



**HAL**  
open science

# Développement de nouveaux biosenseurs fluorescents pour l'étude dynamique de la signalisation purinergique

Matthias Ollivier

► **To cite this version:**

Matthias Ollivier. Développement de nouveaux biosenseurs fluorescents pour l'étude dynamique de la signalisation purinergique. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT024 . tel-01925306

**HAL Id: tel-01925306**

**<https://theses.hal.science/tel-01925306>**

Submitted on 16 Nov 2018

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

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

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé spécialité Neurosciences

Préparée au sein de l'école doctorale CBS2 (Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé)

Et de l'unité de recherche Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF)

## Développement de nouveaux biosenseurs fluorescents pour l'étude dynamique de la signalisation purinergique

Présentée par Matthias OLLIVIER

Le 12 octobre 2018

Sous la direction de François RASSENDREN  
et Vincent COMPAN

Devant le jury composé de

Dr. RASSENDREN François, DR, IGF, Montpellier

Dr. COMPAN Vincent, CR, IGF, Montpellier

Dr. BOUE-GRABOT Eric, DR, IMN, Bordeaux

Dr. DURANTON Christophe, DR, LP2M, Nice

Dr. AVIGNONE Elena, MCU, IIN, Bordeaux

Dr. GRUTTER Thomas, DR, LCAMB, Strasbourg

Directeur de Thèse

Co-encadrant

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur et président du jury



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

# Citations

*« Toutes choses étant causées et causantes, aidées et aidantes, médiates et immédiates, et toutes s'entretenant par un lien naturel et insensible qui lie les plus éloignées et les plus différentes, je tiens impossible de connaître les parties sans connaître le tout, non plus que de connaître le tout sans connaître particulièrement les parties. »*

Pascal (éd. Brunschvicg, II, 72)

*« La connaissance isolée qu'a obtenue un groupe de spécialistes dans un champ étroit n'a en elle-même aucune valeur d'aucune sorte. Elle n'a de valeur que dans le système théorique qui la réunit à tout le reste de la connaissance, et seulement dans la mesure où elle contribue réellement, dans cette synthèse, à répondre à la question : « Qui sommes-nous ? » »*

E. Schrödinger

# Remerciements

Je remercie tout d'abord les Dr. BOUE-GRABOT Éric, Dr. DURANTON Christophe, Dr. GRUTTER Thomas et Dr. AVIGNON Elena d'avoir accepté de juger mon travail et pour l'honneur qu'ils m'ont fait en participant à mon jury de thèse.

Merci à tous les membres de l'équipe. Merci de m'avoir supporté car j'ai conscience d'être parfois un peu tête en l'air. J'ai été très heureux et ne regrette pas d'avoir réalisé ma thèse dans une si belle équipe. Un grand merci à Nathalie (pour toutes ces cellules ensemencées), à Hélène (pour ses conseils en statistiques), Anne-Laure, Lauriane (pour sa bonne humeur et la relecture de ma thèse), Jennifer, Vincent et François. Je remercie aussi tous ceux qui ont séjourné au sein de l'équipe au cours de ma thèse et avec qui j'ai généralement créé de très bons liens (Sarah, Audrey, Cédric, Charlène, Maxime, Eloïse...).

Je tiens à remercier très chaleureusement mon directeur de thèse, François, de m'avoir accueilli si gentiment au sein de l'équipe alors que j'étais un peu perdu en sortant de mon stage de master 2. Tu es et resteras comme un père scientifique pour moi. Vincent, je te dois aussi beaucoup dans la réalisation de cette thèse. J'ai énormément appris par ton approche et ta rigueur scientifique. Dorénavant, j'entends ta voix quand je fais quelque chose « un peu à l'arrache » et je suis sûre que cette petite voix me servira en post-doctorat. Malgré une pointe d'appréhension, je pense que vous m'avez, tous les deux, donné les armes nécessaires pour faire un bout de chemin dans le monde scientifique.

Merci à Jennifer, super co-thésarde. Aucun mot ne suffira pour exprimer la gratitude que j'éprouve envers toi. Il va être difficile de retrouver une collègue de travail (ou une amie) aussi bien que toi. Je te remercie d'avoir été là pour écouter mes histoires de vie parfois rocambolesques, pour toutes ces sorties, pour tous ces verres partagés, pour toutes ces fois où tu m'as avancé de l'argent et toutes ces fois où tu m'as fait goûter tes bons petits plats asiatiques ! Et puis je te remercie d'avoir relu en partie cette thèse. J'imagine que je pourrais te remercier pour bien d'autres choses.

Je tiens à remercier l'IGF ainsi que tous les services communs et toutes les personnes avec qui j'ai pu manger, discuter ou échanger. Je me rends compte de la chance que j'ai eu de réaliser ma thèse dans un environnement scientifique aussi favorable que celui-ci. Je remercie également les plateformes qui m'ont permis de réaliser la plupart de ces travaux, dont la plateforme ARPEGE et la plateforme de microscopie MRI (Julien, Marie-Pierre, Amélie).

Je tiens à remercier l'Université de Montpellier, pour avoir financé mes 3 premières années de thèses. Je tiens aussi à remercier le LabEx « canaux ioniques », qui a permis de financer ma

4<sup>ème</sup> année de thèse, de réaliser plusieurs congrès scientifiques et de présenter mes travaux toujours dans la joie et la bonne humeur. Je remercie l'école doctorale CBS2 ainsi que son association et tous ses membres que j'ai pu côtoyer tout au long de ma thèse.

Un grand merci à toute la bande de joyeux thésards de l'institut (dans laquelle j'inclus Rosana et Julie, ma super colocataire). Sans vous, cette thèse, et surtout cette dernière année, aurait paru bien plus longue. J'espère ne pas vous perdre de vue et tous vous recroiser rapidement.

Un grand merci aux copains de l'IUT de Lyon, de la fac de Montpellier et à l'ensemble de la bande des « Mojito Tsé-Tsé ». Sept belles années en votre compagnie, je ne vous oublierai pas, même si je quitte cette jolie ville de Montpellier. Un merci tout particulier à Mélanie et ses colocataires de m'avoir accueilli chez eux lors d'une période qui n'a pas été super agréable pour moi. Je remercie aussi Diané, cet écrivain aguerri, d'avoir corrigé quelques fautes du manuscrit. Enfin, merci à Julie de m'avoir supporté pendant plus de trois années et pour ces beaux voyages que l'on a partagé.

Un grand merci à tous les copains de Lyon, les Majolans. Je ne vais pas citer tout le monde, il y a bien trop de monde... J'ai conscience de la chance d'avoir des amis comme vous et surtout d'avoir réussi à garder une telle relation après sept années d'expatriation. Vous êtes tous fou à votre manière et vous avez évidemment participé à la construction de ce que je suis aujourd'hui. Vous représentez probablement le socle solide de ma vie et me donnez constamment la force d'aller plus loin de façon sereine. Ces dernières années, j'ai le sentiment grandissant de prendre un autre chemin que la plupart d'entre vous. A mon plus grand bonheur, certains se marient, font des enfants. Ces moments, bien que magiques, ne me rajeunissent pas. Sans savoir vraiment pourquoi, je ressens encore le besoin de parcourir un bout de chemin ailleurs avant de, sans doute, revenir... Quand elle me dira dégage et dans beaucoup d'autres circonstances, j'aurai toujours une petite pensée pour vous, même à l'autre bout du monde (et encore plus pour le petit Timothée dorénavant...).

Je tiens à remercier l'ensemble de ma famille et tout particulièrement mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans mes idées, mes projets et financièrement pendant ces longues années étudiantes. Je ne suis pas sûre que la branche professionnelle dans laquelle je me suis engagé permette un remboursement rapide de mes dettes, mais le cœur y est. Un grand merci à ma sœur, Lauriane. Un grand merci à mon frère, Stéphane, et sa copine, Vanessa, partis en ces contrées lointaines. J'espère avoir la chance de faire de même si la vie me le permet.

Enfin je remercie toutes les personnes que j'aurais pu oublier dans ces remerciements. Mais partant du principe que chaque rencontre, si courte soit-elle, modifie d'une manière ou d'une autre notre environnement sensoriel, notre expérience cérébrale et donc notre façon de penser, merci infiniment !

# Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>19</b>
<b>I. L'ATP et les récepteurs purinergiques.....</b>	<b>20</b>
I.1. L'ATP, un messager chimique .....	20
I.1.1. Structure et découverte de l'ATP .....	20
I.2. Les récepteurs purinergiques.....	22
I.2.1. Les récepteurs métabotropiques P1 de l'adénosine.....	22
I.2.1.1. Structure et voies de transduction.....	22
I.2.1.2. Localisation et rôles physiopathologiques .....	23
I.2.2. Les récepteurs métabotropiques P2 P2Y .....	23
I.2.2.1. Structure et voies de transduction.....	23
I.2.2.2. Localisation et rôles physiopathologiques .....	23
I.2.2.2.a. Les récepteurs P2Y neuronaux.....	24
I.2.2.2.b. Les récepteurs P2Y gliaux.....	24
I.2.3. Les récepteurs P2 ionotropiques P2X.....	24
I.2.3.1. Propriétés moléculaires.....	25
I.2.3.1.a. Topologie .....	25
I.2.3.1.b. Glycosylation .....	26
I.2.3.1.c. Pont disulfure.....	26
I.2.3.1.d. Phosphorylation .....	27
I.2.3.1.e. Trafic et endocytose .....	27
I.2.3.1.f. Stœchiométrie et formation d'hétéromères .....	27
I.2.3.2. Structure/Fonction .....	28
I.2.3.2.a. Site de liaison à l'ATP.....	28
I.2.3.2.b. Gating .....	29
I.2.3.2.c. Pore et accès des ions.....	30
I.2.3.2.d. Sélectivité ionique et perméabilité calcique .....	32
I.2.3.2.e. Propriétés de dilatation des récepteurs P2X.....	34
I.2.3.3. Pharmacologie des récepteurs P2X.....	34
I.2.3.3.a. Les agonistes.....	34
I.2.3.3.b. Les autres agonistes .....	35
I.2.3.3.c. Les modulateurs allostériques positifs .....	36

I.2.3.3.d.	Les antagonistes .....	36
I.2.3.3.e.	Autres modulateurs.....	38
I.2.3.4.	Localisation et rôles physiopathologiques des récepteurs P2X .....	38
I.2.3.4.a.	Rôle dans la transmission synaptique .....	39
I.2.3.4.b.	Rôle dans les douleurs chroniques.....	42
I.2.3.4.c.	Autres implications des récepteurs P2X.....	46
I.3.	Les outils pour étudier les récepteurs P2X.....	47
I.3.1.	La mesure des courants P2X par l'électrophysiologie.....	47
I.3.2.	Le contrôle des récepteurs canaux par la lumière .....	48
I.3.2.1.	Activation des récepteurs P2X par de l'ATP cagée photosensible .....	48
I.3.2.2.	L'optogating des récepteurs P2X grâce aux molécules « photo-switchables » .....	49
I.3.3.	Les sondes et senseurs calciques .....	51
I.3.3.1.	Les sondes calciques organiques.....	51
I.3.3.2.	Les GECIs.....	51
I.3.3.2.a.	Les sondes double tonneaux de type Caméléon.....	51
I.3.3.2.b.	Les sondes simple tonneau de type GCaMP .....	52
I.3.3.3.	Utilisation des sondes et senseurs calciques pour suivre l'activité P2X ...	54
I.3.3.3.a.	Utilisation des sondes calciques organiques pour suivre l'activité P2X.....	54
I.3.3.3.b.	Utilisation des GECIs pour suivre l'activité des récepteurs P2X.....	55
<b>II.</b>	<b>La libération d'ATP, mécanismes et détection .....</b>	<b>59</b>
II.1.	Les mécanismes de la libération d'ATP .....	59
II.1.1.	La libération vésiculaire .....	59
II.1.1.1.	Stockage vésiculaire de l'ATP par le transporteur VNUT .....	60
II.1.1.2.	Rôle de la libération vésiculaire d'ATP .....	61
II.1.1.2.a.	Rôle de la libération vésiculaire d'ATP par les neurones .....	62
II.1.1.2.b.	Rôle de la libération vésiculaire d'ATP par les astrocytes.....	62
II.1.1.2.c.	Rôle de la libération vésiculaire d'ATP par les microglies .....	62
II.1.2.	La libération médiée par les canaux.....	63
II.1.2.1.	Libération par les héli-canaux connexines.....	64
II.1.2.1.a.	Les connexines.....	64
II.1.2.1.b.	La perméabilité à l'ATP par les connexines.....	65
II.1.2.1.c.	Rôles physiologiques de l'ATP libérée par les connexines .....	65

II.1.2.2.	Libération par PANX1 .....	65
II.1.2.2.a.	Les pannexines .....	65
II.1.2.2.b.	Perméabilité à l'ATP par les PANX1.....	66
II.1.2.2.c.	Rôles physiologiques de l'ATP libérée par les PANX-1 .....	66
II.1.2.3.	Libération par les CALHM1 .....	67
II.1.2.3.a.	Le canal CALHM1 .....	67
II.1.2.3.b.	Perméabilité à l'ATP par les CALHM1.....	68
II.1.2.3.c.	Rôles physiologiques de l'ATP libérée par les CALHM1 .....	68
II.1.2.4.	Libération par les Maxi Anion Channels (MACs) .....	69
II.1.2.4.a.	Les MACs.....	69
II.1.2.4.b.	Perméabilité à l'ATP par les MACs .....	69
II.1.2.4.c.	Rôles physiologiques de l'ATP libérée par les MACs .....	70
II.1.2.5.	Libération par les Volume Regulated Anion Channels (VRACs) .....	71
II.1.2.5.a.	Les VRACs et la régulation du volume cellulaire .....	71
II.1.2.5.b.	Perméabilité à l'ATP par les VRACs .....	72
II.1.2.5.c.	Rôles physiologiques supposés de l'ATP libérée par les VRACs .....	73
II.1.2.5.d.	Canaux LRRC8, système purinergique et régulation du volume cellulaire, liens et hypothèses .....	74
II.2.	Les outils pour détecter la libération d'ATP extracellulaire.....	75
II.2.1.	La détection de l'ATP basée sur des réactions enzymatiques.....	75
II.2.1.1.	Les méthodes basées sur la technique luciférine/luciférase .....	75
II.2.1.1.a.	Principe et développement .....	75
II.2.1.1.b.	Caractéristiques et limites.....	76
II.2.1.1.c.	Luciférase ciblées à la membrane plasmique .....	76
II.2.1.1.d.	Imagerie de l'ATP par les approches de bioluminescence.....	78
II.2.1.2.	Les méthodes basées sur d'autres réactions enzymatiques.....	80
II.2.1.2.a.	Les biosenseurs ampérométriques d'ATP .....	80
II.2.1.2.b.	Les biosenseurs d'ATP fluorescents basés sur les réactions enzymatiques .....	80
II.2.1.3.	Les méthodes basées sur le transfert d'énergie par résonance entre protéines fluorescentes (FRET) ou bioluminescentes (BRET) .....	82
II.2.1.3.a.	Les méthodes basées sur le FRET .....	82
II.2.1.3.b.	Les méthodes basées sur le BRET .....	83
II.2.1.4.	La détection de l'ATP basée sur l'activité des récepteurs purinergiques .....	84

- II.2.1.4.a. Les biosenseurs d'ATP basés sur la fluorescence de cellules rapportrices induite par l'activation des récepteurs purinergiques..... 84
- II.2.1.4.b. Les biosenseurs d'ATP basés sur la mesure des courants P2X ..... 84

**Résultats et discussion..... 86**

**I. Contexte de l'étude .....87**

**II. Création et caractérisation fonctionnelle de l'outil P2X-GCaMP6s .....89**

- II.1. Caractérisation fonctionnelle de l'outil P2X-GCaMP6s sur lignée cellulaire HEK 89
  - II.1.1. Fusion de la GCaMP6s au récepteur P2X ..... 89
  - II.1.2. Fonctionnalité de l'outil P2X2-GCaMP6s..... 90
    - II.1.2.1. Validation électrophysiologique..... 90
    - II.1.2.2. Détection de la fluorescence suite à l'application d'ATP ..... 91
  - II.1.3. Spécificité de l'outil P2X2-GCaMP6s ..... 92
    - II.1.3.1. Réponse fluorescente sans calcium extracellulaire ..... 92
    - II.1.3.2. Réponse fluorescente suite à l'activation des récepteurs P2Y endogènes..... 93
    - II.1.3.3. Réponse fluorescente suite à l'activation d'autres récepteurs ionotropiques membranaires perméables au calcium (NMDA/TRPV1) ..... 96
      - II.1.3.3.a. Co-transfection avec les récepteurs NMDA ..... 96
      - II.1.3.3.b. Co-transfection avec les récepteurs TRPV1 ..... 98
  - II.1.4. Fusion et caractérisation sur les autres récepteurs P2X ..... 100
    - II.1.4.1. Caractérisation de l'outil P2X4-GCaMP6s ..... 100
      - II.1.4.1.a. Validation électrophysiologique..... 100
      - II.1.4.1.b. Détection de la fluorescence suite à l'application d'ATP ..... 101
      - II.1.4.1.c. Spécificité de l'outil P2X4-GCaMP6s..... 102
    - II.1.4.2. Fonctionnalité sur les autres récepteurs P2X..... 103
- II.2. Caractérisation fonctionnelle de l'outil P2X-GCaMP6s sur lignée astrocytaire 1321N1 et culture de neurones primaires hippocampiques ..... 105
  - II.2.1. Développement d'une stratégie lentivirale..... 105
  - II.2.2. L'outil P2X-GCaMP6s dans la lignée astrocytaire 1321N1 ..... 105
  - II.2.3. L'outil P2X-GCaMP6s dans les neurones hippocampiques en culture primaire..... 107
    - II.2.3.1. Expression et localisation des outils P2X2-GCaMP6s et P2X4-GCaMP6s dans les neurones..... 107

II.2.3.2. Caractérisation biochimique de P2X2-GCaMP6s exprimé dans les neurones.....	108
II.2.3.3. Caractérisation vidoémicroscopique de l'outil P2X2-GCaMP6s dans les neurones hippocampiques.....	110
II.2.3.4. Libération d'ATP et activation de P2X2 suite à une dépolarisation au KCl.....	111

### **III. Développement d'un biosenseur de l'ATP extracellulaire à partir de l'outil P2X2-GCaMP6s ..... 113**

III.1. Développement d'un biosenseur de l'ATP.....	113
III.1.1. Choix du récepteur P2X2 et des mutants alanine .....	113
III.1.2. Criblage et expression cellulaire des mutants sur cellules HEK.....	115
III.1.2.1. Criblage des mutants P2X-GCaMP6s.....	115
III.1.2.2. Expression des mutants P2X-GCaMP6s.....	117
III.1.2.3. Fluorescence basale des mutants P2X-GCaMP6s .....	118
III.1.2.4. Choix de deux mutants comme biosenseurs d'ATP potentiels.....	119
III.1.3. Validation électrophysiologique des mutants PPG et PNG .....	119
III.1.4. Caractérisation des biosenseurs sélectionnés sur une lignée astrocytaire 1321N1.....	121
III.2. Preuve de concept <i>in vitro</i> : détection d'une libération endogène d'ATP après un gonflement cellulaire .....	122
III.2.1. Détection de la libération endogène d'ATP après un choc hypotonique appliqué sur cellules HEK .....	123
III.2.1.1. Détection de l'ATP .....	123
III.2.1.2. Spécificité et validation des biosenseurs .....	125
III.2.1.2.a. Spécificité de la fluorescence observée .....	125
III.2.1.2.b. Validation par dosage de l'ATP par la méthode luciférine/luciférase.....	127
III.2.1.3. PNG et PPG, des outils semi-quantitatifs .....	128
III.2.2. Détection de la libération endogène d'ATP après un choc osmotique sur cellules astrocytaires 1321N1 .....	130
III.2.2.1. Détection de la libération d'ATP après différents chocs osmotiques... ..	130
III.2.2.2. Spécificité de la fluorescence observée .....	132
III.2.2.3. Quantification de l'ATP libérée par les cellules 1321N1 .....	133

**IV. Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la libération d'ATP dans un contexte de gonflement cellulaire suite à des changements osmotiques. ....134**

IV.1. Mécanismes moléculaires impliqués dans la libération d'ATP sur des cellules HEK.....	134
IV.1.1. Approches pharmacologiques .....	134
IV.1.1.1. Implication des Pannexines/Connexines et du canal LRRC8A .....	134
IV.1.1.2. Effet des drogues sur le senseur PNG .....	137
IV.1.2. Approche génétique .....	138
IV.1.2.1. Caractérisation de la lignée HEK LRRC8A KO .....	138
IV.1.2.2. Libération d'ATP .....	139
IV.1.2.3. Validation de l'implication des canaux LRRC8 par dosage de l'ATP par la méthode luciférase / luciférase .....	142
IV.1.2.4. Rôle physiologique de la libération d'ATP par LRRC8 .....	143
IV.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la libération d'ATP sur une lignée de monocytes THP-1 différenciés en macrophage .....	145
IV.2.1. Caractérisation des biosenseurs et détection de l'ATP sur les macrophages différenciés.....	146
IV.2.1.1. Dose-réponse du biosenseur PNG exprimé dans les macrophages .....	146
IV.2.1.2. Détection et quantification de la libération d'ATP en réponse à un choc hypotonique .....	146
IV.2.2. Implication du canal LRRC8.....	148
IV.2.2.1. Création et caractérisation la lignée shARN-LRRC8A.....	148
IV.2.2.2. Implication du canal LRRC8 dans la libération d'ATP.....	150
IV.2.2.3. Validation par dosage de l'ATP par les méthodes de bioluminescence.....	153
IV.2.3. Rôle de l'ATP libérée par les canaux LRRC8.....	154
IV.2.3.1. Mise au point expérimentale de l'approche de vidéomicroscopie .....	154
IV.2.3.2. Corrélation temporelle entre la libération d'ATP et le RVD .....	156
IV.2.3.3. Modulation de la vitesse du RVD par la libération d'ATP endogène .....	158
IV.2.3.4. Volume cellulaire suite à un traitement avec l'apyrase.....	159
IV.2.3.5. Effet d'ajout exogène d'ATP.....	159
IV.2.3.6. Hypothèse sur les voies moléculaires impliquées .....	160

## **Conclusion ..... 162**

### **I. Les outils P2X-GCaMP6s ..... 163**

- I.1. Bilan sur les outils P2X-GCaMP6s ..... 163
  - I.1.1. Avantages et limites des outils P2X-GCaMP6s ..... 163
    - I.1.1.1. Avantages des outils P2X-GCaMP6s ..... 163
    - I.1.1.2. Limites des outils P2X-GCaMP6s ..... 164
  - I.2. Les futures applications ..... 164
    - I.2.1. Utilisation de l'outil P2X2-GCaMP6s pour l'étude des récepteurs P2X neuronaux ..... 164
    - I.2.2. Utilisation de l'outil P2X-GCaMP6s pour l'étude des récepteurs P2X en contexte pathologique ..... 164
    - I.2.3. Utilisation des outils P2X-GCaMP6s pour l'étude des hétéromères ..... 165
    - I.2.4. Utilisation des outils P2X-GCaMP6s pour cribler de nouvelles drogues ..... 165

### **II. Les biosenseurs d'ATP PNG et PPG ..... 166**

- II.1. Bilan sur les biosenseurs PNG et PPG ..... 166
  - II.1.1. Avantages et limites des biosenseurs ..... 166
    - II.1.1.1. Avantages des biosenseurs à l'ATP PNG et PPG ..... 166
    - II.1.1.2. Limites des biosenseurs à l'ATP PNG et PPG ..... 167
  - II.2. Les futures applications ..... 169
    - II.2.1. Estimer la quantité d'ATP libéré et décrypter les mécanismes de la libération d'ATP *in vivo* en condition physiologique et pathologique ..... 169
    - II.2.2. Vers de nouveaux biosenseurs purinergiques améliorés ? ..... 171
      - II.2.2.1. Points d'améliorations possibles des outils PNG et PPG ..... 171
      - II.2.2.2. Vers d'autres biosenseurs purinergiques fluorescents basés sur la fusion de cp-EGFP aux récepteurs ..... 172

### **III. Rôle du canal LRRC8 dans la libération d'ATP ..... 173**

- III.1. Bilan sur les résultats obtenus ..... 173
- III.2. Rôles potentiels de la libération d'ATP dépendante des récepteurs LRRC8 ..... 173

## **Matériels et Méthodes ..... 175**

### **I. Biologie moléculaire ..... 176**

- I.1. Fusion des protéines GCaMP6s, RCaMP2 et jRGECO ..... 176
- I.2. Mutagenèse sur P2X2-GCaMP6s ..... 176

### **II. Culture cellulaire, transfection et transduction ..... 176**

II.1.	Culture et transfection des cellules HEK .....	176
II.2.	Production de lentivirus .....	177
II.3.	Culture et transduction de la lignée astrocytaire 1321N1.....	177
II.4.	Culture et transduction de la lignée monocyttaire THP-1.....	177
II.5.	Création des lignées HEK LRRC8-KO et THP-1 shRNA-LRRC8A .....	178
II.6.	Culture et transduction de neurones primaires hippocampiques.....	178
<b>III. Enregistrement et analyse des signaux fluorescents.....</b>		<b>178</b>
III.1.	Expériences réalisées en lecteur de plaques .....	178
III.2.	Expériences réalisées en vidéomicroscopie.....	179
III.3.	Analyses.....	180
<b>IV. Biochimie .....</b>		<b>180</b>
IV.1.	Préparation des extraits protéiques pour Western blot.....	180
IV.2.	Préparation des extraits protéiques pour synaptosomes.....	180
IV.3.	Préparation des extraits protéiques membranaires (biotinylation) .....	181
IV.4.	Western blot.....	181
<b>V. Immunofluorescence .....</b>		<b>181</b>
<b>VI. Dosage de l'ATP par bioluminescence.....</b>		<b>182</b>
<b>VII. Electrophysiologie .....</b>		<b>182</b>
VII.1.	Culture des cellules HEK .....	182
VII.2.	Electrophysiologie .....	182
<b>Bibliographie .....</b>		<b>184</b>

# *Liste des abréviations*

2meSATP : 2-methyl-thio Adenosine TriPhosphate  
AAQ : Acrylamide-Azobenzene-Quaternary ammonium  
ABC : ATP Binding Cassette  
AC : Adénylate Cyclase  
ADN : Adénosine Désoxyribonucléique  
ADP : Adénosine Diphosphate  
AFM : Atomic Force Microscope  
AMP : Adénosine MonoPhosphate  
AMPA : Amino-hydroxy-Méthylisoazol-Propionate Acid  
ARN : Acide RiboNucléique  
ATP : Adénosine TriPhosphate  
ATP<sub>γ</sub>S : Gamma-thio Adénosine TriPhosphate  
BAPTA : Bis (o-AminoPhenoxy) ethane-Tetraacetic Acid  
BBG : Brillant Blue G  
BMA : Bis-Maleimido-Azobenzene  
BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer  
BzATP : Benzoyl Adénosine TriPhosphate  
CA : Corne d'Ammon  
CALHM : CALcium Homeostasis Modulator ion channel  
CaM : CalModulin  
CBX : Carbenoxolone  
CFP : Cyan Fluorescent Protein  
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator  
CNB : Carboxy-2 NitroBenzyl  
cpEGFP : circularly permuted GFP  
Cx : Connexine  
DCPIB : Butyl-dichloro-cyclopentyl-dihydro-oxo-Hindenyl-oxy-butanoic acid  
DIV : Day In Vitro  
DMNB : DiMethoxy-2-NitroBenzyl  
DMNPE : Dimethoxy-2-Nitrophenyl-Ethyl Ester  
DRG : Dorsal Root Ganglion  
EC50 : half maximal Effective Concentration  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein  
EGTA : Ethylene Glycol-bis (β-aminoethyl ether) Tetraacetic Acid  
ENT3 : Equilibrative Nucleoside Transporter 3  
fEPSP : field Excitatory PostSynaptic Potential  
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

G3P : Glycerol 3 Phosphate  
G6P : Glucose 6 Phosphate  
GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GECI : Genetically Encoded  $\text{Ca}^{2+}$  Indicators  
GK : Glycerol Kinase  
HEK : Human Embryonic Kidney  
IC50 : half maximal Inhibitory Concentration  
IL : InterLeukine  
IVM : Ivermectine  
KCC2 :  $\text{K}^+\text{Cl}^-$  Cotransporter 2  
KO : Knock-Out  
LiAChR : Light-gated Acétylcholine receptor  
LiGABAR : Light-gated GABA receptor  
LiGluR : Light-gated ionotropic glutamate receptor  
LPS : LipoPolySaccharides  
LRRC : Leucin Rich Repeat Channel  
LTP : Long Term Potentiation  
MAC : Maxi Anion Channel  
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases  
MEA-TMA : Maleimide Ethylene Azobenzene TriMethyl Ammonium  
mEPSCs : miniature Excitatory Postsynaptic Currents  
MRP : Multidrug Resistance Protein  
MTS : Methan ThioSulfonate  
NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogen  
NANC : Non-norAdrenergic, Non-Cholinergic  
NMDA : N-Méthyl-D-Aspartique acid  
NMDG : N-Methyl-D-Glucamine  
OFP : Orange Fluorescent Protein  
PAM : Postitif Allosteric Modulator  
PANX : Pannexine  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PG : P2X2-GCaMP6s  
PGE2 : ProstaGlandine E2  
Pi : Phosphate inorganique  
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase  
PKA : Protéine Kinase A  
PLC : PhosphoLipase C  
PNG : P2X2-N333A-GCaMP6s  
PNI : Peripheral Nerve Injury  
PPADS : PyridoxalPhosphate-Azophenyl-DiSulfonic

PPG : P2X2-P329A-GCaMP6s  
PPSE : Potentiel Post-Synaptique Excitateur  
PSD-95 : PostSynaptic Density protein 95  
RCPG : Récepteurs Couplés au Protéines G  
ROS : Reactive Oxygen Species  
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction  
RVD : Regulatory Volume Decrease  
SCAM : Substitued Cystein Accessibility Method  
shRNA : short hairpin RiboNucleique Acid  
siRNA : small interferant RiboNucleique Acid  
SLC : SoLute Carrier  
SNAP25 : SyNaptosomal-Associated Protein 25  
SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor  
SNC : Système Nerveux Centrale  
SNP : Système nerveux périphérique  
SPARK : Synthetic Photoisomerizable Azobenzene-Regulated K<sup>+</sup> channel  
TM : segment TransMembranaire  
TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
TNP-ATP : TriNitroPhenyl-Adénosine TriPhosphate  
TrkB : Tropomyosin receptor kinase B  
UDP : Uridine DiPhosphate  
UTP : Uridine TriPhosphate  
VAAC : Volume-Activated Anion Channels  
VNUT : Vesicular NUcleotide Transporter  
VRAC : Volume-Regulated Anion Channel  
VSOAC : Volume-Sensitive Organic osmolyte and Anion Channels  
VSOR : Volume-Sensitive Outwardly Rectifying chloride channel  
YC : Yellow Cameleon  
YFP : Yellow Fluorescent Protein  
 $\alpha\beta$ -meATP : Alpha-beta-methylene Adénosine TripPhosphate  
 $\beta\gamma$ -meATP : Beta-gamma-méthylène Adénosine TripPhosphate

# Liste des illustrations

## Figures

Figure 1 : structure de l'Adénosine Triphosphate (ATP) .....	20
Figure 2 : Les récepteurs des nucléotides extracellulaires .....	22
Figure 3 : Structure moléculaire d'une sous-unité des récepteurs P2X .....	26
Figure 4 : Site de liaison à l'ATP.....	29
Figure 5 : Structure du récepteur P2X3 humain en conformation fermée et ouverte.....	30
Figure 6 : Localisation de la porte du canal P2X3 humain en conformation fermée (A), ouverte (B) et désensibilisée (C) .....	32
Figure 7 : Perméabilité calcique des récepteurs P2X.....	33
Figure 8 : Propriétés d'activation et cinétiques de désensibilisation des récepteurs P2X en système recombinant.....	35
Figure 9 : Neuromodulation des synapses excitatrices et inhibitrices par les récepteurs P2X .....	42
Figure 10 : Localisation et distribution des sous-unités P2X dans les voies des douleurs périphériques .....	43
Figure 11 : Mécanismes moléculaires par lesquels P2X4 exprimé par les microglies activées peut conduire à la douleur neuropathique suite à une PNI .....	45
Figure 12 : Activation par la lumière des récepteurs P2X2 .....	50
Figure 13 : Principaux types de sondes calciques fluorescentes .....	54
Figure 14 : Mise en évidence d'un courant calcique dépendant de P2X4 sur culture primaire de neurones sensoriels.....	55
Figure 15 : Création et caractérisation de l'outil P2X2-caméléon sur neurones primaire d'hippocampe.....	56
Figure 16 : Représentation schématique de la libération vésiculaire d'ATP .....	61
Figure 17 : La libération d'ATP par les canaux .....	64
Figure 18 : Propriétés du canal LRRC8 (ou SWELL1) .....	72
Figure 19 : Exemples de luciférases ciblées à la membrane.....	77
Figure 20 : Visualisation dynamique de la libération d'ATP par les méthodes de bioluminescences luciférine/luciférase.....	79
Figure 21 : Détection de l'ATP extracellulaire suite à une réaction enzymatique fluorescente .....	81
Figure 22 : Le senseur d'ATP extra-cellulaire ecATeam 3.10 .....	83
Figure 23 : Détection de l'ATP extracellulaire basé sur l'activité des récepteurs P2X.....	85
Figure 24 : Fusion de la GCaMP6s à la queue C-terminale du récepteur P2X2 .....	90
Figure 25 : Caractérisation électrophysiologique de l'outil P2X2-GCaMP6s .....	91
Figure 26 : Détection de la fluorescence suite à l'application d'ATP sur des cellules HEK exprimant l'outil P2X2-GCaMP6s .....	92
Figure 27 : Spécificité de réponse de l'outil P2X2-GCaMP6s : réponse à l'ATP dans un milieu extracellulaire sans calcium .....	93

Figure 28 : Spécificité de réponse de l'outil P2X2-GCaMP6s suite à l'activation des récepteurs P2Y endogènes exprimés par les cellules HEK .....	95
Figure 29 : Spécificité de réponse de l'outil P2X2-GCaMP6s suite à l'activation des récepteurs NMDA exprimés à la membrane .....	97
Figure 30 : Spécificité de réponse de l'outil P2X2-GCaMP6s suite à l'activation des récepteurs TRPV1 exprimés à la membrane .....	99
Figure 31 : Caractérisation électrophysiologique de l'outil P2X4-GCaMP6s .....	100
Figure 32 : Détection de la fluorescence suite à l'application d'ATP sur des cellules HEK exprimant l'outil P2X4-GCaMP6s .....	101
Figure 33 : Spécificité de l'outil P2X4-GCaMP6s .....	102
Figure 34 : Fusion du senseur calcique GCaMP6s aux autres sous-unités P2X .....	104
Figure 35 : Caractérisation des outils P2X2-GCaMP6s et P2X4-GCaMP6s sur la lignée astrocytaire 1321N1 .....	106
Figure 36 : Immunocytochimie outils P2X2-GCaMP6s et P2X4-GCaMP6s exprimés dans des neurones primaires hippocampiques.....	107
Figure 37 : Caractérisation biochimique de l'outil P2X2-GCaMP6s exprimé dans des neurones primaires hippocampiques.....	109
Figure 38 : Réponse à l'ATP de l'outil P2X2-GCaMP6s exprimé dans des neurones primaires hippocampiques.....	110
Figure 39 : Libération d'ATP par les neurones hippocampiques exprimant l'outil P2X2-GCaMP6s suite à une dépolarisation au KCl .....	112
Figure 40 : Développement du biosenseur à l'ATP : insertion de mutations alanines dans les segments transmembranaires de l'outil P2X2-GCaMP6s .....	114
Figure 41 : Caractérisation des différents mutants alanines sur cellules HEK et sélection de deux biosenseurs à l'ATP : P2X2-N333A-GCaMP6s (PNG) et P2X2-P329A-GCaMP6s (PPG) .	116
Figure 42 : Expression des mutants P2X2-GCaMP6s .....	118
Figure 43 : Fluorescence basale des mutants P2X2-GCaMP6s .....	119
Figure 44 : Caractérisation électrophysiologique des biosenseurs PPG et PNG.....	120
Figure 45 : Caractérisation des biosenseurs PNG et PPG sur la lignée astrocytaire 1321N1	121
Figure 46 : Preuve de concept in vitro : détection d'une libération d'ATP endogène par les biosenseurs PNG et PPG suite à des changements osmotiques.....	122
Figure 47 : Détection d'une libération d'ATP endogène suite à l'application de chocs osmotiques sur cellules HEK .....	124
Figure 48 : Spécificité de la fluorescence observée suite à un choc osmotique à 160 mOsm .....	126
Figure 49 : Validation de la détection de l'ATP par nos biosenseurs grâce à une détection de l'ATP extracellulaire par les méthodes de bioluminescence classiques basées sur la luciférine/luciférase. ....	127
Figure 50 : PPG et PNG, des biosenseurs d'ATP sensibles et semi-quantitatifs. Quantification de la libération d'ATP suite à des chocs osmotiques sur cellules HEK.....	129
Figure 51 : Détection d'une libération d'ATP endogène suite à l'application de chocs osmotiques sur lignée astrocytaire 1321N1 .....	131
Figure 52 : Spécificité de la fluorescence observée suite à un choc osmotique à 90 mOsm	132

Figure 53 : Quantification de la libération d'ATP suite à des chocs osmotiques sur cellules astrocytaires 1321N1 .....	133
Figure 54 : Implication des connexines/pannexines et du canal LRRC8A dans la libération d'ATP par les cellules HEK suite à un choc hypotonique de 50 % (160 mOsm) .....	136
Figure 55 : Effets des drogues CBX et DCPIB sur la sensibilité à l'ATP du senseur à l'ATP PNG .....	137
Figure 56 : Analyse du volume cellulaire sur les lignées HEK et HEK LRRC8A KO par mesure de fluorescence de la calceïne .....	139
Figure 57 : Effet du DCPIB sur la lignée mère HEK et la lignée LRRC8A KO .....	140
Figure 58 : Effet du DCPIB sur la lignée mère HEK et la lignée LRRC8A KO transfectées avec l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s .....	141
Figure 59: Comparaison de la libération d'ATP entre les lignées HEK WT LRRC8A KO .....	142
Figure 60 : Validation de l'implication du canal LRRC8 dans la libération d'ATP grâce à une détection de l'ATP extracellulaire par les méthodes de bioluminescence classiques basées sur la luciférine/luciférase.....	143
Figure 61 : Corrélacion temporelle entre la libération d'ATP et le phénomène de RVD .....	144
Figure 62 : Protocole de transduction et de différenciation des THP-1 en macrophages.....	145
Figure 63 : Dose-réponse des senseurs PG et PNG exprimés dans les macrophages .....	146
Figure 64 : Détection et quantification de la libération d'ATP extracellulaire endogène suite à un choc hypotonique de 50 % (160 mOsm).....	147
Figure 65 : Caractérisation de la lignée THP-1 exprimant un shARN dirigé contre le canal LRRC8 .....	149
Figure 66 : Implication du canal LRRC8 dans la libération d'ATP suite à un choc hypotonique de 50 % (160 mOsm) .....	151
Figure 67 : Effet du DCPIB sur la libération d'ATP suite à un choc hypotonique de 50 % (160 mOsm) dans la lignée shRNA-LRRC8A.....	152
Figure 68 : Effet du choc hypotonique 50 % et du DCPIB dans les lignées de macrophages WT et shRNA-LRRC8A transduites avec l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s.....	153
Figure 69 : Validation de l'implication du récepteur LRRC8 dans la libération d'ATP par les macrophages grâce à une méthode de bioluminescence classique basée sur le couple luciférine/luciférase .....	154
Figure 70 : Modifications de la sensibilité du biosenseur suite au traitement par le PMA... 155	155
Figure 71: Observation de la libération d'ATP par vidéomicroscopie suite à un choc hypotonique de 90 mOsm.....	156
Figure 72 : Corrélacion temporelle entre la libération d'ATP et le RVD suite à un choc hypotonique de 90 mOsm.....	157
Figure 73 : Augmentation de la vitesse du RVD pour les cellules libérant de l'ATP au cours d'un choc hypotonique de 90 mOsm dans des macrophages WT.....	158
Figure 74 : Effet inhibiteur de l'apyrase sur le RVD suite à un choc hypotonique de 90 mOsm dans des macrophages sauvages .....	159
Figure 75 : Effet de l'ATP exogène sur le RDV suite à un choc hypotonique de 90 mOsm dans des macrophages sauvages.....	160
Figure 76 : Hypothèse sur le rôle de l'ATP libérée dans la régulation du volume cellulaire..	161

Figure 77: Fusion et caractérisation des outils P2X2-N333A-RCaMP2 et P2X2-N333A-jRGECO1a sur cellules HEK .....	170
Figure 78: Principaux types de senseurs calciques GECI disponibles classés selon leur taille .....	171
Figure 79: Développement de nouveaux biosenseurs à l'acétylcholine basé sur la fusion d'une cpEGFP aux récepteurs muscariniques .....	172

## *Tableaux*

Tableau 1 : Pharmacologie des récepteurs P2X.....	37
Tableau 2 : Principales fonctions physiologiques des sous-unités P2X déterminées grâce à l'utilisation d'animaux knock-out (KO).....	39
Tableau 3 : Récapitulatif des avantages et limites des principales méthodes utilisées pour détecter l'ATP extracellulaire .....	168

# *Introduction*

## I. L'ATP et les récepteurs purinergiques

### I.1. L'ATP, un messenger chimique

#### I.1.1. Structure et découverte de l'ATP

L'adénosine triphosphate (ATP) est une molécule énergétique commune à tous les êtres vivants, des bactéries aux mammifères. Cette molécule est composée d'un nucléotide, l'adénosine, comprenant la base azotée adénine liée au sucre ribose. Ce dernier est lui-même relié à une chaîne de 3 groupements phosphates (Figure 1).

