi: [10.3389/fncel.2013.00215](https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00215)
- Rothwell SW**, Stansfeld PJ, Bragg L, Verkhratsky A, North RA. 2014. Direct gating of ATP-activated ion channels (p2X2 receptors) by lipophilic attachment at the outer end of the second transmembrane domain. *The Journal of Biological Chemistry* **289**:618–626. doi: [10.1074/jbc.M113.529099](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529099)
- Samways DS**, Li Z, Egan TM. 2014. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**:6. doi: [10.3389/fncel.2014.00006](https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00006)
- Seeber M**, Cecchini M, Rao F, Settanni G, Caflisch A. 2007. Wordom: a program for efficient analysis of molecular dynamics simulations. *Bioinformatics* **23**:2625–2627. doi: [10.1093/bioinformatics/btm378](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm378)
- Smart OS**, Neduvellil JG, Wang X, Wallace BA, Sansom MSP. 1996. HOLE: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *Journal of Molecular Graphics* **14**:354–360. doi: [10.1016/S0263-7855\(97\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0263-7855(97)00009-X)
- Stelmashenko O**, Compan V, Browne LE, North RA. 2014. Ectodomain movements of an ATP-gated ion channel (p2X2 receptor) probed by disulfide locking. *The Journal of Biological Chemistry* **289**:9909–9917. doi: [10.1074/jbc.M113.542811](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.542811)
- Stelmashenko O**, Lalo U, Yang Y, Bragg L, North RA, Compan V. 2012. Activation of trimeric P2X2 receptors by fewer than three ATP molecules. *Molecular Pharmacology* **82**:760–766. doi: [10.1124/mol.112.080903](https://doi.org/10.1124/mol.112.080903)
- Szymański W**, Beierle JM, Kistemaker HA, Velema WA, Feringa BL. 2013. Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches. *Chemical Reviews* **113**:6114–6178. doi: [10.1021/cr300179f](https://doi.org/10.1021/cr300179f)
- Tochitsky I**, Banghart MR, Mourof A, Yao JZ, Gaub B, Kramer RH, Trauner D. 2012. Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Chemistry* **4**:105–111. doi: [10.1038/nchem.1234](https://doi.org/10.1038/nchem.1234)
- Trujillo CA**, Nery AA, Martins AH, Majumder P, Gonzalez FA, Ulrich H. 2006. Inhibition mechanism of the recombinant rat P2X(2) receptor in glial cells by suramin and TNP-ATP. *Biochemistry* **45**:224–233. doi: [10.1021/bi051517w](https://doi.org/10.1021/bi051517w)
- Vanommeslaeghe K**, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, Darian E, Guvench O, Lopes P, Vorobyov I, Mackerell AD. 2010. CHARMM general force field: a force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry* **31**:671–690. doi: [10.1002/jcc.21367](https://doi.org/10.1002/jcc.21367)
- Virginio C**, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A. 1999. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nature Neuroscience* **2**:315–321. doi: [10.1038/7225](https://doi.org/10.1038/7225)
- Volgraf M**, Gorostiza P, Numano R, Kramer RH, Isacoff EY, Trauner D. 2006. Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nature Chemical Biology* **2**:47–52. doi: [10.1038/nchembio756](https://doi.org/10.1038/nchembio756)
- Zhao WS**, Wang J, Ma XJ, Yang Y, Liu Y, Huang LD, Fan YZ, Cheng XY, Chen HZ, Wang R, Yu Y. 2014. Relative motions between left flipper and dorsal fin domains favour P2X4 receptor activation. *Nature Communications* **5**:4189. doi: [10.1038/ncomms5189](https://doi.org/10.1038/ncomms5189)

On the permeation of large organic cations through the pore of ATP-gated P2X receptors

Mahboubi Harkat^{a,b,1}, Laurie Peverini^{a,b,1}, Adrien H. Cerdan^{b,c}, Kate Dunning^{a,b}, Juline Beudez^{a,b}, Adeline Martz^{a,b}, Nicolas Calimet^{b,c}, Alexandre Specht^{a,b}, Marco Cecchini^{b,c}, Thierry Chataigneau^{a,b}, and Thomas Grutter^{a,b,2}

^aLaboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, Équipe de Chimie et Neurobiologie Moléculaire, Faculté de Pharmacie, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7199, F-67400 Illkirch, France; ^bUniversité de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France; and ^cLaboratoire d'Ingénierie des Fonctions Moléculaires, Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires (ISIS), UMR 7006, CNRS, F-67000 Strasbourg, France

Edited by Christopher Miller, Howard Hughes Medical Institute, Brandeis University, Waltham, MA, and approved March 31, 2017 (received for review January 25, 2017)

Pore dilation is thought to be a hallmark of purinergic P2X receptors. The most commonly held view of this unusual process posits that under prolonged ATP exposure the ion pore expands in a striking manner from an initial small-cation conductive state to a dilated state, which allows the passage of larger synthetic cations, such as *N*-methyl-D-glucamine (NMDG⁺). However, this mechanism is controversial, and the identity of the natural large permeating cations remains elusive. Here, we provide evidence that, contrary to the time-dependent pore dilation model, ATP binding opens an NMDG⁺-permeable channel within milliseconds, with a conductance that remains stable over time. We show that the time course of NMDG⁺ permeability superimposes that of Na⁺ and demonstrate that the molecular motions leading to the permeation of NMDG⁺ are very similar to those that drive Na⁺ flow. We found, however, that NMDG⁺ “percolates” 10 times slower than Na⁺ in the open state, likely due to a conformational and orientational selection of permeating molecules. We further uncover that several P2X receptors, including those able to desensitize, are permeable not only to NMDG⁺ but also to spermidine, a large natural cation involved in ion channel modulation, revealing a previously unrecognized P2X-mediated signaling. Altogether, our data do not support a time-dependent dilation of the pore on its own but rather reveal that the open pore of P2X receptors is wide enough to allow the permeation of large organic cations, including natural ones. This permeation mechanism has considerable physiological significance.

pore dilation | purinergic receptor | photoswitches | YO-PRO uptake | spermidine

P2X receptors are nonselective cation channels activated by adenosine 5'-triphosphate (ATP). They are integral membrane proteins and form a family of trimeric receptors composed of seven subunits (P2X1–P2X7) that are involved in a wide range of physiological and pathological processes, including pain sensation, hearing protection, taste, modulation of neurotransmitter release, hypertension, inflammation, and neuropathic pain (1–5). P2X receptors have, therefore, attracted attention as promising therapeutic targets (5, 6). Supported by recent X-ray structures (7–11), a functional receptor is composed of three subunits that assemble in the cell membrane as a homo- or heterotrimer to form a central transmembrane pore (12, 13). Each subunit comprises two transmembrane helices, named TM1 and TM2, which are linked by an extracellular domain, where the ATP-binding sites are nestled. In response to a short application of ATP, the pore rapidly opens on the millisecond timescale—a process known as gating—to a state that is selective to small inorganic cations, such as Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ ions. The flow of these cations is estimated to occur at relatively high conduction rates, from 6 to 20 × 10⁶ ions per second at a given driving force amplitude (14–16). This rapidly affects the ion balance of the cell and consequently initiates signal transduction. This open state is sometimes referred to as I₁ state (2).

A remarkable feature of P2X receptors is that a longer ATP application causes a striking time-dependent pore dilation of the channel. This process, named pore dilation, is observed only for selected subtypes, notably homomeric P2X2, P2X4, and P2X7 and heteromeric receptors P2X2/3 and P2X2/5 (17–21). Different possible mechanisms have been proposed to explain pore dilation (22, 23), but the most prevailing one posits that the open pore of the initial I₁ state progressively dilates for several seconds to form an enlarged pore, denoted I₂ state, that is permeable to large organic cations such as *N*-methyl-D-glucamine (NMDG⁺) or fluorescent dyes such as ethidium bromide and YO-PRO-1, a carbocyanine DNA binding dye (2). As these cations are larger than small inorganic ions, they are believed to be impermeable to the I₁ state. This belief has been supported by many biophysical studies, including atomic force microscopy (AFM), patch-clamp electrophysiology, fluorescent dye uptakes, and real-time conformational change measurements (17, 18, 24–31). However, the molecular mechanism of pore expansion is still unclear.

Very recently, a study has challenged the pore dilation paradigm (32). The study suggests that the slow transition toward the I₂ state is not caused by a progressive change in the permeability ratio of NMDG⁺ relative to Na⁺, which is usually determined by measuring the hallmark shift in equilibrium potentials by patch-clamp electrophysiology under bi-ionic conditions but rather by a dramatic, unappreciated change of the concentrations of these ions inside the cell. Moreover, this study showed that NMDG⁺ permeability is rapidly activated and can be inhibited when a

Significance

Unlike many ion channels whose pore conductances remain relatively stable over time, it is thought that prolonged ATP applications to P2X receptors cause a striking increase over time in the permeability of large molecules, a process dubbed pore dilation. However, this mechanism remains poorly understood and highly controversial. Here, we use different methods spanning single-channel recordings, photochemistry, molecular biology, and computations to show that contrary to longstanding view, rapid activation by ATP allows the stable passage of large cations through the P2X pore. We further discover that spermidine, a large natural cation known to modulate other ion channels, is able to transit through many P2X receptors, including those thought to be nondilating. Our data thus reveal an unacknowledged P2X-mediated signaling.

Author contributions: A.S., M.C., and T.G. designed research; M.H., L.P., A.H.C., K.D., J.B., A.M., N.C., A.S., M.C., and T.C. performed research; M.H., L.P., A.H.C., K.D., J.B., A.M., N.C., A.S., M.C., T.C., and T.G. analyzed data; and T.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹M.H. and L.P. contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed. Email: grutter@unistra.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1701379114/-DCSupplemental.

pore-lining cysteine residue is reacted with methanethiosulfonate (MTS) reagents, suggesting that the open state of P2X receptors exhibits measurable and stable permeability to large cations. In line with this work, pore dilation has never been observed at the single-channel level (16, 33), and no crystal structure of a dilated state has been reported to date, making the study of this peculiar state particularly difficult. Finally, the physiological relevance of P2X pore dilation remains unclear, especially due to the unknown identity of the natural molecules that permeate through the dilated state. A recent work has, however, shown that genetically determined P2X7 dilated pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity (34). The study revealed that in women having undergone a mastectomy there is a genetic association between lower pain intensity and the hypofunctional His270 (rs7958311) allele of *P2RX7* gene, suggesting that selectively targeting P2X pore formation may be a new strategy for individualizing the treatment of chronic pain. The concept of pore dilation of P2X receptors has remained a matter of controversy for almost 20 years, and as such, understanding of this molecular mechanism with new approaches represents a challenging and pertinent issue.

In this paper, we discover the molecular mechanism of permeation of large organic cations in P2X receptors. Contrary to the prevailing assumptions, we provide evidence by single-channel recordings that the pore does not undergo a time-dependent dilation upon opening but rather enters rapidly, in response to ATP binding, a state that allows the stable passage of large organic cations. In addition, we designed and used photo-switchable cross-linkers of different lengths to probe conformational changes of engineered cysteine-substituted P2X2 receptors that are associated with NMDG⁺ and YO-PRO-1 permeability. We demonstrate that the molecular motions leading to the permeation of these large organic cations are very similar to those that drive Na⁺ flow. We

further reveal by molecular dynamics (MD) simulations a complex mechanism for NMDG⁺ permeation, which involves both a conformational and orientational selection of the permeating molecules. Finally, we uncover that desensitizing P2X receptors have the capacity to transiently conduct NMDG⁺ ions in response to ATP binding and identify spermidine as a natural large molecule able to permeate selected human P2X pores. Our results underscore a previously unappreciated P2X signaling.

Results

ATP Gates a Pore That Is Immediately Permeable to NMDG⁺. In a recent study carried out in P2X2 receptors, it has been shown that ATP rapidly gates macroscopic currents in symmetric NMDG⁺ solutions (32). To determine whether this occurs at the level of the single channel, we used the outside-out configuration of the patch-clamp technique that enables fast solution exchange at the cell membrane on the millisecond time scale. We used symmetric NMDG⁺ solutions, in which NMDG⁺ is present in both the external (outside) and internal (inside the pipette) solutions (NMDG⁺_{out}/NMDG⁺_{in}) and thus represents the only carrier of cationic currents. To increase seal resistance and patch stability, fluoride ions (F⁻) were used as internal counterions to NMDG⁺ cations (*Materials and Methods*). We transiently transfected human embryonic kidney (HEK-293) cells with plasmids encoding the rat P2X2-3T, which is a cysteine-less mutated receptor that retains wild-type P2X2 functionality (35) but displays increased single-channel conductance (36). In a first series of experiments, we used excised outside-out patches that contained multiple channels and observed robust inward NMDG⁺ currents that developed rapidly following fast perfusion of 3 μM ATP, while holding the voltage to -120 mV (activation time constant $\tau_{\text{NMDG}^+} = 203 \pm 47$ ms, $n = 9$ patches; Fig. 1*A, Left* and Fig. S1*A and B*). NMDG⁺ currents remained constant during the 6-s time

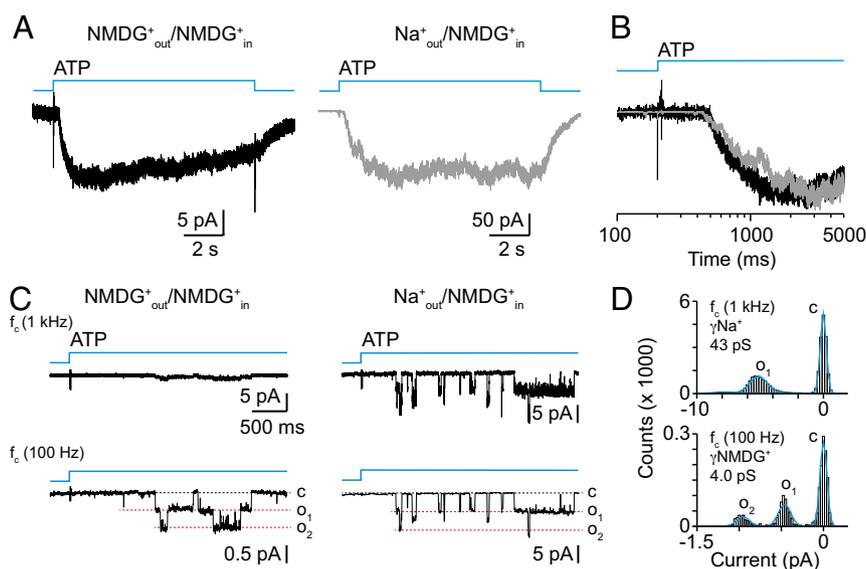


Fig. 1. Rapid ATP activation of P2X2-3T receptors induces instantaneous and stable permeation of NMDG⁺. (A) Fast application of ATP (3 μM, blue traces) to a multiple channel-containing outside-out patch from HEK-293 cells expressing the P2X2-3T receptor evokes rapid NMDG⁺ (Left) and Na⁺ (Right) currents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

application. Increasing ATP concentration consistently decreased activation time constants ($\tau_{\text{NMDG}^+} = 36 \pm 4$ ms, $n = 10$ patches at $10 \mu\text{M}$; Fig. S1B). Consistent with a recent study (32), these data show that ATP rapidly gates an NMDG⁺ conductance, which remains stable over time.