Dans les cellules, l'ATP est synthétisée à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi) au cours la glycolyse dans le cytosol mais aussi, de façon plus importante, pendant la phosphorylation oxydative dans les mitochondries. C'est l'hydrolyse de cette liaison phosphoanhydride à haute énergie (réaction exergonique) qui va fournir l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme, à la locomotion, à la division cellulaire ou encore au transport actif de composés chimiques au travers des membranes biologiques.

L'ATP a été découverte en 1929 par le biochimiste allemand Karl Lohman<sup>1</sup> et, parallèlement, par les biochimistes américain Cyrus Fiske et indien Yellapragada Subbarao<sup>2</sup>. C'est l'Allemand Fritz Albert Lipmann qui a suggéré son rôle d'intermédiaire entre les réactions qui libèrent de l'énergie et les réactions qui en absorbent.

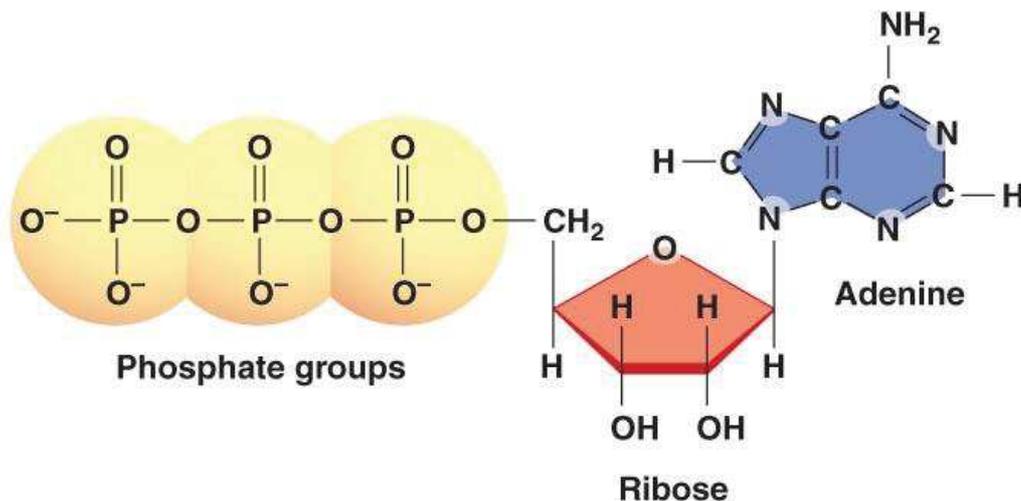


Figure 1 : structure de l'Adénosine Triphosphate (ATP)

Dès sa découverte, plusieurs expériences suggèrent le rôle des composés purinergiques (adénosine et ATP) comme messagers chimiques extracellulaires. Dès 1929, Drury et Szent-Györgyi mettent en évidence une action de l'ATP et de l'Adénosine sur le cœur et les vaisseaux coronaires<sup>3</sup>. En 1948, Emmelin et Feldberg montrent qu'une injection intraveineuse d'ATP chez le chat entraîne des effets complexes et affecte les mécanismes périphériques et centraux<sup>4</sup>. Enfin, Holton met en évidence pour la première fois une libération d'ATP suite à une stimulation antidromique du nerf sensoriel de l'oreille de lapin<sup>5</sup>.

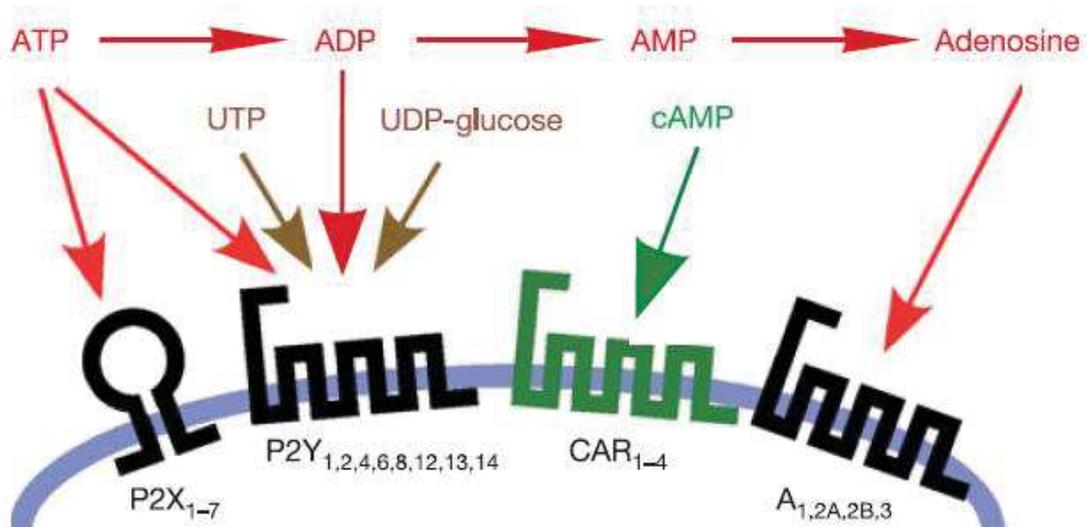
Historiquement, de nombreuses études ont été réalisées au niveau de la jonction neuromusculaire. En 1948, Buchtal et Folkow montrent, chez la grenouille, qu'une exposition à l'ATP potentialise la contraction des fibres du muscle squelettique induite par l'acétylcholine<sup>6</sup>. Dans les années 1960, Burnstock et son équipe mènent une série d'expériences montrant la relation du système adrénergique, cholinergique et purinergique dans la jonction neuromusculaire. Ainsi, en 1962, ils découvrent, chez le cochon d'Inde, une réponse hyperpolarisante des muscles lisses, tout en ayant bloqué la réponse due aux neurotransmetteurs classiques que sont la noradrénaline et l'acétylcholine<sup>7</sup>. Cette conduction inhibitrice « non-adrénergique non-cholinergique » (NANC) fut confirmée sur différents organes par d'autres équipes de recherche<sup>8</sup>.

Toutes ces études ont conduit Burnstock en 1970 à émettre l'hypothèse purinergique selon laquelle l'ATP serait le messager synaptique responsable de cette conduction NANC<sup>9</sup>. Bien que d'autres études aient conforté cette hypothèse, une résistance considérable de la communauté scientifique persista face à cette dernière. En effet, il paraissait peu probable pour certains scientifiques qu'une molécule puisse être à la fois source d'énergie intracellulaire et messager extracellulaire. Ce n'est qu'avec l'identification pharmacologique des premiers récepteurs purinergiques, dans les années 1980, et leur clonage dans les années 1990, que la notion de transmission purinergique est définitivement acceptée.

Aujourd'hui, on sait que l'ATP est libérée dans le milieu extracellulaire et convertie en ADP puis en adénosine monophosphate (AMP) puis en adénosine par différentes ecto-enzymes présentes à la membrane. Ces différents composés purinergiques agissent sur deux familles de récepteurs nommés P1 et P2 (Figure 2).

Les récepteurs P1 à l'adénosine sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) induisant diverses voies de signalisation intracellulaire. Les récepteurs P2 sont composés des RCPG P2Y qui peuvent être activés par l'ATP, l'ADP, l'uridine diphosphate-glucose (UDP-glucose) et l'uridine triphosphate (UTP). Ces dernières sont couplées à des voies de signalisation intracellulaire diverses. Enfin, les récepteurs P2 sont aussi composés des récepteurs ionotropiques P2X, uniquement sensible à l'ATP, dont l'activation va entraîner une entrée d'ions dans la cellule.

De nombreuses données montrent que l'ATP et ses produits de dégradation jouent un rôle important en tant que messagers chimiques dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la prolifération, la différenciation, la mort cellulaire, mais aussi dans la neurotransmission et la neuromodulation.



**Figure 2 : Les récepteurs des nucléotides extracellulaires**

L'ATP est transformée en ADP puis en AMP puis en adénosine par différentes ecto-enzymes à la membrane. Les récepteurs purinergiques présents chez les vertébrés et certains invertébrés (en noir) incluent les récepteurs P2X, P2Y et ceux de l'adénosine. L'ATP peut agir sur les récepteurs P2X et certains récepteurs P2Y. Certains récepteurs P2Y sont activés par l'ADP, l'UTP ou l'UDP-glucose. L'adénosine agit sur 4 types de récepteurs nommés A. Chez *Dictyostelium* (en vert) l'AMP cyclique peut agir sur quatre autres types de récepteurs RCPG nommés CAR.

## 1.2. Les récepteurs purinergiques

### 1.2.1. Les récepteurs métabotropiques P1 de l'adénosine

#### 1.2.1.1. Structure et voies de transduction

L'adénosine active 4 types de récepteurs purinergiques nommés A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub>. Ces derniers ont tous été clonés chez plusieurs espèces dont l'humain<sup>10,11</sup>. Ils appartiennent à la famille des RCPG et possèdent donc 7 segments transmembranaires (TM) constitués d'hélices- $\alpha$ . Le segment terminal NH<sub>2</sub> est extracellulaire et le segment terminal COOH intracellulaire. La boucle entre les TM4 et TM5 et la boucle entre les TM5 et TM6 sont plus larges. La première, extracellulaire, va contenir le site de fixation du ligand tandis que la deuxième, intracellulaire, va interagir avec la protéine G appropriée et induire un signal de transduction intracellulaire. Ces récepteurs sont principalement couplés positivement ou négativement à l'adénylate cyclase (AC). Les récepteurs A<sub>2A</sub> et A<sub>2B</sub> sont couplés aux protéines G « stimulantes » G<sub>s</sub><sup>12,13</sup> et à la production du second messenger AMP cyclique (AMPc), conduisant à l'activation de la protéine kinase A (PKA) puis de différents effecteurs. Les récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>3</sub> sont couplés aux protéines G « inhibitrices » G<sub>i/o</sub><sup>14,15</sup> et inhibent, entre autre l'AC. Certaines études ont montré que les récepteurs A<sub>2B</sub> pourraient interagir avec la protéine G<sub>q</sub> couplée à la phospholipase C (PLC) et entraîner une libération de calcium des stocks intracellulaires<sup>13</sup>.

#### 1.2.1.2. Localisation et rôles physiopathologiques

Les quatre récepteurs P1 sont largement exprimés en périphérie et dans tout le système nerveux. Les animaux knock-out (KO) pour ces récepteurs et la pharmacologie<sup>16</sup> ont permis de mettre en évidence leurs rôles dans de nombreuses fonctions physiologiques importantes telles que l'activité motrice<sup>17</sup>, le sommeil<sup>18</sup>, la cognition<sup>19</sup>, l'angiogenèse<sup>20</sup>, le métabolisme lipidique<sup>21</sup> ou encore la régulation cardiaque<sup>21</sup>. Ces récepteurs sont impliqués dans diverses pathologies telles que les maladies inflammatoires<sup>22</sup>, l'ischémie et la reperfusion<sup>23</sup> ainsi que dans certaines maladies neurodégénératives<sup>24</sup>.

### 1.2.2. Les récepteurs métabotropiques P2 P2Y

#### 1.2.2.1. Structure et voies de transduction

Les récepteurs métabotropiques P2Y appartiennent à la famille des RCPG et sont composés de 8 membres activés par des agonistes nucléotidiques différents : P2Y<sub>1</sub> (activé par l'ADP), P2Y<sub>2</sub> (activé par l'UTP et l'ATP), P2Y<sub>4</sub> (activé par l'UTP), P2Y<sub>6</sub> (activé par l'UDP), P2Y<sub>11</sub> (activé par l'ATP), P2Y<sub>12</sub> (activé par l'ADP), P2Y<sub>13</sub> (activé par l'ADP) et P2Y<sub>14</sub> (activé par l'UDP). Ces derniers ont tous été clonés et caractérisés dans les années 1990 ou au début des années 2000<sup>25-32</sup>. La structure cristallographique des récepteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub> a été résolue récemment<sup>33,34</sup>.

Les récepteurs P2Y possèdent 7 TM constitués d'hélices- $\alpha$  avec un segment terminal NH<sub>2</sub> qui est extracellulaire et un segment terminal COOH qui est intracellulaire. Le TM<sub>6</sub>, très conservé, contribue fortement à la reconnaissance du ligand<sup>35-38</sup>. La portion C-terminale est, quant à elle, importante pour le couplage aux protéines G<sup>39</sup> ainsi que pour les phénomènes de régulation de l'activité du récepteur (internalisation, désensibilisation, localisation)<sup>40-42</sup>.

On classe généralement ces récepteurs en deux sous-familles en fonction de la voie de signalisation qu'ils activent<sup>43</sup>. Ainsi, les « P2Y<sub>1</sub>-like receptors », composés de P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> et P2Y<sub>6</sub> sont couplés à la protéine G<sub>q</sub> qui va stimuler la PLC et entraîner une libération de calcium des stocks intracellulaires. Les « P2Y<sub>12</sub>-like receptors », composés de P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> et P2Y<sub>14</sub> sont, eux, couplés à la protéine G<sub>i</sub> et vont entraîner une inhibition de l'AC, diminuer la production d'AMPc et l'activité de la PKA mais également moduler l'activité de certains canaux ioniques.

#### 1.2.2.2. Localisation et rôles physiopathologiques

Les récepteurs P2Y sont largement exprimés en périphérie et dans le système nerveux. Les animaux KO pour ces récepteurs et la pharmacologie ont permis de mettre en évidence leurs rôles dans plusieurs fonctions physiologiques et pathologiques. Leur principal rôle en périphérie est l'agrégation plaquettaire médiée par les récepteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub><sup>44</sup>. Aujourd'hui, différentes molécules bloquant le récepteur P2Y<sub>12</sub> et donc l'agrégation plaquettaire sont utilisées en clinique en prévention et thérapies cardiovasculaires<sup>45</sup>. Dans le système nerveux central (SNC), les récepteurs P2Y sont exprimés au niveau neuronal,

astrocytaire, oligodendrocytaire et microglial. Ils jouent des rôles physiologiques importants dans la neurotransmission, la neurogenèse et la communication cellulaire. Ils sont aussi impliqués dans plusieurs pathologies du SNC telles que, l'ischémie cérébrale, la douleur et les maladies neurodégénératives.

#### I.2.2.2.a. Les récepteurs P2Y neuronaux

Plusieurs P2Y (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>13</sub>) sont exprimés par les neurones. La localisation présynaptique de ces récepteurs va permettre la modulation de la transmission synaptique<sup>46</sup>. D'une part, les P2Y présynaptiques vont entraîner une diminution de la libération de divers neurotransmetteurs tels que le glutamate, le GABA, la noradrénaline ou la dopamine<sup>47</sup>. D'autre part, ces récepteurs vont moduler l'activité ou l'insertion à la membrane de plusieurs récepteurs canaux tels que les récepteurs NMDA, GABA<sub>A</sub> ou VACCs<sup>48</sup>. De manière générale, l'activation des récepteurs P2Y, inhibe la transmission post-synaptique excitatrice médiée par les récepteurs NMDA et augmente l'inhibition médiée par les récepteurs GABA<sub>A</sub>.

#### I.2.2.2.b. Les récepteurs P2Y gliaux

Les astrocytes expriment principalement P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> et P2Y<sub>4</sub>. P2Y<sub>1</sub> a été le plus étudié. Son activation va conduire, via la voie PLC, à une libération de calcium des stocks intracellulaires et une augmentation du calcium intracellulaire. L'activité P2Y<sub>1</sub> peut ainsi moduler la concentration extracellulaire de neurotransmetteurs en modulant l'activité des transporteurs ou la libération de différents neurotransmetteurs (glutamate et ATP)<sup>49</sup>. En condition pathologique, P2Y<sub>1</sub> est généralement surexprimé et la signalisation calcique est augmentée<sup>50</sup>. Une étude *in vivo* sur des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer, a mis en évidence une augmentation de la concentration calcique intracellulaire dans les astrocytes proches des plaques  $\beta$ -amyloïdes<sup>51</sup>. Dans ces conditions, une inhibition de P2Y<sub>1</sub> permet le retour à une signalisation calcique normale, suggérant le rôle central de ce récepteur dans la signalisation calcique astrocytaire<sup>52</sup>.

Les cellules microgliales expriment principalement P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>13</sub>. Leur expression est fortement dépendante du niveau d'activation des cellules microgliales<sup>52</sup>. Par manque d'outils pharmacologiques, le rôle précis de P2Y<sub>13</sub> reste inconnu. P2Y<sub>12</sub>, exprimé exclusivement par les microglies, agit comme un senseur sensible à l'ATP extracellulaire. Plusieurs études ont mis en évidence son rôle en tant que régulateur des phénomènes de mouvements et de chimiotaxie microgliaux<sup>53</sup>. Enfin, le récepteur P2Y<sub>6</sub>, a été décrit comme un acteur important dans les processus de phagocytose<sup>54</sup>.

### I.2.3. Les récepteurs P2 ionotropiques P2X

Les récepteurs P2X sont des canaux cationiques activés par l'ATP et exprimés chez la plupart des vertébrés. Néanmoins, on retrouve ces récepteurs chez certains invertébrés comme le trématode *Schistosoma mansoni* ainsi que chez certaines espèces invertébrées marines telles que l'anémone *Nematostella vectensis* ou le mollusque *Lottia gigantea*. Ces récepteurs ont aussi été identifiés sur des organismes plus primitifs tels que l'amibe unicellulaire

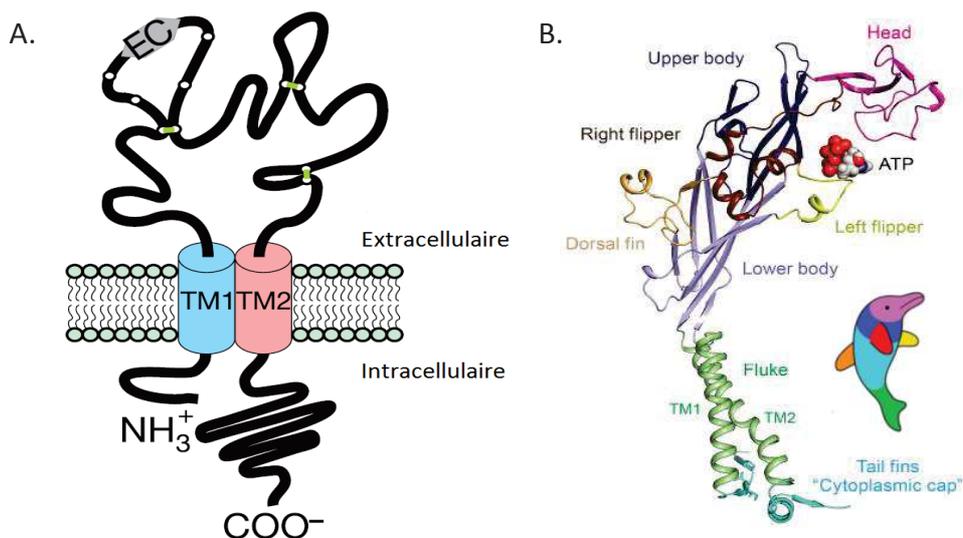
*Dictyostelium discoideum* ou l'algue verte *Ostreococcus tauri*. De façon étonnante, les récepteurs P2X semblent absents chez de nombreux animaux modèles tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le nématode *Caenorhabditis elegans* ou l'arthropode *Drosophila melanogaster*<sup>55</sup>. Chez les mammifères, cette famille est composée de 7 sous-unités (P2X1 à P2X7). En 1994, le premier récepteur P2X1 a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de canal déférent de rat exprimée dans des oocytes de xénope<sup>56</sup>. Deux ans plus tard, en 1996, le dernier membre de la famille, P2X7, d'abord nommé P2Z, fut identifié et caractérisé<sup>57</sup>. Quinze années durant, la topologie et les propriétés moléculaires des récepteurs P2X ont été le fruit de résultats issus d'études de biochimie, de mutagenèse et d'électrophysiologie. La résolution cristallographique d'une forme tronquée du récepteur P2X4 de zebrafish en conformation fermée, en 2009<sup>58</sup>, puis en conformation ouverte, en 2012<sup>59</sup>, a permis de préciser un grand nombre de ces propriétés moléculaires. Plus récemment, la structure des récepteurs P2X3 humain<sup>60</sup> et P2X7 de panda<sup>61</sup> et de poulet<sup>62</sup> ont été résolus. La résolution de la structure du récepteur P2X3 humain en conformation ouverte, fermée et désensibilisée a permis d'apporter des informations cruciales quant aux mécanismes de gating des récepteurs P2X.

#### 1.2.3.1. Propriétés moléculaires

##### 1.2.3.1.a. Topologie

Les récepteurs P2X sont composés de 7 sous-unités, nommées P2X1 à P2X7 et codées par différents gènes. Pour certaines sous-unités, notamment P2X4 et P2X7, ces gènes sont adjacents, reflétant probablement une duplication génétique récente au cours de l'évolution<sup>63</sup>. Chez le rat, les sous-unités protéiques possèdent entre 379 (P2X6) et 595 acides aminés (P2X7) et l'homologie de séquence entre les différents P2X varie entre 40 et 50 %<sup>64</sup>.

Toutes les sous-unités partagent une topologie commune et sont composées de régions C-terminales et N-terminales intracellulaires, de deux segments transmembranaires (TM1 et TM2) et d'une large boucle extracellulaire riche en glycosylation et en ponts disulfures (Figure 3A)<sup>65</sup>. D'après la forme cristallisée des récepteurs P2X4<sup>58</sup>, P2X3<sup>60</sup> et P2X7<sup>61,62</sup>, chaque sous-unité prend la forme d'un dauphin ayant la tête vers le haut. Les deux segments transmembranaires, composés chacun de 6 hélices  $\alpha$ , forment la queue du dauphin. La partie extracellulaire est composée du corps, principalement formé de feuillets  $\beta$ , de la tête, composée de feuillets  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$  ainsi que de 3 autres éléments distincts : la nageoire dorsale, la nageoire droite et la nageoire gauche (Figure 3B). Alors que la forme cristallisée de P2X4 était dépourvue des parties N et C-terminales, la forme cristallisée de P2X3, a permis de mettre en évidence la présence d'une « cape cytoplasmique » composée de feuillets  $\beta$  et jouant probablement un rôle important dans la stabilisation de la conformation ouverte des récepteurs.



**Figure 3 : Structure moléculaire d'une sous-unité des récepteurs P2X**

(A) Représentation schématique de la structure moléculaire des récepteurs P2X, composés de deux segments transmembranaires (TM1 et TM2), de parties N et C-terminales cytoplasmiques et d'une large boucle extracellulaire comprenant plusieurs ponts disulfures et plusieurs sites de glycosylation (d'après Kakh et al,<sup>65</sup>). (B) Structure cristallographique du récepteur P2X3 humain. Chaque sous-unité possède une forme de dauphin, dont les différentes parties sont représentées par différentes couleurs (d'après Mansoor et al,<sup>60</sup>).

#### 1.2.3.1.b. Glycosylation

La résolution cristallographique des récepteurs P2X mais aussi des études de mutagenèse sur P2X1, P2X2, P2X3 et P2X7 ont montré que la large boucle extracellulaire est riche en glycosylation<sup>58</sup>. Ces sites de N-glycosylation, caractérisés par le motif Asn-X-Ser/Thr (où X est n'importe quel acide aminé sauf une proline), varient de 2 à 5 selon les sous-unités et apparaissent importants pour la fonction du récepteur mais aussi pour son adressage à la membrane. En effet la mutation de ces sites peut entraîner une diminution des courants induits par l'ATP ou réduire l'expression des récepteurs à la membrane<sup>66-69</sup>.

#### 1.2.3.1.c. Pont disulfure

Un pont disulfure (S-S) est un lien covalent fort qui, par oxydation, réunit les fonctions thiols de deux cystéines d'une séquence peptidique. Ces ponts participent à la structure tertiaire et quaternaire des protéines. Dix cystéines sont conservées dans la partie extracellulaire de toutes les sous-unités P2X. Les mutations des cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures de P2X1 et P2X2 peuvent entraîner une diminution des courants induits par l'ATP ainsi qu'une diminution d'adressage à la membrane, probablement dues à des changements de conformation<sup>70,71</sup>. Enfin, une étude montre que ces ponts disulfures pourraient être impliqués dans la potentialisation de l'activité P2X4 par le zinc<sup>72</sup>. Néanmoins, ces ponts disulfures ne semblent pas cruciaux pour la fonction du récepteur.

#### I.2.3.1.d. Phosphorylation

Les sites de phosphorylation des récepteurs P2X ont principalement été identifiés sur les parties N et C-terminales. Ces parties intracellulaires sont très variables d'une sous-unité à l'autre. Néanmoins, un motif de phosphorylation (TXR/K) pour la protéine kinase C (PKC), a été identifié sur la partie N-terminale de la plupart des sous-unités. La mutation de ce site entraîne une altération de la désensibilisation P2X1 et P2X2<sup>73,74</sup>. D'autres études sur P2X3 ont montré que la mutation de ces sites pouvait moduler les courants après activation par l'ATP<sup>75</sup>. Cependant, la démonstration que le résidu thréonine est effectivement phosphorylé n'a pas été apportée. Ces résultats sont donc à interpréter avec prudence.

D'autres études pharmacologiques et de mutagenèse ont montré que des phosphorylations de la partie C-terminale pouvaient aussi être impliquées dans la régulation de l'activité de P2X4 et P2X7<sup>76</sup>. Ainsi, pour P2X4, une implication de la PKA dépendante de l'AMPC a été mise en évidence<sup>77</sup>.

#### I.2.3.1.e. Trafic et endocytose

Un motif YXXXX commun à tous les P2X, situé juste au-dessous du TM2, a été identifié au niveau de la queue C-terminale des récepteurs. Ce motif régule l'expression membranaire des récepteurs P2X. Des mutations au niveau de ce motif entraînent une réduction du trafic des récepteurs à la membrane en accélérant notamment leur internalisation et leur dégradation lysosomale. Ce motif joue donc un rôle important dans la stabilité du récepteur à la membrane<sup>78</sup>.

Parmi les récepteurs P2X, le trafic particulier de P2X4 a été très étudié. En effet, après activation par l'ATP, P2X4 est rapidement internalisé dans les endosomes précoces puis envoyé dans des lysosomes de recyclage pour être ensuite réinséré à la membrane plasmique et/ou dégradé. Un deuxième motif, YXXGL, a été identifié comme responsable du trafic et recyclage rapide<sup>79</sup>. Ce domaine permet en effet l'interaction du récepteur avec la protéine adaptatrice AP2 qui va entraîner son endocytose. Enfin, un motif di-leucine sur la partie N-terminale a aussi été décrit comme importante pour la localisation lysosomale de P2X4<sup>80</sup>.

#### I.2.3.1.f. Stœchiométrie et formation d'hétéromères

Contrairement aux deux autres grandes familles de récepteurs ionotropiques, les récepteurs glutamatergiques et nicotiques qui sont respectivement tétramériques et pentamériques, les canaux P2X sont trimériques. A la membrane, les récepteurs P2X peuvent donc former des homotrimères ou hétérotrimères.

Très tôt, des études électrophysiologiques sur des neurones de ganglions rachidiens ont montré que 3 molécules d'ATP sont nécessaires pour activer les récepteurs P2X, suggérant une organisation trimérique<sup>80</sup>. Plus tard, des études biochimiques (cross-linking des protéines membranaires ou analyse en gel natif) ont effectivement montré que P2X1 et P2X3 migrent sous forme de trimères en western blot<sup>81</sup>. Une étude en microscopie à force atomique (AFM) et des études en microscopie électronique ont confirmé la formation de trimères<sup>82,83</sup>. Enfin,

la cristallisation de P2X4 et de P2X3 a définitivement démontré que ces récepteurs sont présents à la membrane sous forme de trimères<sup>58,60</sup>. D'après ces structures, chaque sous-unité interagit avec la sous-unité voisine principalement via la partie haute du corps (Figure 5).

Les homotrimères P2X ont été depuis longtemps caractérisés au niveau biophysique et pharmacologique (cf. chapitre pharmacologie des récepteurs P2X) et de nombreuses études ont montré leur expression en tissus natifs<sup>84</sup>. Tous les récepteurs homotrimériques sont fonctionnels excepté P2X6 qui ne semble pas former de trimères<sup>83</sup>. P2X5 quant à lui est peu fonctionnel chez les rongeurs. Chez l'homme, P2X5 est souvent non fonctionnel. En effet, dans 95 % de la population la présence d'un polymorphisme au niveau d'une jonction intro-exon ne permet pas la reconnaissance de l'exon 10 par la machinerie d'épissage. Il en résulte que la protéine encodée ne contient pas la majeure partie du TM2. Cependant, le P2X5 humain complet et fonctionnel génère des courants de forte intensité en système recombinant<sup>85,86</sup>.

Les propriétés biophysiques et pharmacologiques des récepteurs P2X homomériques exprimés en système hétérologue ne correspondent pas tout à fait aux propriétés observées en tissus natifs. Ces observations ont suggéré une possible hétéro-oligomérisation.

Le premier hétéromère mis en évidence a été P2X2/P2X3<sup>87</sup>. C'est aujourd'hui le mieux caractérisé et cette association a été confirmée en tissu natif. Il est exprimé au niveau du système sensoriel, possède une signature électrophysiologique et pharmacologique spécifique, et est impliqué dans la transmission douloureuse<sup>88</sup> (cf. chapitre rôle dans la douleur). Deux autres hétéromères ont été décrits en système hétérologue et en tissu natif : P2X1/P2X5 et P2X2/P2X5. P2X1/P2X5 possède des propriétés fonctionnelles claires et serait impliqué dans l'excitabilité astrocytaire<sup>89,90</sup>. P2X2/P2X5, quant à lui, a été caractérisé au sein du laboratoire par des approches de co-immunoprécipitations, cross-linking et BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)<sup>91</sup>, et semble exprimé dans le cerveau et au niveau de la moelle épinière bien que son rôle précis reste à ce jour inconnu<sup>92</sup>.

Une étude menée en 1999 et basée sur la co-immunoprécipitation des différentes sous-unités P2X a en effet mis en évidence que la plupart des sous-unités peuvent former des hétéromères avec les autres sous-unités (sauf P2X7)<sup>93</sup>. Ainsi les hétéromères P2X1/P2X2, P2X1/P2X4, P2X2/P2X4, P2X2/P2X6 et P2X4/P2X7 ont été co-immunoprécipités en système recombinant. Des études supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour confirmer leur existence en tissu natif.

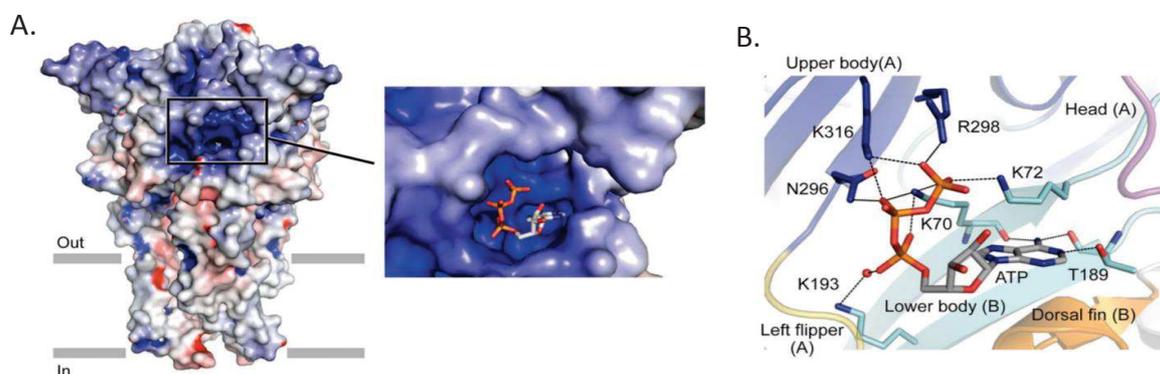
#### 1.2.3.2. Structure/Fonction

##### 1.2.3.2.a. Site de liaison à l'ATP

Plusieurs années d'études de mutagenèse et d'électrophysiologie sur les différents homotrimères ont apporté des informations cruciales quant à la localisation du site de liaison de l'ATP. D'après ces études, chaque trimère possède trois sites de liaison pour l'ATP. Pour chaque site, plusieurs résidus paraissent jouer un rôle important pour la liaison de la molécule d'ATP (K69, K308, F289, N140 et L186 selon la numérotation de P2X2 chez le rat)<sup>94-99</sup>.

Néanmoins, les données issues de la mutagenèse restent limitées car elles ne permettent pas de discriminer les effets du site de liaison de l'agoniste de ceux entraînant simplement une modification du gating.