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

To determine NMDG⁺ permeation rates, we measured unitary conductance of NMDG⁺ current from outside-out patches that contained single channels, using the same protocols as described for patches that contained multiple channels. In NMDG⁺_{out}/NMDG⁺_{in}, barely visible single openings and closings were detected following $1 \mu\text{M}$ ATP application, whereas robust single-channel currents were recorded in Na⁺_{out}/NMDG⁺_{in} (Fig. 1C, Top) with a mean conductance of 44 ± 8 pS ($n = 7$ patches, data filtered at 1 kHz). However, when the same recordings were further filtered at a much lower bandwidth (100 Hz; Materials and Methods), discernable unitary currents were then resolved in symmetric NMDG⁺ solution (Fig. 1C, Bottom). These small unitary currents were always recorded in patches that responded to ATP in Na⁺_{out} (16 out of 24 examined patches; the remaining 8 patches were unresponsive to ATP and no unitary NMDG⁺ currents were detected), and they were not observed in the absence of ATP (Fig. S1D). All-points histogram analysis revealed that the mean conductance of these unitary currents was 3.3 ± 0.6 pS (mean amplitude of 0.40 ± 0.04 pA, $n = 6$ patches), which represented 7.5% of the unitary Na⁺ currents, a value that was close to that of the ratio $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$ determined from multi-channel currents (Fig. 1D and Fig. S1C). Increasing ATP concentration to 10 or $30 \mu\text{M}$ did not change the ratio of the mean conductance of NMDG⁺ relative to Na⁺, suggesting that a near saturating concentration of ATP does not increase NMDG⁺ conductance (Fig. S1C). Compared with recordings carried out in symmetric Na⁺ solution (43 ± 6 pS, $n = 4$ patches at $1 \mu\text{M}$ ATP; Fig. S1E), the unitary conductance of NMDG⁺ currents was about 13 times lower than that of Na⁺ currents. From these values, we conclude that NMDG⁺ ions flow through the ATP-gated open pore at extremely low rates ($\sim 2.5 \times 10^6$ NMDG⁺ ions per second per channel at -120 mV with 132.6 mM NMDG⁺) compared with Na⁺ ($\sim 32 \times 10^6$ Na⁺ ions per second per channel at -120 mV with 132.6 mM Na⁺). Given the fact that NMDG⁺ can rapidly transit through the ATP-gated receptor channel, our data demonstrate that the open pore is wide enough to allow its passage on the millisecond time scale.

Molecular Motions Underlying NMDG⁺ Permeation Are Similar to Those Underlying Na⁺ Permeation. We next sought to determine the molecular motions that drive permeation of NMDG⁺. We used our recent “opto-tweezers” strategy, which enabled us to

probe the gating mechanism of P2X2 receptors by using light to open and close the pore (36). This strategy entails the use of a synthetic semirigid azobenzene cross-linker, 4,4'-bis(maleimidoglycine) azobenzene, called MAM (named hereafter MAM-3), which is covalently tethered between a pair of engineered cysteine-substituted residues located at an appropriate distance apart. Light stimulation at specific wavelengths can then be used to force parts of the protein to come closer together or move farther apart due to isomerization of the azobenzene between defined *trans* and *cis* configurations (Fig. 2A and B). These light-driven motions provide a faithful readout of the molecular movements induced by ATP (36, 37).

We focused on the region of the pore that is particularly effective for manipulating molecular motions by light—that is, around residues I328 and S345, which can be cross-linked horizontally or vertically relative to the membrane plane by MAM-3 (36) (Fig. 2C). To increase the chance of trapping any incremental change of the pore diameter, we synthesized two shorter, more rigid photo-switchable cross-linkers, named MAM-1 (also known as BMA) (37) and MAM-2, in which the cysteine-reactive maleimides are either directly attached to both extremities of the azobenzene core (MAM-1) or indirectly at one of the two extremities by a glycine unit (MAM-2) (Fig. 2A and Figs. S2–S4). As a result, the two end-to-end maleimides are incrementally separated by 2 \AA between any two consecutive MAMs in their *trans* configuration (Fig. S5). The end-to-end distance distributions in the *cis* configuration were significantly broader and more difficult to interpret. We produced 13 single and double cysteine mutants in the P2X2–3T background that were expressed in HEK-293 cells and individually treated with each photo-switchable cross-linker, giving rise to 42 different combinations, including controls on the P2X2–3T (Fig. 2E). Effects of light on receptor activity were then assayed using whole-cell patch-clamp recordings on 365-nm (80 ms or 2 s, 17.7 mW/mm²), 530-nm (2 or 4 s, 13.3 mW/mm²), or 455-nm (2 s, 39.5 mW/mm²) illumination cycles to elicit photocurrents in symmetric NMDG⁺ solutions. These currents were normalized to those carried by Na⁺ ($I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$), following the rapid exchange of cells to an Na⁺_{out}/NMDG⁺_{in} solution.

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

Third, two phenotypes were observed in light-induced NMDG⁺ currents: Horizontally cross-linked single mutants (I328C treated with MAM-2 or MAM-3, and I332C treated with MAM-1) were activated in the *trans* configuration of the azobenzene, leading to an NMDG⁺ permeability, whereas vertically cross-linked double mutants (I328C/S345C treated with any MAMs, and I332C/S345C treated with MAM-2) were activated in the *cis* configuration (Fig. 2D and E). Conversely, backward isomerization of the

$I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$ from $\sim 0.2\%$ to $\sim 6\%$. Although we cannot rule out the hypothesis that the presence of MAM is specifically interfering with the bulkier NMDG⁺, these data suggest the existence of partially, Na⁺-selective open states that are not permeable to NMDG⁺.

Light-Induced Motions Gate Dye Uptake in Physiological Conditions.

To further confirm data obtained by patch-clamp electrophysiology, we measured YO-PRO-1 dye uptake in physiological conditions, where Na⁺ replaced NMDG⁺. We focused on the pair I328C and S345C treated with MAM-2, which gave both the highest $I_{\text{NMDG}^+}/I_{\text{Na}^+}$ ratio and the most robust light-gated Na⁺ current density. Robust dye uptake following a pulse of 5 s of light at 365 nm was observed for the double mutant I328C/S345C (Fig. 3 A and C). These uptakes were light-dependent and were similar to those induced by 30 μM ATP on the P2X2-3T background (Fig. 3 A and B). In contrast, no dye uptake was observed in cells expressing the single mutant I328C or S345C incubated with MAM-2 that were illuminated at 530 nm, following a brief preirradiation at 365 nm before YO-PRO-1 application to reset the azobenzene in the *cis* state (Fig. 3 D and E). Although these fluorescence data were in agreement with patch-clamp data, the lack of YO-PRO-1 intake for I328C seemed to be in contrast to the recorded NMDG⁺ permeability. However, a careful analysis showed a rapid inactivation of light-gated currents during and after irradiation of cells expressing the I328C mutant treated with MAM-2, whereas stable light-gated currents were recorded for the double mutant I328C/S345C incubated with the same photo-cross-linker (Fig. S7). The transient light-gated activation of the single mutant likely prevents substantial accumulation of YO-PRO-1 into cells, a hypothesis that readily explains the apparent lack of dye uptake. All together, these results provide evidence that YO-PRO-1 uptake induced by the *cis* configuration of MAM-2 tethered to the I328C/S345C double mutant occurs in physiological conditions.

MD Simulations of NMDG⁺ Permeation. To obtain insights into the permeation mechanism of large organic cations in P2X receptors, NMDG⁺ conductance was explored by all-atom MD. For this purpose, an atomistic model of the open state of zP2X4 equilibrated with three MAM-2 vertically cross-linked between I336C and N353C (i.e., equivalent to I328C and S345C in rP2X2) was simulated in the presence of a membrane potential generated by a constant electric field (*Materials and Methods*). To capture NMDG⁺ permeation events on the simulation time scale (i.e., < 50 ns), the ion channel devoid of the extracellular domain was simulated in the presence of a large membrane potential (up to -2 V) in the absence of MAM and with harmonic restraints on the backbone atoms to preserve its open-pore conformation. The MD results show that our open-state model of zP2X4 is permeable to NMDG⁺ (Fig. 4 and Movie S1) with a permeation rate of 7×10^7 s⁻¹, which is approximately one order of magnitude lower than that simulated in the presence of Na⁺ (Table S1). Of note, these results closely match the ratio measured from single-channel recordings, although the absolute values obtained from modeling were largely higher than those determined experimentally. This is likely due to the non-physiological value of the electrochemical driving force that was used in MD. These simulations reveal that the difference in permeability observed for Na⁺ versus NMDG⁺ is due to a more complex permeation mechanism for the latter, which involves a selection for permeation based on both the molecular conformation and the orientation of the organic cation relative to the pore axis. In fact, by monitoring the end-to-end distance and the orientation of NMDG⁺ along a series of successful permeation events sampled by MD, we found that to be able to cross the constriction point, the organic cation must adopt a fully extended conformation ($d > 7.5$ Å) and have the charged nitrogen atom

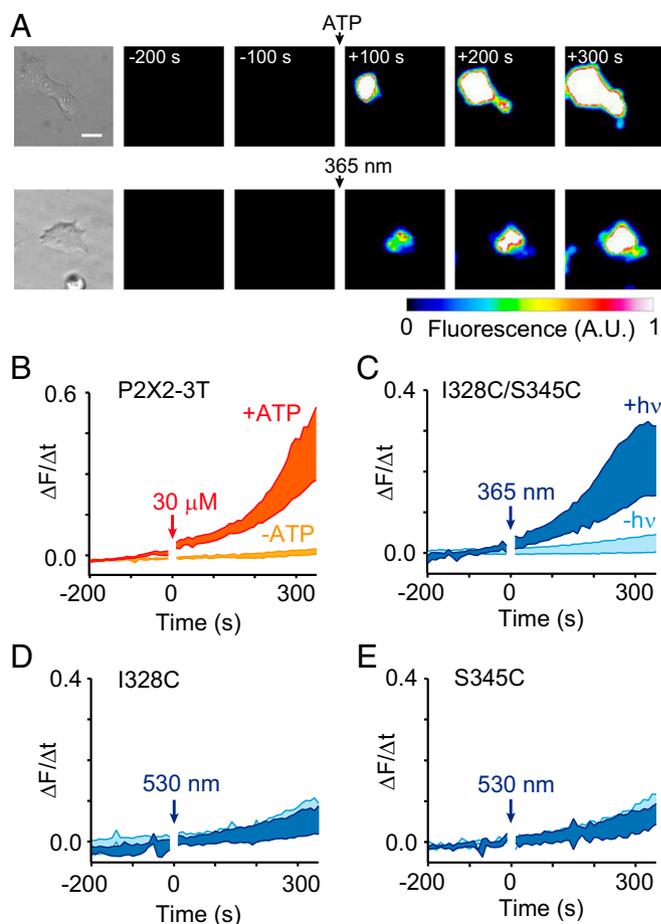


Fig. 3. Structural changes of TM2 helices induce cellular dye uptake in physiological conditions. (A) Selected time series of YO-PRO-1 dye uptake in HEK-293 cells expressing the P2X2-3T receptor (*Upper*) and double mutant I328C/S345C treated with MAM-2 (*Lower*). Fluorescence (in arbitrary units) corresponding microphotographs under transmitted light. (Scale bar, 20 μm .) (B) Corresponding rate of YO-PRO-1 dye uptake in cells ($n = 15$ cells) expressing the P2X2-3T receptor in the absence (orange) or presence (red) of ATP. The arrow indicates the time at which ATP was applied. (C) Corresponding rate of dye uptake in cells expressing the double mutant I328C/S345C treated with MAM-2 in the absence (light blue) or presence (dark blue) of irradiation at 365 nm ($n = 18$ cells). The arrow indicates the time at which cells were briefly irradiated. (D) Same protocol as in C for cells expressing the single mutant I328C treated with MAM-2, except that irradiation occurred at 530 nm ($n = 12$ cells). (E) Same protocol as in D for cells expressing the single mutant S345C treated with MAM-2 ($n = 18$ –21 cells). For D and E, cells were briefly preirradiated at 365 nm for 2 s just before YO-PRO-1 application. Shaded areas denote mean \pm SEM.

facing downward along the electrochemical gradient ($\theta < -50^\circ$) (Fig. 4). In addition, the simulations indicated that before populating a permeable conformation, the flexible NMDG⁺ needs to sample several conformations and orientations, which significantly hinders its permeability, consistent with low unitary conductance of single-channel NMDG⁺ currents. Hence, the simulation results confirm that the open-channel state elicited by MAM is permeable to NMDG⁺ and provide an atomistic picture of the permeation mechanism.