C'est la structure de P2X4 chez le zebrafish qui a définitivement confirmé l'existence de 3 sites de liaisons de l'ATP équivalents et extracellulaires situés à l'interface des différentes sous-unités<sup>59</sup>. Chaque site est situé à l'intérieur d'une cavité formée par deux sous-unités voisines. Cette cavité est entourée par la tête et la nageoire gauche de la première sous-unité et par la nageoire dorsale de la seconde sous-unité (Figure 4). Le résidu L217 est impliqué dans la reconnaissance du ribose, alors que les résidus K70, K72, R298, N296 et K316 stabilisent la chaîne triphosphate dans une structure en forme de U. Enfin, les résidus K70 et T189, forment des ponts hydrogènes avec la base adénine tandis que L191 et I232 forment aussi des interactions hydrophobiques avec l'adénine (Figure 4). La résolution des structures de P2X3 et P2X7 a permis de confirmer l'implication de ces résidus dans la liaison de l'ATP<sup>60,61</sup>.



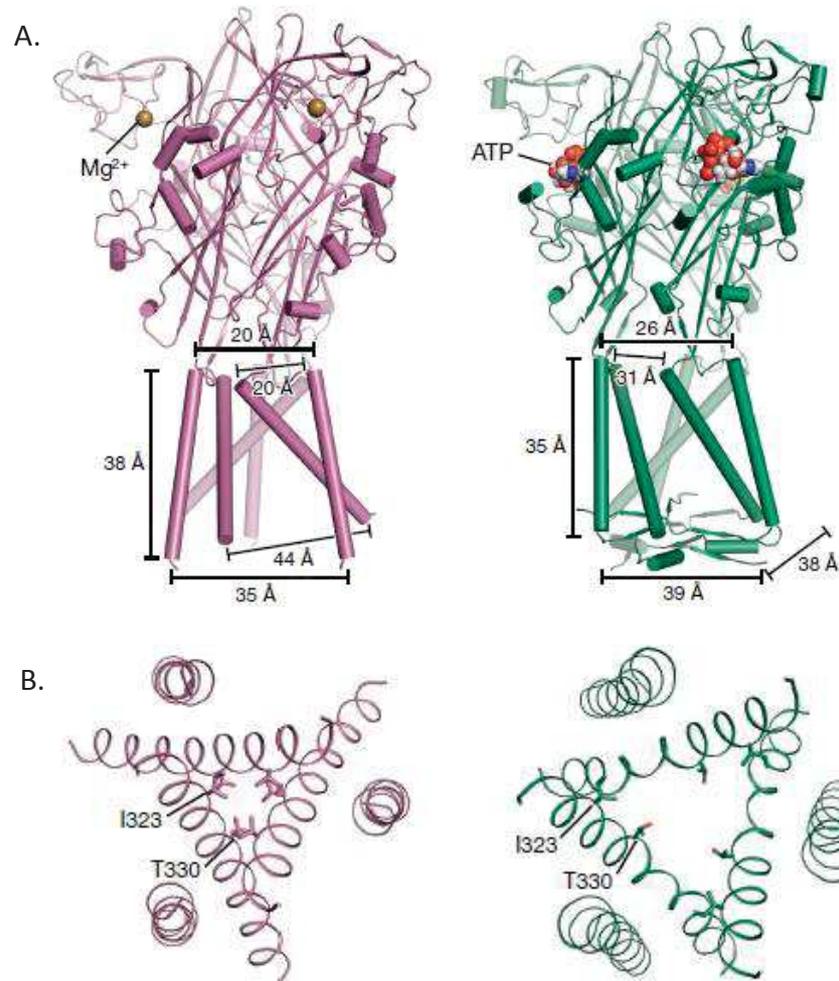
**Figure 4 : Site de liaison à l'ATP (d'après Hattori et al, <sup>59</sup>)**

(A) Potentiel électrostatique de surface du récepteur P2X4 de zebrafish de - 10 kT (rouge) à + 10 kT (bleu). Grossissement sur la cavité chargée positivement formée par deux sous-unités adjacentes. La molécule d'ATP vient se fixer en forme de U dans la cavité. (B) Détail des résidus impliqués dans la fixation de la molécule d'ATP dans cette cavité. Les lignes noires en pointillé représentent les liaisons hydrogène.

#### 1.2.3.2.b. Gating

Le gating correspond au changement de conformation de la protéine suite à la liaison de l'ATP et conduisant à l'ouverture du pore. La comparaison structurale des récepteurs P2X en conformation ouverte et fermée a permis de comprendre précisément les changements conformationnels qui interviennent lors du gating<sup>60</sup>. L'ATP entraîne d'abord la fermeture de la cavité située entre la tête de la première sous-unité et la nageoire dorsale de la deuxième, à la suite de quoi la sortie de la nageoire gauche de la cavité entraîne une flexion extérieure du corps de chaque sous-unité. Enfin, la partie basse du corps, directement couplée au TM1 et TM2, entraîne leur flexion extérieure menant directement à l'ouverture du canal ionique. Vue de dessus, cette flexion des TM vers l'extérieur ressemble à un mouvement d'ouverture de l'iris (Figure 5B).

Alors que la cristallisation de P2X4 décrivait seulement une rotation rigide des segments transmembranaires lors du gating, la cristallisation avec les parties N et C-terminales de P2X3 a permis de mettre en évidence une modification du pas des hélices- $\alpha$  transmembranaires. Cette modification permettrait la mise en place de la cape cytoplasmique composée d'un réseau de feuillettes  $\beta$  recouvrant la surface cytoplasmique du pore et permettant de stabiliser le canal en conformation ouverte (Figure 5A).



**Figure 5 : Structure du récepteur P2X3 humain en conformation fermée et ouverte (d'après Mansoori et al,<sup>60</sup>)**

(A) Structure des trimères du récepteur P2X3 humain cristallisé en conformation fermée (gauche) et ouverte (droite), vue parallèle à la membrane. (B) Structure des trimères de P2X3 humain cristallisé en conformation fermée (gauche) et ouverte (droite), vue de dessus du côté extracellulaire. Mouvement semblable à l'ouverture d'un iris suite à la fixation de l'ATP.

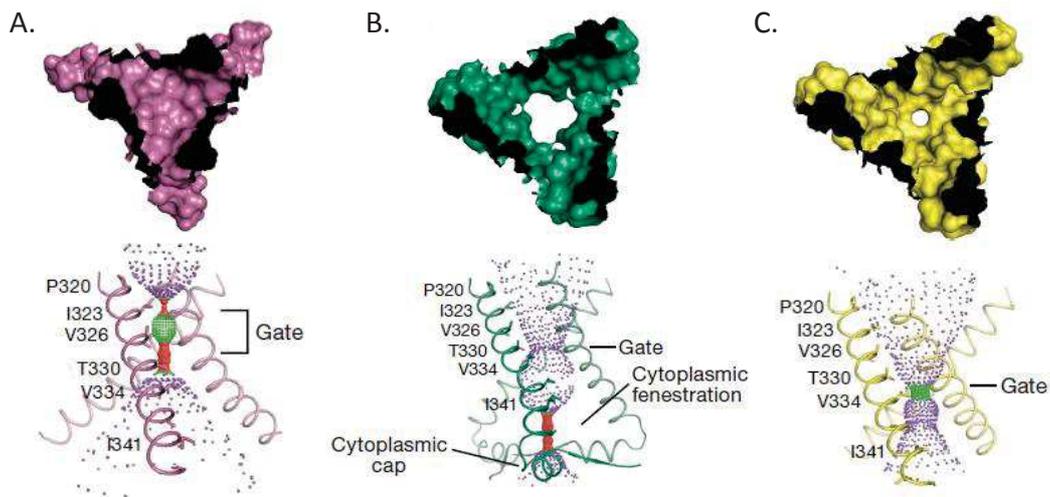
#### 1.2.3.2.c. Pore et accès des ions

Le pore est une structure continue et ininterrompue permettant le passage d'ions au travers de la membrane. Les principaux résidus impliqués dans la formation du pore ont historiquement été identifiés par la technique SCAM (Substitued Cystein Accessibility Method). Dans cette technique, les courants sont mesurés avant, pendant et après l'ajout de composés methan thiosulfonate (MTS), d'argent ( $\text{Ag}^+$ ) ou de Cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) qui vont réagir

ou non sur les cystéines libres des sous-unités mutées. Cette technique a permis de mettre en évidence l'implication de plusieurs résidus du TM2 dans la formation du pore notamment T336 et T339 qui formeraient la porte du canal de P2X2<sup>100</sup>.

Du fait de la troncation des parties N et C-terminales, les premières structures de P2X4 n'ont pas permis de confirmer tous les résultats obtenus par SCAM. La structure de P2X3, avec ses parties N et C-terminales, a permis de préciser les résidus impliqués dans la formation du pore. Le TM2 et les résidus I323, V326, T330 et V334 forment le pore (numérotation du P2X3 humain). En conformation fermée, les résidus I323 et T330 forment les limites du pore du côté extracellulaire et cytoplasmique respectivement. Un troisième résidu, V326 participe à l'occlusion du pore (Figure 6A). En conformation ouverte, P2X3 forme un pore continu d'un diamètre d'environ 6,4 Å. Dans ce cas, les résidus I323 et V326, qui ont été poussés vers le haut et qui ont subi une rotation vers l'extérieur, forment le centre du pore du canal. Le résidu T330 forme la région la plus étroite du pore (Figure 6B). Enfin, dans la conformation désensibilisée, la montée et la rotation du résidu V334, entraîne la formation d'un pore d'un diamètre de 3 Å, trop étroit pour permettre le passage des ions Na<sup>++</sup> hydratés (Figure 6C).

Concernant l'accès des ions au niveau du canal, la cristallisation en conformation fermée de P2X4 a tout d'abord suggéré deux voies possibles par lesquelles les ions pouvaient arriver jusqu'au pore<sup>58</sup>. Une voie centrale, formée de vestibules, le long de l'axe central du récepteur, ou une voie latérale, formée par trois fenêtres proches de la bicouche lipidique. Les cristallisations en conformation ouverte de P2X4 et P2X3 ont montré que la voie centrale était trop étroite pour permettre le passage d'ions alors que les fenêtres latérales étaient grandes ouvertes. Cette observation est en accord avec d'autres études fonctionnelles et informatiques<sup>101,102</sup>. La structure en conformation ouverte de P2X3 montre que la cape cytoplasmique forme un orifice trop étroit pour permettre la sortie des ions le long de l'axe central. La sortie des ions du côté cytoplasmique s'effectue donc probablement aussi via des fenêtres latérales.



**Figure 6 : Localisation de la porte du canal P2X3 humain en conformation fermée (A), ouverte (B) et désensibilisée (C) (d'après Mansoori et al,<sup>60</sup>)**

Représentation schématique en vue de dessus (en haut) et représentation du pore ionique (en bas) pour les conformations : fermée en violet (A), ouverte en vert (B) et désensibilisée en jaune (C).

#### 1.2.3.2.d. Sélectivité ionique et perméabilité calcique

En condition physiologique, les récepteurs P2X sont décrits comme des canaux cationiques non sélectifs perméables aux ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , et  $\text{Ca}^{2+}$ . Comme les autres canaux cationiques, le potentiel de membrane et le gradient électrochimique vont favoriser une entrée de cations dans la cellule et provoquer une dépolarisation membranaire et éventuellement la propagation de potentiels d'action. L'activation des récepteurs P2X va également conduire à l'activation de nombreux processus physiologiques dus à l'influx de calcium<sup>103,104</sup>.

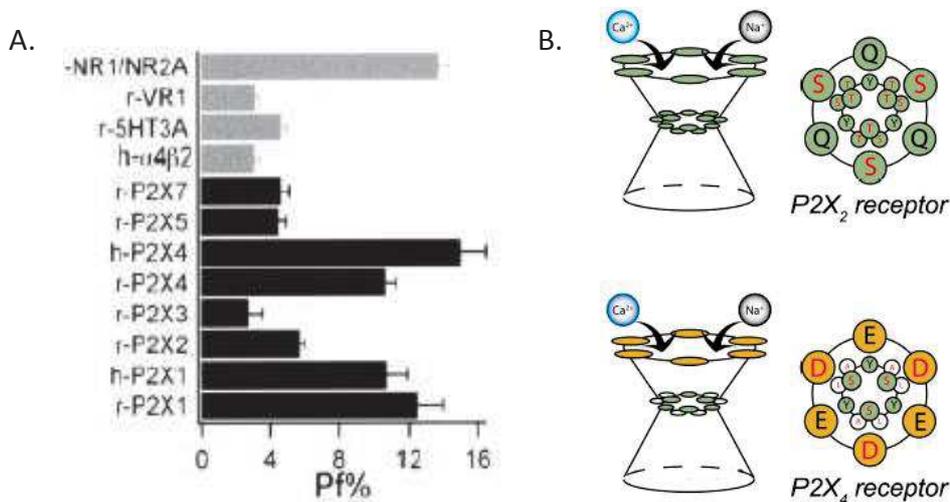
Bien que décrits comme cationiques non sélectifs, une perméabilité chlorure a été mesurée pour le P2X5 humain en système hétérologue, mais les bases moléculaires responsables de cette perméabilité restent à ce jour inconnues<sup>85</sup>. Une perméabilité chlorure a été également décrite pour le récepteur P2X5 de poulet<sup>105</sup>.

Une caractéristique importante des récepteurs P2X est leur forte perméabilité calcique. Deux méthodes ont permis d'évaluer cette dernière. La première estime la perméabilité relative du calcium par rapport à d'autres ions monovalents tels que le sodium ( $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}}$ ) ou le césium ( $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Cs}}$ ). Cette méthode électrophysiologie est basée sur le calcul des potentiels d'inversion à des concentrations de calcium extracellulaires différentes<sup>106</sup>. Néanmoins, cette technique ne permet pas de conserver un environnement ionique extracellulaire physiologique. Pour cette raison, une méthode alternative, basée sur des méthodes électrophysiologiques et de fluorescence, a été développée pour estimer la perméabilité calcique. Cette dernière consiste à mesurer, simultanément, le courant ionique en patch-clamp et l'activation d'une sonde calcique fluorescente qui reflète directement l'influx de calcium à travers le pore du canal. Le ratio entre ces deux mesures va donner une fraction calcique en pourcentage (Pf %) <sup>107,108</sup>.

Les récepteurs homotrimeriques P2X1 et P2X4 ont la plus haute perméabilité calcique (Pf de 12 % et 14 % respectivement)<sup>109</sup>. De façon surprenante, c'est autant que les récepteurs ionotropiques du glutamate NMDA. Les autres homotrimeres ont une fraction calcique comprise entre 2 et 5 %, comparable à celle d'autres canaux ioniques tels que les récepteurs nicotiques, sérotoninergiques ou TRPV1 (Figure 7A). La forte perméabilité calcique des récepteurs P2X a aussi été confirmée en tissus natifs<sup>110</sup>.

D'un point de vue moléculaire, la forte perméabilité calcique de certains récepteurs P2X est probablement due à des interactions ioniques entre le calcium et les résidus chargés négativement situés au niveau de la bouche du pore du canal. La perméabilité calcique pour P2X1 et P2X4 est en grande partie dépendante des acides aminés E52 et D331 (numérotation P2X4). En effet, leur remplacement par des acides aminés non chargés diminue fortement la perméabilité calcique. De plus, les récepteurs P2X2 humain et P2X4 de zebrafish, faiblement perméable au calcium, ne possèdent pas ces acides aminés (Figure 7B). Enfin, l'insertion de ces deux résidus chargés négativement sur P2X2 augmente l'influx calcique. L'ensemble de ces résultats montre donc l'importance des acides aminés E52 et D331 dans la perméabilité calcique des récepteurs P2X<sup>111</sup>.

D'autres acides aminés situés dans le TM2 ont été décrits sur P2X2 comme pouvant être impliqués dans la perméabilité calcique, suggérant une implication du pore lui-même. C'est notamment le cas des acides aminés T336, T339 et S340 dont la mutation peut entraîner une abolition complète de la perméabilité calcique<sup>112</sup>.



**Figure 7 : Perméabilité calcique des récepteurs P2X**

(A) Courants calciques partiels (Pf %) des récepteurs P2X en système recombinant. Les valeurs moyennes des Pf % des récepteurs P2X humain (h) et rat (r) homomériques sont mesurées après stimulation à l'ATP (3 ou 30 μM) en comparaison avec d'autres récepteurs canaux (glutamate, vanilloïde, sérotoninergique et nicotinique). P2X6 n'apparaît pas, car aucun courant n'est observé après stimulation à l'ATP (d'après Egan et al,<sup>109</sup>). (B) Représentation schématique des acides aminés formant le pore du canal de P2X2 (en haut) et P2X4 (en bas). Résidus du TM1 (en noir) et du TM2 (en rouges). Vue de côté (gauche) ou en vue de dessus (droite). L'anneau extérieur de P2X4 (résidus D et E) conservé pour P2X1 n'est pas conservé pour le récepteur P2X2. De la même façon, les 3 sérines (S) à l'intérieur de pore forment un anneau polaire, qui n'est pas conservées sur P2X2.

#### I.2.3.2.e. Propriétés de dilatation des récepteurs P2X

Suite à une activation prolongée des récepteurs P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> et P2X<sub>7</sub>, un état de perméabilité supplémentaire a été historiquement décrit. Cet état dilaté i<sub>2</sub> (en comparaison à l'état de perméabilité aux petits cations nommé i<sub>1</sub>) est censé permettre le passage progressif de larges cations tels que le N-méthyl-D-glucamine (NMDG) ou de différentes molécules fluorescentes cationiques dont le YO-PRO-1<sup>113,114</sup>. Deux hypothèses principales ont été émises pour expliquer ce phénomène : une propriété intrinsèque des récepteurs P2X a dilater progressivement<sup>115,116</sup> ou le recrutement de systèmes de transport parallèle, activés suite à l'activation des récepteurs P2X<sup>117</sup>.

Une étude récente sur P2X<sub>2</sub> a remis en cause le dogme de la dilatation<sup>118</sup>. Cette étude montre que l'enregistrement électrophysiologique d'un passage de l'état i<sub>1</sub> à i<sub>2</sub> ne reflète pas un changement progressif de perméabilité du NMDG<sup>+</sup> par rapport au sodium mais un changement de concentration ionique de part et d'autre de la membrane plasmique. En effet, en condition bi-ionique (NMDG<sup>+</sup><sub>out</sub>/Na<sup>+</sup><sub>in</sub>), l'application d'ATP entraîne un décalage progressif du potentiel d'inversion enregistré, classiquement interprété comme une augmentation progressive de la perméabilité au NMDG. Les auteurs montrent qu'en réalité, ce décalage est artéfactuel et dû à une déplétion en cations intracellulaire suite à l'activation soutenue des récepteurs P2X. De plus, ils montrent que la perméabilité NMDG<sup>+</sup> est aussi rapide que la perméabilité sodique et stable au cours du temps. L'état dilaté n'avait jamais été observé avec des enregistrements sur canal unique<sup>119</sup>. Une deuxième étude sur canal unitaire a mis évidence une perméabilité au NMDG<sup>+</sup> stable et aussi rapide que la perméabilité sodique<sup>120</sup>. Enfin, les mécanismes moléculaires impliqués dans ces perméabilités semblent être les mêmes. Ces deux études remettent donc en cause vingt ans d'études décrivant une dilatation progressive de certains canaux P2X. Il est probable que la perméabilité au YO-PRO1 suive les mêmes propriétés que celle du NMDG<sup>+</sup>. Néanmoins aucune preuve expérimentale n'a encore été apportée.

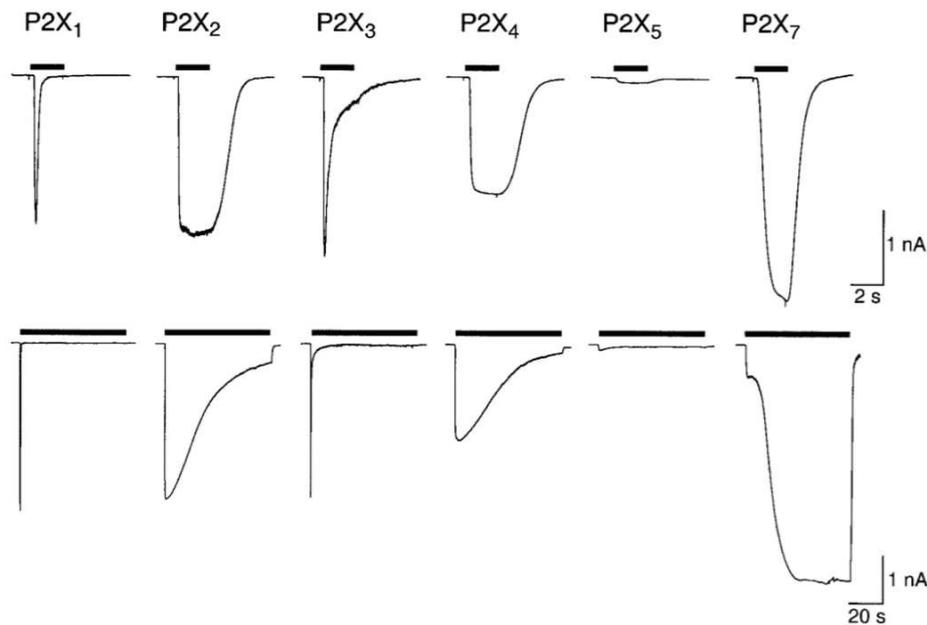
#### I.2.3.3. Pharmacologie des récepteurs P2X

##### I.2.3.3.a. Les agonistes

L'agoniste endogène de tous les récepteurs P2X est l'ATP. La quantité d'ATP nécessaire pour induire la moitié de la réponse maximale (EC<sub>50</sub>) est très variable selon les sous-unités P2X. Elle varie entre des valeurs sub-micromolaires (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> et P2X<sub>5</sub>), proche du micromolaire (P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> et P2X<sub>6</sub>), ou supérieures à 100 μM (P2X<sub>7</sub>).

Une application continue d'ATP sur certains récepteurs P2X peut produire une désensibilisation, un état dans lequel le récepteur n'est plus actif et incapable de s'activer de nouveau pendant un certain temps. Cette variabilité de désensibilisation a été déterminée en système recombinant pour chaque P2X et a permis de les classer en plusieurs groupes. Le premier regroupe les récepteurs avec une désensibilisation rapide (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>) alors que le deuxième est composé des récepteurs avec une désensibilisation lente (P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub>). Enfin, P2X<sub>7</sub> ne semble pas désensibiliser au cours du temps (Figure 8)<sup>121</sup>.

Au niveau moléculaire, des études de mutagenèses et l'utilisation de récepteurs chimères ont montré que plusieurs résidus des régions proximales intracellulaires jouent un rôle important dans les phénomènes de désensibilisation<sup>122,123</sup>. De façon intéressante, la cristallisation de P2X3 semble confirmer ces résultats<sup>60</sup>. En effet, la cape cytoplasmique précédemment décrite n'est pas retrouvée dans la structure désensibilisée. Les auteurs suggèrent que la vitesse de désensibilisation de cette cape suite à l'activation du récepteur pourrait être responsable des différentes vitesses de désensibilisation observées pour les récepteurs P2X.



**Figure 8 : Propriétés d'activation et cinétiques de désensibilisation des récepteurs P2X en système recombinant (d'après North, 2002<sup>121</sup>)**

Comparaison des désensibilisations rapides (en haut) et lentes (en bas) de différents homomères P2X de rat. Notez l'échelle de temps différente d'un facteur 10. Une désensibilisation rapide est observée pour P2X1 et P2X3. Application brève (2 secondes) d'ATP (30  $\mu$ M, 1 mM pour P2X7). Une désensibilisation lente est observée pour les récepteurs P2X2 et P2X4. Application prolongée (60 secondes) d'ATP (30  $\mu$ M, 1 mM pour P2X7). Courants enregistrés en cellule entière sur cellules HEK.

#### 1.2.3.3.b. Les autres agonistes

Historiquement, différents agonistes ont été utilisés pour activer les récepteurs P2X, mais aucun d'entre eux n'est spécifique d'un récepteur particulier. Ces agonistes sont principalement des dérivés de la molécule d'ATP tels que le 2-méthyl-thio-ATP (2meSATP) et le gamma-thio-ATP (ATP $\gamma$ S) qui sont métaboliquement plus stables. L'alpha-beta-méthylène-ATP ( $\alpha\beta$ -meATP) active préférentiellement P2X1 et P2X3 mais est aussi un agoniste partiel des P2X4. Le beta-gamma-méthylène-ATP ( $\beta\gamma$ -meATP), quant à lui, montre une préférence pour P2X1. Enfin, le benzoyl-ATP (Bz-ATP) est le ligand préférentiel de P2X7 mais active également P2X1, P2X2 avec une efficacité supérieure ou proche de celle de l'ATP<sup>124</sup>.

#### I.2.3.3.c. Les modulateurs allostériques positifs

L'ivermectine (IVM) est le modulateur allostérique positif (PAM) le plus utilisé et le mieux caractérisé. Cette molécule est utilisée comme antiparasitaire car elle active les récepteurs glutamatergiques ionotropiques des invertébrés ; l'IVM agit également sur différents récepteurs-canaux (nicotiniques, GABA). L'IVM facilite l'activation des récepteurs P2X4 et ralentit également leur désensibilisation à de faibles concentrations (0,1-3  $\mu\text{M}$ )<sup>125</sup>. L'IVM peut aussi activer le récepteur P2X7 humain mais pas celui de rat ou de souris<sup>126</sup>. L'utilisation de récepteurs chimères ainsi que des études de mutagénèses ont permis de mettre en évidence l'importance des TM et de certains résidus (dont Y42 et W46) dans l'interaction de l'IVM avec le récepteur. Aujourd'hui on pense que l'IVM facilite l'activation de P2X4 par son insertion entre les hélices transmembranaires<sup>127</sup>.

D'autres PAM ont été identifiés : le MRS2219 a été décrit comme PAM de P2X1 chez le rat sans être actif sur P2X2, P2X3 et P2X4<sup>128</sup>. Le PSB-10129 permet une potentialisation par trois des courants de P2X2 humains<sup>129</sup>. Enfin, le Bleu Cibacron agit aussi comme un PAM des récepteurs humains P2X3 et des récepteurs P2X4 de rat<sup>130</sup>.

#### I.2.3.3.d. Les antagonistes

Historiquement, plusieurs molécules non sélectives ont été utilisées. Parmi elles, on peut citer la suramine, Le réactif bleu 2 (RB-2), le PPADS et l'iso-PPADS. Le TNP-ATP est aussi très efficace pour bloquer P2X1 et P2X3 avec un IC50 (concentration pour laquelle 50 % de la réponse induite par l'ATP est inhibée) de l'ordre du nanomolaire mais aussi P2X2, P2X4 et P2X7 à de plus fortes concentrations<sup>131</sup>. L'implication des récepteurs P2X dans plusieurs pathologies (cf. rôle physiopathologique des récepteurs P2X) a conduit à des efforts considérables pour développer des antagonistes spécifiques de chaque homotrimère et certains hétérodimères. Aujourd'hui, différents antagonistes commerciaux sont disponibles exceptés pour les récepteurs P2X5 et P2X6. Les principaux antagonistes sont dérivés d'antagonistes non sélectifs (de la suramine pour les composés « NF » et du RB-2 pour les composés « PSB ») et ont la capacité d'inhiber ces récepteurs à des doses de l'ordre du nanomolaire (Tableau 1)<sup>131</sup>. Pour les hétéromères, la pharmacologie reste à ce jour pauvre et limitée. Bien qu'il n'existe aucun ligand sélectif pour les différents hétéromères décrits, les antagonistes sélectifs P2X3 ciblent généralement aussi les hétéromères P2X2/P2X3 (RO-4, RO-51)<sup>132,133</sup>.

La résolution des structures de certains récepteurs P2X en présence d'antagonistes, a permis de décrire les mécanismes moléculaires conduisant à l'inhibition des récepteurs. C'est notamment le cas de P2X3, cristallisé en présence de l'antagoniste non spécifique TNP-ATP et de l'antagoniste spécifique A317491<sup>60</sup>. Alors que l'ATP vient se fixer en forme de U dans sa cavité, ces antagonistes viennent se fixer plus profondément en forme de Y, empêchent la fixation de l'ATP et donc l'activation du récepteur. Au contraire, pour P2X7 cristallisé en présence du TNP-ATP, les auteurs décrivent une fixation du TNP-ATP proche de celle de l'ATP, mais où le groupe TNP ne permet pas une activation complète du récepteur<sup>62</sup>. Des études

structurales et fonctionnelles supplémentaires paraissent nécessaires pour comprendre et valider les différences observées entre ces deux récepteurs.

Enfin, la structure de P2X7 en présence de différents antagonistes spécifiques (Tableau 1), a permis de décrire de nouvelles cavités inter sous-unités, différentes du site de liaison à l'ATP, où se logeraient les différents antagonistes. La présence d'antagonistes dans ces poches empêcherait les changements de conformations de la partie haute du corps de la sous-unité et donc l'activation du récepteur<sup>61</sup>.

		P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X7
<b>Agonists (EC50, <math>\mu</math>M)</b>	ATP	0,1-1	1-30	1	10	10	100
	ADP	30	300	50	>100	300	>300
	2-meSATP	0,1-1	3-10	0,3	1-100	10	10
	ATP $\gamma$ S	10	1-30	1	-	-	-
	$\alpha\beta$ -meATP	1-3	>300	1	>300	>300	>300
	$\beta\gamma$ -meATP	10	>300	>300	-	-	>100
	Bz-ATP	3-30	30	-	-	500	5-10
<b>Antagonists (IC50, <math>\mu</math>M)</b>	suramin	1	10	3	>300	4	500
	PPADS	1	1	1	>300	3	50
	TNP-ATP	0,006	1	0,001	15	-	>30
	RB-2	>5	1,4	>10	>10	-	0,01
	NF279	<b>0,019</b>	0,76	1,62	>10		2,8
	NF449	<b>0,001</b>	47	1,8	>10		>10
	RO-1	<b>3</b>	>100	>100			
	NF770	0,94	<b>0,019</b>	0,074	>10		>10
	PSB-1011	0,422	<b>0,079</b>	0,494	>10		>10
	A-317491	2,5	4,1	<b>0,022</b>	2,7		8,6
	RO-4 (AF-353)	>5	>5	<b>0,008</b>	>5		>5
	RO-51 (AF-906)			<b>0,009</b>			
	5-BDBD				<b>1,6</b>		
	PSB-12054	6,52	>10	10	<b>0,19</b>		>10
	PSB-12062	>10	>10	>10	<b>1,38</b>		>10
	BX-430	5,00		5,00	<b>0,54</b>	5,00	>50
	A804598						<b>0,021</b>
A740003						<b>0,069</b>	
GSK1482160						<b>0,003</b>	
JNJ-54175446						<b>0,010</b>	
<b>Potentiators (EC50, <math>\mu</math>M)</b>	IVM				0,1-3		3 (h)
	MRS 2219	5,9					
	PSB-10129		0,49				
	Cibracon Blue			1,40	3-30 (h)		

**Tableau 1 : Pharmacologie des récepteurs P2X**

La sensibilité des 6 récepteurs (quand elle est mentionnée dans la littérature), pour les principaux agonistes non sélectifs (bleu), antagonistes non sélectifs (jaune), antagonistes sélectifs (gris) pour P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 et P2X7 (valeur IC50 en gras), et potentialisateurs. (h), effet pour le récepteur humain seulement. Tableau réalisé d'après Jacobson et al<sup>131</sup>, Stokes et al<sup>134</sup>, Bhattacharya<sup>135</sup>.

#### 1.2.3.3.e. Autres modulateurs

La fonction des récepteurs P2X peut être modulée par de nombreux ions ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$ )<sup>136</sup>. Le calcium extracellulaire bloque ou diminue les courants de P2X2, P2X3, P2X5, P2X7 mais n'a pas d'effet sur P2X1. Le magnésium bloque les courants P2X2 et P2X7. Le zinc, quant à lui, potentialise les courants de P2X2, P2X3 et P2X4 mais inhibe les courants de P2X1 et P2X7. De nombreuses études montrent que le pH, les stéroïdes, les lipides, et l'alcool peuvent aussi moduler l'activité des récepteurs P2X<sup>136</sup>.

Longtemps débattu, les sites de liaison des ions  $Mg^{++}$  et  $Zn^{++}$  ont été récemment décrits<sup>62</sup>. Une étude, se basant sur la structure du récepteur P2X de tique (*Amblyomma maculatum*), a permis de décrire deux sites distincts nommés M1 et M2. Le site M1, localisé au niveau d'une chambre centrale entre les sous-unités, permet la potentialisation par le  $Zn^{++}$  en facilitant les changements structuraux induits par l'ATP. Le site M2, couplé au site de liaison à l'ATP, pourrait quant à lui contribuer à la régulation par le  $Mg^{++}$ .

#### 1.2.3.4. Localisation et rôles physiopathologiques des récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont largement exprimés chez les vertébrés. On les retrouve dans de nombreux tissus : peau, muscle, colon, pancréas, intestin, vessie, cœur et au niveau du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP). La création d'animaux KO pour les gènes P2X1, P2X2, P2X3, P2X4 et P2X7 ont permis de déterminer leurs principaux rôles (Tableau 2)<sup>137</sup>.

En périphérie, plusieurs P2X ont des fonctions aujourd'hui bien décrites. P2X1 est exprimé au niveau du canal déférent et permet sa contraction au moment de l'éjaculation. En effet, les animaux KO ont une réduction drastique de leur fertilité. P2X1 joue aussi un rôle important au niveau rénal entraînant une vasoconstriction des artéioles afférentes de l'appareil glomérulaire. Enfin, ce dernier est aussi important dans l'activation des plaquettes sanguines et la formation de thrombose. P2X2, via son rôle dans la modulation synaptique, est impliqué dans la neurotransmission neurosensorielle, intestinale et gustative. Les animaux P2X2 KO vont, par exemple, souffrir d'incontinence ou de défauts gustatifs. De la même façon, P2X3 joue un rôle dans la neurotransmission sensorielle, et les animaux KO possèdent plusieurs phénotypes communs avec celui des animaux P2X2 KO (probablement un reflet de l'implication de hétéromères P2X2/P2X3). Néanmoins, le rôle dans la détection thermique paraît spécifique aux animaux P2X3 KO. P2X4 joue un rôle important dans le système vasculaire. Il est impliqué dans la régulation du tonus vasculaire via la libération d'oxyde nitrique (NO) et participe aussi au contrôle de la contractilité des cardiomyocytes. Enfin, P2X7 est impliqué dans les processus inflammatoires, dans le métabolisme squelettique et dans la sécrétion de certaines glandes exocrines (glandes salivaires et pancréatiques).

Dans le SNC, les récepteurs P2X sont exprimés par la plupart des cellules. Le paragraphe suivant va aborder en détail quelques contextes physiologiques et/ou pathologiques dans lesquels ces récepteurs jouent un rôle important.

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

**Tableau 2 : Principales fonctions physiologiques des sous-unités P2X déterminées grâce à l'utilisation d'animaux knock-out (KO) (d'après Kaczmarek-Hajek et al, <sup>137</sup>)**

#### 1.2.3.4.a. Rôle dans la transmission synaptique

En périphérie, l'ATP joue un rôle fonctionnel important dans la transmission synaptique rapide notamment au niveau des jonctions neuro-effectrices sympathiques<sup>138,139</sup>, des synapses neuro-neuronales<sup>140</sup> ou encore du système gastro-intestinal<sup>141</sup>. Dans le SNC, plusieurs études pharmacologiques ont montré que les récepteurs P2X pouvaient médier une transmission synaptique rapide dans plusieurs endroits du cerveau tels que l'hippocampe<sup>142</sup>, l'hypothalamus<sup>143</sup>, la moelle épinière<sup>144</sup> et le cortex somatosensoriel<sup>110</sup>. Néanmoins, ces observations *ex vitro* requièrent souvent de fortes stimulations électriques et n'ont pas été confirmées avec l'utilisation d'animaux KO. De plus, l'amplitude des mEPSCs (miniature excitatory post synaptic current) mesurés sont souvent de faible amplitude et observés dans des sous-populations de neurones. Enfin, plusieurs études ont montré que les récepteurs neuronaux P2X2, P2X4 et P2X6 sont principalement exprimés au niveau des dendrites et à la pérисynapse<sup>145,146</sup>. L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'ATP libérée à la synapse jouerait un rôle principalement neuromodulateur.

i. Les récepteurs P2X pré-synaptiques

De façon générale, l'activation des récepteurs P2X pré-synaptiques augmente la probabilité de libération des neurotransmetteurs via un influx de calcium. De nombreuses études ont notamment décrit, au niveau du SNC, une facilitation de la libération de glutamate.

L'activation des P2X pré-synaptiques des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (DRG) peut faciliter la libération de glutamate et moduler les signaux sensoriels<sup>147,148</sup>. Au niveau de l'hippocampe, l'activation des P2X2 pré-synaptiques augmente la libération de glutamate sur les interneurons GABAergiques du *striatum radiatum* mais pas sur les neurones pyramidaux de l'aire CA1, suggérant un rôle modulateur de ces récepteurs<sup>149</sup>. Enfin, une étude récente montre que l'activation des P2X4 pré-synaptiques des fibres myélinisées de l'aire CA3 de l'hippocampe peut conduire à une augmentation de la transmission synaptique basale et à une diminution de la plasticité à court terme<sup>150</sup>.

Aujourd'hui, bien qu'une réponse pré-synaptique facilitatrice ait été décrite dans plusieurs régions du système nerveux, le manque d'outils pour étudier spécifiquement ces récepteurs *in situ* ou *in vivo* ne permet pas de conclure quant à leurs fonctions physiologiques précises.

ii. Les récepteurs P2X post-synaptiques (Figure 9)

**Modulation de la transmission synaptique glutamatergique par la modulation des récepteurs AMPA**

Les récepteurs AMPA sont des récepteurs cationiques activés par le glutamate. Ils sont fortement exprimés au niveau de la densité post-synaptique des synapses excitatrices glutamatergiques et sont responsables de la dépolarisation synaptique. Deux études principales ont montré que la libération d'ATP par les astrocytes module l'activité synaptique des récepteurs AMPA par le biais des récepteurs P2X.

Une première étude, réalisée au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, a montré que la stimulation des récepteurs noradrénergiques astrocytaires entraîne une libération d'ATP qui va, à son tour, engendrer une augmentation des mEPSCs médiés par les récepteurs AMPA<sup>151</sup>. En effet, l'entrée de calcium induite par l'activation des P2X stimule l'activité de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), favorisant l'insertion des récepteurs AMPA à la synapse. Cette insertion est bloquée par l'utilisation de Brilliant Blue G (BBG) suggérant l'implication des récepteurs P2X7. Le BBG n'étant pas très spécifique et l'expression des récepteurs P2X7 dans les neurones étant sujette à caution, l'identité des récepteurs P2X impliqués dans ce phénomène reste encore inconnue.

Une deuxième étude récente montre que l'activation des récepteurs P2X (certainement P2X2), par la libération d'ATP astrocytaire, change l'efficacité synaptique glutamatergique au niveau de l'hippocampe<sup>152</sup>. Dans ce cas, l'activation des P2X entraîne une longue et lente diminution des mEPSCs médiés par les récepteurs AMPA. Cette observation est confirmée sur tranche aigue d'hippocampe, où l'application d'ATP conduit à une dépression des fEPSPs (field Excitatory PostSynaptic Potentials) enregistrés dans la région CA1. Les auteurs de cette étude

montrent enfin, en systèmes hétérologues, que l'entrée de calcium via P2X2 et P2X4, peut conduire à une internalisation des récepteurs AMPA dépendante de la dynamine. Cette internalisation est associée à une phosphorylation par la CaMKII de sites localisés au niveau de la queue C-terminale des sous-unités GluA1.

La libération d'ATP par les astrocytes semble donc moduler positivement ou négativement la transmission glutamatergique synaptique selon les régions étudiées et/ou le type de récepteur P2X impliqué. Ces résultats mettent aussi en lumière l'importance du système purinergique astrocytaire dans les phénomènes de neuromodulation.

### ***Modulation de la plasticité synaptique dépendante des récepteurs NMDA***

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs cationiques activés par le glutamate et la glycine. Localisés à la post-synapse, ils sont responsables de la phase lente des potentiels post synaptiques excitateurs (PPSE) et jouent un rôle primordial dans les phénomènes de LTP (Long Term Potentiation) et de mémorisation.

Le blocage pharmacologique des récepteurs P2X facilite l'induction de LTP dépendante des récepteurs NMDA suggérant que les récepteurs P2X diminuent cette LTP<sup>142</sup>. De façon opposée, une étude utilisant des animaux P2X4 KO révèle que la LTP des neurones de l'aire CA1 de l'hippocampe est réduite par rapport aux animaux sauvages<sup>153</sup>. Dans cette étude, l'IVM, un potentialisateur de P2X4 augmente la LTP chez les animaux sauvages mais pas chez les animaux P2X4 KO, suggérant une action facilitatrice de P2X4 sur la LTP. Il est intéressant de noter que l'IVM n'a pas d'effet sur le fEPSPs lorsque les stimulations sont appliquées à basses fréquences, mais que son effet est révélé lors de stimulations téaniques. Cette observation suggère que le récepteur P2X4 n'est activé que lors d'activités neuronales soutenues.

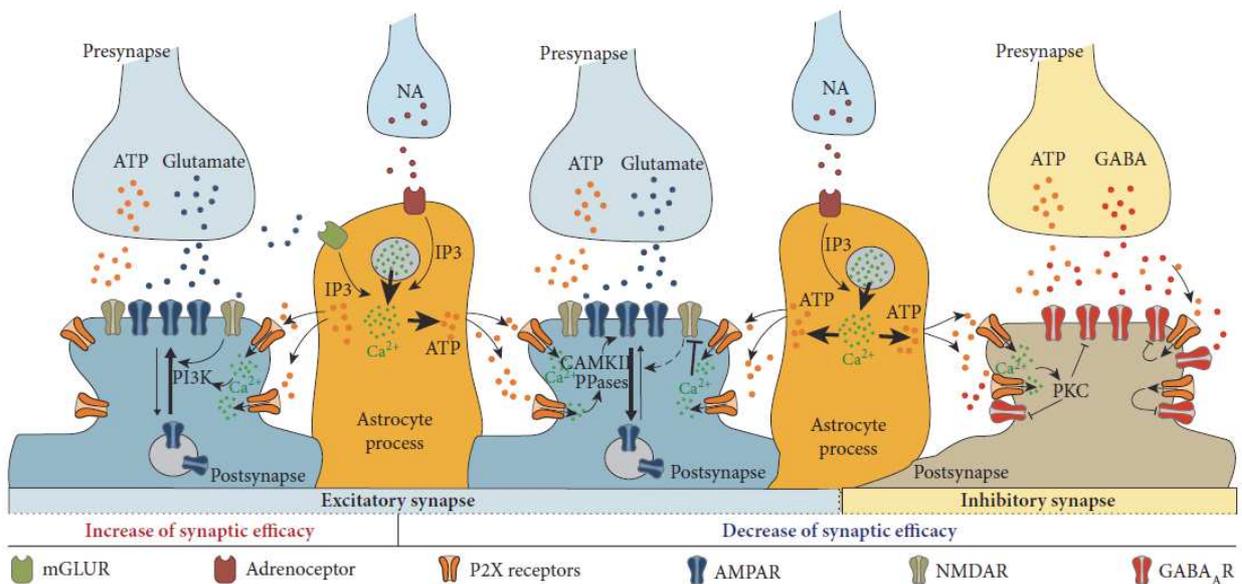
Une étude récente s'est intéressée au rôle de l'ATP libérée au niveau des synapses corticales<sup>154</sup>. Cette étude montre que la libération d'ATP gliale et neuronale peut activer les récepteurs P2X et réduire les courants induits par les récepteurs NMDA. Cet effet est dépendant d'une interaction entre les récepteurs NMDA et la calcineurine au sein du complexe protéique synaptique PSD-95. La diminution des courants NMDA est en effet renversée chez les souris P2X4 KO ou chez des animaux mutants pour le complexe PSD-95. Chez ces derniers, la LTP est bien augmentée, suggérant un rôle inhibiteur de la signalisation purinergique sur la LTP.

La diversité des effets observés selon les études suggère, en plus de l'inactivation des courants NMDA, des modulations bidirectionnelles complexes pouvant aussi impliquer les récepteurs AMPA ainsi que la signalisation inhibitrice GABAergique.

### ***Modulation des synapses inhibitrices GABAergiques***

Le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur du SNC. Au niveau des synapses GABAergiques, le GABA peut agir sur deux types de récepteurs, dont les récepteurs ioniques GABA<sub>A</sub>. Leur activation va entraîner une entrée de chlore et conduire à une hyperpolarisation.

La modulation des courants inhibiteurs par les P2X a d'abord été identifiée au niveau de l'hypothalamus où le blocage de l'endocytose des P2X4 va entraîner une dépression des courants GABAergiques et par conséquent une augmentation de l'excitabilité neuronale<sup>155</sup>. Dans ce cas, l'inhibition des courants GABA<sub>A</sub> par P2X4 semble due à un couplage physique entre les deux récepteurs. D'autres exemples d'inhibitions croisées ont été décrites entre les récepteurs GABA<sub>A</sub>/P2X2 et GABA<sub>A</sub>/P2X3<sup>156,157</sup>. Une étude récente montre que la libération d'ATP par les astrocytes du cortex peut moduler l'inhibition GABAergique<sup>158</sup>. Dans ce cas, l'inhibition des courants GABA<sub>A</sub> est indirecte et médiée par des phénomènes de phosphorylation dépendants de l'entrée de calcium par les P2X. Enfin, Ces phénomènes d'atténuation de l'inhibition GABAergique par les P2X peuvent faciliter l'induction de LTP.



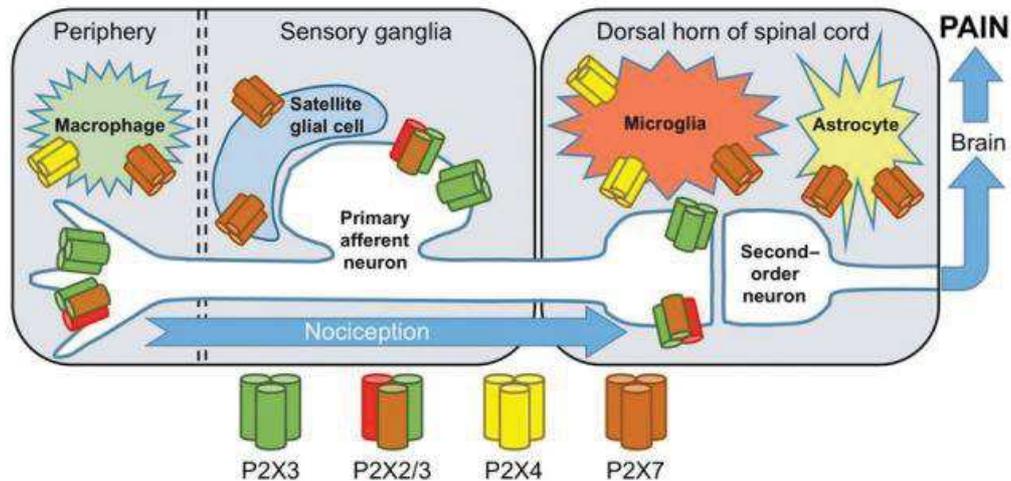
**Figure 9 : Neuromodulation des synapses excitatrices et inhibitrices par les récepteurs P2X (d'après Boué-Grabot et al, <sup>420</sup>)**

Modulation synaptique médiée par les P2X suite à une libération d'ATP par les astrocytes (en orange) ou les neurones. La noradrénaline et le glutamate entraînent une libération d'ATP par les astrocytes. L'activation des récepteurs P2X post-synaptiques au niveau des synapses glutamatergiques (en bleu) entraîne une insertion PI3K dépendante des récepteurs AMPA conduisant à une augmentation de l'excitabilité. Elle entraîne aussi une internalisation des récepteurs AMPA conduisant à une dépression synaptique (synapse du milieu). Les P2X peuvent aussi moduler la plasticité des synapses excitatrices en inhibant la fonction des récepteurs NMDA. Au niveau des synapses inhibitrices (en marron), l'ATP libérée diminue l'efficacité GABAergique par des altérations directes ou indirectes des récepteurs GABA<sub>A</sub>.

#### I.2.3.4.b. Rôle dans les douleurs chroniques

On sait depuis des décennies que l'ATP est impliquée dans les mécanismes de douleur aiguë. Dès les années 1970, de nombreuses études mettent en évidence qu'une injection d'ATP dans la peau humaine induit des signaux douloureux<sup>159</sup>. Aujourd'hui, on sait que plusieurs P2X

exprimés le long des voies nociceptives sont impliqués dans les phénomènes de douleurs neuropathiques et inflammatoires (Figure 10).



**Figure 10 : Localisation et distribution des sous-unités P2X dans les voies des douleurs périphériques (d'après Bernier et al,<sup>427</sup>)**

Schéma de la distribution cellulaire des récepteurs P2X exprimés le long des voies nociceptives périphériques. La stœchiométrie exacte des récepteurs hétéromères P2X2/P2X3 reste inconnue.

*i. Rôle des récepteurs P2X3 et P2X2/P2X3*

Les récepteurs homomériques P2X3 et hétéromériques P2X2/P2X3 sont exclusivement exprimés au niveau des neurones sensoriels, et plus particulièrement sur les fibres C non myélinisées de petit diamètre. La plupart des études indiquent une augmentation de l'expression de ces récepteurs suite à une lésion nerveuse périphérique<sup>160</sup> ou à une compression des ganglions de la racine dorsale (DRG)<sup>161</sup>. L'utilisation d'antagonistes spécifiques<sup>162</sup>, d'oligonucléotides antisens<sup>163</sup>, d'animaux KO P2X3<sup>164</sup> ou double KO P2X2/P2X3<sup>88</sup> ont permis de diminuer l'hyperalgésie et l'allodynie observées dans les différents modèles de douleurs chroniques et ainsi mettre en évidence l'importance des récepteurs P2X3 et P2X2/P2X3 dans les douleurs chroniques neuropathiques et inflammatoires.

Au niveau des afférences sensorielles primaires, à la terminaison nerveuse, ces récepteurs peuvent directement initier la stimulation nerveuse nociceptive. En effet, ces canaux, via l'entrée de calcium, vont exercer un effet de sensibilisation des fibres C et faciliter leur dépolarisation. Au niveau des DRG, leur localisation pré-synaptique va faciliter la libération de glutamate et activer les voies nociceptives<sup>162</sup>.

*ii. Rôle du récepteur P2X4*

Ces dernières années, une attention particulière a été portée sur le rôle des P2X4 dans les douleurs chroniques. Dès 2003, une équipe montre que l'allodynie induite par une lésion nerveuse périphérique (PNI) est renversée par le blocage de P2X4 de la moelle épinière et que l'injection intrathécale de microglies activées par l'ATP (exprimant P2X4) est suffisante à induire

une allodynie<sup>165</sup>. De plus, des animaux KO ou knock-down pour P2X4 ne présentent pas d'allodynie après une PNI<sup>166</sup>.

L'expression *de novo* de P2X4 dans les microglies activées s'est avérée être un processus clé dans les douleurs neuropathiques et les phénomènes d'allodynie. De nombreuses études se sont ensuite intéressées aux mécanismes moléculaires sous-jacents. Ainsi, on sait que l'activation des récepteurs P2X4 microgliaux stimule la synthèse et la libération de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor)<sup>166</sup>. Ce dernier agit sur ses récepteurs TrkB et cause une altération du gradient ionique transmembranaire des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, probablement via l'inhibition du transporteur chlore neuronal KCC2. Ainsi, l'effet normalement hyperpolarisant du GABA et de la glycine devient dépolarisant et entraîne une hyperexcitabilité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Figure 11)<sup>167,168</sup>.

De façon intéressante, P2X4 paraît aussi impliqué dans les douleurs inflammatoires périphériques. Une surexpression de P2X4 est retrouvée au niveau des macrophages en conditions inflammatoires. Ces récepteurs sont nécessaires et suffisants pour induire une hypersensibilité chronique dans un modèle d'inflammation chronique. Dans ce contexte, P2X4 conduit à la libération de molécules pro-inflammatoires telle que les prostaglandines E2 (PGE2)<sup>169</sup>. Bien que fortement exprimés par les microglies activées, les P2X4 sont aussi exprimés au niveau des neurones sensoriels. Une étude récente réalisée au sein du laboratoire montre que P2X4 neuronal est aussi surexprimé dans un modèle de douleur inflammatoire. Cette surexpression conduirait à la libération de BDNF et contribuerait à l'hyperexcitabilité neuronale et aux douleurs chroniques<sup>170</sup>. Néanmoins, l'utilisation d'animaux P2X4 KO spécifique pour les neurones ou les microglies paraît indispensable afin d'évaluer et de discriminer l'importance de chaque P2X4 dans les phénotypes observés.

### *iii. Rôle du récepteur P2X7*

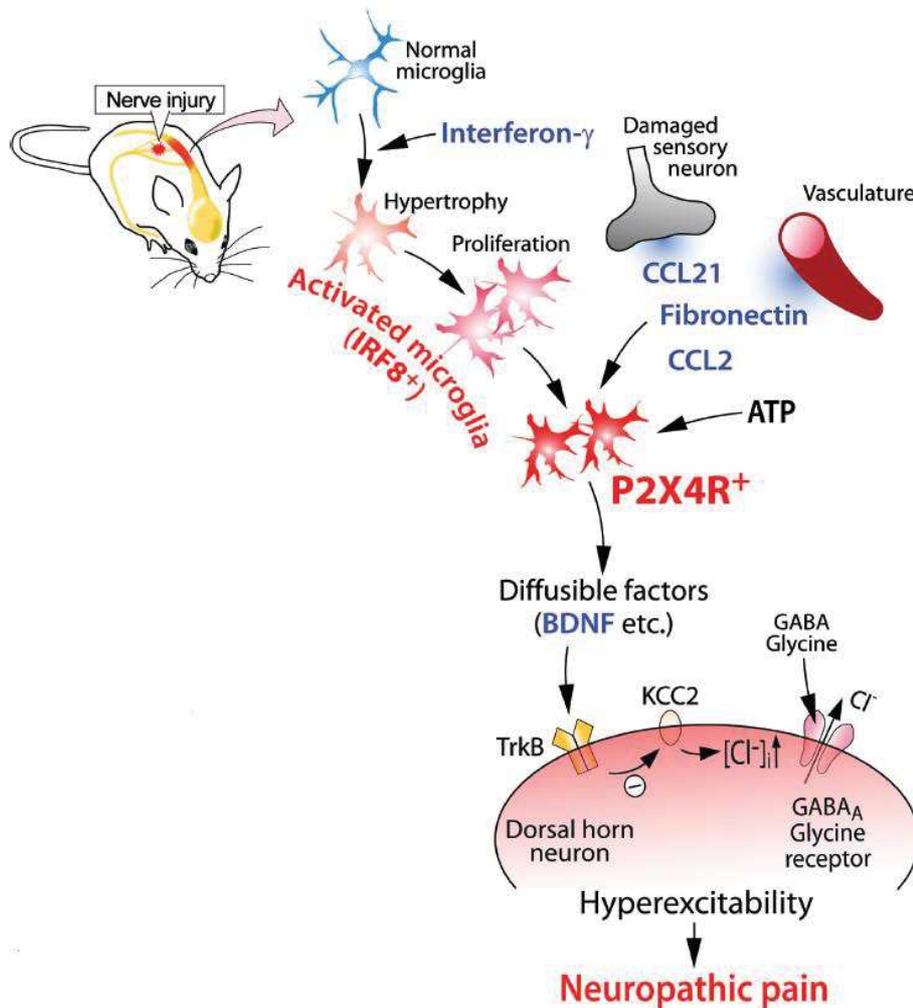
P2X7 est connu pour son implication dans les phénomènes inflammatoires. En effet, son activation conduit au recrutement de l'inflammasome puis à l'activation de multiples cascades inflammatoires dont la libération de molécules pro-inflammatoires telles que les interleukines (IL-1 $\beta$ , IL-10) ou le TNF- $\alpha$ <sup>171</sup>.

En condition de douleurs inflammatoires, l'utilisation d'antagonistes P2X7 entraîne une inhibition de l'hyperalgésie mécanique<sup>172</sup>. Chez des souris P2X7 KO, l'hypersensibilité tactile et thermique induite par l'injection d'un adjuvant inflammatoire est réduite. Ces phénotypes impliqueraient la libération d'IL-1 $\beta$  et d'IL-10 puisque cette dernière est affectée chez les animaux P2X7 KO<sup>173</sup>. Il a aussi été montré que l'induction de phénomènes douloureux induits par le LPS (Lipopolysaccharide) est dépendante de P2X7 et de la voie P38 MAPK<sup>174</sup>. Enfin, on sait aussi que la libération d'IL-1 $\beta$  induit la transcription de différents facteurs (COX-2 et NOX) qui jouent un rôle essentiel dans le maintien de la douleur inflammatoire<sup>171</sup>.

P2X7 est aussi impliqué dans douleurs neuropathiques. Comme pour P2X4, l'expression de P2X7 microgliale est augmentée suite à une PNI<sup>175</sup>. De plus, le blocage de P2X7 par des antagonistes peut prévenir l'allodynie mécanique post chirurgicale chez le rat<sup>176</sup>. Enfin, chez

des patients souffrant de douleurs neuropathiques chroniques, une augmentation de l'expression de P2X7 dans les lymphocytes et monocytes périphériques ainsi qu'une augmentation d'IL-1 $\beta$  dans le sérum ont été décrites<sup>177</sup>.

Bien que la plupart des études se soient focalisées sur les cellules immunitaires, un rôle de P2X7 exprimés au niveau des cellules gliales satellites entourant les neurones sensoriels des DRG a été suggéré. Dans ce cas, la libération d'ATP via les pannexines-1 associées à P2X7, conduirait à l'activation de P2Y<sub>1</sub> puis à la diminution de l'expression des récepteurs neuronaux P2X3<sup>178</sup>.



**Figure 11 : Mécanismes moléculaires par lesquels P2X4 exprimé par les microglies activées peut conduire à la douleur neuropathique suite à une PNI (d'après Tsuda et al, <sup>182</sup>)**

La lésion du nerf périphérique active les microglies de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces dernières surexpriment P2X4. Plusieurs facteurs (CCL21, la fibronectine, CCL2) vont entraîner la surexpression de P2X4. P2X4, activé par l'ATP, va libérer des facteurs diffusibles tels que le BDNF qui va entraîner la diminution de l'expression du transporteur de chlore KCC2 via son récepteur TrkB. Ainsi, l'augmentation de la concentration de chlore intracellulaire va entraîner un changement de gradient anionique à la membrane. L'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> et glycine, normalement hyperpolarisant, va conduire à une sortie de chlore et donc devenir dépolarisant. La dépolarisation des neurones de la corne dorsale par le GABA et la glycine va entraîner une hyperexcitabilité neuronale et les phénomènes de douleur neuropathique.

#### I.2.3.4.c. Autres implications des récepteurs P2X

Les récepteurs P2X, notamment P2X4 et P2X7, via leur implication dans les processus inflammatoires, sont impliqués dans de nombreuses autres pathologies du SNC telles que les attaques cérébrales, les ischémies cérébrales, les maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique), l'épilepsie ou encore certaines maladies neuropsychiatriques (schizophrénie, dépression, anxiété, addictions)<sup>179</sup>.

##### *i. Implication des récepteurs P2X dans l'épilepsie*

Très tôt, des études ont montré qu'une application d'ATP exogène peut entraîner une excitabilité neuronale et l'apparition de crises épileptiques<sup>180</sup>. De plus, l'inhibition génétique de la libération vésiculaire d'ATP par les astrocytes permet de diminuer la fréquence des crises et les dommages neuronaux associés<sup>181</sup>. Ces études, associées à un fort remodelage de l'expression de certains P2X au cours de la pathologie<sup>182</sup>, ont suggéré l'implication de ces récepteurs dans l'épilepsie.

Après une crise épileptique, la libération de molécules pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) et l'activation des voies inflammatoires vont participer aux dommages neuronaux et à l'altération des réseaux neuronaux<sup>183</sup>. P2X7, surexprimé chez des patients épileptiques, a fait l'objet de nombreuses études chez des animaux modèles. Dans un premier modèle d'injection systémique de pilocarpine, P2X7 apparaît avoir un rôle protecteur. En effet, chez des animaux P2X7 KO ou suite à l'injection d'antagonistes spécifiques, la sensibilité aux crises épileptiques est augmentée<sup>184</sup>. Au contraire, dans un modèle d'injection de kaïnate dans l'amygdale, P2X7 semble avoir un effet délétère. L'utilisation d'animaux KO ou d'antagonistes spécifiques, réduit les crises et la mort neuronale au niveau de l'hippocampe<sup>185</sup>. Enfin une étude récente inhibant P2X7 grâce à un nouvel antagoniste met en évidence, sur le modèle kaïnate, un effet bénéfique sur les crises dans leur phase chronique<sup>186</sup>.

P2X4 est le deuxième récepteur étudié dans ce contexte pathologique. Par des méthodes immunohistochimiques, deux études décrivent des résultats contradictoires quant à l'expression de P2X4 sur des modèles systémiques de pilocarpine ou sur des modèles kaïnate<sup>187,188</sup>. Néanmoins, aucun contrôle n'est réalisé sur la spécificité des anticorps utilisés. Une étude réalisée au sein du laboratoire, utilisant un modèle épileptique par injection de kaïnate intra-péritonéale, a mis en évidence une augmentation de l'expression des P2X4 au niveau de microglies activées<sup>189</sup>. Chez des animaux P2X4 KO, une diminution de l'activation microgliale, une diminution de l'expression de gènes pro-inflammatoires ainsi qu'une diminution de la mort neuronale au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe sont observées.

P2X4 s'exprime à la fois au niveau des neurones et des microglies activées. Le patron d'expression de P2X7 est encore débattu, mais il semble s'exprimer au niveau neuronal et microglial. Encore une fois, dans ce contexte, l'utilisation d'animaux KO conditionnels spécifique pour un type cellulaire paraît nécessaire afin de discriminer le rôle des récepteurs microgliaux et neuronaux.

### **I.3. Les outils pour étudier les récepteurs P2X**

Comme mentionné précédemment, les récepteurs P2X sont largement exprimés dans les différents tissus de l'organisme. Le patron d'expression de ces récepteurs a été évalué par de nombreuses études moléculaires (Northern Blot, RT-PCR, hybridation *in situ*) ou biochimiques (western blot, immunohistochimie). Néanmoins, le manque de spécificité de certains anticorps utilisés ainsi que la pauvreté des outils pharmacologiques pour chaque sous-unité ont compliqué l'étude des P2X. L'utilisation d'animaux transgéniques KO pour chaque sous-unité a permis d'énormes progrès quant à la compréhension du rôle de ces récepteurs. Néanmoins, le manque d'outils pour mesurer, suivre ou contrôler l'activité des récepteurs limite leur étude *in vivo*.

La partie suivante va s'intéresser aux principales méthodes actuellement disponibles permettant de mesurer, contrôler ou suivre l'activité des récepteurs P2X, ainsi qu'à leurs avantages et limites.

#### **I.3.1. La mesure des courants P2X par l'électrophysiologie**

L'électrophysiologie permet la mesure des courants électrochimiques au travers d'une membrane biologique. Différentes techniques de patch-clamp ont permis de mesurer le courant entrant (entrée de cations) des différents récepteurs P2X. Les techniques dites en cellule entière (whole-cell) permettent d'enregistrer les courants d'une population de récepteurs alors que les techniques « single channel » permettent d'enregistrer le courant d'un petit nombre de récepteurs ou de récepteur unique. A l'échelle d'un réseau cellulaire ou d'un organe (études sur tranches ou *in vivo*), on mesure un potentiel de champ.

En système de surexpression hétérologue, la mesure des courants en patch-clamp a permis de décrypter la plupart des caractéristiques biophysiques connues à ce jour pour les récepteurs P2X (activation, inactivation, désensibilisation, ...) mais aussi de décrire les propriétés de la plupart des agents pharmacologiques disponibles aujourd'hui. En tissu natif, la mise en évidence de courants purinergiques endogènes reste compliquée. D'une part, les caractéristiques de certains courants P2X comme une désensibilisation rapide (P2X1 et P2X3) ou un trafic rapide (P2X4) compliquent leur détection. D'autre part, la mise en évidence de ces courants reste sous dépendance de l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes spécifiques. Comme nous l'avons vu précédemment, la pharmacologie des récepteurs P2X est pauvre et il existe peu d'antagonistes sélectifs pour chaque sous-unité et aucun agoniste sélectif. De plus, l'application d'une drogue ne permet pas l'activation du récepteur avec une bonne résolution spatio-temporelle et l'ATP perfusée sur tranche est généralement rapidement métabolisée. L'ATP est donc utilisée à de fortes concentrations pouvant générer des réponses non spécifiques.

Pour toutes ces raisons, le développement de méthodes alternatives non invasives permettant de mesurer spécifiquement l'activité de sous-unité P2X sur tranche ou *in vivo* est apparu indispensable.

### 1.3.2. Le contrôle des récepteurs canaux par la lumière

Combiner des méthodes chimiques et optiques a été l'une des voies employées pour contrôler précisément l'action pharmacologique d'un agoniste et donc l'activité du récepteur d'intérêt. Plusieurs méthodes, nommées optopharmacologies et utilisant des agents photosensibles, ont été développées.

Le premier outil optopharmacologique consiste à utiliser des agonistes cagés pouvant être libérés sous le contrôle de la lumière. Cette méthode a d'abord été développée pour le glutamate et a permis sa libération avec une précision spatio-temporelle se rapprochant d'une libération physiologique<sup>190</sup>. Cette méthode a ensuite été décrite pour de nombreux autres neurotransmetteurs<sup>191</sup>. Néanmoins ces techniques conduisent à l'activation non réversible du récepteur d'intérêt et ne permettent pas de cibler spécifiquement un sous-type de récepteurs.

Pour pallier cela, d'autres outils optopharmacologiques ont été développés. Des ligands fusionnés à des composés photo-switchables (isomérisables) ont ainsi permis de contrôler de façon réversible l'activité de récepteurs endogènes<sup>192</sup>. Les composés photosensibles utilisés sont généralement des azobenzènes capables de passer de façon réversible d'une forme *cis* (courte) à *trans* (longue) sous l'effet de différentes longueurs d'ondes. Cette méthode a notamment été développée pour les canaux potassiques<sup>193</sup>. Dans ce cas, le ligand photosensible, nommé AQQ, permet le blocage des canaux potassiques en conformation *trans* et leur activation en conformation *cis*. Cette technique, développée sur d'autres récepteurs canaux (GABA<sub>A</sub>, AMPA)<sup>194,195</sup>, semble néanmoins avoir une spécificité limitée.

Enfin, le développement d'une méthode combinant l'optique, la chimie et la génétique, nommée « optogénétique pharmacologique », a permis de contrôler spécifiquement et de façon réversible l'activité d'un récepteur d'intérêt<sup>196</sup>. L'idée fût d'attacher un composé photo-switchable (azobenzène) à un récepteur exogène modifié génétiquement. Généralement, c'est l'insertion de mutations cystéines qui va permettre la fixation spécifique de l'azobenzène. Le passage de la conformation d'une forme *cis* à *trans* (ou inversement) va permettre de contrôler le gating et donc l'activité du canal. Cette technique a été développée sur les canaux potassiques (SPARK)<sup>197</sup>, les récepteurs kaïnate (LiGluR)<sup>198</sup>, GABA<sub>A</sub> (LiGABAR)<sup>199</sup> ou nicotiniens (LinAChRs)<sup>200</sup>, *in vitro* et parfois *in vivo*.

Récemment, ces méthodes optopharmacologiques ont été développées pour contrôler la libération d'ATP et l'activité des récepteurs P2X. Le paragraphe suivant fait la synthèse des approches optiques développées pour étudier la signalisation purinergique.

#### 1.3.2.1. Activation des récepteurs P2X par de l'ATP cagée photosensible

C'est dans les années 1980 que les premiers composés cagés permettant de libérer de l'ATP sous le contrôle de la lumière UV (Ultra-Violet) ont été développés<sup>201</sup>. Néanmoins, la production de composés de dégradations secondaires suite à leur hydrolyse a fortement limité leur utilisation. Une seconde génération de molécules comme le DMNB (4,5-dimethoxy-

2-nitrobenzyl) ou le CNB ( $\alpha$ -carboxy-2nitrobenzyl), ayant une stabilité plus importante, ont permis de limiter la production des produits de dégradation<sup>202</sup>. L'utilisation du DMNPE-ATP a été décrite *in vivo* chez des drosophiles exprimant P2X2 dans une population de neurones spécifiques<sup>203</sup>. Les auteurs de l'étude réussissent à générer une activité neuronale robuste suite à des pulses de lumière U.V (355 nm). De façon intéressante, cette activation est capable de moduler le comportement de locomotion des mouches, montrant la capacité de l'outil à contrôler l'activité neuronale.

Comme mentionné ci-dessus, ce genre d'outils ne permet pas de contrôler le type de sous-unité activé par l'ATP. Cette caractéristique a donc limité son utilisation pour étudier la signalisation purinergique et a conduit au développement de nouvelles méthodes d'optopharmacologies.

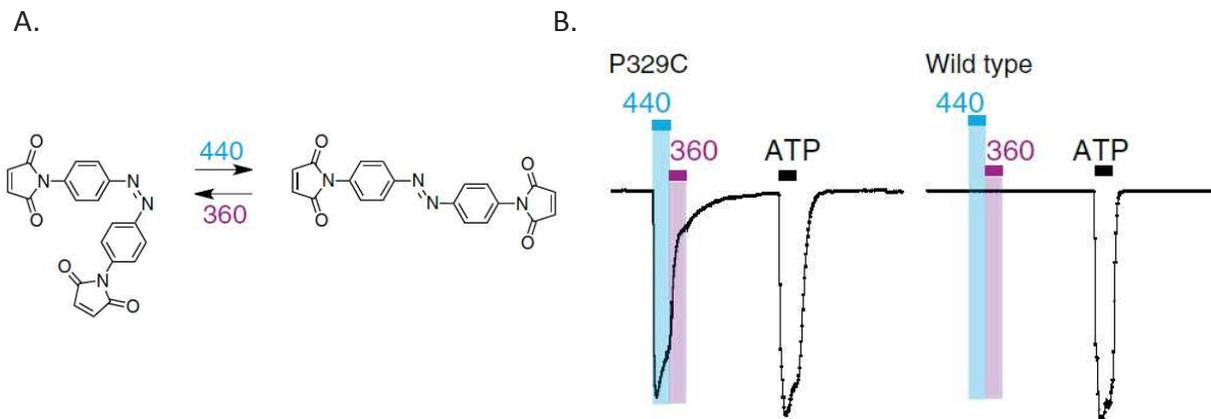
#### 1.3.2.2. L'optogating des récepteurs P2X grâce aux molécules « photo-switchables »

La méthode d'optogénétique pharmacologique, récemment développée sur P2X2, a été nommée optogating car elle ne cible pas le site actif du ligand mais joue directement sur le gating du récepteur. Cette méthode a été simultanément développée sur les récepteurs P2X par deux équipes de recherche en 2013.

Dans une première étude, les auteurs utilisent un dérivé d'azobenzène, le MEA-TMA (maleimide ethylene azobenzene trimethyl ammonium), capable de s'isomériser de façon stable d'une forme courte *cis* à une forme longue *trans*, sous une lumière à 525 nm<sup>204</sup>. Ce changement de conformation est renversé sous une lumière à 365 nm. Ils appliquent l'isomère sous forme *cis* sur différents mutants cystéines P2X2 et enregistrent les courants entrants suite à l'application de lumière à 525 nm. Ils identifient ainsi un mutant (P2X2-I328C), capable de s'activer rapidement et de façon réversible suite au passage de l'azobenzène en forme *trans* (525 nm). Le passage en forme *trans* va en effet permettre le contrôle du gating du récepteur mutant indépendamment de l'ATP. Les auteurs suggèrent une fixation de l'azobenzène *cis* au niveau des hélices- $\alpha$  du TM2 entraînant un écartement des TM2 et une ouverture du pore lors de son passage en conformation *trans*. Enfin, l'outil est validé sur culture de neurones primaires, ouvrant la voie à une future utilisation *in situ* ou *in vivo*.

Dans la deuxième étude, un autre dérivé d'azobenzène est utilisé pour contrôler l'activité du récepteur, le BMA (bis(maleimido)azobenzene)<sup>205</sup>. Ce dernier, va passer de la forme courte *cis* à la forme longue *trans* sous une lumière à 440 nm. Ce changement de conformation est renversé sous une lumière à 360 nm. Selon le même principe, l'attachement de la forme *cis* à un récepteur P2X2 muté (P2X2-P329C) et son passage en forme *trans* vont entraîner l'activation rapide du récepteur de façon indépendante de l'ATP (Figure 12). De façon intéressante, les auteurs montrent que cette méthode est applicable aux autres sous-unités P2X. Cette preuve de concept est en effet reproduite sur un mutant du récepteur P2X3 (P320C). L'expression de P2X3 muté dans des cellules exprimant des P2X2 endogènes, va

permettre le contrôle, par la lumière, de courants caractéristiques des hétéromères P2X2/P2X3. Cet outil pourrait donc aussi s'avérer intéressant pour l'étude des hétéromères.



**Figure 12 : Activation par la lumière des récepteurs P2X2 (d'après Brown et al, <sup>203</sup>)**

(A) L'azobenzène BMA en état court cis (gauche) et dans un état trans long (droite). (B) Le récepteur P2X2-P329C. Un courant est enregistré par électrophysiologie après une illumination à 440 nm (2 secondes, barre bleue). Une illumination à 360 nm stoppe ce courant (2 secondes, barre violette). Le courant induit par la lumière est d'environ 30 % de celle induite par l'ATP. Il n'y a pas d'effet de l'illumination sur le récepteur P2X2 WT (droite) malgré une réponse à l'ATP. Dans chaque condition l'azobenzène BMA est pré-incubé 10-12 minutes.

Ces outils ont été développés en 2013. Ils n'ont néanmoins pas encore été utilisés *in vivo*. Certaines limites techniques peuvent en partie expliquer cela. Premièrement, l'un des désavantages de cette méthode est l'utilisation de récepteurs mutés. La surexpression de ces récepteurs *in vivo* pourrait altérer certaines propriétés cellulaires ou encore modifier l'expression des récepteurs endogènes. Deuxièmement, l'attachement de l'azobenzène nécessite que les cystéines mutées restent libres. L'application d'agents réducteurs pour une application *in vivo* paraît donc nécessaire. De plus, bien que ces méthodes semblent spécifiques *in vitro*, il paraît aussi indispensable d'évaluer les autres cibles (off-target) potentielles des azobenzènes utilisés. Enfin, dans ces deux études, l'inactivation des récepteurs se fait par une stimulation dans l'UV (~360 nm). Or, on sait que les UV pénètrent mal dans les tissus cérébraux et peuvent provoquer une toxicité cellulaire.