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

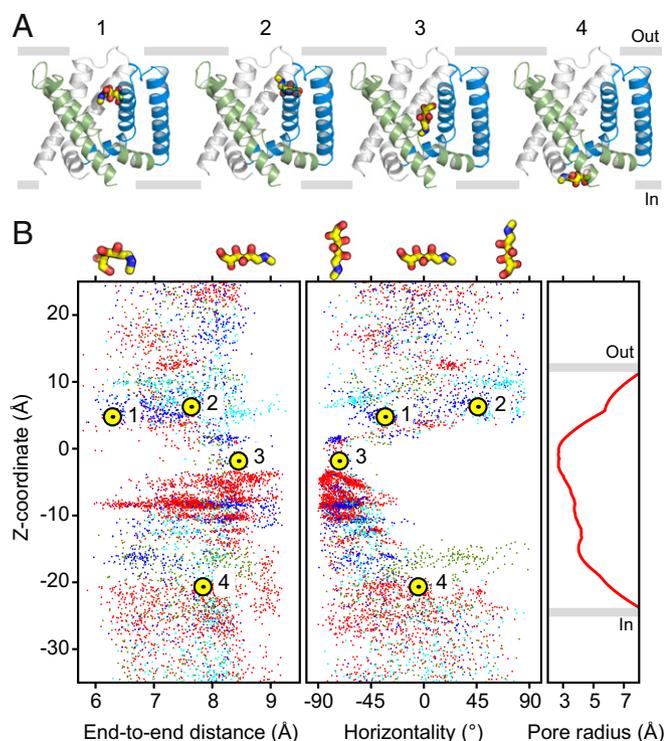


Fig. 4. Mechanism of NMDG⁺ permeation revealed by MD simulations. (A) Snapshots at different simulation times. (B) End-to-end distance of NMDG⁺ (Left) and angle formed by the longitudinal axis of NMDG⁺ cation with the axis parallel to the membrane plane (Middle) are displayed per frame of the simulation for all permeant molecules. Data were collected from four different NMDG⁺ concentration and membrane potential simulation setups: 1 M at -1 V (red dots), 0.15 M at -1 V (green), 0.15 M at -1.5 V (blue), and 0.15 M at -2 V (cyan). Molecular snapshots of NMDG⁺ conformations and orientations corresponding to extreme values for these two observables are shown on top. Indicated numbered dots in yellow are snapshots from A. HOLE profile of the zP2X4 open-state model after 50 ns of equilibration (Right). The simulation results indicate that the ion pore of the ATP-bound state is sufficiently wide to allow for the passage of large organic cations.

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

Finally, having shown that rapid activation of P2X receptors allows permeation of NMDG⁺, we sought to determine which natural compounds can transit through the pore. We focused on positively charged compounds that share a similar size to NMDG⁺. We selected spermidine, which is a natural polyamine known to modulate many ion channels (38), and produced symmetric spermidine solutions (*Materials and Methods*). We observed robust inward spermidine whole-cell currents following rapid application of

ATP in cells expressing the human P2X2 and P2X3 receptors while the membrane was held at -60 mV (Fig. 5B). Of note, MD simulations show that the ATP-bound, zP2X4 open state is also permeable to spermidine (Movie S2). In addition, the simulations indicate that its permeation rate ($5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) is sevenfold faster than that of NMDG⁺ under the same membrane potential. The symmetrical structure of spermidine in addition to the presence of positive charges at the extremities make both the conformational and orientational barriers for permeation almost vanish, thus drastically enhancing its permeability relative to NMDG⁺ despite their similar size. These data therefore uncover a previously unappreciated P2X signaling in which large molecules can rapidly permeate through the pore in response to ATP binding.

Discussion

In this article we uncover the molecular mechanism underlying the permeability of P2X receptors to large organic cations and identify an important natural ion channel modulator able to flow through the ATP-gated pore. Our data tackle the pore dilation paradigm, which has remained for nearly 20 years one of the most enigmatic features of ionotropic purinergic receptors (19, 20). Until recently, the dogma concerning pore dilation was that the channel undergoes a progressive expansion, over time reaching a diameter wide enough to allow permeation of large cations, such as NMDG⁺ and YO-PRO-1. However, a recent study challenged this model by elegantly demonstrating that P2X channels rapidly develop an

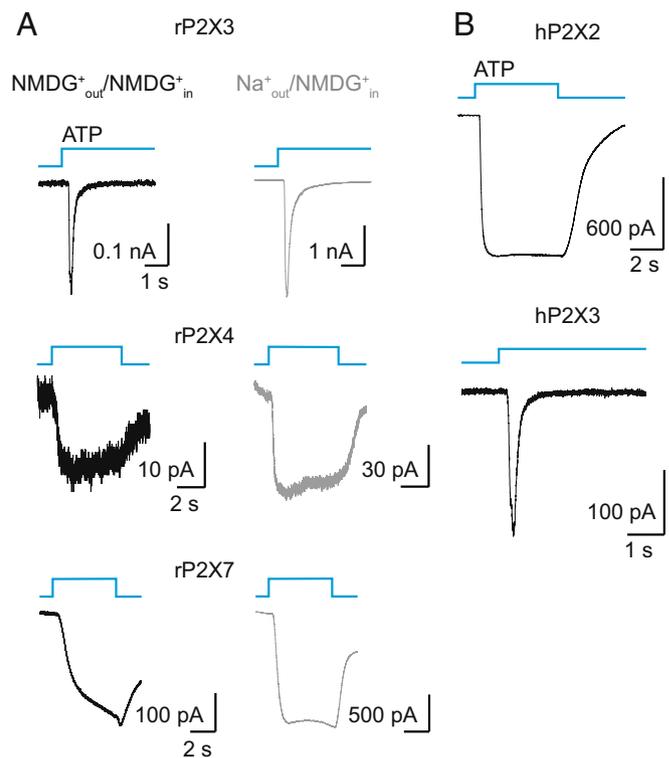


Fig. 5. P2X receptors are permeable to natural organic cations. (A) Macroscopic ATP-gated currents recorded at -60 mV from HEK-293 cells expressing the indicated rat P2X receptors. Recordings were first made in symmetric NMDG⁺_{out}/NMDG⁺_{in} solution (black traces) and then in Na⁺_{out}/NMDG⁺_{in}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

NMDG⁺ current upon ATP binding and lack the slow phase of pore dilation (32). Our results are consistent with this work, and taken together, these two studies firmly establish that, in striking contrast to earlier beliefs, the open state that is reached in milliseconds following ATP binding is also permeable to large molecules. This important finding raises considerable questions concerning the previously predominant view that suggested that the initial I₁ open state is only selective to small cations, such as Na⁺, K⁺, and Ca²⁺. The immediate implication of our results is that the structure of the open pore of the ATP-bound state must be sufficiently wide to accommodate large molecules. From the X-ray structures of the ATP-bound zfp2X4 receptor (8) and very recently the ATP-bound human P2X3 (hP2X3) receptor (10), this seems to be the case, as the minimal cross-section of an extended NMDG⁺ (6 Å × 6 Å × 12.5 Å) is less than the diameter of the open pore (~7 Å for zfp2X4 and 6.4 Å for hP2X3). However, reliable NMDG⁺ permeation by MD simulations cannot be made on the zfp2X4 X-ray structure because the pore systematically collapses within a few nanoseconds (<5) of equilibration (36), likely due to the lack of the intracellular domain that was removed for crystallization purposes (8). By using an improved model of the open state of zfp2X4 (36), which was equilibrated by 50-ns MD in a physiological environment and stabilized by three vertically cross-linked MAM-2 molecules, we provide clear evidence that both NMDG⁺ and the natural cation spermidine may flow through the ion pore of the ATP-bound state. We found, however, that the flow of NMDG⁺ was significantly lower than that of Na⁺, as the former needs to “snake” through the permeating pathway in a fully linear conformation, with the positively charged nitrogen head group pointing downward along the electrochemical gradient. The conformational confinement to this extended form, along with specific orientational constraints in the narrowest region of the pore, introduces significant barriers that hinder cation permeability, thus revealing a complex mechanism for NMDG⁺ permeation. These molecular requirements therefore cause a decrease in the overall rate of NMDG⁺ flow. This conclusion is fully consistent with the low unitary conductance of single-channel NMDG⁺ currents that we (present study) and others (16, 33, 39) have measured for P2X2 and P2X7 receptors.

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

An important finding of this study is that the molecular motions driving NMDG⁺ conductance are very similar to those that lead to Na⁺ flow. By using our recently reported opto-tweezers approach (36), we tested the ability of three photo-switchable cross-linkers of different lengths to optically control NMDG⁺ permeability of 13 cysteine mutants. We observed reliable NMDG⁺ permeation with only 7 out of the 39 tested combinations and found a clear correlation between light-gated NMDG⁺ currents and light-gated Na⁺ currents. The specificity of cross-linked residues and the size dependence of the MAMs strengthen the conclusion that the used tweezers do not induce disorder in the protein but rather can be used as mechanical actuators to justly monitor naturally relevant motions. We identified two molecular motions that lead to permeation of large organic cations: a horizontal outward separation of the extracellular ends of TM2 helices and a vertical motion, in which the N and C termini of TM2 helices from adjacent subunits come closer together or change their orientations relative to one another, most

likely through a change of the helical structure. Importantly, such similar molecular motions were also identified during channel gating (36), suggesting that ATP binding drives the rapid opening of a pore that is simultaneously selective to both small and large cations. As we do not have evidence for a time-dependent increase of the permeability of large cations, our data thus support the conclusion that pore dilation is not an intrinsic property of the channel itself. However, we do not rule out the possibility that pore dilation does exist, but if this were the case, it must require a regulatory element that is external to the P2X pore and that would be lost in our experimental conditions.

One intriguing feature of the mechanism revealed by the opto-tweezers approach is that it raises the possibility to open the channel in a state that is not fully open. We found that an insufficient horizontal outward separation or inappropriate vertical motions of two adjacent TM2 helices failed to open NMDG⁺ conductance but not Na⁺ conductance, suggesting that the pore is partially open. A further variation, by only a few Å, of adjacent helices induced an NMDG⁺ permeation in addition to the Na⁺ flow, thus allowing the pore to become fully opened. The physiological relevance of these partially open states remains unclear, but they might be related to dynamic changes of other biophysical properties of P2X receptors, such as ATP potency and rectification, as reported previously (40, 41). Another possibility would be that these partially open states might correspond to the actual I₁ state. However, we do not favor this hypothesis because we provide no evidence that ATP binding naturally drives the opening of the channel in partially open states that are only selective to small cations.

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

Materials and Methods

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

For MAM-1 synthesis, 498 mg (2.348 mmol) of (*E*)-4,4'-(diazene-1,2-diyl)dianiline and 462.3 mg (4.715 mmol, 2 eq) of maleic anhydride were mixed in 20 mL of anhydrous THF and left 1 h at 4 °C. The resulting product was centrifuged (4 min, 8,000 g), and the precipitate was resuspended in 20 mL of anhydrous THF. Then, 0.5 mL (5.324 mmol, 2.3 eq) of acetic anhydride and 50.2 mg of sodium acetate were added. The mixture was heated under microwave conditions (20 min, 110 °C). Distilled water was added (100 mL), and after centrifugation (10 min, 8,000 g), the precipitate was resuspended in 100 mL of methanol and an orange solid was obtained by slowly adding cold water. After filtration, purification was carried out by Flash-column chromatography (silica) with dichloromethane and ethyl acetate (gradient 100:0 \geq 95:5). After evaporation of the solvent, the pure MAM-1 was obtained as a bright orange solid (36% yield): NMR ¹H (CDCl₃): δ (ppm), 8.01 (4H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.55 (4H, d, *J* = 8.8 Hz), and

6.88 (4H, s); NMR ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm), 169.16, 151.23, 134.42, 133.72, 126.22, and 123.70; and (ESI-HMRS):(m/z , $[\text{M}+\text{H}]^+$), calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_4^+$, 373.0859; found, 373.0932.

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

For synthesis of MAM-2, 200 mg (0.5725 mmol) of intermediate 1 was mixed with 112.3 mg (1.145 mmol, 2 eq) of maleic anhydride and heated under microwave conditions (110 °C, 90 min) in acetone. The obtained precipitate was filtered and resuspended in acetone and then heated 5 min at 60 °C with 0.12 mL of triethylamine (0.8588 mmol, 1.5 eq). We then added 0.54 mL of acetic anhydride (5.725 mmol, 10 eq) with a catalytic amount of manganese acetate (III), and the mixture was heated under microwave conditions (90 min, 110 °C). After addition of water and filtration, 46.1 mg of MAM-2 was obtained (19% yield): NMR ^1H (DMSO- d_6): δ (ppm), 10.66 (1H, s), 7.97 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.92 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.79 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.58 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.23 (2H, s), 7.16 (2H, s), and 4.34 (2H, s); NMR ^{13}C (acetone- d_6): δ (ppm), 171.30, 170.38, 166.17, 152.11, 149.51, 142.76, 135.71, 135.60, 135.25, 127.78, 124.83, 123.80, 120.53, and 41.46; (ESI-HMRS):(m/z , $[\text{M}+\text{H}]^+$), 429.1073 calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_5^+$; found, 429.1069.