Malgré ces limites, les techniques d'optogating restent à ce jour les seules capables de contrôler l'activité des récepteurs P2X. Une fois ces défis techniques surmontés, ces outils seront sans doute une alternative sérieuse aux outils pharmacologiques pour comprendre le rôle précis de ces récepteurs *in vivo*.

### 1.3.3. Les sondes et senseurs calciques

Le calcium est un messager secondaire universel dans les cellules permettant le contrôle de nombreux processus physiologiques. Au niveau du SNC, l'activité neuronale est caractérisée par des potentiels d'actions entraînant de fortes et rapides variations de calcium intracellulaire. C'est pourquoi le développement de sondes calciques a très tôt été une préoccupation centrale des neuroscientifiques. Aujourd'hui, il existe principalement deux types de sondes calciques fluorescentes, les sondes calciques organiques et les sondes calciques encodées génétiquement (ou GECIs pour « Genetically Encoded Ca<sup>2+</sup> Indicators »).

#### 1.3.3.1. Les sondes calciques organiques

Les premières sondes calciques organiques ont été développées dans les années 1980 par l'équipe du Dr. Tsien<sup>206,207</sup>. Ces dernières sont généralement des molécules dérivées du BAPTA associées à un fluorophore. Certaines sondes, dites ratiométriques, telles que le Fura-2 ou l'Indo-1, possèdent une double excitation (Fura-2) ou une double émission (Indo-1) permettant de quantifier les variations calciques grâce à un ratio de fluorescence (Figure 13A). D'autres sondes, dites non ratiométriques, telles que le Fluo-4, le Fura-red ou l'OGB-1, ne possèdent qu'une seule onde d'émission et d'excitation et ne permettent pas de quantifier le calcium. Ces sondes ont l'avantage de pouvoir mesurer des cinétiques de calcium très rapide, ont un ratio signal sur bruit (SNR) élevé et une forte affinité pour le calcium. L'une des dernières sondes développées, dérivée de l'OGB-1 et nommée Cal-520, possède une forte affinité pour le calcium ( $K_D$  de 320 nM), une vitesse d'activation et d'inactivation permettant de détecter un seul potentiel d'action ainsi qu'une augmentation de fluorescence ( $\Delta F/F_0$ ) *in vitro* d'environ 20<sup>208</sup>. Ces molécules ont longtemps été les indicateurs de choix utilisés pour étudier la signalisation calcique.

Ces sondes sont fusionnées à des groupements acetoxymethyl-ester (AM) afin de faciliter leur passage et leur maintien dans les cellules. Malgré cela, la principale limite de ces dernières est leur diffusion hors de la cellule au cours du temps. Elles sont donc appropriées pour des expériences *in vitro* mais peu adaptées pour de longues expériences *in vivo*.

#### 1.3.3.2. Les GECIs

Les GECIs, second type de senseurs calciques, sont des protéines dérivées de la GFP associées à une structure liant le calcium (la calmoduline ou la troponine). L'avantage principal de ces senseurs protéiques est de pouvoir être inséré génétiquement grâce à des approches virales. Ce sont donc des outils de choix pour une utilisation *in situ* et *in vivo*. Aujourd'hui, deux types de sondes sont principalement utilisés, les sondes double tonneaux et les sondes simple tonneau (Figure 13 B/C)<sup>209</sup>.

##### 1.3.3.2.a. Les sondes double tonneaux de type Caméléon

L'approche des sondes à double tonneaux consiste à intercaler un senseur calcique entre deux protéines fluorescentes. Les sondes construites selon ce schéma tirent parti d'un phénomène

de transfert d'énergie appelé FRET (Förster Resonance Energy Transfer) entre les deux protéines fluorescentes, l'une jouant le rôle de donneur d'énergie et l'autre le rôle d'accepteur. Dans un indicateur basé sur le FRET, le changement conformationnel du senseur induit un changement de l'arrangement spatial des deux protéines fluorescentes qui va se traduire par une variation de leur ratio de fluorescence (ces sondes sont dites ratiométriques). Sur ce principe, dès la fin des années 1990, les indicateurs calciques Caméléons (YC) ont été développés<sup>210</sup>. Chez les YC, le peptide synthétique M13 (domaine de liaison à la calmoduline (CaM) de la kinase de la chaîne légère de la myosine) et la CaM sont fusionnés à une paire de variant bleu et jaune de la GFP (CFP et YFP, respectivement). En présence de calcium, le rapprochement du peptide M13 et de la CaM va entraîner un rapprochement de la CFP et YFP, facilitant le transfert d'énergie entre ces deux protéines. Ce phénomène va se traduire par une augmentation du ratio de fluorescence YFP/CFP (Figure 13B). Le peptide M13 pouvant interférer avec certaines protéines endogènes, une nouvelle famille de sondes calciques FRET, nommée twitch, a été développée par la suite. Ces dernières se basent sur une architecture TN-XXL qui utilise la troponine C comme senseur calcique.

Alors que les premières versions des protéines caméléons étaient sensibles au pH, avaient une faible affinité pour le calcium (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) et un faible ratio de fluorescence, des études de mutagenèse ainsi que le remplacement de la YFP par la protéine fluorescente Venus, ont permis d'améliorer l'ensemble de ces paramètres<sup>210</sup>. Aujourd'hui, plus d'une vingtaine de senseurs calciques de cette famille est disponible. Parmi eux, l'une des dernières versions, Twitch 2B, possède une forte affinité pour le calcium de 200 nM ( $K_D$ ) et des ratios de fluorescence comparable à ceux des sondes organiques. Elles ont été utilisées *in vivo* et sont capable de détecter une activité neuronale *in vivo*<sup>210</sup>.

Malgré leur récente optimisation, ces senseurs souffrent de plusieurs défauts. Premièrement, l'acquisition de la fluorescence se fait sur deux longueurs d'ondes différentes et est donc étalée sur une large bande spectrale. Cette caractéristique limite donc son association avec d'autres outils fluorescents ou des méthodes optogénétiques. De plus, en comparaison aux sondes calciques organiques, la dynamique de ces sondes reste lente. En effet, le temps de diminution de la fluorescence est de l'ordre de la seconde (2 secondes pour twitch 2B) et ne permet pas de détecter certains potentiels d'actions à haute fréquence. Enfin, ces senseurs, composés de deux protéines fluorescentes, forment de grosses protéines (environ 60 kDa). Leur fusion à d'autres récepteurs ou protéines pourrait donc affecter leur expression ou leur trafic.

#### 1.3.3.2.b. Les sondes simple tonneau de type GCaMP

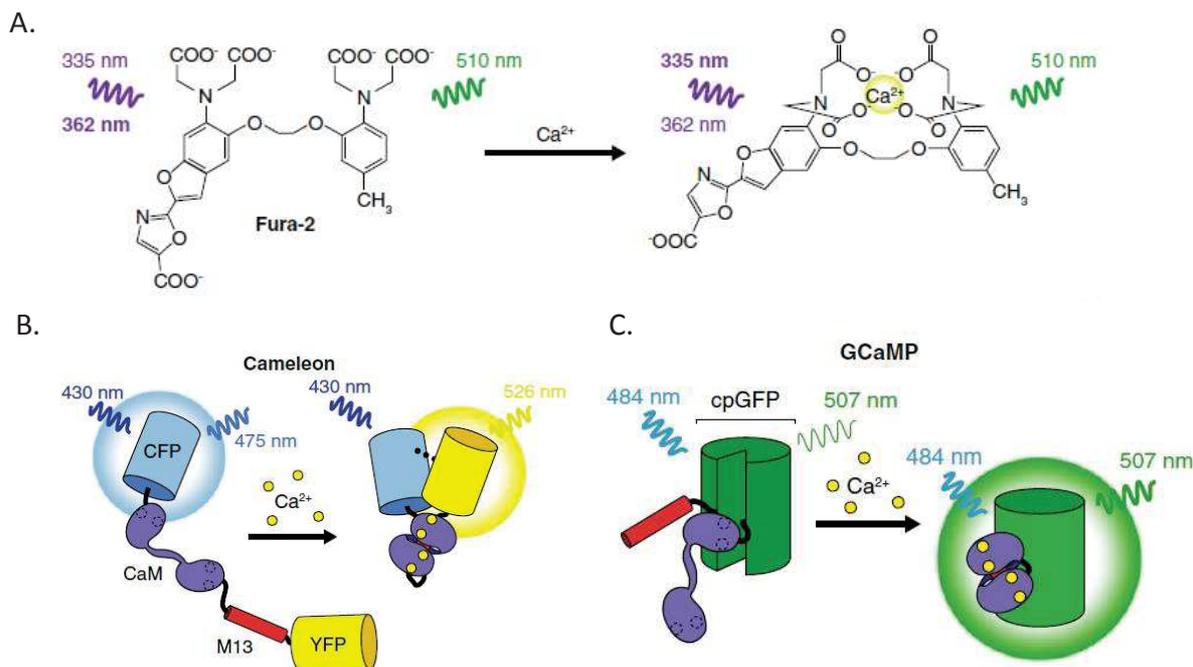
Parallèlement aux sondes à double tonneaux, des sondes simple tonneau, nommées camgaroo, péricam ou GCaMPs, ont été développées au début des années 1990<sup>211,212</sup>. Les GCaMPs sont composées d'une EGFP circularisée permutée (cpEGFP). La permutation circulaire de l'EGFP consiste à fusionner les deux extrémités N et C-terminale d'origine puis à en créer de nouvelles. Ces nouvelles extrémités ont alors été fusionnées à la CaM et au

peptide M13. En l'absence de calcium, la GFP permutée est faiblement fluorescente. En liant le calcium, le domaine CaM s'enroule autour du peptide M13 et provoque un changement conformationnel de la protéine qui restaure la fluorescence de la GFP (Figure 13C). Selon le même principe, les sondes camgaroo et péricam sont composées d'une cpYFP fusionnée à une CaM et au peptide M13. Néanmoins, ces deux versions ont été très peu développées par rapport aux protéines GCaMPs.

La première GCaMP développée possédait un faible ratio  $\Delta F/F_0$  (environ 4), une faible affinité pour le calcium (environ 7  $\mu\text{M}$ ) et était sensible au pH<sup>212</sup>. Au fil des années, des mutations au sein de la cpEGFP et sur la CaM ont permis d'améliorer drastiquement les propriétés de ces sondes<sup>212</sup>. Ainsi, la dernière série développée, les GCaMP6, possède trois variants classés selon leur vitesse d'inactivation<sup>212</sup>. Pour un stimulus donné, la GCaMP6f (f pour fast) possède une vitesse d'inactivation très rapide, la GCaMP6s (s pour slow) une vitesse d'inactivation plus lente et la GCaMP6m (m pour medium) une vitesse d'inactivation intermédiaire. Ces senseurs ont une forte affinité pour le calcium ( $K_D$  entre 144 et 375 nM) et un ratio de fluorescence ( $\Delta F/F_0$ ) *in vitro* compris entre 38 et 63. Ces GCaMP6 ont été utilisées avec succès sur des neurones *in vivo* et s'avèrent capables de détecter des trains de potentiel d'action à haute fréquence.

Plus récemment, des efforts considérables ont été faits pour élargir la palette spectrale des GECIs. En effet, le développement d'indicateurs calciques simple tonneau « rouges » va permettre le couplage de ces outils avec d'autres outils fluorescents « verts » ainsi qu'avec les outils optogénétiques. De plus, on sait que les longueurs d'ondes rouges pénètrent plus profondément dans les tissus biologiques pouvant améliorer l'utilisation *in vivo* de ces senseurs. Par mutagenèse, plusieurs senseurs calciques ont été développés dont les séries RCaMPs (issues de la protéine fluorescente rouge mRuby) et RGECOs (issues de la protéine fluorescente rouge mApple). La RCaMP2, développée en 2015, possède une très forte affinité pour le calcium ( $K_D$  de 69 nM), des vitesses d'activation et d'inactivation rapides, mais un ratio de fluorescence faible ( $\Delta F/F_0$  de 4,8)<sup>213</sup>. En 2016, deux nouvelles GECIs, nommées jRGECO1a et jRCaMP1b possèdent des ratios de fluorescence ( $\Delta F/F_0$ ) autour de 10. Elles semblent être aujourd'hui les sondes rouges les plus performantes pour une utilisation *in vivo*<sup>214</sup>.

Ces sondes simple tonneau, aux caractéristiques proches ou supérieures à celles des sondes organiques, paraissent donc aujourd'hui les plus adaptées pour détecter facilement des variations calciques rapides. De plus, les sondes à simple tonneau sont beaucoup moins grosses que les protéines caméléons (40 kDa contre 60 kDa respectivement) et s'avèrent donc intéressantes pour être utilisées en fusion avec d'autres protéines ou récepteurs.



**Figure 13 : Principaux types de sondes calciques fluorescentes (d'après Qiang et al,<sup>209</sup>)**

(A) Structure de la sonde fluorescente organique FURA-2, dérivée du chélateur BAPTA. La longueur d'onde d'émission est de 510 nm. La longueur d'onde d'excitation varie de 362 nm pour un état sans calcium (gauche) à 335 nm pour un état chélaté avec calcium (droite). Le ratio de l'intensité d'émission avec ces deux excitations permet une quantification dynamique du calcium intracellulaire. Aujourd'hui, ces sondes sont fusionnées à des groupements acetoxy-méthyle ester (AM) afin de faciliter leur passage et leur maintien dans les cellules. (B) et (C) Les sondes calciques encodées génétiquement (GECIs). (B) Les sondes caméléons sont composées d'une paire de protéines fluorescentes reliées par une calmoduline et un peptide M13. Suite à la fixation de calcium, un changement de conformation va induire un rapprochement des protéines fluorescentes. Cela va entraîner une augmentation du signal de FRET. (C) Les GCaMPs sont composées d'une GFP circulaire permulée dans laquelle ont été intégrés une calmoduline et un peptide M13. La fixation du calcium va entraîner un changement conformationnel de la GFP et augmenter sa fluorescence.

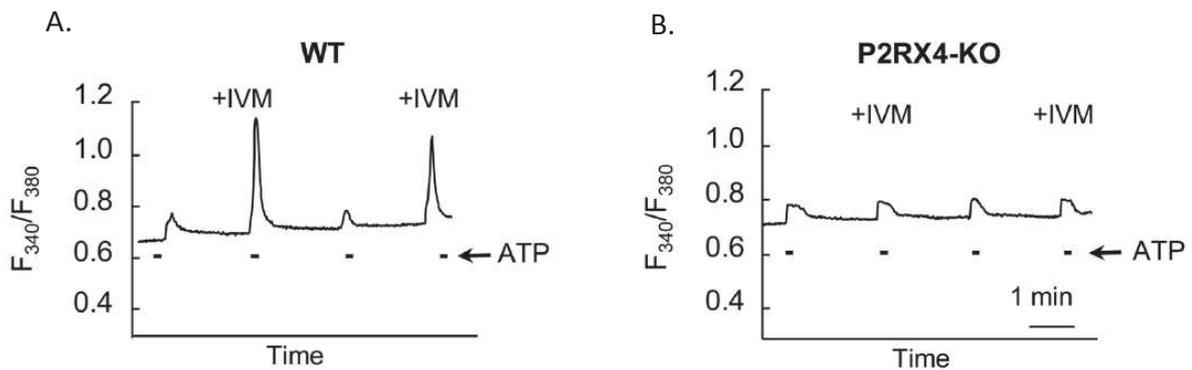
### I.3.3.3. Utilisation des sondes et senseurs calciques pour suivre l'activité P2X

Comme décrit précédemment, les récepteurs P2X sont des canaux cationiques fortement perméables au calcium ; leur activation va donc entraîner une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Toutes ces sondes et senseurs ont été utilisés pour mettre en évidence l'activité de ces récepteurs.

#### I.3.3.3.a. Utilisation des sondes calciques organiques pour suivre l'activité P2X

Les sondes calciques organiques sont depuis longtemps utilisées pour mettre en évidence la présence de récepteurs et de courants P2X à la membrane. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence l'activité endogène de P2X4 dans des cultures primaires de macrophages<sup>169</sup> ou des cultures primaires de neurones<sup>170</sup>. Néanmoins, suite à une application d'ATP, l'augmentation de calcium intracellulaire est à la fois due à l'activation des récepteurs P2X mais aussi à l'activation des récepteurs P2Y couplés à Gq (entraînant une libération des stocks de calcium

intracellulaires). Ces sondes ne permettent donc pas de discriminer les réponses P2X des réponses P2Y et des outils pharmacologiques (antagonistes, PAM) sont nécessaires pour mettre en évidence le courant souhaité. Pour étudier P2X4, les auteurs utilisent généralement l'IVM, permettant de mettre en évidence une composante P2X4 dans la réponse calcique (Figure 14). Néanmoins, pour certains P2X, le manque d'outils pharmacologiques limite l'utilisation de telles sondes. Enfin, bien que ces sondes possèdent une dynamique rapide et une forte fluorescence, l'impossibilité de les adresser génétiquement à un type cellulaire donné limite leur utilisation *in situ* et *in vivo* pour de longues expériences.



**Figure 14 : Mise en évidence d'un courant calcique dépendant de P2X4 sur culture primaire de neurones sensoriels (d'après Ulmann et al,<sup>173</sup>)**

L'expression et l'activité des récepteurs membranaires P2X4 sont mis en évidence grâce à la sonde calcique organique ratiométrique FURA-2. (A) Chez des animaux WT, une augmentation de calcium intracellulaire suite à une application d'ATP est enregistrée. Cette augmentation est fortement potentialisée quand l'ATP est co-appliqué avec de l'IVM (PAM de P2X4), mettant en évidence une expression et une activité P2X4 dans les neurones sensoriels. (B) L'augmentation de calcium intracellulaire n'est pas potentialisée chez des animaux KO P2X4, confirmant la spécificité d'action de l'IVM sur P2X4.

#### 1.3.3.3.b. Utilisation des GECIs pour suivre l'activité des récepteurs P2X

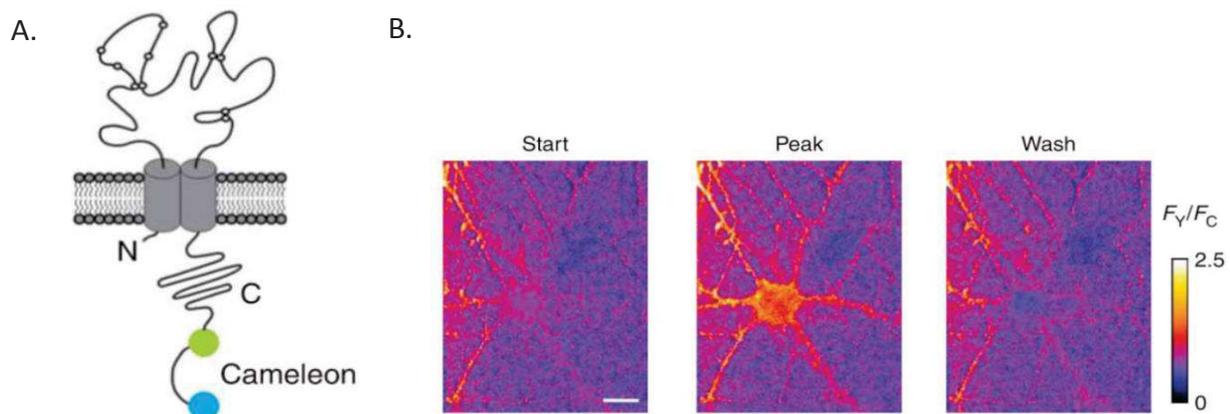
Dans le but de suivre l'activité des P2X, l'intérêt d'utiliser des GECIs est de pouvoir les fusionner génétiquement au récepteur d'intérêt. La fusion d'un senseur calcique à une partie intracellulaire du récepteur va pouvoir, en théorie, permettre de suivre son activité. En effet, suite à l'activation du récepteur, l'entrée de calcium par le canal va conduire à l'activation réversible du senseur calcique. Le paragraphe suivant détaille les quelques études ayant réalisé ces fusions dans le but d'étudier l'activité des P2X.

##### *i. Développement de l'outil P2X2-Cameleon*

En 2013, pour la première fois, les propriétés de perméabilité calcique du récepteur P2X2 vont être utilisées pour suivre en temps réel et de façon spécifique son activité *in vivo*. Pour cela, le senseur calcique caméléon YC3.1 est fusionné à la queue C-terminale de P2X2. Comme attendu, suite à l'activation du récepteur par l'ATP, un changement de FRET dû à l'entrée de calcium via le récepteur est enregistré (Figure 15)<sup>215</sup>.

Après la caractérisation de l'outil en système hétérologue, les auteurs s'assurent de la spécificité de réponse grâce au mutant P2X2-K69A (mutant du site de liaison non activable par l'ATP). Ils montrent qu'une augmentation de calcium intracellulaire due à l'activation du récepteur P2X4 ou du récepteur P2Y4 n'est pas capable d'activer le senseur fusionné au P2X2. De façon inédite, cet outil permet donc de suivre l'activation d'un récepteur P2X par fluorescence sans être contaminé par les réponses P2Y ou d'autres P2X. De plus, cet outil paraît fonctionnel pour tous les homomères P2X fonctionnels. Enfin ce nouvel outil a permis de caractériser la localisation, l'activité et la mobilité des récepteurs P2X2 neuronaux.

Développé il y a une dizaine d'année maintenant, cet outil n'a été que très peu utilisé pour étudier l'activité des P2X. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cela. Premièrement, la sonde YC3.1 a une dynamique d'activation et d'inactivation assez lente (de l'ordre de quelques secondes) et une faible affinité pour le calcium (environ 2  $\mu$ M). La fluorescence ne reflète donc pas exactement celle du canal. De plus, les GECIs double tonneaux sont de grosses protéines. Leur fusion à des canaux peut potentiellement perturber l'adressage et l'expression du récepteur à la membrane. Des études menées au sein du laboratoire ont en effet montré que fusionné à la protéine caméléon, l'adressage à la membrane des P2X était en partie perturbé. Dans ce cas, la fusion des récepteurs à des sondes simple tonneau pourrait s'avérer intéressant.



**Figure 15 : Création et caractérisation de l'outil P2X2-caméléon sur neurones primaire d'hippocampe (d'après Richler et al,<sup>215</sup>)**

(A) La protéine caméléon YC3.1 est fusionnée à la queue C-terminale de la sous-unité P2X2 pour former P2X2-cam. (B) Image représentant un changement de FRET induit par l'ATP (100  $\mu$ M) sur des neurones primaires de l'hippocampe exprimant P2X2-cam (barre d'échelle 10  $\mu$ m).

#### ii. Développement de l'outil P2X-GCaMP2

Une deuxième étude, parue en 2014, a décrit pour la première fois la fusion d'une protéine GCaMP au récepteur P2X (P2XA) de l'algue (*Dictyostelium discoideum*)<sup>216</sup>. Ces récepteurs, de par leur localisation vacuolaire et leur homologie de séquence, s'apparenteraient aux récepteurs P2X4 des vertébrés. Après avoir montré leur rôle dans la régulation du volume cellulaire après un choc osmotique<sup>217</sup>, les auteurs de cette étude s'intéressent au rôle de P2XA dans les phénomènes de fusions vésiculaires. Ils mettent en évidence un mécanisme

moléculaire par lequel l'efflux de calcium via P2XA peut réguler la fusion de vésicules dépendante d'une voie Rab. Afin de visualiser l'activité de P2XA dans le phénotype observé, une protéine GCaMP2 est fusionnée à la queue C-terminale du récepteur. Sur le même principe qu'avec la protéine caméléon, l'entrée de calcium via le récepteur P2XA va permettre de visualiser spécifiquement son activité. Grâce à cet outil, une fusion vésiculaire dépendante de l'activité P2XA est mise en évidence.

Malgré une bonne affinité pour le calcium ( $K_D$  de 545 nM) et une vitesse d'activation et d'inactivation plus rapide que la protéine caméléon YC3.1, les variations de fluorescences restent faibles ( $\Delta F/F_0 = 5$  *in vitro*)<sup>218</sup> et semblent encore plus faibles quand la protéine caméléon est fusionnée au récepteur P2XA. On peut donc être sceptique quant au fonctionnement optimal de cet outil au niveau du SNC sur d'autres modèles. L'utilisation de GCaMPs plus récentes, comme les GCaMP5 ou les GCaMP6, pourrait permettre d'optimiser cet outil<sup>219</sup>.

### *iii. Développement de l'outil P2X4-GECO*

Une dernière étude, parue en 2015, s'est intéressée au rôle de P2X4 dans la fusion membranaire des endolysosomes<sup>220</sup>. Bien que la localisation lysosomale des P2X4 ait été décrite depuis quelques années, le rôle précis de ce récepteur restait inconnu<sup>80</sup>. Les auteurs montrent d'abord que la surexpression de P2X4 conduit à une augmentation de la fusion des endolysosomes. Ayant précédemment montré que P2X4 est inactif aux pH acides retrouvés dans les endolysosomes, ils suggèrent qu'une alcalinisation préalable du milieu intra-endolysosomal est nécessaire à l'activation de P2X4 puis à la fusion membranaire. Ils montrent en effet qu'un traitement alcalin augmente fortement la fusion des endolysosomes. Cette fusion n'est pas observée sur des lysosomes exprimant un mutant dominant négatif de P2X4, suggérant un rôle central de l'activité P2X4 dans le phénotype observé. Pour prouver que ces fusions vésiculaires sont dépendantes d'un efflux de calcium des lysosomes par P2X4, les auteurs fusionnent le senseur calcique GECO à la queue C-terminale du P2X4 WT ou d'un mutant non fonctionnel. Le senseur GECO étant sensible au pH, les auteurs ne parviennent pas à observer directement l'activité du récepteur lors de la fusion vésiculaire. Néanmoins, à l'aide d'agents permettant la rupture de la membrane des lysosomes, ils mettent en évidence une faible activation de la GECO fusionnée au P2X4 WT et une forte activation de la GECO fusionnée au mutant non fonctionnel. Ce résultat suggère donc indirectement une diminution de calcium intra-vésiculaire dépendante de l'activité de P2X4.

Les protéines GECOs, développées en 2011, sont des mutants améliorés du senseur GCaMP3<sup>221</sup>. Ces versions sont sensibles aux variations de pH. Dans cette étude, il aurait été plus séduisant de montrer directement l'activité P2X4 lors du traitement alcalinisant. Néanmoins, la sensibilité de la GECO aux changements de pH (alcalinisation dans cette étude) n'a pas permis cela. Aujourd'hui, les dernières GCaMPs développées sont beaucoup moins sensibles aux variations de pH.

*iv. Autres outils fluorescents pour l'étude des récepteurs P2X*

Plusieurs protéines fluorescentes (GFP ou ses dérivées) ont été directement fusionnées aux récepteurs P2X afin de suivre leur expression et leurs propriétés dans des tissus spécifiques. Généralement, les fusions sont réalisées au niveau de la large boucle extracellulaire ou plus souvent au niveau de la queue C-terminale afin de ne pas perturber l'expression et les propriétés du récepteur.

Dans ce contexte, la protéine YFP (Yellow Fluorescent Protein) a été fusionnée à la boucle extracellulaire de P2X2<sup>222</sup>. Cette fusion a permis de réaliser de l'imagerie sur récepteur unique afin d'étudier la mobilité de ces récepteurs au niveau des dendrites de neurones primaires. Une seconde fusion de la protéine YFP à la boucle extracellulaire de P2X4 a permis d'étudier sa mobilité sur microglies activées et non activées et de mettre en évidence une mobilité dépendante de l'ATP et du calcium<sup>223</sup>.

Comme mentionné précédemment, P2X4 se caractérise par une expression à la membrane plasmique ainsi que dans divers compartiments intracellulaires (vacuoles, endosomes, lysosomes)<sup>80</sup>. Les mécanismes moléculaires responsables de la régulation de l'expression de P2X4 à la membrane plasmique sont mal caractérisés. Dans le but d'éclaircir ces mécanismes, un nouvel outil permettant de visualiser spécifiquement les récepteurs membranaires a été développé<sup>224</sup>. Une GFP, sensible au pH (pHluorin), a ainsi été insérée dans la boucle extracellulaire de P2X4. Cette dernière n'est pas fluorescente à des pH acides mais devient fluorescente à des pH neutres. Le pH des endosomes étant acide, une augmentation de la fluorescence traduira donc une insertion des récepteurs P2X4<sup>pHluorin</sup> à la membrane plasmique. Grâce à cet outil, les fractions membranaire et intracellulaire de P2X4 ont été décrites sur neurone primaire et sur une lignée de microglie.

Ces dernières fusions décrites ont permis d'étudier la localisation des récepteurs P2X mais ne permettent pas de suivre leur activité. Les quelques fusions à des senseurs calciques décrites permettent, quant à elles, de suivre en temps réel l'activité des récepteurs et d'identifier de nouveaux rôles physiologiques. Néanmoins, l'utilisation de ces outils a été limitée par les caractéristiques des sondes calciques utilisées. Avec le développement récent de nouvelles sondes calciques performantes, la création de nouveaux outils semble donc pertinente pour étudier le rôle des récepteurs P2X.

## ***II. La libération d'ATP, mécanismes et détection***

Comme nous l'avons vu en première partie, l'ATP est un messenger chimique extracellulaire important. Dans les cellules, sa concentration est de l'ordre de plusieurs millimolaire (mM) et peut atteindre plus de 100 mM dans certains compartiments cellulaires tels que les vésicules de sécrétion<sup>225,226</sup>. Au niveau extracellulaire, les estimations de la concentration d'ATP au repos sont de l'ordre de quelques nanomolaires<sup>227,228</sup>. L'ATP ne traversant pas la bicouche lipidique, des systèmes de libération sont donc nécessaires afin d'induire une réponse cellulaire via l'activation des récepteurs purinergiques.

Plusieurs mécanismes tels que les déformations mécaniques (stretch, changement osmotique, hypoxie...) ou l'interaction avec un pathogène conduisant à l'inflammation cellulaire peuvent entraîner une libération d'ATP dans le milieu extracellulaire. La communauté scientifique a d'abord pensé que la seule source d'ATP venait de cellules endommagées ou mortes. On sait aujourd'hui qu'une libération d'ATP peut aussi s'effectuer par des cellules non endommagées en condition physiologique ou pathologique. L'ATP peut être libérée au niveau central par les neurones ou les cellules gliales (astrocytes et microglies), mais aussi par une multitude de cellules périphériques.

Aujourd'hui, les contextes cellulaires dans lesquels les cellules libèrent de l'ATP sont encore débattus. En effet, dans le milieu extracellulaire, l'ATP est rapidement dégradée en ADP puis en AMP par les ectonucléotidases membranaires. Bien que plusieurs méthodes de mesures aient été développées ces dernières années, sa détection dans le milieu extracellulaire reste à ce jour difficile dû au manque d'outils pour suivre sa libération en temps réel. On sait néanmoins que sa libération extracellulaire peut faire suite à trois événements : la mort cellulaire, l'exocytose vésiculaire ou l'activation de voies conductives médiées par des canaux ou transporteurs.

### **II.1. Les mécanismes de la libération d'ATP**

#### **II.1.1. La libération vésiculaire**

Il est reconnu depuis de nombreuses années que l'ATP est un médiateur chimique localisé dans les granules de sécrétion de plusieurs tissus endocrines (cellules  $\beta$ -pancréatiques, cellules chromaffines...), ainsi que dans de nombreux tissus exocrines (cellules acineuses du pancréas, mastocytes, neutrophiles, cellules épithéliales des voies aériennes)<sup>229</sup>. Cette ATP va être libérée en tant que transmetteur ou co-transmetteur par des mécanismes d'exocytose dépendants du calcium.

En périphérie, la libération de l'ATP par les cellules chromaffines a été très étudiée. L'ATP est stockée dans des granules de sécrétion avec des catécholamines et de la sérotonine<sup>230</sup>. Le stockage de ces molécules utilise le gradient électrochimique ainsi que la différence de pH créée par la pompe V/H<sup>+</sup>-ATPase située à la membrane des granules<sup>231</sup>. La stimulation

sympathique des cellules chromaffines va entraîner le transport des granules le long du cytosquelette puis une fusion de ces dernières à la membrane plasmique permettant la libération du contenu dans le milieu extracellulaire<sup>232</sup>. De façon générale, les processus d'exocytose des vésicules sont dépendants de l'action des protéines de la famille des SNARE (Soluble Nsf(N-ethylmaleimide-sensitive-factor) Attachment protein Receptor) <sup>233</sup>. L'étape finale de l'exocytose fait intervenir l'attachement des protéines syntaxine/SNAP 25 à la protéine vésiculaire synaptotagmine sensible au calcium. La fusion vésiculaire et la libération de l'ATP dans le milieu extracellulaire va donc être dépendante du calcium<sup>234</sup>.

Au niveau du SNC, des études ont montré une forte concentration en ATP dans les vésicules synaptiques<sup>234</sup>. Aujourd'hui, on sait que l'ATP peut être co-libérée à la synapse avec d'autres neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, le GABA ou le glutamate<sup>234</sup>. Ces phénomènes d'exocytose dépendants du calcium ont plus récemment été décrits au niveau des cellules gliales, astrocytes et microglies<sup>235,236</sup>. Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont semblables à ceux décrits pour les cellules chromaffines.

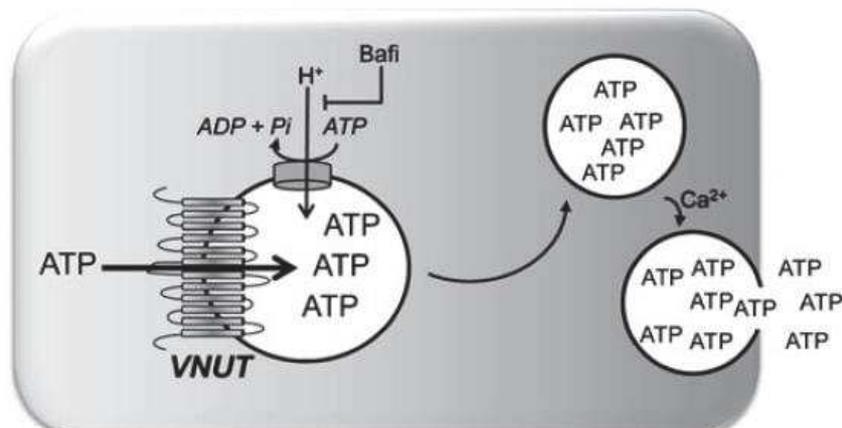
#### II.1.1.1. Stockage vésiculaire de l'ATP par le transporteur VNUT

Malgré la mise en évidence d'une libération d'ATP par les granules et les vésicules, l'identité du transporteur permettant le transfert de l'ATP du cytosol aux vésicules est restée longtemps inconnue. Une protéine, de la famille des transporteurs d'ions SLC (SoLute Carrier) a été identifiée et caractérisée comme le transporteur des nucléotides vésiculaires. Ce transporteur SLC17A9 a été nommé VNUT (Vesicular Nucleotide Transporter) et contribue au stockage et à la libération d'ATP dans de nombreux tissus (Figure 16). Ce transporteur est composé de 430 acides aminés, 12 TM et de segments C et N-terminaux intracellulaire. L'activité de VNUT est dépendante du gradient électrochimique créé par la pompe à proton V/H+ ATPase ainsi que des ions chlorures<sup>237</sup>.

Des études biochimiques, immunohistochimiques et d'hybridations *in situ* ont permis de confirmer la présence de ce transporteur dans les tissus connus pour libérer de l'ATP vésiculaire. Ainsi, VNUT est fortement exprimé au niveau des cellules  $\beta$ -pancréatiques, des cellules chromaffines ou des cellules acineuses. VNUT a aussi été identifié dans de nombreux tissus et cellules tels que l'estomac, l'intestin, le foie, le poumon, la vessie, la langue, les tissus dentaires, les muscles squelettiques, la thyroïde, la rate, les cellules sanguines, les cellules épithéliales sensorielles et encore les cellules immunitaires<sup>238</sup>. Au niveau central, VNUT a été identifié dans les neurones de la moelle épinière, certains neurones centraux (hippocampe, cervelet)<sup>239</sup> et au niveau des cellules astrocytaires et microgliales<sup>235,240</sup>. Cette large localisation suggère un rôle important de la libération vésiculaire d'ATP.

Il est intéressant de noter que d'autres protéines avaient été proposées comme des transporteurs de l'ATP vésiculaire. C'est le cas des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) et ENT3 (Intracellular Nucléoside Transporter). Pour le transporteur ENT3 par exemple, une étude montre qu'une délétion génétique entraîne la suppression de l'ATP libérée suite à une dépolarisation d'astrocytes en culture<sup>241</sup>. Néanmoins, d'autres études ont montrées que ce

transporteur a pour principal substrat les nucléosides et qu'il est principalement localisé au niveau mitochondrial<sup>242</sup>. Par la suite, plusieurs résultats ont montré que les transporteurs ABC et ENT3 n'étaient pas ou peu impliqués dans le stockage vésiculaire de l'ATP.



**Figure 16 : Représentation schématique de la libération vésiculaire d'ATP (d'après Lazarowski<sup>229</sup>)**

Le transporteur vésiculaire nucléotidique VNUT (SCL17A9) est composé de 12 segments transmembranaires. VNUT transporte l'ATP du cytoplasme dans la vésicule en utilisant le gradient électrochimique produit par la pompe à proton V-ATPase. Cette pompe à proton est sensible à la bafilomycine A<sub>1</sub>. Ces vésicules sont ensuite envoyées à la membrane et fusionnent à la membrane par exocytose. Ces phénomènes sont dépendants du calcium.

#### II.1.1.2. Rôle de la libération vésiculaire d'ATP

Dans la plupart des études, la mise en évidence d'une libération vésiculaire d'ATP a d'abord été suggérée par l'utilisation de chélateurs de calcium (de type BAPTA) et d'agents inhibant les voies sécrétrices (toxines, venins). Néanmoins ces agents ne permettent pas de discriminer l'effet dû à la libération d'ATP aux effets dus à l'insertion membranaire de nouveaux canaux. Un autre outil pour étudier la libération d'ATP a été la bafilomycine A<sub>1</sub>, un inhibiteur spécifique de la pompe à protons V-ATPase, permettant d'induire le gradient chimique et donc le remplissage des vésicules en ATP. Enfin, la découverte du transporteur VNUT, son inhibition génétique et la création de souris KO VNUT, ont permis de confirmer les rôles de la libération d'ATP vésiculaire.

En périphérie, l'utilisation d'animaux VNUT<sup>-/-</sup> a permis de confirmer la présence d'ATP vésiculaire au niveau de plusieurs tissus. Pour ne citer que quelques exemples, au niveau des cellules chromaffines des glandes adrénérergiques, l'ATP vésiculaire joue un rôle important dans la synthèse et le stockage des catécholamines<sup>243</sup>. La libération d'ATP au niveau des îlots de Langerhans, permettrait, quant à elle, de diminuer la sensibilité à l'insuline<sup>243</sup>. Enfin, au niveau de la vessie, la libération d'ATP promeut la relaxation de la vessie durant les premières étapes de remplissage<sup>244</sup>.

Au niveau du système nerveux, l'ATP vésiculaire est libérée par les principaux types cellulaires (neurones, astrocytes et microglies) et joue de nombreux rôles.

#### II.1.1.2.a. Rôle de la libération vésiculaire d'ATP par les neurones

Les neurones hippocampiques de souris VNUT<sup>-/-</sup> montrent une diminution de la libération de glutamate et d'aspartate induite par une dépolarisation<sup>243</sup>. Cette diminution du stockage et de la libération d'autres neurotransmetteurs peut être le reflet d'une synergie de transport et de stockage entre l'ATP et les autres neurotransmetteurs. Cette diminution peut aussi être due au blocage du feedback positif induit par l'ATP, sur la libération des autres neurotransmetteurs. Néanmoins, chez ces souris, aucune étude ne s'est intéressée aux courants post-synaptiques induits par le glutamate ainsi qu'aux phénotypes sur l'apprentissage et la mémoire.

Une étude récente a montré que la libération vésiculaire d'ATP est impliquée dans la formation et le maintien des douleurs neuropathiques<sup>245</sup>. De façon intéressante, les auteurs montrent qu'une délétion spécifique de VNUT dans les neurones de la moelle épinière permet d'atténuer les phénomènes d'allodynie. Ils ne reproduisent pas ce résultat avec une délétion au niveau des neurones primaires sensoriels, des astrocytes ou des microglies, confirmant la libération spécifique d'ATP par les neurones de la moelle épinière. Dans le contexte des douleurs neuropathiques mais aussi inflammatoires, un inhibiteur sélectif de l'activité VNUT, le clodronate, a aussi montré des effets bénéfiques ouvrant la voie à de potentiels traitements thérapeutiques<sup>246</sup>.

#### II.1.1.2.b. Rôle de la libération vésiculaire d'ATP par les astrocytes

On sait depuis longtemps que les astrocytes en culture sont capables de libérer de l'ATP vésiculaire. L'utilisation de chélateurs calciques, de bafilomycine A<sub>1</sub>, de souris exprimant une protéine SNARE non fonctionnelle, ainsi que des inhibiteurs ou des ARN interférents (siARN) contre la protéine VNUT ont permis de mettre en évidence une libération d'ATP vésiculaire dépendante du calcium<sup>247,248</sup>. De plus, des études de microscopie ont montré que les vésicules stockant l'ATP correspondent aux lysosomes<sup>240,249</sup>.

Cette ATP permettrait une coordination et une amélioration de la transmission synaptique et pourrait contrôler l'activité des récepteurs NMDA et la plasticité synaptique via les récepteurs P2X (cf. rôle des récepteurs P2X dans la transmission synaptique)<sup>154</sup>. Cette ATP pourrait aussi moduler l'inhibition phasique et tonique au niveau du néocortex par la modulation des systèmes GABAergiques<sup>158</sup>. Enfin, l'ATP vésiculaire des astrocytes situés au niveau du tronc cérébral peut contrôler les phénomènes de respiration de façon dépendante du pH<sup>250</sup>. Aucune étude n'a utilisé les souris VNUT<sup>-/-</sup> pour étudier le rôle de la libération vésiculaire d'ATP par les astrocytes et ces résultats restent donc à confirmer sur le plan expérimental.

#### II.1.1.2.c. Rôle de la libération vésiculaire d'ATP par les microglies

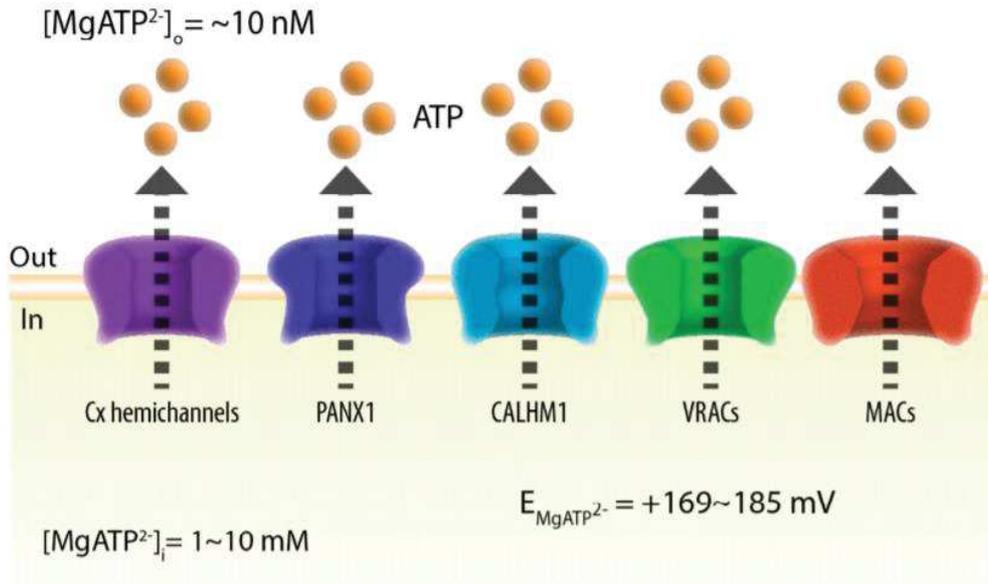
De la même façon, il a été montré que l'ATP microgliale est stockée au niveau des lysosomes de sécrétion et peut être libérée de façon dépendante du calcium, de la pompe à protons V-ATPase et des protéines SNARE<sup>235</sup>. L'ATP agissant sur les microglies peut venir de lésions cellulaires, de neurones, d'astrocytes ou des microglies elles-mêmes. Cette ATP va elle-même

entraîner la libération d'ATP vésiculaire et permettre l'activation des cellules microgliales. Ces phénomènes, appelés « ATP-induced ATP release » vont permettre l'activation puis la migration des microglies jusqu'au site de lésion via le récepteur P2Y12 ainsi que la libération de molécules pro-inflammatoires via le récepteur P2X7<sup>251</sup>. Dans les microglies VNUT<sup>-/-</sup>, ces deux vagues de libération d'ATP ne sont pas observées. Enfin, il a été montré que les lésions cellulaires augmentent l'expression du transporteur VNUT microglial<sup>252</sup>.

### II.1.2. La libération médiée par les canaux

Il est aujourd'hui accepté que la molécule d'ATP puisse être libérée dans le milieu extracellulaire par des voies conductives. La taille du pore du canal, la présence de récepteurs purinergiques à proximité, la mesure de la perméabilité à l'ATP ainsi que la détection d'ATP extracellulaire suite à l'activation du canal sont autant d'arguments qui permettent d'identifier des canaux perméables à l'ATP. Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette), dont font partie des protéines transmembranaires CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) et les protéines MRP (Multidrug Resistance Protein) ont été proposés comme voies conductives potentielles de la libération d'ATP<sup>253,254</sup>. Bien que le pore du canal CFTR soit théoriquement assez large pour permettre le passage de la molécule d'ATP<sup>255</sup>, plusieurs études ont montré que ces transporteurs ne sont pas directement perméables à l'ATP mais seraient plutôt des modulateurs de la libération d'ATP<sup>256,257</sup>. Un autre candidat, P2X7 a été proposé comme perméable à l'ATP<sup>258-260</sup>. Bien qu'encore débattu, on pense aujourd'hui que son association avec les pannexines expliquerait la perméabilité observée.

Aujourd'hui, 5 groupes de canaux sont décrits dans la littérature comme pouvant médier la libération d'ATP en contexte physiologique ou pathologique (Figure 17). Ces derniers sont les hémicanaux connexines (Cx), la pannexine 1 (PANX1), les modulateurs de l'homéostasie calcique 1 (CALHM1), les canaux anioniques régulés par le volume (VRACs ou VSORs ou VSOACs) et les canaux maxi anions (MACs). Avec l'identification moléculaire très récente des canaux VRACs et MACs (LRRC8 et SLCO2A1 respectivement), l'implication et le rôle de la libération d'ATP par ces récepteurs est un champ d'étude en pleine expansion.



**Figure 17 : La libération d'ATP par les canaux (d'après Taruno<sup>428</sup>)**

En présence d'une concentration physiologique de Mg<sup>2+</sup>, la majorité des molécules d'ATP existent sous forme d'anion MgATP<sup>2-</sup> en extra et intracellulaires. La concentration extracellulaire est d'une dizaine de nanomolaires alors que la concentration intracellulaire est de quelques millimolaires. Le potentiel d'équilibre de l'ion calculé se situe entre + 169 et + 185 mV suggérant une sortie d'ions vers le milieu extracellulaire. Les différents canaux perméables à l'ATP sont représentés par différentes couleurs. Cx = Connexine, PANX1 = Pannexine-1, CALHM1 = Modulateurs de l'homéostasie calcique, VRAC = Canaux anioniques régulés par le volume, MAC = Canaux maxi anioniques.

#### II.1.2.1. Libération par les héli-canaux connexines

##### II.1.2.1.a. Les connexines

Les connexines sont les protéines formant les jonctions communicantes ou « gap junctions » chez les vertébrés<sup>261</sup>. Plus de 20 connexines ont été identifiées et elles sont exprimées dans de nombreux tissus. Chaque connexine est nommée selon son poids moléculaire (par exemple, la connexine 43 (Cx43) est une protéine de 43 kDa). Les connexines peuvent former des homo ou hétéro-hexamères et sont envoyées à la membrane pour former des héli-canaux appelés connexons. Deux héli-canaux de cellules adjacentes peuvent s'assembler pour former une jonction communicante, jouant le rôle d'un canal intercellulaire permettant un couplage électrique et chimique entre deux cellules voisines. L'un des rôles importants de ces jonctions est le couplage électrique des potentiels d'action, notamment décrit au niveau du muscle cardiaque et du cerveau<sup>262,263</sup>. De plus, de nombreuses maladies humaines sont associées à des mutations des connexines<sup>264</sup>. Aujourd'hui, on sait que l'expression des héli-canaux à la membrane plasmique peut aussi jouer un rôle important<sup>265</sup>. Ces canaux sont activés par des potentiels de membrane positifs, une diminution du pH ou par une diminution de la concentration calcique extracellulaire<sup>266</sup>. Ces conditions sont réunies au cours d'un choc hypotonique, d'une stimulation mécanique ou d'une forte dépolarisation membranaire. Chaque connexine possède des propriétés de perméabilité spécifique mais leur pore est

généralement assez large pour être perméable à de petites molécules dont les nucléotides<sup>267</sup>. La structure de la connexine 26 humaine a été résolue<sup>268</sup>. Chaque monomère est composé de 4 TM et des domaines C et N-terminaux intracellulaires. Aujourd'hui plusieurs études ont montré la capacité des connexines à libérer de l'ATP dans le milieu extracellulaire.

#### II.1.2.1.b. La perméabilité à l'ATP par les connexines

Le pore des connexines a un diamètre de 1,4 nm à son endroit le plus étroit suggérant une possible perméabilité à la molécule d'ATP ayant un diamètre d'environ 1,2 nm<sup>268</sup>. L'évidence d'une perméabilité à l'ATP par les connexines est venue d'une lignée stable de gliome surexprimant Cx43 et Cx42<sup>269</sup>. Ces clones sont capables de libérer dix fois plus d'ATP par rapport à la lignée sauvage. Cette augmentation de la libération d'ATP a été confirmée avec les connexines Cx43, Cx32, Cx26 et Cx30 dans plusieurs lignées cellulaires<sup>270</sup>. La perméabilité directe des connexines à l'ATP a été montrée pour la Cx43<sup>270</sup>. En effet, l'influx d'ATP, détecté par bioluminescence, coïncide avec l'ouverture de canal unitaire Cx43 enregistré par patch-clamp en configuration « outside-out ». Le ratio de perméabilité sodique sur ATP ( $P_{Na}/P_{ATP}$ ) a été estimé à 2,5 : 1. Ces résultats montrent la perméabilité directe de la Cx43 à l'ATP et suggèrent que les autres connexines le sont aussi.

#### II.1.2.1.c. Rôles physiologiques de l'ATP libérée par les connexines

De nombreuses études ont décrit des rôles des connexines en condition physiologique ou pathologique via la libération d'ATP. Elles sont notamment impliquées dans le couplage intercellulaire de la signalisation calcique (Cx43, Cx26/30)<sup>271,272</sup>, le développement de la rétine (Cx43)<sup>273</sup>, le transport d'ions de l'épithélium rénal (Cx30)<sup>274</sup>, la chemosensitivité respiratoire centrale au niveau du bulbe rachidien (Cx26)<sup>275</sup>, la réponse immunitaire pendant l'inflammation (Cx43)<sup>276</sup> ou encore dans la fonction auditive (Cx26, Cx30)<sup>277</sup>.

Au niveau du cerveau, les connexines Cx30 et Cx43 sont fortement exprimées par les astrocytes mais pas par les neurones. La libération d'ATP par les connexines 43 semble jouer un rôle important dans la communication et les interactions neurones-glies notamment en conditions pathologiques telles que l'ischémie cérébrale ou l'inflammation<sup>278,279</sup>. Ces connexines semblent aussi pouvoir moduler l'activité synaptique via la libération d'ATP<sup>280</sup>. En effet, une étude montre qu'en condition basale, la concentration d'ATP extracellulaire au niveau de l'hippocampe est plus élevée chez les souris WT que chez les souris Cx43 KO, suggérant que l'activité des Cx43 contribue à la libération basale d'ATP. Cette étude montre aussi qu'une libération tonique d'ATP par les Cx43 peut agir sur les récepteurs P2 des neurones pyramidaux de l'aire CA1 et moduler l'activité synaptique excitatrice.

#### II.1.2.2. Libération par PANX1

##### II.1.2.2.a. Les pannexines

Les pannexines ont été identifiées dans les années 2000 et sont formées de trois membres, PANX1, PANX2 et PANX3<sup>281</sup>. Contrairement aux connexines, ces dernières ne forment pas de jonctions communicantes<sup>282</sup>. PANX3 est exprimée exclusivement dans le cerveau et PANX2

dans la peau et les os<sup>283</sup>. La localisation de PANX2 et PANX3 est principalement intracellulaire et ces canaux n'ont donc pas été étudiés pour leur perméabilité à l'ATP<sup>284,285</sup>. Au contraire, PANX1 est exprimée à la membrane de nombreux tissus et cellules tels que le cerveau, différentes cellules endothéliales et épithéliales, les érythrocytes ou les cellules immunitaires<sup>283</sup>. Ces canaux membranaires sont activés par des stimuli semblables aux connexines (stimulation mécanique, dépolarisation, hypotonie, hypoxie, ischémie...) mais le sont aussi par certaines caspases ou lors d'une augmentation de potassium extracellulaire. Leur activité est aussi fortement modulée par l'activation de plusieurs canaux membranaires (NMDA, P2Y, P2X) conduisant à une augmentation de calcium intracellulaires<sup>286</sup>. Les PANX1 sont des protéines N-glycosylées avec 4 TM et des domaines C et N-terminaux intracellulaires<sup>287</sup>. Elles forment des hexamères à la membrane et leur conductance peut atteindre 500 pS. Enfin il est aujourd'hui reconnu que la libération d'ATP par les PANX1 module de façon autocrine et paracrine la signalisation purinergique dans divers contextes physiologiques ou pathologiques.

#### II.1.2.2.b. Perméabilité à l'ATP par les PANX1

La perméabilité à l'ATP des pannexines a été montrée grâce à des enregistrements « inside-out » sur des membranes d'oocytes de xénope injectées avec un ARN humain de PANX1<sup>287</sup>. Le décalage négatif du potentiel d'équilibre de l'ion potassium suite à l'application de différents gradients ATP/K<sup>+</sup>, a suggéré une perméabilité à l'ATP. La même étude a montré une augmentation de la libération d'ATP induite par une forte concentration de potassium extracellulaire. Par la suite, de nombreuses études pharmacologiques ou génétiques (PANX1 KO) ont été réalisées en tissus natifs ou sur lignées cellulaires et ont montré la libération d'ATP et l'absorption de grosses molécules (<1 kDa) associées à l'activation de PANX1<sup>286</sup>.

Les PANX1 ont la capacité, selon le stimulus d'activation, d'adopter deux conformations ouvertes différentes<sup>288</sup>. La plupart des activateurs physiologiques (K<sup>+</sup> extracellulaire, Ca<sup>++</sup> intracellulaire, hypoxie, stress mécanique...) conduisent à une large conductance (500 pS), non sélective et perméable à l'ATP. Au contraire, une activation par la dépolarisation, induit un courant à plus faible conductance (50 pS), sélectif aux anions et non perméable à l'ATP. La première conformation paraît donc nécessaire pour une perméabilité à l'ATP. Néanmoins, une étude récente a remis en cause ces résultats<sup>288</sup>. Utilisant des concatémères possédant plus ou moins de parties C-terminales tronquées (partie auto-inhibitrice), les auteurs montrent que la conductance ainsi que la perméabilité à l'ATP dépendent du nombre de parties C-terminales tronquées. Ce résultat suggère un mode d'activation et de perméabilité à l'ATP plus complexe que les deux conformations préalablement suggérées.

#### II.1.2.2.c. Rôles physiologiques de l'ATP libérée par les PANX-1

Les PANX1 peuvent être activées de façon mécanique. Dans ce contexte, il a été montré que la stimulation de l'épithélium des voies aériennes conduit à la libération d'ATP qui aurait un rôle protecteur<sup>289</sup>. L'ATP libérée par les érythrocytes suite à des changements hypo-osmotiques permet une régulation locale du flux sanguin<sup>290</sup>. La distension des cellules

urothéliales peut aussi libérer de l'ATP et jouer un rôle important dans le contrôle de la miction<sup>291</sup>. Une étude a montré qu'une forme tronquée de PANX1 favorise la libération d'ATP et la survie des cellules cancéreuses métastatiques lors d'un cancer du sein<sup>292</sup>. PANX1 apparaît donc comme une cible thérapeutique potentielle pour le développement de drogues anti-métastatiques. Enfin, dans un contexte d'ischémie cérébrale, l'ATP libérée par PANX1 pourrait aussi participer aux dommages cellulaires associés<sup>278</sup>.

L'ATP extracellulaire module elle-même l'activité des PANX1 suite à l'activation des récepteurs P2Y via une augmentation de calcium intracellulaire<sup>293</sup> ou des récepteurs P2X7 via une association physique<sup>294</sup>. De façon intéressante, une concentration physiologique d'ATP active PANX1, via les P2Y ou P2X7, alors qu'une forte concentration peut directement inhiber PANX1<sup>293</sup>. Cette modulation par l'ATP extracellulaire a été proposée comme un mécanisme de rétrocontrôle permettant une régulation fine de la libération d'ATP. En effet, une faible libération d'ATP va activer les récepteurs P2Y qui stimulent l'activité de PANX1. La libération d'ATP va conduire à l'activation des P2X7. Cette forte concentration extracellulaire d'ATP va en retour inhiber l'activité des PANX1 évitant l'activation prolongée de P2X7 pouvant conduire à des phénomènes d'inflammation et d'apoptose. Bien que l'association physique entre PANX1 et P2X7 reste aujourd'hui débattue<sup>293</sup>, PANX1 paraît être un acteur important des voies de mort cellulaire par apoptose et des voies inflammatoires<sup>295</sup>. Par exemple, suite à différents stimulus, les caspases 3, 7 et 11 vont cliver une partie auto-inhibitrice de la queue C-terminale du récepteur, entraînant son activation et une libération d'ATP<sup>296</sup>. Cette ATP peut agir comme un signal « trouve-moi » et permettre le recrutement de cellules phagocytaires (macrophages ou microglies)<sup>297</sup> ou amplifier les phénomènes d'apoptose médiés par P2X7<sup>298</sup>.

En contexte physiologique, la modulation de PANX1 par de nombreux récepteurs a été décrite (les récepteurs du thromboxane, les récepteurs adrénergique  $\alpha$ -1, les récepteurs de l'insuline, les canaux Cav 1.2...)<sup>286</sup>. Dans les adipocytes par exemple, l'activation des récepteurs de l'insuline entraîne une libération d'ATP par les PANX1, ce qui permet d'augmenter la capture du glucose<sup>299</sup>.

### II.1.2.3. Libération par les CALHM1

#### II.1.2.3.a. Le canal CALHM1

Le canal CALHM1 (pour modulateurs de l'homéostasie calcique 1) a été découvert en 2008 par recherche bio-informatique et son gène a été identifié dans l'hippocampe, comme un gène de susceptibilité à la maladie d'Alzheimer<sup>300</sup>. En effet, un polymorphisme génétique de cette protéine membranaire va influencer l'âge des symptômes de la maladie. Six membres ont été décrits (CALHM1 à CALHM6), mais seul CALHM1 est connu pour former un canal fonctionnel à la membrane permettant de réguler la perméabilité calcique membranaire. CALHM1 est inactif au potentiel de membrane de repos mais est activé à la fois par une réduction du calcium extracellulaire et par une forte dépolarisation<sup>301</sup>. Ces canaux sont exprimés au niveau du cerveau<sup>300</sup>, des papilles gustatives<sup>302</sup>, de l'épithélium nasal<sup>296</sup>, de la vessie<sup>303</sup> et d'autres tissus. Ils sont sensibles au voltage, ont une perméabilité non sélective et une conductance

unitaire d'environ 24 pS. Chaque monomère est constitué de 4 TM, de segments N et C-terminaux intracellulaires, d'une boucle intracellulaire et deux boucles extracellulaires. Des études biochimiques et microscopiques suggèrent que le canal forme des homo-hexamères à la membrane<sup>304</sup>. Aujourd'hui, plusieurs études montrent que CALHM1 est impliqué dans certaines fonctions physiologiques via la libération d'ATP.

#### II.1.2.3.b. Perméabilité à l'ATP par les CALHM1

Des études de perméabilité relative ont permis d'estimer le diamètre du pore du canal à environ 1,4 nm, assez large pour le passage théorique de l'ATP<sup>304</sup>. Bien qu'aucune étude électrophysiologique n'ait montré une perméabilité directe à l'ATP, des mesures de la libération d'ATP associées à l'expression du récepteur ont été décrites *in vitro* et *in vivo*<sup>289,303,305</sup>. Ainsi, l'expression hétérologue dans des cellules HeLa, Cos7 et des ovocytes de xénope entraîne une augmentation de la perméabilité à l'ATP suite à une dépolarisation ou une diminution du calcium extracellulaire. Cette libération est sensible au rouge de ruthénium ne bloquant pas les PANX1 ou les VRACs. Enfin, chez les souris *Calhm1* KO, la libération d'ATP est abolie au niveau des cellules gustatives de type 2<sup>305</sup> et de l'épithélium nasal<sup>289</sup>. Ces résultats suggèrent une libération d'ATP par les canaux CALHM1.

#### II.1.2.3.c. Rôles physiologiques de l'ATP libérée par les CALHM1

L'implication physiologique de la libération d'ATP par le canal CALHM1 a été bien décrite dans la fonction gustative. Ces canaux sont exprimés au niveau des cellules gustatives de type 2, qui modulent les sensations de sucré, acide et salé. La libération d'ATP par ces cellules gustatives va activer les récepteurs hétéromères P2X2/P2X3 des nerfs gustatifs afférents et permettre la perception des qualités gustatives<sup>306</sup>. Plusieurs études ont montré chez le primate et la souris que l'ARNm de CALHM1 est exprimé dans des cellules de type 2<sup>302,305</sup>. De plus, un courant CALHM1 a été détecté dans ces cellules. Enfin, comme mentionné précédemment, chez les souris *Calhm1* KO, la libération d'ATP est abolie et les souris ne répondent plus à des stimuli sucré, umami, amer ou salé<sup>305</sup>. Ces observations suggèrent que CALHM1 pourrait être un composant essentiel de la libération d'ATP lors de la transmission gustative.

La libération d'ATP par le canal CALHM1 a aussi été décrite au niveau de la vessie<sup>303</sup>. La distension de l'épithélium urothélial causée par le remplissage de la vessie provoque la libération d'ATP qui, via son action sur les récepteurs P2X2/P2X3, va activer les voies sensorielles afférentes<sup>88,164</sup>. L'implication du canal CALHM1 a été proposée puisque son expression a été mise en évidence dans la vessie de porc par RT-PCR et immunohistochimie. De plus, la libération d'ATP est inhibée par l'antagoniste non spécifique rouge ruthénium et par un anticorps antagoniste<sup>303</sup>. Des études complémentaires avec des animaux KO paraissent néanmoins nécessaires pour confirmer une réelle implication du canal.

Enfin, la stimulation mécanique de l'épithélium respiratoire conduit à une libération d'ATP qui va augmenter le battement des cils et donc avoir une fonction protectrice<sup>307</sup>. Dans ce contexte, CALHM1 a été proposé comme le canal responsable de la libération d'ATP. En effet,

le transcrit CALHM1 a été détecté dans l'épithélium nasal de souris, et la libération d'ATP suite à un jet d'air est significativement réduite sur des cellules *Calhm1* KO<sup>289</sup>.

Au niveau du SNC, CALHM1 est exprimé dans les neurones de l'hippocampe et du cortex. Des études ont décrit son rôle dans la modulation de l'excitation neuronale via la régulation de la concentration de calcium extracellulaire<sup>301</sup> ainsi qu'un rôle dans la mémoire et la LTP synaptique via la modulation de la phosphorylation des récepteurs AMPA et NMDA<sup>308</sup>. Néanmoins, on ne sait toujours pas si ces observations sont dépendantes ou non d'une libération d'ATP suite à l'activation du canal.

#### II.1.2.4. Libération par les Maxi Anion Channels (MACs)

##### II.1.2.4.a. Les MACs

Les courants MACs sont caractérisés par une dépendance au voltage, une large conductance (300-500 pS) et une perméabilité fortement sélective aux anions<sup>309</sup>. Ils ont initialement été identifiés dans des cultures de cellules musculaires chez le rat<sup>310</sup> puis dans de nombreux types cellulaires. Cependant l'identité moléculaire des courants MACs est restée longtemps inconnue, jusqu'en 2017, où une équipe a découvert la protéine responsable des courants MACs<sup>311</sup>. Par criblage siARN (small interfering ARN), le gène *Slco2a1* a été identifié comme principal responsable des courants MACs. Ce courant a la particularité pharmacologique d'être sensible au gadolinium ( $Gd^{3+}$ ). Les MACs sont activés par de nombreux stimuli tels qu'un changement osmotique<sup>312</sup>, un stress salin<sup>313</sup>, une forte concentration de glucose<sup>314</sup>, l'ischémie<sup>315</sup>, l'hypoxie<sup>316</sup> ainsi que par l'activation de certains RCPG<sup>317</sup>. Les mécanismes d'activation du canal restent inconnus bien que l'on pense que la phosphorylation d'une tyrosine ainsi qu'une augmentation du calcium intracellulaire pourraient être impliquées<sup>318,319</sup>.

##### II.1.2.4.b. Perméabilité à l'ATP par les MACs

Une première étude, basée sur une expérience d'exclusion non électrolyte, a permis d'estimer le diamètre de l'entrée du canal entre 2,3 et 2,8 nm<sup>320</sup>. Une autre étude, basée sur la perméabilité aux anions de différentes tailles a estimé la taille du pore entre 1,1 et 1,5 nm<sup>321</sup>. Ces résultats suggèrent une perméabilité possible à l'ATP<sup>4-</sup> (1,15 nm) et au MgATP<sup>2-</sup> (1,2 nm). La première évidence électrophysiologique de la perméabilité à l'ATP par les MACs a été obtenue sur des cellules C127 en enregistrement « inside-out »<sup>312</sup>. Dans cette étude, les auteurs remplacent les anions par de l'ATP<sup>4-</sup> et observent un petit courant résiduel possédant les mêmes propriétés pharmacologiques que les courants MACs, suggérant une perméabilité à l'ATP<sup>4-</sup>. Le ratio de perméabilité entre les ions Cl<sup>-</sup> et l'ATP<sup>4-</sup> a été estimé à environ 0,1. Depuis d'autres enregistrements sur d'autres types cellulaires ont confirmé cette perméabilité à l'ATP<sup>313,316</sup>.

Enfin, l'ATP libérée suite à un choc osmotique pourrait également dépendre en partie des canaux MACs. Une première étude a décrit un profil pharmacologique identique entre les courants MACs et la libération d'ATP pendant un choc osmotique<sup>312</sup>. Une deuxième étude a

montré que la libération d'ATP suite à un choc osmotique est réduite suite à l'utilisation de siARN contre le gène *Slco2a1* de cellules C127 et potentialisée par l'expression hétérologue de MACs dans des cellules HEK 293T<sup>311</sup>.

#### II.1.2.4.c. Rôles physiologiques de l'ATP libérée par les MACs

Les MACs appartiennent à la famille des canaux activés par volume (VAACs). De par leur forte perméabilité au chlore, ils vont donc participer à la régulation du volume cellulaire. Des courants MACs ont été décrits au niveau du système nerveux et en périphérie dans de nombreux types cellulaires<sup>309</sup>. Du fait de leur récente identification moléculaire, le rôle de la libération d'ATP via ces canaux reste mal caractérisé. Malgré tout, quelques études proposent une implication de ces canaux, suite à différents stimuli.

Au niveau du rein, un changement luminal de concentration de NaCl entraîne une libération d'ATP de la membrane basolatérale des cellules de la *macula densa*. Cette ATP va agir sur les cellules mésangiales voisines et sur les cellules musculaires lisses des artéριοles afférentes. L'ATP va permettre un rétrocontrôle négatif en régulant la concentration de NaCl luminal. Un courant MAC caractéristique a été identifié au niveau de la membrane basolatérale des cellules de la maculadensa<sup>313</sup>. Ce courant, induit par une augmentation de la concentration luminal de NaCl, est accompagné d'une libération d'ATP. Le gonflement cellulaire de la *macula densa* pourrait être à l'origine de l'activation des canaux MACs. Dans ce contexte, la libération d'ATP par le canal doit être confirmée par l'utilisation d'animaux *Slco2a1* KO.

En condition d'ischémie cardiaque, la libération d'ATP est connue pour avoir un rôle cardioprotecteur<sup>322</sup>. Une étude a montré que l'utilisation de siARN contre l'ARNm des canaux MACs, diminue significativement la libération d'ATP induite par la perfusion du cœur avec un milieu privé de glucose et d'oxygène, suggérant un rôle protecteur de l'ATP libérée par les MACs<sup>316</sup>.

Au niveau du SNC, des études antérieures à l'identification moléculaire des MACs ont montré que des chocs ischémiques ou hypotoniques peuvent conduire à une libération d'ATP par les astrocytes suite à l'activation de courants caractéristiques aux courants MACs<sup>315,323</sup>. Suite à une stimulation électrique de neurones en culture, il a été montré que l'entrée de sodium va entraîner une entrée d'eau et un gonflement de l'axone qui va conduire à l'activation des canaux VAACs. Cette dernière, importante pour le maintien de l'excitabilité membranaire, va conduire à la libération d'ATP axonale. Une étude a montré que cette libération dépend de courants dont la pharmacologie est proche de celle des canaux MACs, sans exclure la participation d'autres canaux dont les VRACs<sup>324</sup>. Les auteurs suggèrent un rôle important de l'ATP dans la communication entre les astrocytes et les neurones. Encore une fois, l'utilisation d'animaux *Slco2a1* KO semble nécessaire pour valider le rôle de ces canaux au niveau des cellules du SNC.

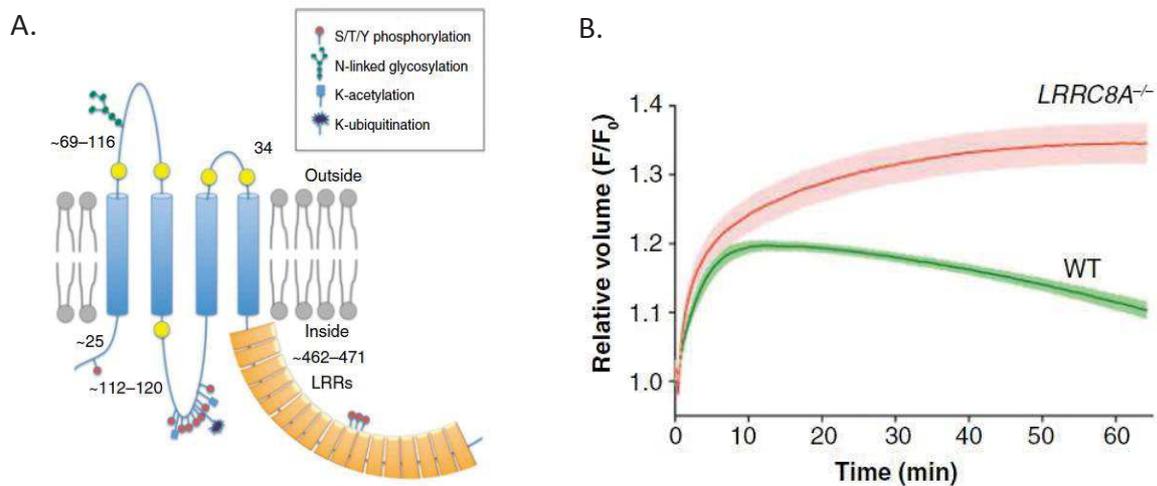
### II.1.2.5. Libération par les Volume Regulated Anion Channels (VRACs)

#### II.1.2.5.a. Les VRACs et la régulation du volume cellulaire

Les canaux VRACs, aussi connus sous les noms de VSOR (Volume Sensitive Outwardly Rectifying anion channel) ou VSOACs (Volume-Sensitive Organic osmolyte and Anion Channels), appartiennent à la famille des canaux activés par le volume (VAACs) et vont participer à la régulation du volume cellulaire<sup>325</sup>. Le contrôle du volume cellulaire est essentiel pour le maintien de l'homéostasie et les fonctions vitales d'une cellule. En condition hypotonique, une réduction de l'osmolarité extracellulaire va entraîner un gonflement cellulaire via un influx d'eau au travers la membrane plasmique. En réponse à ce gonflement, la cellule va activer plusieurs mécanismes moléculaires actifs, permettant un retour au volume initial. Cette étape, appelée « régulation de la diminution du volume cellulaire » (ou RVD pour Regulatory Volume Decrease), fait notamment intervenir l'activation des canaux VRACs qui, via l'efflux d'ions chlore et de petites molécules organiques, vont permettre une sortie d'eau puis une diminution du volume cellulaire. Les courants VRACs ont d'abord été décrits il y a une trentaine d'année sur des lymphocytes<sup>326</sup> et des cellules intestinales humaines<sup>327</sup> et ont depuis été décrits dans la plupart des tissus. Ils sont caractérisés par une rectification sortante pour des potentiels de membrane positifs, une forte sélectivité anionique et une conductance intermédiaire comprise entre 50 et 80 pS<sup>328</sup>. Les courants VRACs sont activés par une augmentation du volume cellulaire et plus particulièrement par une diminution de la force ionique intracellulaire<sup>329,330</sup>. Indépendamment de leur activation par un changement de volume, il a été montré que ces courants peuvent être activés par des composés pro-apoptotiques via les ROS (Reactive Oxygen Species)<sup>331</sup> ainsi que par de nombreux récepteurs membranaires tels que les récepteurs purinergiques<sup>332</sup>, métabotropiques du glutamate<sup>333</sup>, de l'EGF (epidermal growth factor)<sup>334</sup> et des bradykinines<sup>335</sup>.