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

Molecular Biology. Cysteine mutations were introduced into a rP2X2 receptor background in which Cys9, Cys348, and Cys430 were mutated to threonine (P2X2-3T) (35) using KAPA HiFi HotStart PCR kit (Clinisience). All mutations were confirmed by DNA sequencing (GATC-Biotech). All P2X encoding genes were subcloned in pcDNA3.1 vector, except that encoding hP2X2, which was subcloned in the vector pCMV6-AC-mGFP (OriGene). hP2X2 contains mGFP at its C terminus.

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

Patch-Clamp Electrophysiology. Single-channel recordings using outside-out configuration were carried out using HEK-293 cells at room temperature 24 h after transfection. Recording pipettes pulled from borosilicate glass (Harvard Apparatus) were coated with Sylgard 184 (Dow Corning Co.) and fire polished to yield resistances of 10–20 M Ω (Sutter model p-97). The holding potential was -120 mV. The extracellular solution contained 132.6 mM NaCl or NMDG (Sigma), 0.3 mM CaCl_2 , 0.25 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes, pH 7.3, adjusted with NaOH (for NaCl solution) or HCl solution (for NMDG solution). The intracellular solution contained either 132.6 mM NMDG, 9.46 mM Hepes, and 10 mM EDTA, adjusted to pH 7.3, first approximately with a 5% HF solution, then more precisely with 0.5% HF with Polypropylene (PP) pipettes (Dominique Dutscher) or 132.6 mM NaF, 9.46 mM Hepes, and 10 mM EDTA, adjusted to pH 7.3 with NaOH. Osmolarity was adjusted to 290–310 mOsmol $\cdot\text{kg}^{-1}$ with glucose. Data were acquired with a patch-clamp amplifier (HEKA EPC 10) using PATCHMASTER software (HEKA Co.), sampled at 4–10 kHz, and low-pass filtered at 2.9 kHz. For offline analysis, data were refiltered to give a cascaded filter corner frequency (f_c) of either 1 kHz or 100 Hz. For data analyses, FitMaster (HEKA Electronics, v2 \times 73.2) and IGOR PRO (WaveMetrics, v6.37A) softwares were used. Channel events were detected by using TAC software (Bruxton Co.), and conductance levels were measured by all-points amplitude histograms fitted to Gaussian distributions. Fitting procedures to access the time constant were based on the single-exponential decay equation function, $I_t = I_0 + A \exp(-t/\tau)$, where I_t is the instantaneous current; I_0 and A are the residual current and maximal amplitude, respectively; t is the time in seconds; and τ is the time constant in seconds.

Whole-cell recordings were performed 24–48 h after transfection in HEK-293 cells. Normal external solution (NES) contained 140 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM glucose, 10 mM Hepes, adjusted to

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

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

Fluorescence Measurements. Fluorescence was measured using an Olympus IX73 (Olympus LUCPlanFLN 20 \times /0.45 PH1) with ProgRes MF-cool camera. Images were captured at 0.5 Hz. For each experiment, YO-PRO-1 (ThermoFisher) fluorescence was measured from three single cells per field with excitation at 455 nm (ET-EGFP filter, Chroma). For the double-mutant I328C/S345C, cells were first incubated with 10 μM MAM-2 in the presence of 3 μM ATP for 10 min and washed with NES buffer. Then, cells were incubated with 10 μM YO-PRO-1 (4-[(3-methyl-1,3-benzoxazol-2(3H)-ylidene)methyl]-1-[3-(trimethylammonio)propyl]quinolinium diiodide) in NES, and following 10 min of incubation, cells were irradiated at 365 nm for 5 s. For single-mutant I328C and S345C, the same protocol was carried out, except that activation was achieved by 530 nm irradiation and that cells were briefly preirradiated at 365 nm before YO-PRO-1 incubation to reset the azobenzene in the *cis* state. In control experiments with the P2X2-3T, the incorporation of 10 μM YO-PRO-1 was measured in response to 30 μM ATP.

Molecular Modeling. The end-to-end distances for the free MAM-1 and MAM-2 molecules in solution ($\sim 10,000$ atoms with water molecules) were obtained from all-atom MD simulations performed with ACEMD (44). Eight 100 ns-long unrestrained MD simulations were computed in the NVT ensemble at 310 K for the *cis* and *trans* configurations and for the R/R, S/R, R/S, and S/S stereoisomers. The mean distances between the S–S atoms were computed by averaging over the four stereoisomers for a total of $n = 200,000$ per *cis* or *trans* configuration. Normalized probability distributions of the S–S distance were obtained by clustering all distance values using a bin width of 0.5 Å. The permeation mechanism of Na $^+$,

NMDG⁺, YO-PRO-1²⁺, and spermidine³⁺ in P2X was explored by all-atom MD simulations starting from a relaxed open-state model of zfp2X4 stabilized by three vertical MAM-2 photo-switchable cross-linkers fused at the positions I336C/N353C in cis configuration. The latter model (~138,000 atoms) was produced following the procedure described previously (36), with a few differences: (i) Three MAM-2 (instead of MAM-3) cross-linkers were fused to zfp2X4 with the glycine unit placed downward near N353C; (ii) the 2-ns equilibration MD was followed by a production of 50 ns with no positional restraints; (iii) in addition to the distance restraints mimicking the internal TM1/TM2 Cd²⁺ binding site (45), the symmetry of the P2X trimer was loosely controlled by using the "Symmetry Restraints" command in NAMD with force constants of 0.25 and 1.0 kcal·mol⁻¹·Å⁻² for the extracellular and the transmembrane domains, respectively; and (iv) the side chain of L351 involved in the new TM2-TM2 interface was simulated using four non-interacting copies (46) together with the R/R, R/S, S/R, and S/S stereoisomers of MAM-2.

For the MD simulations of cation permeation, two modifications were introduced in the resulting model of the P2X open state. First, the MAM-2 linkers were removed (while keeping the mutated residues into cysteines) to mimic the physiological conditions. Second, the extracellular domain of the receptor was deleted to reduce the size of the system and to enhance the sampling of permeation events on the simulation timescale. This modification was done by introducing a peptide bond between D59 and F333 at the top of the transmembrane domain. The resulting structure was energy-minimized for 5,000 steps with NAMD 2.11 (47) using the CHARMM force-field version 36 (48). NMDG⁺, YO-PRO-1²⁺, and spermidine³⁺ parameters were obtained from the CHARMM general force field (49). During all simulations, harmonic restraints (5 kcal·mol⁻¹·Å⁻²) on the backbone atoms of the protein were applied to preserve the configuration of the transmembrane domain as in the MAM2-equilibrated model. The receptor was then embedded into a pre-equilibrated 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) lipid bilayer, solvated with TIP3P water molecules and NaCl at 0.15 M or 1 M concentration using VMD (50). To study permeation of large organic cations, Na⁺ ions were replaced by NMDG⁺, YO-PRO-1²⁺, or spermidine³⁺ (51). All simulations were performed with periodic boundary conditions and Particle Mesh Ewald long-range electrostatics. The system (~90,000 atoms) was minimized during 5,000 steps, briefly thermalized (600ps) to 300K, and equili-

brated for 2 ns in the NPT ensemble at 1 atm pressure. Production runs were performed in NVT ensemble imposing a membrane potential to increase the ion permeation probability on the simulation timescale. The membrane potential V_m was generated by introducing a constant electric field E_z on all atoms along the z axis perpendicular to the membrane plane (52), $E_z = V_m/L_z$, where L_z is the size of the simulated system in the z direction. The membrane potential was set to the following voltages: -2, -1.5, and -1 V. Analysis of ion permeation was done using Tcl scripting in VMD, whereas the pore profiles were computed by the program HOLE (53). The End-to-End distance of permeant NMDG⁺ was computed at each simulation step as the distance between the two terminal carbons. To compute the horizontality, we selected a vector from the center of mass of the molecule to the terminal carbon linked to the nitrogen, and then the complement of the polar angle was computed. The z coordinate of the center of mass of permeant NMDG⁺ was plotted as a function of the two previous observables.

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

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Professor Hongbo Zhao and Dr. François Rassendren for providing human P2X2 and human P2X3 receptors, respectively; and Dr. Frederic Bolze and Romain Vauchelles for imaging advising. This work was supported by Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-14-CE11-0004-01 (to T.G.), the Ministère de la Recherche, and the Fondation Pierre et Jeanne Spiegel. Financial support from the International Center for Frontier Research in Chemistry (icFRC) and the Agence Nationale de la Recherche through the LabEx project Chemistry of Complex Systems (ANR-10-LABX-0026 CSC; to M.C.) is gratefully acknowledged. This work was granted access to the High Performance Computing resources of the Centre de Calcul Recherche et Technologie/Centre Informatique National de l'Enseignement Supérieur/Institut du Développement et des Ressources en Informatique Scientifique under the allocation 2016-[076644] made by the Grand Equipement National de Calcul Intensif.

- Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509:310–317.
- Khakh BS, North RA (2012) Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 76:51–69.
- Wirkner K, Sperlagh B, Illes P (2007) P2X3 receptor involvement in pain states. *Mol Neurobiol* 36:165–183.
- Yan D, et al. (2013) Mutation of the ATP-gated P2X(2) receptor leads to progressive hearing loss and increased susceptibility to noise. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:2228–2233.
- Pijacka W, et al. (2016) Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat Med* 22:1151–1159.
- North RA, Jarvis MF (2013) P2X receptors as drug targets. *Mol Pharmacol* 83:759–769.
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460:592–598.
- Hattori M, Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485:207–212.
- Kasuya G, et al. (2016) Structural insights into divalent cation modulations of ATP-gated P2X receptor channels. *Cell Reports* 14:932–944.
- Mansoor SE, et al. (2016) X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action. *Nature* 538:66–71.
- Karasawa A, Kawate T (2016) Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *eLife* 5:5.
- Browne LE, Jiang LH, North RA (2010) New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends Pharmacol Sci* 31:229–237.
- Habermacher C, Dunning K, Chataigneau T, Grutter T (2016) Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology* 104:18–30.
- Ding S, Sachs F (1999) Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *J Gen Physiol* 113:695–720.
- Evans RJ (1996) Single channel properties of ATP-gated cation channels (P2X receptors) heterologously expressed in Chinese hamster ovary cells. *Neurosci Lett* 212:212–214.
- Riedel T, Schmalzing G, Markwardt F (2007) Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X7 receptor-operated single-channel currents. *Biophys J* 93:846–858.
- Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A (1999) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 2:315–321.
- Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci* 2:322–330.
- Rokic MB, Stojilkovic SS (2013) Two open states of P2X receptor channels. *Front Cell Neurosci* 7:215.
- Wei L, Caseley E, Li D, Jiang LH (2016) ATP-induced P2X receptor-dependent large pore formation: How much do we know? *Front Pharmacol* 7:5.
- Compan V, et al. (2012) P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J Neurosci* 32:4284–4296.
- Jiang LH, et al. (2005) N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C1295–C1302.
- Pelegrin P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071–5082.
- 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.
- Fisher JA, Girdler G, Khakh BS (2004) Time-resolved measurement of state-specific P2X2 ion channel cytosolic gating motions. *J Neurosci* 24:10475–10487.
- Khakh BS, Egan TM (2005) Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics. *J Biol Chem* 280:6118–6129.
- Chaumont S, Khakh BS (2008) Patch-clamp coordinated spectroscopy shows P2X2 receptor permeability dynamics require cytosolic domain rearrangements but not Panx-1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:12063–12068.
- Yan Z, Li S, Liang Z, Tomić M, Stojilkovic SS (2008) The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J Gen Physiol* 132:563–573.
- Shinozaki Y, et al. (2009) Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X(4) receptors. *PLoS Biol* 7:e1000103.
- Khadra A, et al. (2012) Gating properties of the P2X2a and P2X2b receptor channels: Experiments and mathematical modeling. *J Gen Physiol* 139:333–348.
- Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA (2013) P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *J Neurosci* 33:3557–3566.
- Li M, Toombes GE, Silberberg SD, Swartz KJ (2015) Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 18:1577–1583.
- Ding S, Sachs F (1999) Ion permeation and block of P2X(2) purinoceptors: Single channel recordings. *J Membr Biol* 172:215–223.
- Sorge RE, et al. (2012) Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med* 18:595–599.
- Li M, Chang TH, Silberberg SD, Swartz KJ (2008) Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 11:883–887.
- Habermacher C, et al. (2016) Photo-switchable tweezers illuminate pore-opening motions of an ATP-gated P2X ion channel. *eLife* 5:e11050.
- Browne LE, et al. (2014) Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:521–526.
- Guerra GP, Rubin MA, Mello CF (2016) Modulation of learning and memory by natural polyamines. *Pharmacol Res* 112:99–118.
- Pippel A, et al. (2017) Localization of the gate and selectivity filter of the full-length P2X7 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:E2156–E2165.
- Clyne JD, Brown TC, Hume RI (2003) Expression level dependent changes in the properties of P2X2 receptors. *Neuropharmacology* 44:403–412.

Supporting Information

Harkat et al. 10.1073/pnas.1701379114

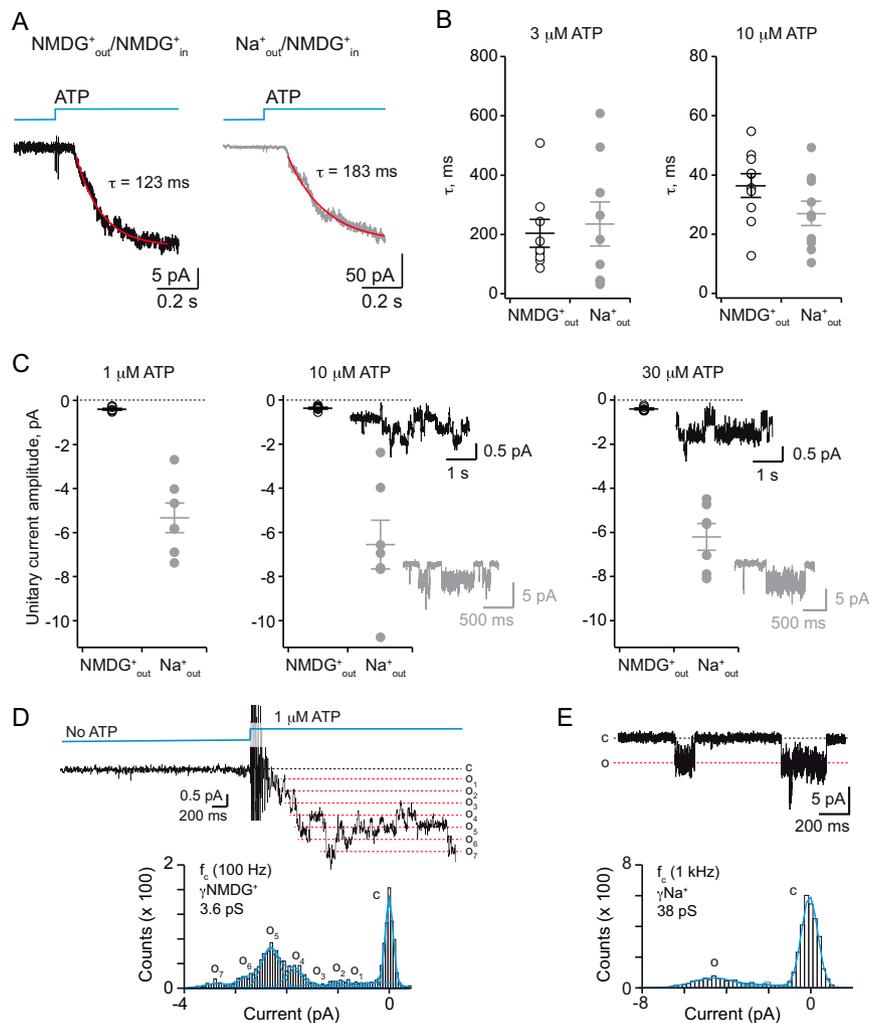


Fig. S1. Kinetics and unitary conductance of NMDG⁺ currents from outside-out patches expressing the P2X2-3T receptor. (A) Determination of the activation time constant τ by fitting NMDG⁺ currents (Left, black trace) or Na⁺ currents (Right, gray trace), induced by 3 μ M ATP (blue traces), to a single-exponential decay function. Currents were recorded from the same patch at -120 mV using the same protocol as described in Fig. 1A. Red curves indicate fitted traces. (B) Pooled data, presented as individual τ values and as mean \pm SEM, obtained at 3 μ M ($n = 9$ patches) and 10 μ M ATP ($n = 10$) in NMDG⁺_{out}/NMDG⁺_{in} solution (black lines and dots) and in Na⁺_{out}/NMDG⁺_{in} solution (gray lines and dots). (C) Unitary current amplitude determined from single-channel recordings at indicated ATP concentrations in NMDG⁺_{out}/NMDG⁺_{in} solution (black) and in Na⁺_{out}/NMDG⁺_{in} solution (gray) recorded at -120 mV. Data, presented as individual values and as mean \pm SEM ($n = 7$ patches for all ATP concentrations, except for 1 and 30 μ M ATP in NMDG⁺_{out}/NMDG⁺_{in} for which $n = 6$, because NMDG⁺ currents cannot be clearly resolved in the seventh patch), acquired in NMDG⁺_{out}/NMDG⁺_{in} and in Na⁺_{out}/NMDG⁺_{in} solutions were sampled at 10 kHz and filtered at a final f_c of 100 Hz (black lines and dots) or 1 kHz (gray lines and dots), respectively. Representative recordings are shown next to the relevant mean values for each concentration, except for 1 μ M ATP, for which representative traces are already shown in Fig. 1C. (D, Top) Single-channel recording of P2X2-3T current elicited by 1 μ M ATP recorded in symmetric NMDG⁺_{out}/NMDG⁺_{in} solution at -120 mV. Data were sampled at 10 kHz and filtered at a final f_c of 100 Hz. Note the absence of unitary currents in the absence of ATP, whereas discernable channel openings (downward deflections indicated by red dashed lines and denoted o_1 to o_7) are visible following fast application of ATP. Baseline current, which corresponds to closed channels (c), is indicated by a black dashed line. (Bottom) Corresponding all-points amplitude histogram of single-channel NMDG⁺ currents. Distributions were fit by a sum of nine Gaussians. For this patch, the mean unitary conductance of NMDG⁺ current is 3.6 pS. (E, Top) Single-channel recording of P2X2-3T current elicited by 1 μ M ATP recorded in symmetric Na⁺_{out}/Na⁺_{in} solution (Materials and Methods) at -120 mV. Data were filtered at a final f_c of 1 kHz. Channel openings (o) are downward deflections indicated by the red dashed line. Baseline current, which corresponds to closed channels (c), is indicated by a black dashed line. (Bottom) Corresponding all-points amplitude histogram of single-channel Na⁺ currents. Distributions were fit by a sum of three Gaussians. For this patch, the mean unitary conductance of Na⁺ current is 38 pS.

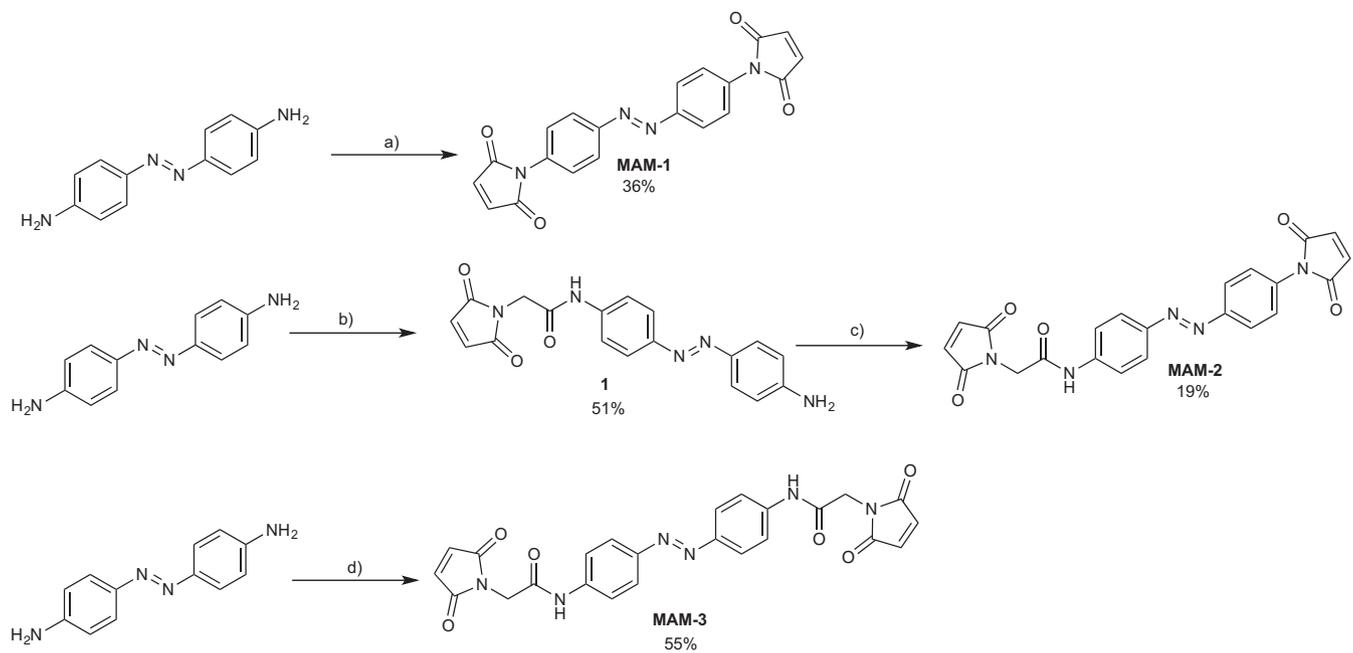


Fig. S2. Chemical synthesis of azobenzene cross-linker MAMs. (A) 1. Maleic anhydride, THF, 60 min, 4 °C; 2. acetic anhydride, sodium acetate (cat.), THF, 20 min, 110 °C MW. (B) 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetic acid, HATU, DIPEA, ACN/DMF, 20 h, RT. (C) 1. Maleic anhydride, acetone, 90 min,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

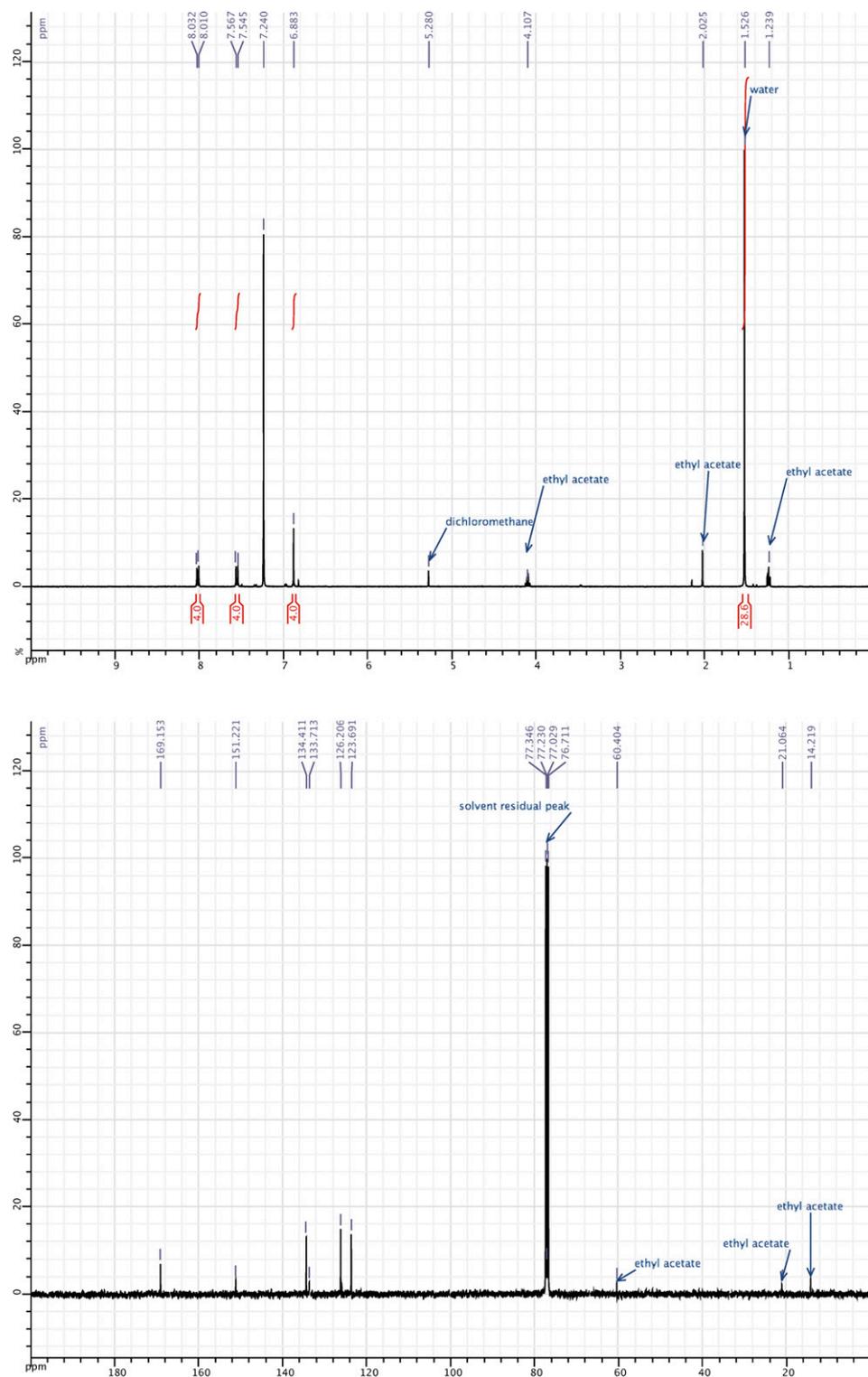


Fig. S3. ¹H and ¹³C NMR of MAM-1.