L'identité moléculaire des courants VRACs est longtemps restée inconnue, ce qui a limité les études fonctionnelles et la compréhension des rôles physiologiques et pathologiques du canal. Récemment, deux groupes ont identifié la protéine responsable des courants VRACs<sup>336,337</sup>. Les auteurs ont décrit la protéine LRRC8 (Leucin Rich Repeat Channel) (ou SWELL1) comme un composant essentiel des courants VRACs et nécessaire à la phase de RVD et au retour à un volume cellulaire normal (Figure 18). Les protéines LRRC8 sont composées de 5 membres (LRRC8A à LRRC8E) et la sous-unité LRRC8A est requise pour la fonctionnalité du canal. Dans des cellules HEK, LRRC8A ne génère des courants de type VRACs qu'à condition d'être co-exprimé avec l'un des autres membres de la famille. De façon intéressante, la composition en sous-unité détermine la cinétique d'activation<sup>336</sup>, la conductance unitaire<sup>330</sup>, la sensibilité au stress oxydatif du canal<sup>338</sup> ainsi que la perméabilité à certaines petites molécules organiques<sup>339</sup>. Très récemment une partie du canal LRRC8 a été cristallisée permettant de confirmer la topologie et la stœchiométrie des canaux précédemment déduites d'études biochimiques et de mutagenèse<sup>340</sup>. Chaque sous-unité est composée de deux boucles extracellulaires, de 4 TM, d'une boucle intracellulaire et de queues N et C-terminales intracellulaires. La queue C-terminale, de grande taille, est composée de séquences répétées

riches en leucines (LRR). De nombreux sites de phosphorylations potentiels se trouvent sur la deuxième boucle intracellulaire et au niveau de la région LRR, mais les fonctions associées restent à ce jour inconnues. A la membrane, les canaux forment des hexamères.



**Figure 18 : Propriétés du canal LRRC8 (ou SWELL1) (d'après Pederson et al<sup>345</sup>)**

(A) Topologie proposée et sites de modifications post-traductionnelles du canal LRRC8. Chaque sous-unité est composée de deux boucles extracellulaires, de 4 segments transmembranaires, d'une boucle intracellulaire et de queues N et C-terminales intracellulaires. La queue C-terminale, de grande taille, est composée de séquences répétées riches en leucines. Le schéma indique les positions des sites de modifications post-traductionnelles potentiels (phosphorylation, glycosylation, acétylation et ubiquitination). (B) Déficit du RVD chez les HEK LRRC8A<sup>-/-</sup>. Les cellules sont soumises à une solution à 96 mOsm. Le volume est mesuré grâce aux variations de fluorescence de la calcéïne lors des changements de volume cellulaire. A noter, le retour au volume initial des cellules WT lors de la phase de RVD alors que les cellules LRRC8A<sup>-/-</sup> ne sont pas capables de réguler leur volume suite à un choc hypotonique.

#### II.1.2.5.b. Perméabilité à l'ATP par les VRACs

Il est aujourd'hui accepté que le canal LRRC8 est perméable aux petites molécules organiques telles que la taurine, l'aspartate et le glutamate<sup>336,341</sup>. Des mesures de la perméabilité de calixarines de différentes tailles, ainsi que la mesure de la perméabilité de molécules non électrolytes ont permis d'estimer le diamètre du pore entre 1,2 et 1,4 nm<sup>342,343</sup>. Cette taille permet donc théoriquement le passage des molécules d'ATP. Une augmentation extracellulaire d'ATP fut d'abord rapportée sur des cellules endothéliales de l'aorte en condition hypo-osmotique grâce à l'utilisation d'antagonistes VRACs<sup>344</sup>. Bien que des études aient remis en question une perméabilité directe à l'ATP<sup>345,346</sup>, une diminution de l'ATP extracellulaire suite au blocage des courants VRACs en condition hypo-osmotique, a été montrée sur la lignée astrocytaire 1321N1<sup>347</sup>. Enfin, en condition iso et hypo-osmotique, une étude décrit l'activation des courants VRACs par le médiateur inflammatoire S1P (sphingosine-1-phosphate) associée à une libération d'ATP<sup>348</sup>. Néanmoins, ces études sont basées sur l'utilisation d'antagonistes dont la spécificité laisse souvent à désirer<sup>349</sup>. Depuis l'identification moléculaire de LRRC8, une seule étude s'est intéressée à la perméabilité à l'ATP

du canal exprimé dans des ovocytes de xénopes<sup>350</sup>. Elle met en évidence une augmentation de la libération d'ATP sur des ovocytes exprimant les sous-unités LRRC8A/E suite à un choc hypo-osmotique. Il est intéressant de noter que plusieurs études ont montré que la perméabilité de LRRC8 à certaines molécules (taurine, glutamate) est dépendante de la composition en sous-unités du canal<sup>330,339</sup>. Ces observations pourraient en partie expliquer les résultats contradictoires observés quant à la libération d'ATP.

La perméabilité à l'ATP des canaux LRRC8 est donc probable. Néanmoins, maintenant que l'identité moléculaire des canaux VRACs est connue, des études électrophysiologiques et génétiques supplémentaires semblent nécessaires afin de confirmer la perméabilité à l'ATP de ces canaux.

#### II.1.2.5.c. Rôles physiologiques supposés de l'ATP libérée par les VRACs

Depuis l'identification du canal LRRC8, aucun rôle précis de la libération d'ATP par ces canaux chlores n'a été décrit. Néanmoins, quelques évidences pharmacologiques peuvent nous amener à faire des hypothèses quant au rôle potentiel de la libération d'ATP via les VRAC au niveau du SNC.

Dans les astrocytes, les rôles de la perméabilité à d'autres molécules telles que la taurine, l'aspartate et le glutamate ont été plus étudiés. Pour ne citer qu'un exemple, la libération de glutamate par les canaux VRACs astrocytaires a été décrite dans une condition pathologique d'ischémie cérébrale<sup>341</sup>. Dans ces conditions, la libération de ces acides aminés excitateurs contribuerait à l'hyperexcitabilité neuronale et à la mort cellulaire. En effet, le traitement par un antagoniste diminue la quantité de glutamate extracellulaire ainsi que les dommages cellulaires associés.

Au niveau neuronal, comme mentionné pour les canaux MACs, une stimulation électrique conduit à l'activation des courants VAACs. Par la libération d'ATP, les canaux VRACs pourraient participer et donc jouer un rôle dans la communication entre les neurones et les astrocytes en condition physiologique comme pathologique<sup>324</sup>.

Enfin, les canaux VRACs microgliaux jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions telles que la prolifération, la ramification, la migration ainsi que la phagocytose<sup>351,352</sup>. La signalisation purinergique joue aussi un rôle important dans ces fonctions<sup>353</sup>. On peut donc faire l'hypothèse qu'une libération d'ATP par ces canaux pourrait contribuer à certaines de ces fonctions. Dans ce sens, une étude récente a montré qu'une libération d'ATP suite à un choc osmotique pouvait augmenter l'activité de courants chlore via une voie P2Y et dépendante du calcium et augmenter la mobilité microgliale<sup>354</sup>. Suite à l'utilisation d'antagonistes non spécifiques, les auteurs suggèrent l'implication des PANX dans la libération d'ATP. Cependant, ces antagonistes ciblant aussi les canaux LRRC8, l'implication du canal LRRC8 dans la libération d'ATP n'est pas exclue.

#### II.1.2.5.d. Canaux LRRC8, système purinergique et régulation du volume cellulaire, liens et hypothèses

Suite à un choc hypo-osmotique, le canal LRCC8 s'active et induit la phase de RVD. En effet, son blocage pharmacologique ou sa délétion génétique entraîne une inhibition du RVD et les cellules ne retrouvent pas leur volume initial<sup>336</sup>. Depuis longtemps, on sait que l'ATP est libérée suite à un choc hypo-osmotique. Bien que les pannexines soient candidates à la libération d'ATP dans ce contexte, leurs implications semblent variables d'un type cellulaire à un autre. LRRC8 pourrait donc être un candidat de la libération d'ATP dans ce contexte cellulaire. Parallèlement, différentes études sur différents types cellulaires ont montré que la libération d'ATP peut participer aux phénomènes de RVD et à la régulation du volume cellulaire<sup>346,355-359</sup>. Bien que cette hypothèse soit encore débattue, les voies de signalisation décrites impliqueraient une activation des récepteurs P2Y par l'ATP et une augmentation du calcium intracellulaire. Sachant que quelques études montrent que l'activation de récepteurs purinergiques peut moduler l'activité des canaux LRRC8, on peut raisonnablement penser qu'une libération d'ATP par LRRC8 pourrait renforcer sa propre activité et donc un retour plus rapide au volume cellulaire initial.

Cette relation entre LRRC8 et la libération d'ATP semble jouer un rôle important dans la gliotransmission astrocytaire. En effet, des études récentes<sup>360-363</sup> indiquent qu'au sein des astrocytes, le canal LRRC8 régule non seulement la libération de glutamate induit par l'hypo-osmolarité, mais également celle induite par l'ATP. On peut donc penser que dans les astrocytes, de faibles changements osmotiques peuvent conduire à l'efflux simultané de chlore ainsi que de plusieurs molécules telles que l'ATP et le glutamate. L'ATP libérée, pourrait agir de façon paracrine et moduler positivement l'activité des canaux LRRC8 par des voies dépendantes des récepteurs P2Y et du calcium. Cette modulation positive de l'activité du canal chlore potentialiserait la phase de RVD mais aussi la libération d'ATP et de glutamate dans le milieu extracellulaire. On peut facilement imaginer qu'en condition physiologique, une faible activation du canal permettrait un faible efflux d'ions et d'ATP permettant une régulation optimale du volume cellulaire, alors que l'efflux faible de glutamate permettrait une modulation fine de l'activité neuronale. En conditions pathologiques (ischémie, trauma), la forte activation de LRRC8 pourrait conduire à une forte augmentation de la concentration de glutamate extracellulaire, et donc à des phénomènes d'excitotoxicité neuronale. Enfin, dans ces conditions, on peut imaginer que l'augmentation d'ATP extracellulaire pourrait perturber les mécanismes de neuromodulation ainsi que jouer un rôle dans l'initiation des phénomènes inflammatoires par l'activation des cellules immunitaires environnantes.

Après des décennies de flou, l'identification moléculaire des canaux VRACs va permettre le développement d'outils génétiques permettant de contrôler l'expression des récepteurs LRRC8 dans des tissus spécifiques. Ces outils, associés au développement d'outils pour détecter la libération d'ATP en temps réel *in situ* ou *in vivo* permettront de valider ou réfuter l'implication de ces canaux dans la libération d'ATP en condition physiologique et pathologique.

## II.2. Les outils pour détecter la libération d'ATP extracellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe plusieurs mécanismes de libération d'ATP dans le milieu extracellulaire. Ces mécanismes ont été mis en évidence la plupart du temps en système hétérologue par la combinaison d'outils pharmacologiques ou génétiques couplés à des méthodes de détection de l'ATP extracellulaire. Suite à différents stimuli, l'ATP peut être rapidement libérée, mais aussi rapidement dégradée par les différentes ectonucléotidases membranaires, rendant difficile sa quantification exacte. Malgré le développement d'outils pour mesurer l'ATP extracellulaire, peu d'entre eux permettent de visualiser de façon rapide, précise et en temps réel la libération d'ATP à la membrane *in situ* ou *in vivo*, limitant ainsi la compréhension de la signalisation purinergique.

Plusieurs méthodes physiques et chimiques ont été utilisées pour détecter les nucléotides dont l'ATP. Ces méthodes, allant de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse, s'avèrent sensibles et spécifiques mais ne permettent pas une détection dynamique de la libération d'ATP<sup>364,365</sup>. Des analogues fluorescents de l'ATP ont aussi été développés et utilisés pour étudier les mécanismes de la libération vésiculaire. Néanmoins, dans ce cas-là, l'ATP étudié n'est pas endogène<sup>366</sup>. Aujourd'hui la plupart des méthodes disponibles pour détecter de façon dynamique une libération d'ATP endogène se base sur la détection de réactions enzymatiques dépendantes de l'ATP ou sur la mesure directe ou indirecte de l'activité des récepteurs P2X<sup>367</sup>. Le paragraphe suivant propose un tour d'horizon non exhaustif des principales méthodes actuellement disponibles pour détecter l'ATP extracellulaire ainsi que leurs avantages et limites.

### II.2.1. La détection de l'ATP basée sur des réactions enzymatiques

#### II.2.1.1. Les méthodes basées sur la technique luciférine/luciférase

##### II.2.1.1.a. Principe et développement

La méthode de détection de l'ATP extracellulaire par la bioluminescence produite par le couple luciférine/luciférase est sans doute la plus ancienne et encore la plus utilisée. Cette réaction a été découverte dès 1884 et sa première utilisation pour doser l'ATP a été faite en 1947<sup>368</sup>. La réaction chimique est basée sur l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine par l'enzyme luciférase (Figure 19A). Cette réaction, dépendante du magnésium, de l'oxygène et de l'ATP, va produire une bioluminescence dont le spectre d'émission présente un pic autour de 560 nm. La luminescence est proportionnelle à la quantité d'ATP consommée et permet donc de mesurer indirectement la quantité d'ATP présente dans le milieu extracellulaire. Ces dernières années, des efforts considérables ont été réalisés pour produire des luciférases aux propriétés optimisées permettant de réaliser de l'imagerie par bioluminescence<sup>369</sup>. Actuellement, Les luciférases les plus utilisées sont des luciférases dérivées de la luciole et du scarabée. Récemment, une équipe a développé une nouvelle luciférase avec une forte activité et un meilleur rendement quantique en fusionnant le domaine N-terminale d'une luciférase de luciole (*Photinus pyralis*) au domaine C-terminale d'une luciférase d'une autre espèce de

luciole (*Luciola Italica*). Cette nouvelle luciférase chimérique s'avère être trois fois plus sensible par rapport au variant commercial Luc2<sup>370</sup>.

#### II.2.1.1.b. Caractéristiques et limites

Cette méthode, simple et robuste, peut être utilisée pour mesurer la quantité d'ATP extracellulaire d'un milieu avec ou sans cellules à l'aide d'un luminomètre. L'ATP est détectée avec une grande spécificité par rapport aux autres nucléotides (UTP, UDP, ADP). La réaction a l'avantage d'être rapide (quelques millisecondes) et peut détecter des seuils d'ATP extrêmement bas (de l'ordre du femtomolaire)<sup>370</sup>. Néanmoins, plusieurs facteurs peuvent interférer avec l'activité enzymatique de la luciférase. En effet, son activité est optimale à 20°C, à un pH de 7,8 et est dépendante de la présence de dioxygène et de magnésium<sup>371</sup>. Son activité est inhibée par plusieurs anions (Br<sup>-</sup>, NO<sup>3-</sup>, I<sup>-</sup>...) <sup>372</sup> et par une forte concentration de sel<sup>373</sup>. L'inhibiteur du transporteur d'anions DIDS<sup>374</sup>, le gadolinium (Gd<sup>3+</sup>) (bloqueur des canaux MAC)<sup>375</sup>, ainsi que des antagonistes aux récepteurs P2 comme la suramine<sup>376</sup> inhibent l'activité de la luciférase. Toutes ces caractéristiques sont des obstacles non négligeables pour l'utilisation de cette méthode.

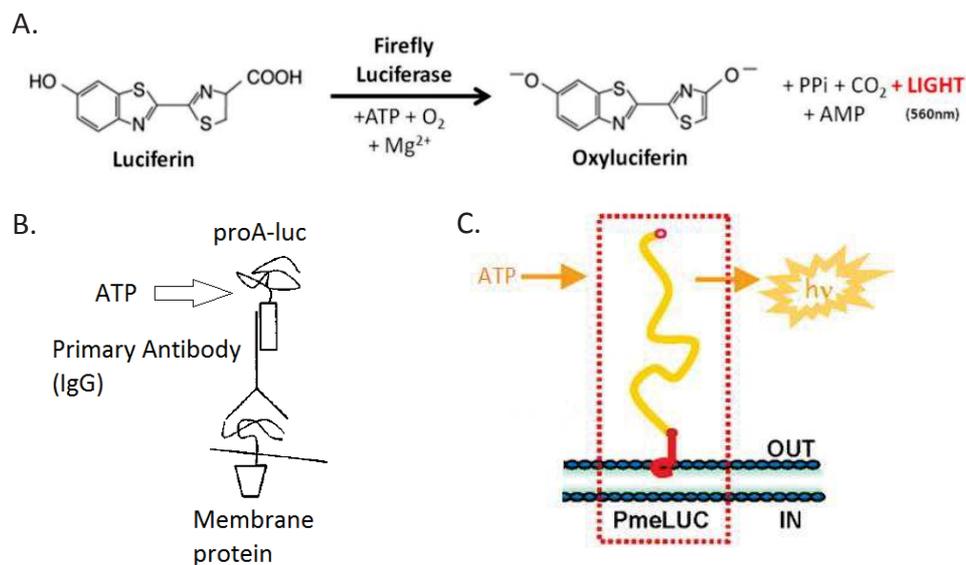
Bien que cette méthode permette, grâce à une gamme étalon, de déterminer une concentration d'ATP précise, cette concentration dépend du volume extracellulaire. De plus, l'ATP dosée a déjà probablement été en partie dégradée par les ectonucléotidases membranaires. Cette méthode ne permet donc pas d'estimer les quantités d'ATP réellement libérées à la membrane.

#### II.2.1.1.c. Luciférases ciblées à la membrane plasmique

Pour dépasser certaines limites préalablement évoquées, l'une des idées a été d'accrocher artificiellement la luciférase à la membrane plasmique pour pouvoir y détecter l'ATP libérée. Une première méthode consiste à utiliser les propriétés d'attachement de la protéine bactérienne A (proA) aux immunoglobulines IgG. Dans ce cas, des anticorps primaires IgG sont d'abord mis en contact avec les cellules et vont s'attacher à la membrane plasmique par reconnaissance de protéines membranaires endogènes. Puis une luciférase fusionnée avec la protéine A bactérienne (proA-luc) est ajoutée aux cellules. La reconnaissance entre les IgG et la proA-luc va permettre d'ancrer les luciférases à la membrane (Figure 19B)<sup>377</sup>. L'utilisation de ces luciférases chimères a permis de mettre en évidence, suite à l'activation de cellules plaquettaires, des concentrations d'ATP membranaire vingt fois supérieures à celles obtenues par la méthode classique. Cette méthode permet donc d'estimer la quantité d'ATP libérée à la membrane de façon plus réaliste. Cette technique a ensuite été utilisée pour caractériser la libération d'ATP dans une lignée astrocytaire humaine<sup>378</sup> ainsi que sur les cellules épithéliales des voies aériennes en culture où la quantité d'ATP à la membrane suite à un choc osmotique a été estimée à environ 1  $\mu\text{M}$ <sup>379</sup>. Une approche similaire, basée sur la fusion de la luciférase à une biotine a permis de cibler la luciférase à la membrane grâce à un système biotine-streptavidine<sup>380</sup>.

Une deuxième approche pour cibler la luciférase à la membrane plasmique a été de fusionner la partie C-terminale de la luciférase à la séquence lipidique membranaire GPI du récepteur à la vitamine B9 (Figure 19C)<sup>381</sup>. Ce senseur, nommé pmeLUC, peut être transfecté dans des lignées cellulaires HEK de façon stable. Dans ce cas, cette lignée rapportrice peut être injectée directement *in vivo* pour détecter la présence d'ATP. Même si aucune étude ne le confirme expérimentalement, cet outil peut théoriquement aussi être ciblé dans des cellules spécifiques par des méthodes virales.

Bien que la luciférase libre puisse détecter des concentrations d'ATP de l'ordre du femtomolaire, la fusion génétique avec des protéines membranaires entraîne une perte de la sensibilité à l'ATP. Bien que proA-Luc puisse détecter des libérations d'ATP de 1 à 100  $\mu\text{M}$ , l'outil pmeLUC détecte l'ATP à partir de 10  $\mu\text{M}$  seulement. Son utilisation *in vitro* et *in vivo* s'est donc limité à des contextes où la libération d'ATP est forte (contexte inflammatoire et libération d'ATP par les cellules cancéreuses)<sup>382-384</sup>. Enfin, cibler la luciférase à la membrane ne permet pas de s'affranchir des facteurs précédemment cités pouvant perturber l'activité enzymatique de la luciférase.



**Figure 19 : Exemples de luciférases ciblées à la membrane (d'après Beigi et al (B)<sup>377</sup> ; Pellegatti et al (C)<sup>381</sup>)**

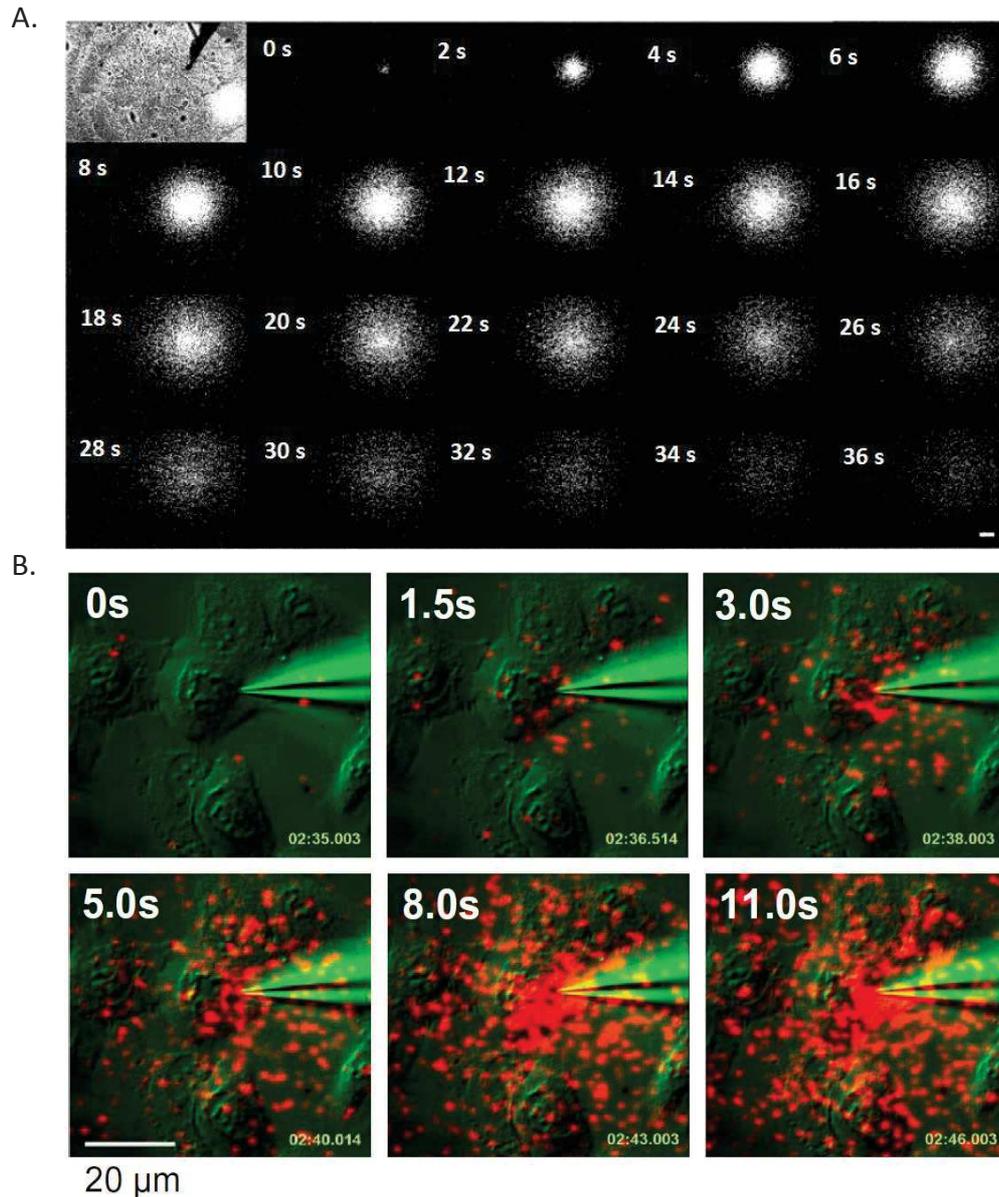
(A) Réaction chimique du couple luciférine/luciférase. Production d'un signal de bioluminescence (560 nm) en présence d'ATP, de dioxygène (O<sub>2</sub>) et de magnésium (Mg<sup>2+</sup>). L'oxydation de la luciférine va produire de l'oxyluciférine, du pyrophosphate inorganique (PPi), du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), de l'AMP ainsi qu'une énergie lumineuse (hv). La quantité d'énergie lumineuse dégagée va être proportionnelle à la quantité d'ATP consommée permettant sa quantification. (B) Le système proA-luc est constitué de la fusion de la luciférine à la protéine bactérienne A. L'utilisation d'anticorps primaire IgG qui va reconnaître à la fois les protéines membranaires et la proA-luc va permettre de cibler la luciférase au niveau de la membrane plasmique. (C) Le système pmeLUC consiste à fusionner la luciférase à une séquence lipidique membranaire GPI. Cet outil permet l'expression de la luciférase à la membrane plasmique.

#### II.2.1.1.d. Imagerie de l'ATP par les approches de bioluminescence

Ces méthodes de bioluminescence ont été utilisées avec succès pour visualiser la libération d'ATP en temps réel. Une première étude, parue en 2000, a permis la visualisation, pour la première fois, une libération d'ATP endogène suite à une stimulation physique d'astrocytes en culture<sup>371</sup>. Par la suite, de nombreuses études ont utilisé cette technique pour caractériser la libération d'ATP dans les cellules endothéliales<sup>374</sup>, de cellules gliales de la rétine<sup>385</sup> ou encore au niveau du système nerveux central de mollusque<sup>373</sup>. La microscopie utilisant les luciférases ciblées à la membrane a aussi été réalisée sur plusieurs cellules telles que des cellules endothéliales<sup>386</sup> ou des fibroblastes<sup>387</sup>. Enfin, l'imagerie concernant le senseur pmeLuc a principalement été réalisée chez des animaux entiers. Grâce à l'injection de cellules HEK exprimant de façon stable le senseur pmeLuc au niveau des tumeurs, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de la concentration d'ATP au sein de l'environnement tumoral<sup>388</sup>.

La faible luminescence émise par la luciférase est l'un des facteurs limitant pour détecter en temps réel la libération d'ATP. En effet, les acquisitions requièrent un équipement d'imagerie ultra-sensible (caméra CDD) et un temps d'intégration de plusieurs minutes conduisant à des images de faible résolution temporelle ou avec un temps d'intégration plus court mais avec une faible résolution spatiale (Figure 20A). Ces limites ne permettent pas l'analyse de phénomènes dynamiques<sup>371</sup>. Récemment, la résolution temporelle de la détection de la luminescence a été augmentée à 100 ms grâce à l'utilisation de caméra EMCCD couplée à un amplificateur d'image pour compenser la faible émission de photons (Figure 20B)<sup>387</sup>. A faible grossissement, et avec des objectifs à forte ouverture numérique, il est alors possible de détecter une libération d'ATP de quelques dizaines de nanomolaires avec une résolution spatiale de quelques micromètres. Cette approche a permis de caractériser de façon élégante la libération d'ATP suite à divers stimuli (stimulation mécanique, osmotique) dans différentes lignées cellulaires.

Malgré les récents progrès de l'imagerie et l'amélioration continue des luciférases utilisées, la résolution spatio-temporelle des signaux de luminescence reste faible. Atteindre une résolution nécessaire pour visualiser la libération d'ATP au niveau cellulaire demande un équipement spécifique. De plus, l'utilisation de la méthode de bioluminescence luciférine/luciférase demande l'apport exogène d'un substrat, la luciférine. Bien que l'outil pmeLuc ait été utilisée *in vivo* grâce à l'apport de luciférine par des injections intrapéritonéales<sup>388</sup>, cette approche paraît difficilement applicable au niveau du SNC. Enfin, comme mentionné précédemment, la modulation de l'activité de la luciférase par de nombreux ions et agents pharmacologiques explique aussi en partie pourquoi les outils luciférine/luciférase sont peu utilisés pour caractériser de façon précise les contextes et mécanismes de la libération d'ATP en temps réel.



**Figure 20 : Visualisation dynamique de la libération d'ATP par les méthodes de bioluminescences luciférine/luciférase (d'après Wang et al (A)<sup>376</sup> et Furuya et al (B)<sup>392</sup>)**

(A) Enregistrement spatio-temporel de la libération d'ATP par des astrocytes en culture par une caméra ICCD. Acquisition toute les 2 secondes avec un temps d'exposition de 500 ms. La première image correspond à une image en champ clair montrant le positionnement de la micropipette permettant une stimulation mécanique des cellules. Notons la faible résolution spatiale obtenue avec ce type de caméra pour une acquisition relativement rapide (bar d'échelle = 50 µM). (B) Enregistrement spatio-temporel de la libération d'ATP de cellules épithéliales mammaires primaires suite à une stimulation mécanique rapide par une microélectrode en verre. Les signaux de luminescence sont représentés en rouge et enregistrés grâce à une caméra EMCCD + amplificateur, et les cellules sont détectées grâce à une caméra IR-DIC. Le temps d'exposition est de 500 ms. Notons la résolution spatiale de quelques micromètres pour cette acquisition rapide grâce à l'utilisation de l'amplificateur.

## II.2.1.2. Les méthodes basées sur d'autres réactions enzymatiques

### II.2.1.2.a. Les biosenseurs ampérométriques d'ATP

Ces méthodes de détection de l'ATP sont généralement basées sur l'enrobage d'une microélectrode de platine par une couche très fine de différentes enzymes. Ces réactions enzymatiques, dépendantes de l'ATP, vont entraîner des changements ampérométriques détectés par la microélectrode. Différents protocoles d'enrobage ainsi que différentes enzymes ont été testés avec succès produisant un signal robuste et rapide<sup>389,390</sup>. Les premières microélectrodes développées se sont basées sur la consommation du glucose par une glucose oxydase et une hexokinase et se sont avérées capable de mesurer des concentrations d'ATP situées entre 10 et 200 nM<sup>389</sup>. Un deuxième type de microélectrode basé sur l'activité des enzymes glycérol kinase (GK) et glycérol-3-phosphatase (G3P) a été développé pour détecter l'ATP<sup>390</sup>. En présence d'ATP, le glycérol va être converti en G3P, qui en présence d'O<sub>2</sub>, va être converti en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce dernier va entraîner l'oxydation de l'électrode de platine induisant un courant proportionnel à la quantité d'ATP consommée. Cette méthode, sensible et spécifique, permet de détecter des concentrations d'ATP de 200 nM à 50 µM. Cette approche a permis, *in vivo*, de mettre en évidence une libération d'ATP au niveau de la moelle épinière lors de l'activité locomotrice chez le xénope. Cette méthode a aussi permis de montrer que l'ATP est un neurotransmetteur important au niveau du bulbe rachidien, impliqué dans la régulation de la respiration suite à une augmentation de la pression partielle en CO<sub>2</sub> périphérique<sup>391</sup>.

Bien que ces méthodes soient spécifiques, il a été montré que d'autres composés électro-actifs, comme la sérotonine ou l'ascorbate, peuvent perturber certaines réactions enzymatiques<sup>390</sup>. De plus, la deuxième méthode demande l'apport exogène de glycérol. Des contrôles sans glycérol sont donc nécessaires. Enfin, bien que ces méthodes puissent être optimisées pour détecter la libération d'ATP par un petit nombre de cellules, l'utilisation de microélectrodes reste invasive. Dans un système complexe comme au niveau du SNC, ces méthodes ne permettront donc pas de discriminer la libération d'ATP par un type cellulaire précis. Enfin ces méthodes ne permettent pas non plus de visualiser la libération d'ATP en temps réel.

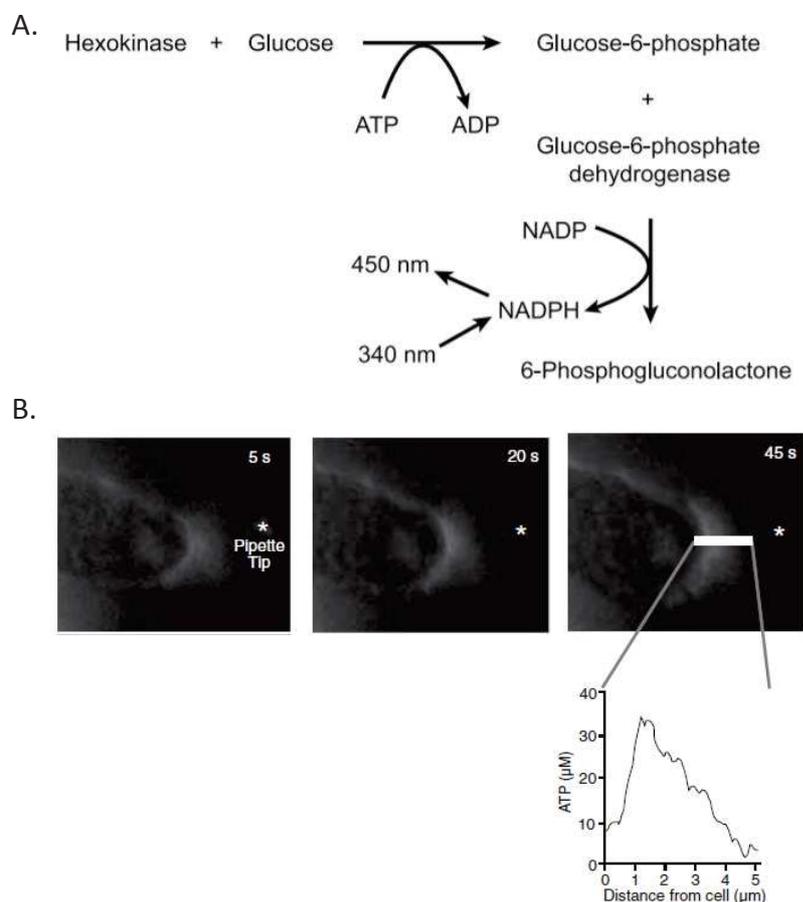
### II.2.1.2.b. Les biosenseurs d'ATP fluorescents basés sur les réactions enzymatiques

Une des limites des approches ampérométriques précédemment décrites est l'incapacité de visualiser, par fluorescence, la libération d'ATP et donc d'obtenir des informations spatiales. Pour pallier cette limite, des systèmes enzymatiques en tandem couplés à des molécules fluorescentes ont été développés.

Une première méthode est basée sur la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (G6P) dépendante de l'ATP. Ce G6P, en présence d'une G6P déshydrogénase (G6PD) et de NADP va conduire à la production de 6-Phosphogluconolactone et de NADPH. C'est la conversion du NADP<sup>+</sup> en NADPH qui va émettre un pic de fluorescence proportionnelle à la quantité d'ATP libérée (Figure 21A)<sup>392</sup>. Dans ce cas, une micropipette contenant un milieu avec le glucose, l'hexokinase, le G6PD et le NADP<sup>+</sup> va permettre la perfusion les cellules d'intérêts pour détecter l'ATP libérée. Cette méthode a été utilisée pour mettre en évidence la migration

orientée et dépendante de l'ATP de neutrophiles (Figure 21B)<sup>393</sup>. Plus récemment, une deuxième approche a été développée, basée sur la consommation de dioxygène par une glycérol kinase (GK) suite à la production de glycérol-3phosphate (G3P) à partir de glycérol<sup>394</sup>. Dans ce cas, une microélectrode est couverte d'une couche de ruthénium sensible à la concentration d'oxygène. La présence d'ATP dans le milieu extracellulaire va entraîner la réaction enzymatique qui va à son tour entraîner une diminution de dioxygène. Cette dernière va entraîner une diminution de la fluorescence directement proportionnelle à la quantité d'ATP consommée au départ. Cette méthode a notamment permis de détecter une augmentation de l'ATP extracellulaire au niveau des disques intervertébraux chez le porc.

Les deux biosenseurs fluorescents précédemment décrits ont une sensibilité intermédiaire et peuvent détecter des concentrations d'ATP entre 1  $\mu\text{M}$  et une centaine de  $\mu\text{M}$ . Néanmoins, l'aspect invasif des micropipettes ou microélectrodes explique sans doute la faible utilisation de ces outils au niveau du SNC.



**Figure 21 : Détection de l'ATP extracellulaire suite à une réaction enzymatique fluorescente (d'après Corridor et al (A)<sup>392</sup> et Chen et al (B)<sup>393</sup>)**

(A) Résumé des réactions enzymatiques en tandem conduisant à la formation du produit final fluorescent, le NADPH à partir d'ATP et de glucose. (B) Libération d'ATP par des neutrophiles stimulés par un gradient de N-formyl-Met-Leu-Phe (FMLP). La réaction enzymatique utilisée est celle décrite en (A). La production de NADPH est enregistrée en temps réel par un microscope à fluorescence classique ( $\lambda_{\text{exc/em}}$  : 340/460 nm). L'acquisition est de 12 images par minute. La concentration d'ATP est estimée suite à une calibration de la fluorescence.