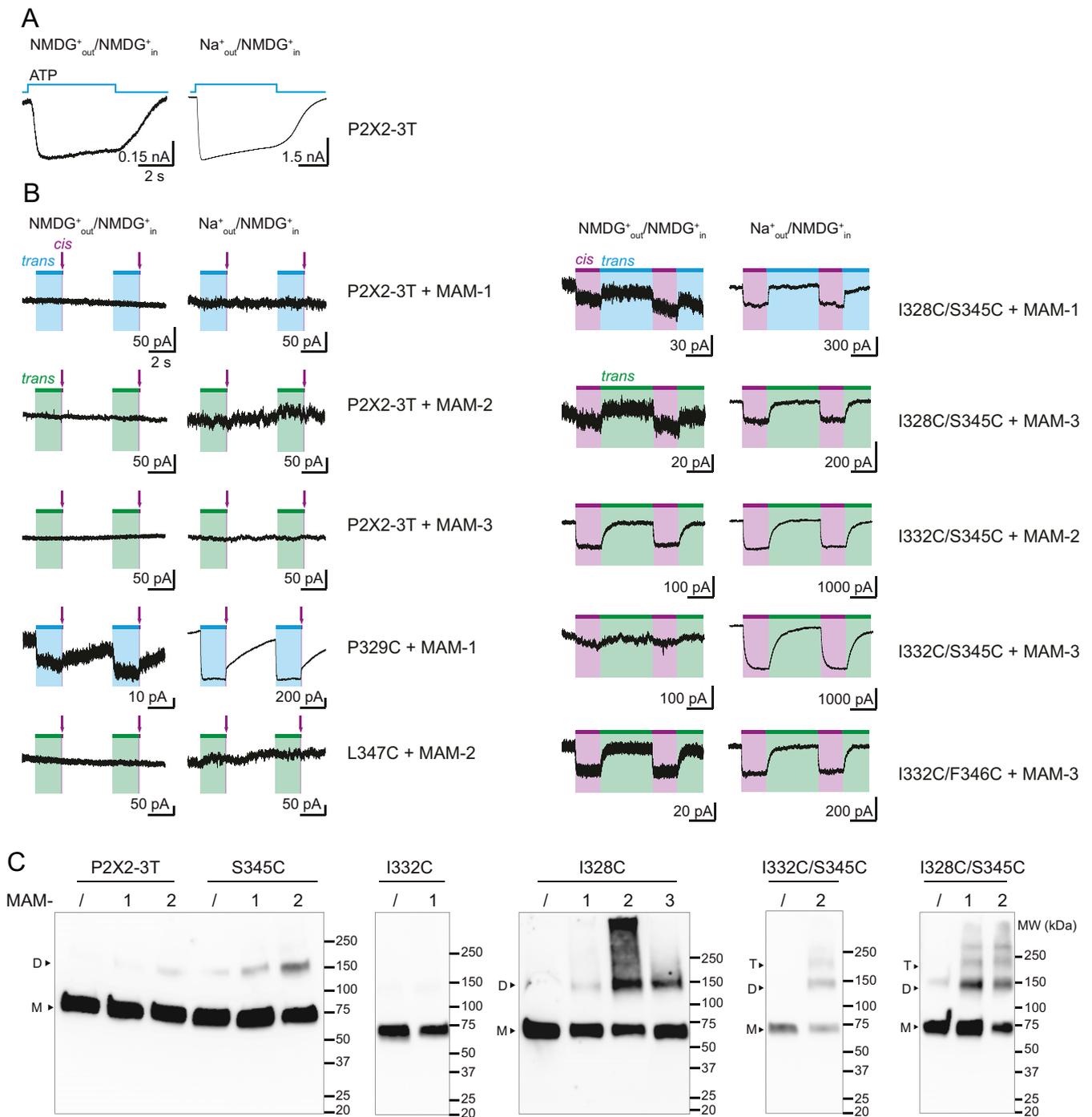


Fig. 56. Molecular mechanism of NMDG⁺ permeation through the lens of opto-tweezers. (A) Macroscopic ATP (30 μM)-gated currents recorded at -60 mV from HEK-293 cells expressing the P2X2-3T. Cells were first bathed in extracellular NMDG⁺ solution (NMDG⁺_{out}/NMDG⁺_{in}, *Left*) and then rapidly exchanged to extracellular Na⁺ solution (Na⁺_{out}/NMDG⁺_{in}, *Right*). (B) Macroscopic light-gated currents recorded at -60 mV from HEK-293 cells expressing the indicated mutants treated with the indicated MAMs. Recordings were made as described in A. Illumination was carried out, as indicated, at 365 nm (violet bars) and 455 nm (blue bars) or 530 nm (green bars) to elicit the *cis* and *trans* states of the azobenzene, respectively. Short illuminations (80 ms) are indicated by violet arrows. For single mutants treated, cells were briefly preirradiated at 365 nm (80 ms) before recordings. (C) Western blot analysis of cell-surface MAM cross-linking of the indicated P2X2-3T constructs expressed in TSA-201 cells, after treatment with MAM-1, MAM-2, MAM-3, or without MAM (indicated by /). Monomer, dimer, and trimer are indicated.

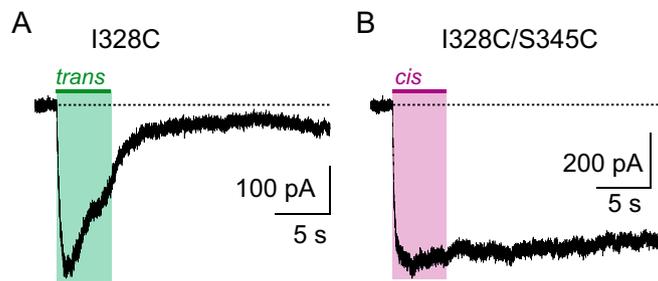


Fig. S7. Stability of the light-gated currents in single and double cysteine mutants treated with MAM-2. Macroscopic light-gated currents recorded at -60 mV from HEK-293 cells expressing either the single mutant I328C (A) or the double mutant I328C/S345C (B) treated with MAM-2. Illumination at 530 nm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

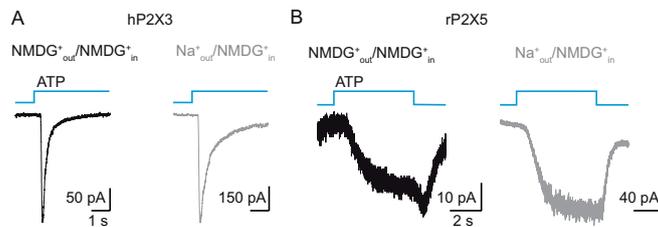
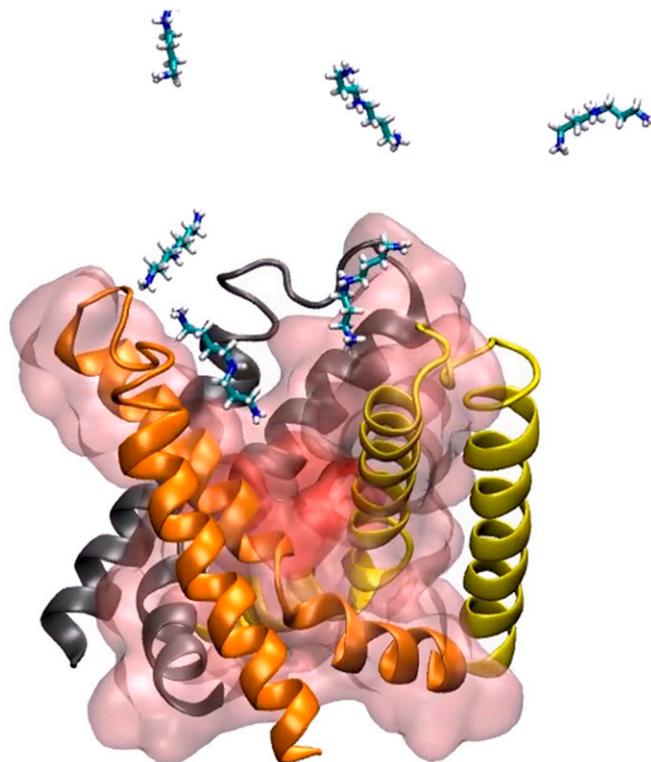


Fig. S8. P2X receptors are permeable to natural organic cations. Macroscopic ATP-gated currents recorded at -60 mV from HEK-293 cells expressing the human P2X3 receptors (A) or rat P2X5 receptors (B). Recordings were first made in symmetric $\text{NMDG}^+_{\text{out}}/\text{NMDG}^+_{\text{in}}$ solution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

Table S1. Summary of all NMDG^+ , Na^+ , spermidine $^{3+}$, and YO-PRO-1 $^{2+}$ permeation events during MD simulations of zfP2X4 active state model

V_m , V	Concentration, M	NMDG^+ permeation events, during x ns	Na^+ permeation events, during x ns	Spermidine $^{3+}$ permeation events, during x ns	YO-PRO-1 $^{2+}$ permeation events, during x ns
-2	0.15	2 (10 ns)	N.D.	N.D.	0 (10ns)
-1.5	0.15	3 (10 ns)	N.D.	N.D.	N.D.
-1	0.15	1 (25 ns)	N.D.	N.D.	N.D.
-1	1	3 (43 ns)	11 (20 ns)	10 (20 ns)	0 (30 ns)

N.D., not determined.



Movie S2. Permeation of 10 Spermidine³⁺ molecules through the open pore of zfP2X4 model (20 ns with $C = 1$ M and $V_m = -1$ V).

[Movie S2](#)

BIBLIOGRAPHIE

- Amberson, W.R. (1954). Rudolf Höber: His Life and Scientific Work. *Science* 120, 199–201.
- Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (2013). KATP channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 660–669.
- Bandara, H.M.D., and Burdette, S.C. (2012). Photoisomerization in different classes of azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* 41, 1809.
- Banfi, C., Ferrario, S., De Vincenti, O., Ceruti, S., Fumagalli, M., Mazzola, A., D' Ambrosi, N., Volontè, C., Fratto, P., Vitali, E., et al. (2005). P2 receptors in human heart: upregulation of P2X6 in patients undergoing heart transplantation, interaction with TNFalpha and potential role in myocardial cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 929–939.
- 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.
- Bartels, E., Wassermann, N.H., and Erlanger, B.F. (1971). Photochromic activators of the acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 1820–1823.
- Beene, D.L., Dougherty, D.A., and Lester, H.A. (2003). Unnatural amino acid mutagenesis in mapping ion channel function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 264–270.
- Beharry, A.A., and Woolley, G.A. (2011). Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* 40, 4422.
- Behrendt, null, Renner, null, Schenk, null, Wang, null, Wachtveitl, null, Oesterheld, null, and Moroder, null (1999). Photomodulation of the Conformation of Cyclic Peptides with Azobenzene Moieties in the Peptide Backbone. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 38, 2771–2774.
- Bernard, C. (1813-1878) A. du texte (1857). Leçons sur les effets des substances toxiques et médicamenteuses / par Claude Bernard ; publié par le Dr A. Tripier (Paris: J.-B. Baillière et fils).
- Blow, D. (2002). *Outline of Crystallography for Biologists* (OUP Oxford).
- 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.
- Bortolus, P., and Monti, S. (1979). Cis-trans photoisomerization of azobenzene. Solvent and triplet donors effects. *J. Phys. Chem.* 83, 648–652.
- Bossi, L. (1983). Context effects: translation of UAG codon by suppressor tRNA is affected by the sequence following UAG in the message. *J. Mol. Biol.* 164, 73–87.
- Boué-Grabot, E., Archambault, V., and Séguéla, P. (2000). A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels.

J. Biol. Chem. 275, 10190–10195.

Boué-Grabot, É., Émerit, M.B., Toulmé, E., Séguéla, P., and Garret, M. (2004). Cross-talk and Co-trafficking between $\rho 1$ /GABA Receptors and ATP-gated Channels. *J. Biol. Chem.* 279, 6967–6975.

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.

Brändle, U., Spielmanns, P., Osteroth, R., Sim, J., Surprenant, A., Buell, G., Ruppersberg, J.P., Plinkert, P.K., Zenner, H.P., and Glowatzki, E. (1997). Desensitization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett.* 404, 294–298.

Brieke, C., Rohrbach, F., Gottschalk, A., Mayer, G., and Heckel, A. (2012). Light-Controlled Tools. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 8446–8476.

Browne, L.E., Nunes, J.P.M., Sim, J.A., Chudasama, V., Bragg, L., Caddick, S., and Alan North, R. (2014). Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 521–526.

Brunner, J. (1993). New photolabeling and crosslinking methods. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 483–514.

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

Burnstock, G., and Knight, G.E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240, 31–304.

Cannon, S.C. (2006). Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain. *Annu Rev Neurosci* 29, 387–415.

Carling, C.-J., Viger, M.L., Nguyen Huu, V.A., Garcia, A.V., and Almutairi, A. (2015). In vivo visible light-triggered drug release from an implanted depot. *Chem Sci* 6, 335–341.

Chakraborty, A., Wang, D., Ebright, Y.W., and Ebright, R.H. (2010). Azide-specific labeling of biomolecules by Staudinger-Bertozzi ligation phosphine derivatives of fluorescent probes suitable for single-molecule fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol.* 472, 19–30.

Changeux, J.-P., Kasai, M., and Lee, C.-Y. (1970). Use of a Snake Venom Toxin to Characterize the Cholinergic Receptor Protein*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 67, 1241–1247.

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

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.

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.

Chin, J.W. (2003). An Expanded Eukaryotic Genetic Code. *Science* 301, 964–967.

- Chin, J.W., Martin, A.B., King, D.S., Wang, L., and Schultz, P.G. (2002a). Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 11020–11024.
- Chin, J.W., Santoro, S.W., Martin, A.B., King, D.S., Wang, L., and Schultz, P.G. (2002b). Addition of *p*-Azido-*L*-phenylalanine to the Genetic Code of *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 9026–9027.
- Cockayne, D.A., Hamilton, S.G., Quan-Ming, Z., Dunn, P.M., and others (2000). Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* *407*, 1011.
- Collingridge, G.L., Olsen, R.W., Peters, J., and Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* *56*, 2–5.
- Collo, G., North, R.A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A., and Buell, G. (1996). Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosci.* *16*, 2495–2507.
- Collo, G., Neidhart, S., Kawashima, E., Kosco-Vilbois, M., North, R.A., and Buell, G. (1997). Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* *36*, 1277–1283.
- Cook, S.P., and McCleskey, E.W. (2002). Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain* *95*, 41–47.
- Coste, B., Xiao, B., Santos, J.S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K.S., Kim, S.E., Schmidt, M., Mathur, J., Dubin, A.E., et al. (2012). Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* *483*, 176–181.
- Crecca, C.R., and Roitberg, A.E. (2006). Theoretical Study of the Isomerization Mechanism of Azobenzene and Disubstituted Azobenzene Derivatives. *J. Phys. Chem. A* *110*, 8188–8203.
- Curtin, D.Y., Grubbs, E.J., and McCarty, C.G. (1966). Uncatalyzed syn-anti Isomerization of Imines, Oxime Ethers, and Haloimines¹. *J. Am. Chem. Soc.* *88*, 2775–2786.
- Ding, S., and Sachs, F. (1999). Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *J. Gen. Physiol.* *113*, 695–720.
- Donato, L., Mourot, A., Davenport, C.M., Herbivo, C., Warther, D., Léonard, J., Bolze, F., Nicoud, J.-F., Kramer, R.H., Goeldner, M., et al. (2012). Water-Soluble, Donor-Acceptor Biphenyl Derivatives in the 2-(*o*-Nitrophenyl)propyl Series: Highly Efficient Two-Photon Uncaging of the Neurotransmitter γ -Aminobutyric Acid at $\lambda=800$ nm. *Angew. Chem. Int. Ed.* *51*, 1840–1843.
- Dougherty, D.A., and Van Arnam, E.B. (2014). In Vivo Incorporation of Unnatural Amino Acids Using the Chemical Aminoacylation Strategy. A Broadly Applicable Mechanistic Tool. *Chembiochem*, *15*, 1710–1720.
- Dubinsky, L., Krom, B.P., and Meijler, M.M. (2012). Diazirine based photoaffinity labeling. *Bioorg. Med. Chem.* *20*, 554–570.
- Egan, T.M. (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 P2X₂ Channel Permeability by the Cytosolic Domain. *J. Gen. Physiol.* 120, 119–131.
- Emerit, M.B., Baranowski, C., Diaz, J., Martinez, A., Areias, J., Alterio, J., Masson, J., Boué-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.
- England, P.M., Lester, H.A., Davidson, N., and Dougherty, D.A. (1997). Site-specific, photochemical proteolysis applied to ion channels in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 11025–11030.
- Ennion, S.J., and Evans, R.J. (2002). P2X₁ Receptor Subunit Contribution to Gating Revealed by a Dominant Negative PKC Mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 611–616.
- 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, 413–422.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Di Virgilio, F. (2006). The P2X₇ receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 3877–3883.
- Gee, K.R., Niu, L., Schaper, K., Jayaraman, V., and Hess, G.P. (1999). Synthesis and Photochemistry of a Photolabile Precursor of N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) That Is Photolyzed in the Microsecond Time Region and Is Suitable for Chemical Kinetic Investigations of the NMDA Receptor. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 3140–3147.
- Gordon, J.L. (1986). Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* 233, 309–319.
- 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.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüg. Arch.* 391, 85–100.
- Hansen, R.R., Nielsen, C.K., Nasser, A., Thomsen, S.I.M., Eghorn, L.F., Pham, Y., Schulenburg, C., Syberg, S., Ding, M., Stojilkovic, S.S., et al. (2011). P2X₇ receptor-deficient mice are susceptible to bone cancer pain. *Pain* 152, 1766–1776.
- Hartley, G.S. (1937). The Cis-form of Azobenzene. *Nature* 140, 281–281.
- Hattori, M., and Gouaux, E. (2012). Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485, 207–212.
- Hecht, S.M., Alford, B.L., Kuroda, Y., and Kitano, S. (1978). “Chemical aminoacylation” of tRNA’s. *J. Biol. Chem.* 253, 4517–4520.
- Hein, J.E., and Fokin, V.V. (2010). Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1302–1315.
- Hermanson, G.T. (2013). Chapter 3 - The Reactions of Bioconjugation. In *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*, (Boston: Academic Press), pp. 229–258.

Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* *117*, 500–544.

Huber, T., Naganathan, S., Tian, H., Ye, S., and Sakmar, T.P. (2013). Unnatural Amino Acid Mutagenesis of GPCRs Using Amber Codon Suppression and Bioorthogonal Labeling. In *G Protein Coupled Receptors: Structure*, P.M. Conn, ed. (San Diego: Elsevier Academic Press Inc), pp. 281–305.

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. EBJ* *37*, 301–314.

Huisgen, R. (1976). 1,3-Dipolar cycloadditions. 76. Concerted nature of 1,3-dipolar cycloadditions and the question of diradical intermediates. *J. Org. Chem.* *41*, 403–419.

Izquierdo-Serra, M., Bautista-Barrufet, A., Trapero, A., Garrido-Charles, A., Díaz-Tahoces, A., Camarero, N., Pittolo, S., Valbuena, S., Pérez-Jiménez, A., Gay, M., et al. (2016). Optical control of endogenous receptors and cellular excitability using targeted covalent photoswitches. *Nat. Commun.* *7*, 12221.

Jewett, J.C., and Bertozzi, C.R. (2010). Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* *39*, 1272–1279.

Jiang, L.-H. (2005). N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X7 receptors. *AJP Cell Physiol.* *289*, C1295–C1302.

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, 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, 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.

Jo, Y.-H., Donier, E., Martinez, A., Garret, M., Toulmé, E., and Boué-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.

Kaplan, J.H., Forbush, B., and Hoffman, J.F. (1978). Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry (Mosc.)* *17*, 1929–1935.

Karasawa, A., and Kawate, T. (2016). Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *eLife* *5*, e22153.

Kasuya, G., Fujiwara, Y., Takemoto, M., Dohmae, N., Nakada-Nakura, Y., Ishitani, R., Hattori, M., and Nureki, O. (2016). Structural Insights into Divalent Cation Modulations of ATP-Gated P2X Receptor Channels. *Cell Rep.* *14*, 932–944.

Kawate, T., Michel, J.C., Birdsong, W.T., and Gouaux, E. (2009). Crystal structure of the ATP-

gated P2X₄ ion channel in the closed state. *Nature* 460, 592–598.

Kawate, T., Robertson, J.L., Li, M., Silberberg, S.D., and Swartz, K.J. (2011). Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. *J. Gen. Physiol.* 137, 579–590.

Ke, H.Z., Qi, H., Weidema, A.F., Zhang, Q., Panupinthu, N., Crawford, D.T., Grasser, W.A., Paralkar, V.M., Li, M., Audoly, L.P., et al. (2003). Deletion of the P2X₇ Nucleotide Receptor Reveals Its Regulatory Roles in Bone Formation and Resorption. *Mol. Endocrinol.* 17, 1356–1367.

Khakh, B.S., and Egan, T.M. (2005). Contribution of Transmembrane Regions to ATP-gated P2X₂ Channel Permeability Dynamics. *J. Biol. Chem.* 280, 6118–6129.

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., Bao, X.R., Labarca, C., and Lester, H.A. (1999). Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat. Neurosci.* 2, 322–330.

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. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 4871–4877.

Klán, P., Šolomek, T., Bochet, C.G., Blanc, A., Givens, R., Rubina, M., Popik, V., Kostikov, A., and Wirz, J. (2013). Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* 113, 119–191.

Koh, J.T., Cornish, V.W., and Schultz, P.G. (1997). An Experimental Approach to Evaluating the Role of Backbone Interactions in Proteins Using Unnatural Amino Acid Mutagenesis. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 11314–11322.

Köhn, M., and Breinbauer, R. (2004). The Staudinger Ligation—A Gift to Chemical Biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 3106–3116.

Koshimizu, T., Goor, F.V., Tomić, M., Wong, A.O.-L., Tanoue, A., Tsujimoto, G., and Stojilkovic, S.S. (2000). Characterization of Calcium Signaling by Purinergic Receptor-Channels Expressed in Excitable Cells. *Mol. Pharmacol.* 58, 936–945.

Kracun, S., Chaptal, V., Abramson, J., and Khakh, B.S. (2010). Gated access to the pore of a P2X receptor: structural implications for closed-open transitions. *J. Biol. Chem.* 285, 10110–10121.

Kumita, J.R., Smart, O.S., and Woolley, G.A. (2000). Photo-control of helix content in a short peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3803–3808.

Labrakakis, C., Tong, C.-K., Weissman, T., Torsney, C., and MacDermott, A.B. (2003). Localization and function of ATP and GABA_A receptors expressed by nociceptors and other postnatal sensory neurons in rat. *J. Physiol.* 549, 131–142.

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.

Lang, K., Davis, L., and Chin, J.W. (2015). Genetic encoding of unnatural amino acids for

labeling proteins. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1266, 217–228.

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

Lê, K.T., Babinski, K., and Séguéla, P. (1998). Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 7152–7159.

Lê, K.-T., Boué-Grabot, É., Archambault, V., and Séguéla, P. (1999). Functional and Biochemical Evidence for Heteromeric ATP-gated Channels Composed of P2X1 and P2X5 Subunits. *J. Biol. Chem.* 274, 15415–15419.

Lemoine, D., Jiang, R., Taly, A., Chataigneau, T., Specht, A., and Grutter, T. (2012). Ligand-gated ion channels: new insights into neurological disorders and ligand recognition. *Chem. Rev.* 112, 6285–6318.

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.* 110, 20813–20818.

Levitz, J., Pantoja, C., Gaub, B., Janovjak, H., Reiner, A., Hoagland, A., Schoppik, D., Kane, B., Stawski, P., Schier, A.F., et al. (2013). Optical Control of Metabotropic Glutamate Receptors. *Nat. Neurosci.* 16, 507–516.

Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R.A., Buell, G., and Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377, 432–435.

Li, M., Silberberg, S.D., and Swartz, K.J. (2013). Subtype-specific control of P2X receptor channel signaling by ATP and Mg²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3455–E3463.

Li, M., Toombes, G.E.S., 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.

Liao, M., Cao, E., Julius, D., and Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107–112.

Lin, W.-C., Davenport, C.M., Mourot, A., Vytla, D., Smith, C.M., Medeiros, K.A., Chambers, J.J., and Kramer, R.H. (2014). Engineering a Light-Regulated GABAA Receptor for Optical Control of Neural Inhibition. *ACS Chem. Biol.* 9, 1414–1419.

Liu, C.C., and Schultz, P.G. (2010). Adding New Chemistries to the Genetic Code. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 413–444.

Liu, W., Brock, A., Chen, S., Chen, S., and Schultz, P.G. (2007). Genetic incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. *Nat. Methods* 4, 239–244.

MAEHLE, A.-H. (2004). “Receptive Substances”: John Newport Langley (1852–1925) and his Path to a Receptor Theory of Drug Action. *Med. Hist.* 48, 153–174.

Malkin, S., and Fischer, E. (1962). Temperature dependence of photoisomerization. part ii.1 quantum yields of cis \rightleftharpoons trans isomerizations in azo-compounds. *J. Phys. Chem.* 66, 2482–2486.

- Mansoor, S.E., Lü, W., Oosterheert, W., Shekhar, M., Tajkhorshid, E., and Gouaux, E. (2016). X-ray structures define human P2X3 receptor gating cycle and antagonist action. *Nature* 538, 66–71.
- Marquez-Klaka, B., Rettinger, J., Bhargava, Y., Eisele, T., and Nicke, A. (2007). Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 1456–1466.
- Mcperson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods* 34, 254–265.
- Miller, J.C., Silverman, S.K., England, P.M., Dougherty, D.A., and Lester, H.A. (1998). Flash decaging of tyrosine sidechains in an ion channel. *Neuron* 20, 619–624.
- Minor, D.L. (2007). The Neurobiologist's Guide to Structural Biology: A Primer on Why Macromolecular Structure Matters and How to Evaluate Structural Data. *Neuron* 54, 511–533.
- Mitscherlich (1834). Ueber das Stickstoffbenzid. *Ann. Pharm.* 12, 311–314.
- Mitsunobu, O. (1981). The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products. *Synthesis* 1981, 1–28.
- Montana, V., Malarkey, E.B., Verderio, C., Matteoli, M., and Parpura, V. (2006). Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia* 54, 700–715.
- Mony, L., Zhu, S., Carvalho, S., and Paoletti, P. (2011). Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J.* 30, 3134–3146.
- Mourot, A., Tochitsky, I., and Kramer, R.H. (2013). Light at the end of the channel: optical manipulation of intrinsic neuronal excitability with chemical photoswitches. *Front. Mol. Neurosci.* 6.
- Mulryan, K., Gitterman, D.P., Lewis, C.J., Vial, C., Leckie, B.J., Cobb, A.L., Brown, J.E., Conley, E.C., Buell, G., Pritchard, C.A., et al. (2000). Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* 403, 86–89.
- 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.
- Nair, D.P., Podgórski, M., Chatani, S., Gong, T., Xi, W., Fenoli, C.R., and Bowman, C.N. (2014). The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chem. Mater.* 26, 724–744.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799–802.
- Neumann-Staubitz, P., and Neumann, H. (2016). The use of unnatural amino acids to study and engineer protein function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 38, 119–128.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T., and Numa, S. (1982). Primary structure of alpha-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* 299, 793–797.
- Noisier, A.F.M., Harris, C.S., and Brimble, M.A. (2013). Novel preparation of chiral α -amino acids using the Mitsunobu–Tsunoda reaction. *Chem. Commun.* 49, 7744.

- Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C., and Schultz, P.G. (1989). A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science* **244**, 182–188.
- North, R.A. (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol. Rev.* **82**, 1013–1067.
- North, R.A., and Jarvis, M.F. (2013). P2X Receptors as Drug Targets. *Mol. Pharmacol.* **83**, 759–769.
- O'Donnell, M.J. (2004). The Enantioselective Synthesis of α -Amino Acids by Phase-Transfer Catalysis with Achiral Schiff Base Esters. *Acc. Chem. Res.* **37**, 506–517.
- O'Donnell, M.J., Boniece, J.M., and Earp, S.E. (1978). The synthesis of amino acids by phase-transfer reactions. *Tetrahedron Lett.* **19**, 2641–2644.
- O'Donnell, M.J., Bennett, W.D., Bruder, W.A., Jacobsen, W.N., Knuth, K., LeClef, B., Polt, R.L., Bordwell, F.G., Mrozack, S.R., and Cripe, T.A. (1988). Acidities of glycine Schiff bases and alkylation of their conjugate bases. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 8520–8525.
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 993–996.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhatsky, A., and North, R.A. (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* **452**, 589–597.
- Pantoja, R., Rodriguez, E.A., Dibas, M.I., Dougherty, D.A., and Lester, H.A. (2009). Single-molecule imaging of a fluorescent unnatural amino acid incorporated into nicotinic receptors. *Biophys. J.* **96**, 226–237.
- Pelegri, P., and Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* **25**, 5071–5082.
- Pellegatti, P., Falzoni, S., Pinton, P., Rizzuto, R., and Di Virgilio, F. (2005). A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3659–3665.
- Pelliccioli, A.P., and Wirz, J. (2002). Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 441–458.
- Peters, F.B., Brock, A., Wang, J., and Schultz, P.G. (2009). Photocleavage of the Polypeptide Backbone by 2-Nitrophenylalanine. *Chem. Biol.* **16**, 148–152.
- Pittolo, S., Gómez-Santacana, X., Eckelt, K., Rovira, X., Dalton, J., Goudet, C., Pin, J.-P., Llobet, A., Giraldo, J., Llebaria, A., et al. (2014). An allosteric modulator to control endogenous G protein-coupled receptors with light. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 813–815.
- Pless, S.A., and Ahern, C.A. (2013). Unnatural Amino Acids as Probes of Ligand-Receptor Interactions and Their Conformational Consequences. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, 211–229.
- Pouget, J.-T., Toulme, E., Martinez, A., Choquet, D., Hosy, E., and Boué-Grabot, E. (2014). ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron* **83**, 417–430.
- Praetorius, H.A., and Leipziger, J. (2009). ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic*

Signal. 5, 433–446.

Puchałowicz, K., Tarnowski, M., Baranowska-Bosiacka, I., Chlubek, D., and Dziedziejko, V. (2014). P2X and P2Y Receptors—Role in the Pathophysiology of the Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 23672–23704.

Rabek, J.F., and Scott, G.W. (1989). *Photochemistry and Photophysics* (CRC Press).

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.

Ren, J., Bian, X., DeVries, M., Schnegelsberg, B., Cockayne, D.A., Ford, A.P.D.W., and Galligan, J.J. (2003). P2X₂ subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. *J. Physiol.* 552, 809–821.

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

Ringer, S. (1882). Regarding the Action of Hydrate of Soda, Hydrate of Ammonia, and Hydrate of Potash on the Ventricle of the Frog's Heart. *J. Physiol.* 3, 195–202.6.

Rodier, J.M., and Myers, A.B. (1993). cis-Stilbene photochemistry: solvent dependence of the initial dynamics and quantum yields. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 10791–10795.

Rospert, S., Rakwalska, M., and Dubaquié, Y. (2005). Polypeptide chain termination and stop codon readthrough on eukaryotic ribosomes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*

Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., and Sharpless, K.B. (2002). A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2596–2599.

Ruan, H.Z., and Burnstock, G. (2005). The distribution of P2X₅ purinergic receptors in the enteric nervous system of mouse. *Cell Tissue Res.* 319, 191–200.

Ryten, M., Dunn, P.M., Neary, J.T., and Burnstock, G. (2002). ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X₅ receptor on satellite cells. *J. Cell Biol.* 158, 345–355.

Sakamoto, K., Hayashi, A., Sakamoto, A., Kiga, D., Nakayama, H., Soma, A., Kobayashi, T., Kitabatake, M., Takio, K., Saito, K., et al. (2002). Site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 30, 4692–4699.

Sakmann, B., and Neher, E. (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 46, 455–472.

Samanta, S., Qin, C., Lough, A.J., and Woolley, G.A. (2012). Bidirectional Photocontrol of Peptide Conformation with a Bridged Azobenzene Derivative. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 6452–6455.

Samways, D.S.K., 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.

- Samways, D.S.K., 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.
- Saul, A., Hausmann, R., Kless, A., and Nicke, A. (2013). Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front. Cell. Neurosci.* 7.
- Saxon, E., and Bertozzi, C.R. (2000). Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* 287, 2007–2010.
- Saxon, E., Armstrong, J.I., and Bertozzi, C.R. (2000). A “traceless” Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds. *Org. Lett.* 2, 2141–2143.
- Shinozaki, Y., Sumitomo, K., Tsuda, M., Koizumi, S., Inoue, K., and Torimitsu, K. (2009). Direct Observation of ATP-Induced Conformational Changes in Single P2X₄ Receptors. *PLoS Biol.* 7, e1000103.
- Shrivastava, A.N., Triller, A., Sieghart, W., and Sarto-Jackson, I. (2011). Regulation of GABA_A Receptor Dynamics by Interaction with Purinergic P2X₂ Receptors. *J. Biol. Chem.* 286, 14455–14468.
- Siewertsen, R., Neumann, H., Buchheim-Stehn, B., Herges, R., Näther, C., Renth, F., and Temps, F. (2009). Highly Efficient Reversible Z–E Photoisomerization of a Bridged Azobenzene with Visible Light through Resolved S₁(nπ*) Absorption Bands. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 15594–15595.
- 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 P2X₇ Receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 125–132.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M., and Stühmer, W. (1997). Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J. Membr. Biol.* 160, 91–100.
- Souslova, V., Cesare, P., Ding, Y., Akopian, A.N., Stanfa, L., Suzuki, R., Carpenter, K., Dickenson, A., Boyce, S., Hill, R., et al. (2000). Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X₃ receptors. *Nature* 407, 1015–1017.
- Staudinger, H., and Meyer, J. (1919). Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* 2, 635–646.
- Stelmashenko, O., Compan, V., Browne, L.E., and North, R.A. (2014). Ectodomain Movements of an ATP-gated Ion Channel (P2X₂ Receptor) Probed by Disulfide Locking. *J. Biol. Chem.* 289, 9909–9917.
- Stoop, R., Surprenant, A., and North, R.A. (1997). Different Sensitivities to pH of ATP-Induced Currents at Four Cloned P2X Receptors. *J. Neurophysiol.* 78, 1837–1840.
- Szymański, W., Beierle, J.M., Kistemaker, H.A.V., Velema, W.A., and Feringa, B.L. (2013). Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. *Chem. Rev.* 113, 6114–6178.
- Tang, X., and Dmochowski, I.J. (2007). Regulating gene expression with light-activated oligonucleotides. *Mol. Biosyst.* 3, 100–110.

- Tochitsky, I., Banghart, M.R., Mourot, A., Yao, J.Z., Gaub, B., Kramer, R.H., and Trauner, D. (2012). Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Chem.* *4*, 105–111.
- Tornøe, C.W., Christensen, C., and Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* *67*, 3057–3064.
- 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.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* *424*, 778–783.
- Tsunoda, T., Nagaku, M., Nagino, C., Kawamura, Y., Ozaki, F., Hioki, H., and Itô, S. (1995). Carbon-carbon bond formation with new Mitsunobu reagents. *Tetrahedron Lett.* *36*, 2531–2534.
- Turro, N.J. (1980). Structure and dynamics of important reactive intermediates involved in photobiological systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *346*, 1–17.
- 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. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 11263–11268.
- 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.
- Virginio, C., MacKenzie, A., North, R. A., and Surprenant, A. (1999a). Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J. Physiol.* *519*, 335–346.
- Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F.A., North, R.A., and Surprenant, A. (1999b). Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* *2*.
- Vodovozova, E.L. (2007). Photoaffinity labeling and its application in structural biology. *Biochem. Mosc.* *72*, 1–20.
- Volgraf, M., Gorostiza, P., Numano, R., Kramer, R.H., Isacoff, E.Y., and Trauner, D. (2006). Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat. Chem. Biol.* *2*, 47–52.
- Volgraf, M., Gorostiza, P., Szobota, S., Helix, M.R., Isacoff, E.Y., and Trauner, D. (2007). Reversibly Caged Glutamate: A Photochromic Agonist of Ionotropic Glutamate Receptors. *J. Am. Chem. Soc.* *129*, 260–261.
- Walbert, S., Pfeleiderer, W., and Steiner, U. (2001). Photolabile protecting groups for nucleosides: mechanistic studies of the 2-(2-nitrophenyl) ethyl group. *Helv. Chim. Acta* *84*, 1601–1611.

- Wang, J., Sun, L.-F., Cui, W.-W., Zhao, W.-S., Ma, X.-F., Li, B., Liu, Y., Yang, Y., Hu, Y.-M., Huang, L.-D., et al. (2017). Intersubunit physical couplings fostered by the left flipper domain facilitate channel opening of P2X4 receptors. *J. Biol. Chem.* *292*, 7619–7635.
- Wang, L., Magliery, T.J., Liu, D.R., and Schultz, P.G. (2000). A New Functional Suppressor tRNA/Aminoacyl-tRNA Synthetase Pair for the in Vivo Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* *122*, 5010–5011.
- Werner, P., Seward, E.P., Buell, G.N., and North, R.A. (1996). Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 15485–15490.
- Wiener, M. (2004). A pedestrian guide to membrane protein crystallization. *Methods* *34*, 364–372.
- 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.
- Williams, K. (1997). Modulation and Block of Ion Channels: A New Biology of Polyamines. *Cell. Signal.* *9*, 1–13.
- 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.
- Ye, S., Köhrer, C., Huber, T., Kazmi, M., Sachdev, P., Yan, E.C.Y., Bhagat, A., RajBhandary, U.L., and Sakmar, T.P. (2008). Site-specific Incorporation of Keto Amino Acids into Functional G Protein-coupled Receptors Using Unnatural Amino Acid Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* *283*, 1525–1533.
- Ye, S., Huber, T., Vogel, R., and Sakmar, T.P. (2009). FTIR analysis of GPCR activation using azido probes. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 397–399.
- Ye, S., Riou, M., Carvalho, S., and Paoletti, P. (2013). Expanding the Genetic Code in *Xenopus laevis* Oocytes. *ChemBioChem* *14*, 230–235.
- Zemelman, B.V., Nesnas, N., Lee, G.A., and Miesenböck, G. (2003). Photochemical gating of heterologous ion channels: remote control over genetically designated populations of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 1352–1357.
- Zhou, X., and Galligan, J.J. (1998). Non-additive interaction between nicotinic cholinergic and P2X purine receptors in guinea-pig enteric neurons in culture. *J. Physiol.* *513*, 685–697.
- Zhu, S., Riou, M., Yao, C.A., Carvalho, S., Rodriguez, P.C., Bensaude, O., Paoletti, P., and Ye, S. (2014). Genetically encoding a light switch in an ionotropic glutamate receptor reveals subunit-specific interfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 6081–6086.

CONCEPTION ET APPLICATION DE NOUVEAUX OUTILS PHOTOCHIMIQUES POUR ETUDIER LES RECEPTEURS CANAUX P2X

RESUME

Les récepteurs P2X (P2XR), activés par l'ATP, sont impliqués dans des rôles physio-pathologiques. Leur fonctionnement est associé à différents états conformationnels.

Le projet de thèse a mené à associer la synthèse organique et l'application de molécules photo-activables avec des techniques d'électrophysiologie patch-clamp, pour décortiquer les mouvements moléculaires de ces récepteurs et effectuer des relations structure-fonction, via trois stratégies :

- La synthèse et application d'agrafes photo-isomérisables qui permet le photo-contrôle des P2XR et l'étude de mouvements
- La synthèse et caractérisation d'un acide aminé (aa) photo-clivable pour étudier les implications de zones sur la fonction des P2XR via une photolyse
- L'incorporation d'un aa non naturel dans les P2XR pour étudier des interactions et mouvements via un « photo-pontage »

Nous avons élucidé les mécanismes moléculaires responsables de la perméabilité des P2XR, récusé l'existence de l'état dilaté et identifié un cation organique physiologique pouvant les traverser. Nous avons aussi conçu un acide aminé photo-clivable pouvant mener à des études structure-fonction des P2XR.

MOTS-CLES : P2XR, photochimie, électrophysiologie patch-clamp

ABSTRACT

P2X receptors are cationic ligand-gated ion channels, activated by extracellular ATP, involved in many physio-pathological roles. Their function is associated with different allosteric states. During this PhD, we have designed three new strategies, spanning photochemical organic synthesis and patch-clamp electrophysiology to elucidate the molecular mechanisms involved in these conformational states and to collect data in order to study structure-function relationships.

- Synthesis and application of molecular tweezers, which allows the photo-control of P2XR and the study of molecular motions
- Synthesis and characterization of a photo-cleavable amino acid with the aim of incorporating it into P2XR and doing structure-function relationships
- Incorporation of an unnatural amino acid for photo-crosslinking studies

We have been able to probe the molecular mechanism involved in large organic cations permeation of P2XR, to bring into question the dilated state and to identify a physiological cation that can flow through P2XR. We have also designed a photo-cleavable amino acid which could serve in the study of structure-function relationships.

KEYWORDS: P2XR, photochemistry, patch-clamp electrophysiology