### II.2.1.3. Les méthodes basées sur le transfert d'énergie par résonance entre protéines fluorescentes (FRET) ou bioluminescentes (BRET)

#### II.2.1.3.a. Les méthodes basées sur le FRET

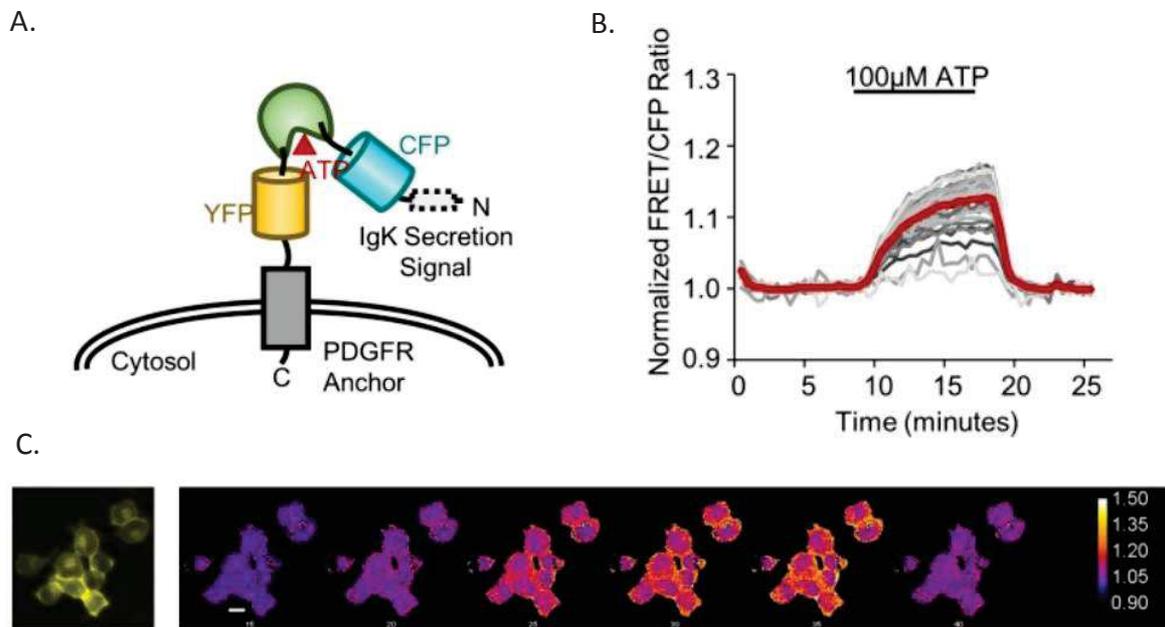
Une alternative aux méthodes utilisant la luciférase a été le développement de méthodes basées sur le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET). Ces senseurs peuvent être adressés par génie génétique et ne requièrent pas l'addition d'un substrat exogène (luciférine, glycérol). Ces dernières années, plusieurs sondes ont été développées pour détecter l'ATP.

Une première famille de senseurs nommés ATeam a été développée en 2009<sup>395</sup>. Ces senseurs sont basés sur l'utilisation de la sous-unité  $\epsilon$  de l'ATP synthase F0/F1 fusionnée à la paire de protéines fluorescentes CFP et YFP. La liaison de l'ATP à cette protéine va permettre le rapprochement de la protéine fluorescente donneuse (CFP) et de la protéine fluorescente accepteuse (YFP) et permettre le transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur. Ce senseur permet de détecter des concentrations d'ATP de 7,4  $\mu\text{M}$  à 3,3 mM, est très sélectif pour l'ATP, et possède une cinétique de réponse de l'ordre de la seconde. Les propriétés de ce senseur ont été améliorées par la suite. Par exemple, le senseur GO-ATeam utilise la paire fluorescente GFP et OFP, permet une détection dans le rouge (donc plus appropriée pour l'imagerie *in vivo*) et possède une plus faible sensibilité au pH<sup>396</sup>. Plus récemment, un nouveau senseur basé sur l'utilisation d'une version mutée de la sous-unité  $\epsilon$  couplée aux fluorophores GFP et YFP a été développé<sup>397</sup>. Ce nouvel outil s'avère capable de détecter l'ATP dès 10 nM et avec une grande spécificité.

Une autre famille de senseurs, nommée QUEEN, utilise une protéine fluorescence permutée (cpFP) insérée entre 2 hélices  $\alpha$  de la sous-unité  $\epsilon$  de l'ATP synthase<sup>398</sup>. Les auteurs ont développé 2 variants capables de détecter de l'ATP entre 7  $\mu\text{M}$  et 2 mM. Enfin, basé sur ce même principe de protéine fluorescente permutée, un rapporteur permettant de quantifier un rapport ATP sur ADP a été développé. Ce senseur, d'abord nommé Perceval, puis amélioré en PercevalHR, est basé sur la fusion de la protéine GlnK1, sensible à l'ATP et à l'ADP, à une protéine Vénus permutée<sup>399</sup>. La protéine GlnK1 va fixer l'ADP ou l'ATP avec une haute affinité permettant l'émission d'une fluorescence à 420 et 500 nm respectivement, permettant *in fine* une mesure du ratio ATP/ADP.

Les outils fluorescents précédemment décrits ont principalement été utilisés pour détecter des changements d'ATP intracellulaire et étudier le métabolisme de différentes cellules<sup>400</sup>. En effet, leur faible sensibilité à l'ATP n'est pas adaptée à la détection de l'ATP extracellulaire. Néanmoins, récemment, un senseur nommé ecATeam3.10, permettant de détecter l'ATP extracellulaire par une mesure de FRET, a été développé<sup>400</sup>. Ce dernier est basé sur la fusion d'une version du senseur ATeam très affin pour l'ATP à une séquence du PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) permettant l'ancrage du senseur à la membrane. Une séquence IgK est aussi fusionnée au niveau de la partie N-terminale permettant l'adressage du senseur à la face extracellulaire de la membrane plasmique (Figure 22). De la même façon que pour les luciférases, la fusion du senseur à la membrane entraîne une diminution de l'affinité pour l'ATP (EC50 d'environ 12  $\mu\text{M}$  contre 500 nM pour la version cytosolique) et la

gamme de détection est généralement comprise entre 1 et 100  $\mu\text{M}$ . Bien que ce senseur FRET permette une quantification de l'ATP libérée, les ratios de fluorescence décrits sont faibles et aucune preuve de concept *in situ* ou *in vivo* n'a été apportée.



**Figure 22 : Le senseur d'ATP extra-cellulaire ecATeam 3.10 (d'après Conley et al,<sup>400</sup>)**

(A) Schéma du senseur FRET exprimé à la membrane plasmique grâce à la fusion à la séquence PDGFR en C-terminal du fluorophore accepteur YFP. Une séquence IgK de sécrétion est fusionnée en N-terminale du fluorophore donneur CFP permet d'envoyer le senseur à la membrane. (B) Le ratio normalisé du signal FRET montre une augmentation moyenne de 1,12 suite à une stimulation avec 100  $\mu\text{M}$  d'ATP. Le tracé de chaque cellule est représenté et la moyenne est représentée en gras. (C) Champ représentatif d'images fluorescentes de cellules analysées en (B). Bar d'échelle = 20  $\mu\text{m}$ .

#### II.2.1.3.b. Les méthodes basées sur le BRET

Enfin, certains outils se sont basés sur la combinaison des protéines bioluminescentes et fluorescentes afin d'augmenter le signal des outils bioluminescents. Un premier senseur, nommé Nano-lantern (ATP1), consiste en une *Renilla luciferase* (Rluc8) coupée en deux avec la sous-unité  $\epsilon$  de l'ATP synthase et la protéine Vénus<sup>401</sup>. La fixation de l'ATP entraîne une reconstitution de la Rluc8 qui peut alors transférer son énergie à la protéine Vénus qui va ainsi émettre un signal fluorescent. Plus récemment, une autre version, nommée BTeam, a été développée<sup>402</sup>. Dans ce cas, la sous-unité  $\epsilon$  de l'ATP synthase relie la NanoLuc à une YFP. La fixation de l'ATP va entraîner un rapprochement des deux protéines et permettre le transfert d'énergie de la NanoLuc vers la YFP qui va émettre à son tour un signal fluorescent.

Aujourd'hui ces senseurs sont développés pour mesurer l'ATP intracellulaire seulement, mais pourraient être théoriquement ciblés à la membrane par des méthodes précédemment décrites. Néanmoins, leur affinité de l'ordre de la centaine de micromolaire ou du millimolaire, ne permet pas d'envisager, en l'état, la création d'un biosenseur d'ATP extracellulaire.

#### II.2.1.4. La détection de l'ATP basée sur l'activité des récepteurs purinergiques

##### II.2.1.4.a. Les biosenseurs d'ATP basés sur la fluorescence de cellules rapportrices induite par l'activation des récepteurs purinergiques

Le principe de ces méthodes est d'utiliser des cellules rapportrices, exprimant des récepteurs purinergiques P2 endogènes, afin de détecter la libération d'ATP par d'autres cellules. Les cellules rapportrices, chargées avec une sonde calcique, sont placées à proximité de cellules libérant de l'ATP, et peuvent donc détecter par fluorescence, une libération d'ATP. Cette méthode, décrite pour la première fois en 1989, a été appliquée sur une co-culture de fibroblastes (cellules rapportrices) et de cellules chromaffines<sup>403</sup>. Suite à une stimulation nicotinique, les cellules chromaffines libèrent de l'ATP qui va activer les récepteurs P2 des fibroblastes et entraîner une augmentation de la fluorescence.

Cette méthode a permis de montrer pour la première fois, sur des cellules leucémiques de rat, que l'ATP est un facteur paracrine important permettant la transmission de la signalisation calcique entre cellules voisines<sup>404</sup>. Des cellules musculaires lisses de souris en culture ont aussi été utilisées pour détecter la libération d'ATP basolatérale de cellules rénales de la *macula densa*<sup>313</sup>. Enfin, des cellules microgliales ont été utilisées comme biosenseur pour évaluer la libération d'ATP par les astrocytes suite à une stimulation mécanique<sup>247</sup>.

La principale limite de cette méthode est sa spécificité. En effet, il est difficile de s'affranchir de l'effet de facteurs externes ou de drogues, pouvant conduire à une libération d'ATP par les cellules rapportrices elles-mêmes. Théoriquement, n'importe quelle cellule exprimant des récepteurs P2 peut être utilisée comme senseur. Néanmoins chaque type cellulaire exprimant un répertoire de récepteurs purinergiques différents, la sensibilité des senseurs va varier selon le type cellulaire utilisé.

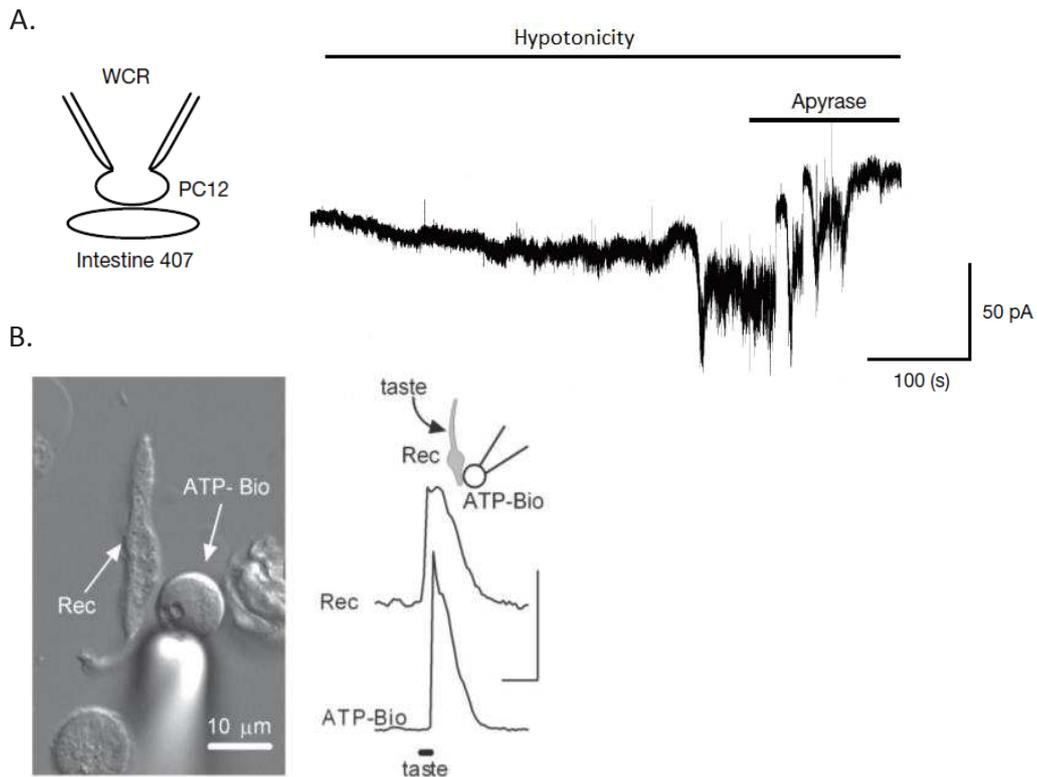
##### II.2.1.4.b. Les biosenseurs d'ATP basés sur la mesure des courants P2X

D'un principe similaire, cette méthode consiste à placer des cellules exprimant des récepteurs P2X à proximité de cellules libérant de l'ATP. L'ATP va activer les récepteurs P2X dont les courants seront enregistrés par électrophysiologie. Cette méthode, aussi appelée « patch-sniffing », enregistre les courants en configuration cellule entière ou « outside-out ». Les cellules utilisées peuvent être des cellules HEK ou les cellules neuroendocrines PC12 exprimant le récepteur P2X2, connu pour sa forte expression membranaire et sa faible désensibilisation (Figure 23A)<sup>405</sup>.

Le biosenseur PC12/P2X2 est le plus utilisé, et a permis de mesurer une libération d'ATP pour de nombreuses cellules : épithéliales, cardiomyocytes, cellules  $\beta$ -pancréatiques, neurones spinaux...<sup>405,409</sup>. Dans certains cas, les cellules d'intérêt peuvent exprimer les récepteurs P2X. Ces dernières sont donc elles-mêmes équipées du biosenseur. Cette approche a été utilisée sur des cellules en culture INS1 pour montrer une libération d'ATP par exocytose<sup>407</sup>.

De façon alternative et intéressante, une étude a décrit l'utilisation de cellules rapportrices CHO exprimant de façon stable les récepteurs P2X2/P2X3 et chargées avec une sonde calcique Fura-2. Dans ce cas, la libération d'ATP par les cellules gustatives de types 2 va entraîner l'activation des récepteurs P2X2/P2X3 et une augmentation de la fluorescence (Figure 23B)<sup>408</sup>.

Généralement, le courant des cellules rapportrices est enregistré en configuration cellule entière. Néanmoins, cette configuration ne permet toujours pas de s'affranchir de l'activation du senseur par des facteurs externes ou des drogues appliquées pour étudier la libération d'ATP. Dans ce cas, il est possible d'éviter ce problème en adoptant une approche en configuration « outside-out » qui permet une plus grande spécificité de réponse. De façon générale, ces biosenseurs basés sur l'activité des récepteurs P2X, ont une sensibilité correcte correspondant à l'affinité pour l'ATP des récepteurs P2X (1 à 100  $\mu$ M). Néanmoins, les propriétés de désensibilisation de certains récepteurs P2X ainsi que l'aspect invasif de ces biosenseurs ont été un frein à leur utilisation *in vivo*.



**Figure 23 : Détection de l'ATP extracellulaire basé sur l'activité des récepteurs P2X (d'après Hayashi et al (A)<sup>405</sup>, et Huang et al (B)<sup>408</sup>)**

(A) A gauche : Des cellules PC12, transfectées avec le récepteur P2X2, permettent l'enregistrement de la libération d'ATP par des cellules épithéliales de l'intestin humain. Les courants sont enregistrés en cellule entière (WCR = Whole Cell Recording). A droite : Trace de courant représentative induite par la libération d'ATP suite à un choc hypotonique. Les courants sont diminués suite à l'application d'apyrase (0,1 mg/mL). (B) Utilisation d'un biosenseur à l'ATP fluorescent pour étudier la sécrétion d'ATP de cellules gustatives de type 2. A gauche : exemple d'une pipette portant une cellule CHO exprimant P2X2/P2X3 (ATP-bio) et proche d'une cellule gustative de type 2 (Rec). Les deux cellules sont chargées en Fura-2. A droite : le tracé du haut représente le signal calcique de la cellule Rec. Le tracé du bas représente la fluorescence du biosenseur témoignant d'une activation des P2X2 et P2X3 et donc d'une libération d'ATP.

# *Résultats et discussion*

## I. Contexte de l'étude

Les récepteurs P2X, identifiés dans les années 1990, sont exprimés par les principales cellules du SNC. Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques dont la transmission synaptique et dans plusieurs pathologies telles que les douleurs chroniques ou certaines maladies neurodégénératives<sup>65</sup>. Malgré cette importance, il est aujourd'hui difficile de suivre en temps réel l'activité de ces récepteurs *in situ* ou *in vivo*. En effet, les caractéristiques de certains de ces récepteurs (localisation intracellulaire, désensibilisation rapide) limitent l'enregistrement de leur activité par les méthodes classiques telles que la mesure des courants par électrophysiologie. De plus, ces méthodes invasives restent limitées à l'échelle de la cellule unique et ne peuvent généralement pas être utilisées *in vivo*. Enfin, les méthodes fluorescentes disponibles, se basant sur la détection d'une entrée de calcium pour suivre l'activation de ces récepteurs, ne permettent pas de discriminer les réponses médiées par les récepteurs P2X de celles des autres récepteurs purinergiques entraînant aussi une augmentation du calcium intracellulaire. Aujourd'hui, une seule étude a décrit une méthode permettant de suivre spécifiquement l'activité des récepteurs P2X par fluorescence<sup>215</sup>. Cette étude se base sur la fusion d'une protéine caméléon sensible au calcium à la queue C-terminale des P2X. Cette fusion permet la détection d'un signal de FRET dépendant du calcium suite à l'activation des récepteurs P2X. Néanmoins des études au sein du laboratoire ont montré que la taille de ce partenaire de fusion altérait le trafic des récepteurs P2X. De plus, l'intensité des signaux de FRET induits par l'activation des senseurs caméléons est assez faible, ce qui limite son utilisation. Il n'existe donc aujourd'hui aucune méthode permettant de détecter de façon simple et robuste l'activité P2X dans des préparations pluricellulaires.

L'ATP est une molécule de signalisation libérée en condition basale ou suite à divers stimuli tels que les déformations mécaniques (stretch, changement osmotique, hypoxie...) ou l'interaction avec un pathogène. L'ATP libérée en grande quantité peut devenir un signal de danger activant les voies inflammatoires et apoptotiques. Il est donc indispensable que la concentration d'ATP extracellulaire soit contrôlée. La plupart des cellules ont donc développé des systèmes de dégradation rapide de l'ATP extracellulaire par le biais de différents types d'ectonucléotidases membranaires permettant une dégradation de l'ATP en ADP et finalement en adénosine. Du fait de cette dégradation rapide, la détection et la quantification de cette molécule dans le milieu extracellulaire reste un défi. Classiquement, la méthode bioluminescente, basée sur le couple luciférine/luciférase, est la plus utilisée. Bien que très sensible, cette méthode ne permet pas de détecter la présence d'ATP proche de la membrane avec une grande sensibilité, même si des adaptations ont permis de cibler la luciférase à la membrane. De plus, les signaux de luminescences émis sont généralement faibles et ne permettent pas la visualisation de l'ATP avec une bonne résolution spatio-temporelle. D'autres méthodes, basées sur l'adressage de protéines fluorescentes à la membrane, ont permis de détecter l'ATP extracellulaire mais avec des sensibilités assez faibles. Il n'existe donc à ce jour, pas de senseurs suffisamment sensibles permettant de détecter et de quantifier la libération d'ATP à la membrane avec une bonne résolution spatio-temporelle. C'est

notamment pour ces raisons que les mécanismes moléculaires sous-jacents à la libération d'ATP restent encore débattus.

L'objectif de cette étude est donc de créer de nouveaux outils fluorescents permettant, d'une part, de suivre l'activité des récepteurs P2X, et d'autre part, de détecter en temps réel et avec une grande sensibilité la libération d'ATP. Basée sur l'idée de fusionner un senseur calcique au récepteur comme précédemment décrit, le senseur calcique GCaMP6s a été fusionné à la queue C-terminale des récepteurs P2X afin de suivre leur activité par l'intermédiaire de l'influx calcique qu'ils génèrent. Ce même outil P2X-GCaMP6s a ensuite été modifié pour créer un biosenseur d'ATP extracellulaire très sensible.

La première partie de cette étude présentera d'abord la caractérisation fonctionnelle des outils P2X-GCaMP6s en système hétérologue, pour aborder ensuite les approches lentivirales permettant la caractérisation des réponses P2X sur une lignée de cellules astrocytaires et des neurones primaires hippocampiques. Dans une deuxième partie, nous décrirons comment l'outil P2X2-GCaMP6s a été modifié pour créer un biosenseur d'ATP extracellulaire ultrasensible. Nous montrerons que l'outil développé permet de détecter et de quantifier de faibles libérations endogènes d'ATP suite à des chocs hypotoniques appliqués sur différents types cellulaires. Comme preuve de concept, une troisième partie concernera la description des mécanismes moléculaires sous-jacents à la libération d'ATP dans un contexte de changements osmotiques.

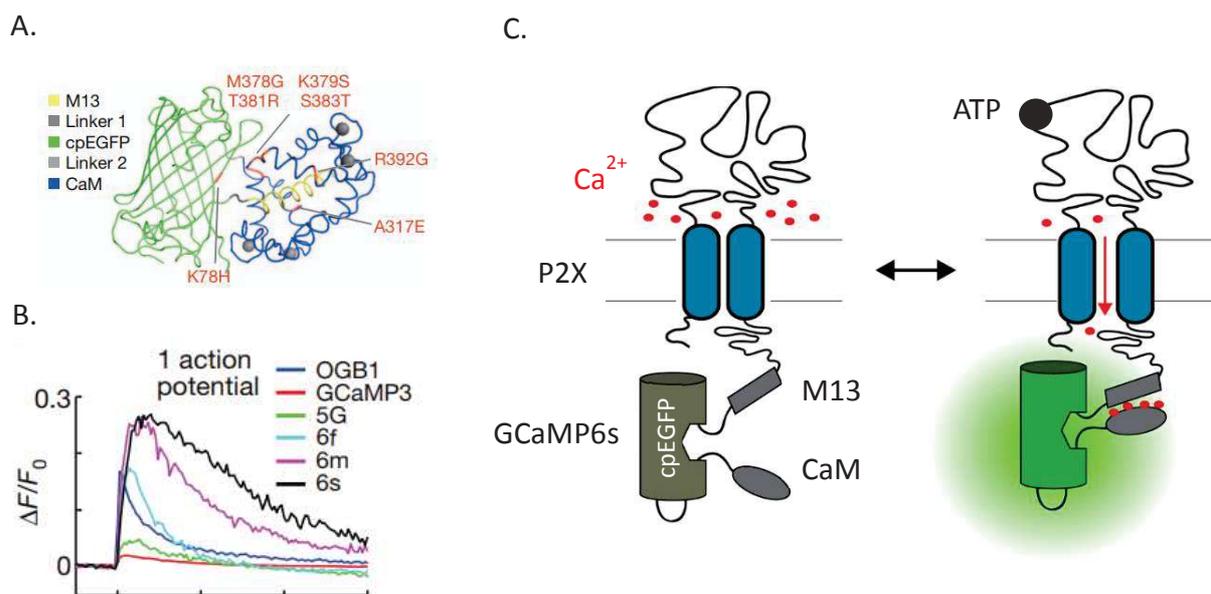
## **II. Création et caractérisation fonctionnelle de l'outil P2X-GCaMP6s**

### **II.1. Caractérisation fonctionnelle de l'outil P2X-GCaMP6s sur lignée cellulaire HEK**

#### **II.1.1. Fusion de la GCaMP6s au récepteur P2X**

Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines GCaMPs sont des sondes calciques adressables composées d'une GFP circularisée fusionnée à un peptide M13 et une calmoduline (CaM)<sup>212</sup>. En 2013, une étude de mutagenèse a permis de développer une série de GCaMPs améliorées, nommées GCaMP6 (Figure 24A)<sup>219</sup>. Trois versions de la GCaMP6 ont été développées, caractérisées sur culture primaire de neurones et nommées en fonction de leur cinétique d'inactivation. La GCaMP6f (fast) possède une cinétique d'inactivation rapide alors que la GCaMP6s possède une cinétique d'activation plus lente. La GCaMP6m possède une cinétique intermédiaire. De façon très intéressante, les GCaMP6 sont sept fois plus brillantes que la version précédente (GCaMP5G) et quasiment deux fois plus brillantes que la sonde organique OGB-1 (Figure 24B).

Dans cette étude, nous avons fait le choix de fusionner la GCaMP6s (slow) à la queue C-terminale du récepteur P2X2 de rat. En effet, la limite de ce genre d'outils est généralement la faible intensité du signal fluorescent émis. Nous avons donc choisi la GCaMP6s possédant le meilleur rapport signal sur bruit ( $\Delta F/F_0$ ). Après suppression du codon ATG, la GCaMP6s, a été fusionné à la partie C-terminale, dans le cadre de lecture du récepteur P2X2. Suite à l'activation du récepteur par l'ATP, l'entrée de calcium par le pore du canal et sa fixation sur la calmoduline va entraîner le rapprochement du peptide M13. Un changement de conformation de la GFP circularisée va ensuite entraîner une augmentation réversible de la fluorescence, dépendante de l'activité de P2X2 (Figure 24C).



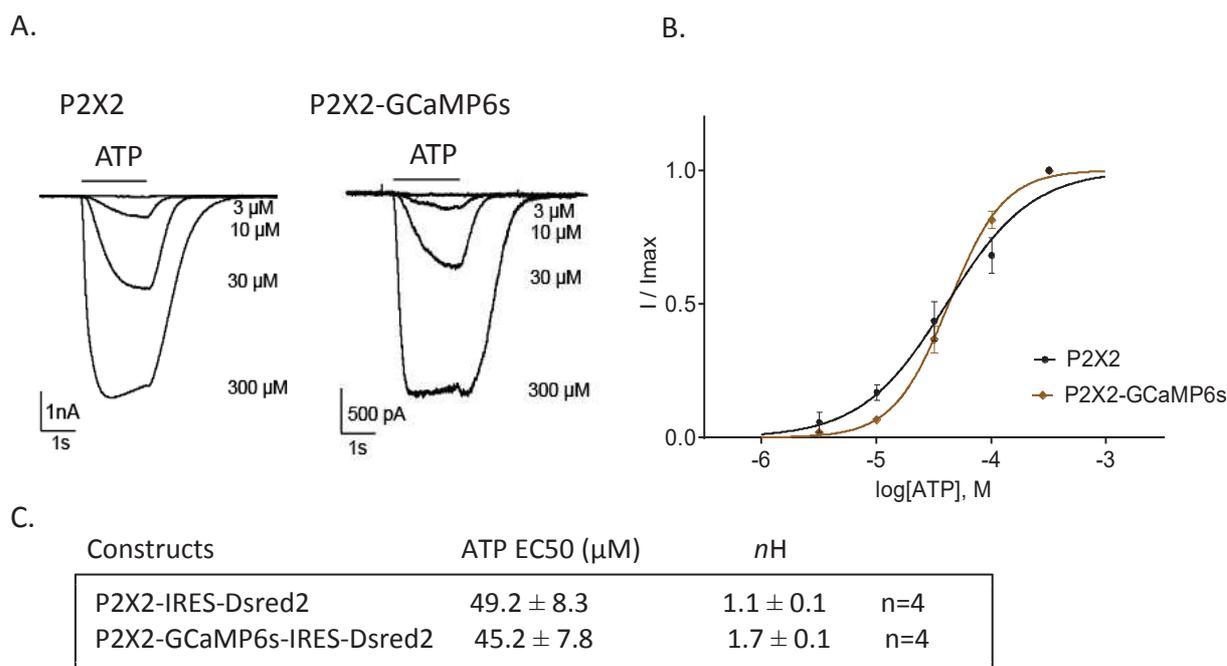
**Figure 24 : Fusion de la GCaMP6s à la queue C-terminale du récepteur P2X2**

(A) Structure de la GCaMP. Les différentes mutations insérées dans le variant GCaMP5 pour obtenir les GCaMP6<sup>219</sup>. (B) Réponses fluorescentes après 1 potentiel d'action appliqué sur des neurones hippocampiques primaires exprimant la GCaMP3, 5G, 6f, 6m, 6s, et OGB1-AM<sup>219</sup>. (C) Schéma du récepteur P2X2 dont la partie C-terminale est fusionnée à la partie M13 de la GCaMP6s. L'entrée de calcium suite à l'activation du récepteur par l'ATP va entraîner un changement de conformation de la GCaMP6s et une augmentation réversible de la fluorescence.

## II.1.2. Fonctionnalité de l'outil P2X2-GCaMP6s

### II.1.2.1. Validation électrophysiologique

La première condition afin de suivre l'activité du récepteur P2X2 est de s'assurer que la fusion de la protéine GCaMP6s ne perturbe pas les propriétés fonctionnelles du canal. Pour cela, des cellules HEK ont été transfectées avec P2X2 ou la fusion P2X2-GCaMP6s et les courants en configuration cellule entière ont été mesurés afin de comparer les propriétés des canaux. Dans les deux cas, un courant entrant est détecté suite à l'application d'ATP (Figure 25A). Les courbes dose-réponse pour l'ATP ne montrent aucune différence de sensibilité à l'ATP entre P2X2 et la fusion P2X2-GCaMP6s (Figure 25B). Les EC<sub>50</sub> ( $49.2 \pm 8.3 \mu\text{M}$  et  $45.2 \pm 7.8 \mu\text{M}$ ) sont en accord avec celles décrites dans la littérature (Figure 25C). La fusion de la GCaMP6s au récepteur P2X2 ne paraît donc pas perturber les propriétés du canal P2X2. Cependant, les propriétés de désensibilisation et de perméabilités ioniques n'ont pas été déterminées. Ces informations pourraient être utiles pour s'assurer que la fusion ne modifie pas ces propriétés.



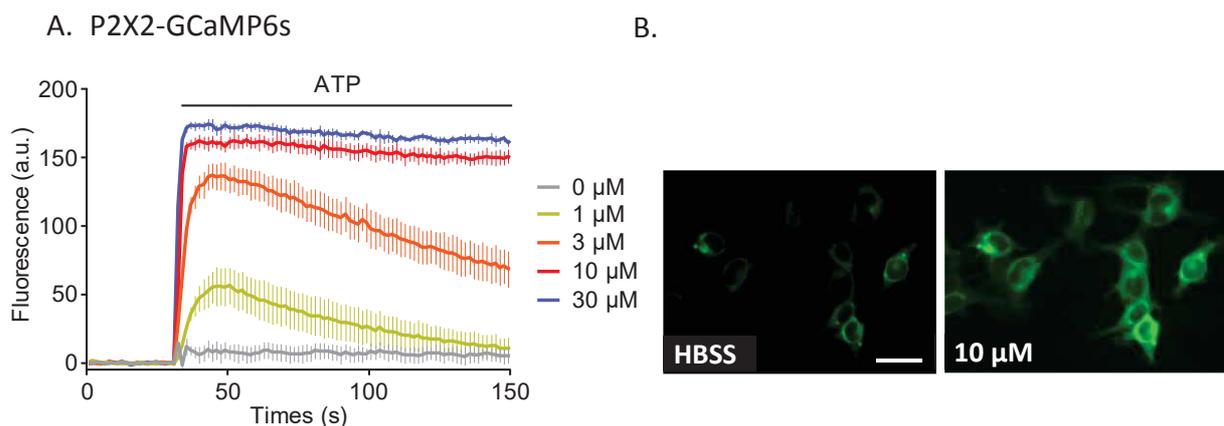
**Figure 25 : Caractérisation électrophysiologique de l'outil P2X2-GCaMP6s**

(A) Tracés représentatifs des courants obtenus suite à l'enregistrement de cellules HEK (configuration cellule entière) transfectées avec les constructions P2X2 (gauche) ou P2X2-GCaMP6s (droite) suite à l'application de doses croissantes d'ATP (temps d'application 3 secondes). (B) Courbes dose-réponse pour P2X2 et P2X2-GCaMP6s obtenues par lissage par la méthode des moindres carrés. (C) Tableau des EC50 et nH (nombre de Hill) calculés par le logiciel Prism. Les EC50 obtenues ne sont pas significativement différentes ( $p$ -value = 0,42).

#### II.1.2.2. Détection de la fluorescence suite à l'application d'ATP

La deuxième condition pour visualiser l'activité du récepteur P2X2 via l'activation de la GCaMP6s est de pouvoir détecter une augmentation de fluorescence suite à l'application d'ATP. Pour cela, un lecteur de plaques a été utilisé pour mesurer l'émission de fluorescence de la GCaMP6s au cours du temps suite à l'application de doses croissantes d'ATP. La Figure 26A montre une augmentation de fluorescence dès l'application d'ATP à 1 μM. Cette augmentation de fluorescence, rapide, sature dès 10 μM d'ATP. De façon intéressante, à cette dose saturante, le signal fluorescent est constant tout au long de l'enregistrement, suggérant que l'outil P2X2-GCaMP6s ne désensibilise pas au cours du temps. Les diminutions de fluorescence observées à 1 et 3 μM sont donc probablement le reflet d'une dégradation progressive de l'ATP extracellulaire par les ectonucléotidases membranaires.

Ce résultat indique que l'outil P2X2-GCaMP6s est capable de suivre l'activité du récepteur P2X2 en temps réel. Des expériences de vidéomicroscopie additionnelles ont permis de visualiser l'activation du récepteur. La Figure 26B montre des cellules HEK avant et après une stimulation avec 10 μM d'ATP. Suite à une stimulation à l'ATP, l'augmentation de la fluorescence paraît essentiellement membranaire. Les récepteurs P2X2 étant principalement exprimés à la membrane, ce résultat suggère donc que l'augmentation de la fluorescence est la conséquence de l'activation de P2X2.



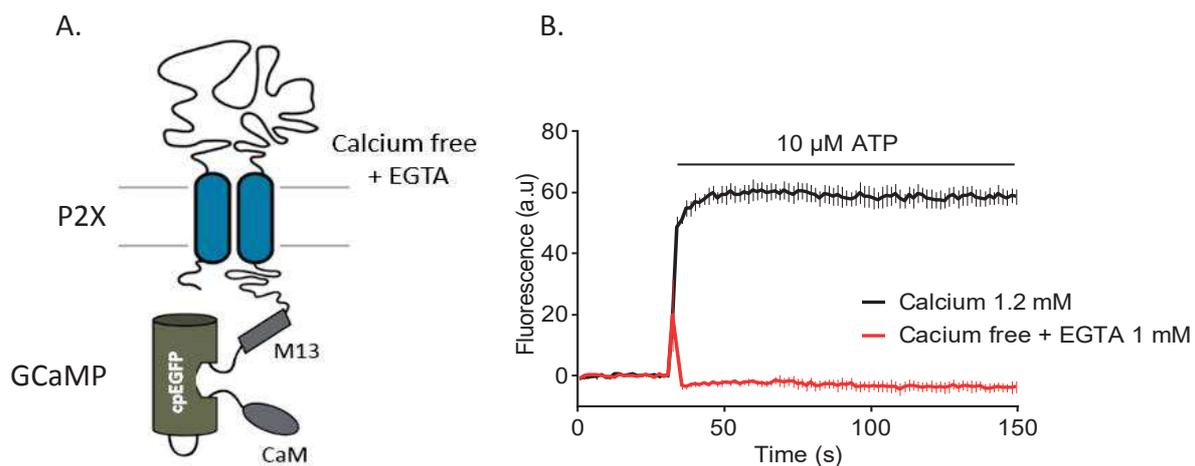
**Figure 26 : Détection de la fluorescence suite à l'application d'ATP sur des cellules HEK exprimant l'outil P2X2-GCaMP6s**

(A) Tracés représentatifs des signaux fluorescents obtenus suite à des applications de doses croissantes d'ATP sur des cellules HEK transfectées avec l'outil P2X2-GCaMP6s (acquisition de la fluorescence toutes les 1,5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/538$ ). (B) Images représentatives issues de films réalisés en vidéomicroscopie sur des cellules HEK exprimant l'outil P2X2-GCaMP6s. Comparaison de la fluorescence avant stimulation (HBSS à gauche) et après stimulation avec 10  $\mu\text{M}$  d'ATP (droite). Bar d'échelle = 20  $\mu\text{m}$ .

### II.1.3. Spécificité de l'outil P2X2-GCaMP6s

#### II.1.3.1. Réponse fluorescente sans calcium extracellulaire

Afin de s'assurer que l'activation de la GCaMP6s est dépendante de l'activation du récepteur et d'une entrée de calcium extracellulaire par le canal de ce dernier, plusieurs contrôles de spécificité ont été réalisés. Un premier contrôle a permis de confirmer que l'activation de la GCaMP6s dépend du calcium extracellulaire. Pour ce faire, un milieu extracellulaire sans calcium contenant un chélateur de calcium (EGTA 1 mM) a été appliqué lors d'une stimulation avec 10  $\mu\text{M}$  d'ATP (Figure 27A). Comme décrit précédemment, la stimulation avec 10  $\mu\text{M}$  d'ATP dans un milieu classique (1,2 mM de calcium), entraîne une forte augmentation de la fluorescence. En condition 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  + EGTA, aucune réponse fluorescente n'est enregistrée (Figure 27B). Ce résultat montre que l'activation de la GCaMP6s est dépendante d'un influx de calcium extracellulaire.



**Figure 27 : Spécificité de réponse de l'outil P2X2-GCaMP6s : réponse à l'ATP dans un milieu extracellulaire sans calcium**

(A) Schéma de la construction P2X2-GCaMP6s en conditions 0 mM calcium + EGTA 1 mM. (B) Tracés représentatifs de réponses fluorescentes suite à une stimulation avec 10  $\mu\text{M}$  d'ATP dans un milieu classique, 1,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (courbe noire) ou dans un milieu sans calcium + EGTA 1 mM (courbe rouge). Signaux fluorescents de cellules HEK exprimant P2X2-GCaMP6s enregistrés grâce à un lecteur de plaques (acquisition de la fluorescence toutes les 1.5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/538$ ).

#### II.1.3.2. Réponse fluorescente suite à l'activation des récepteurs P2Y endogènes

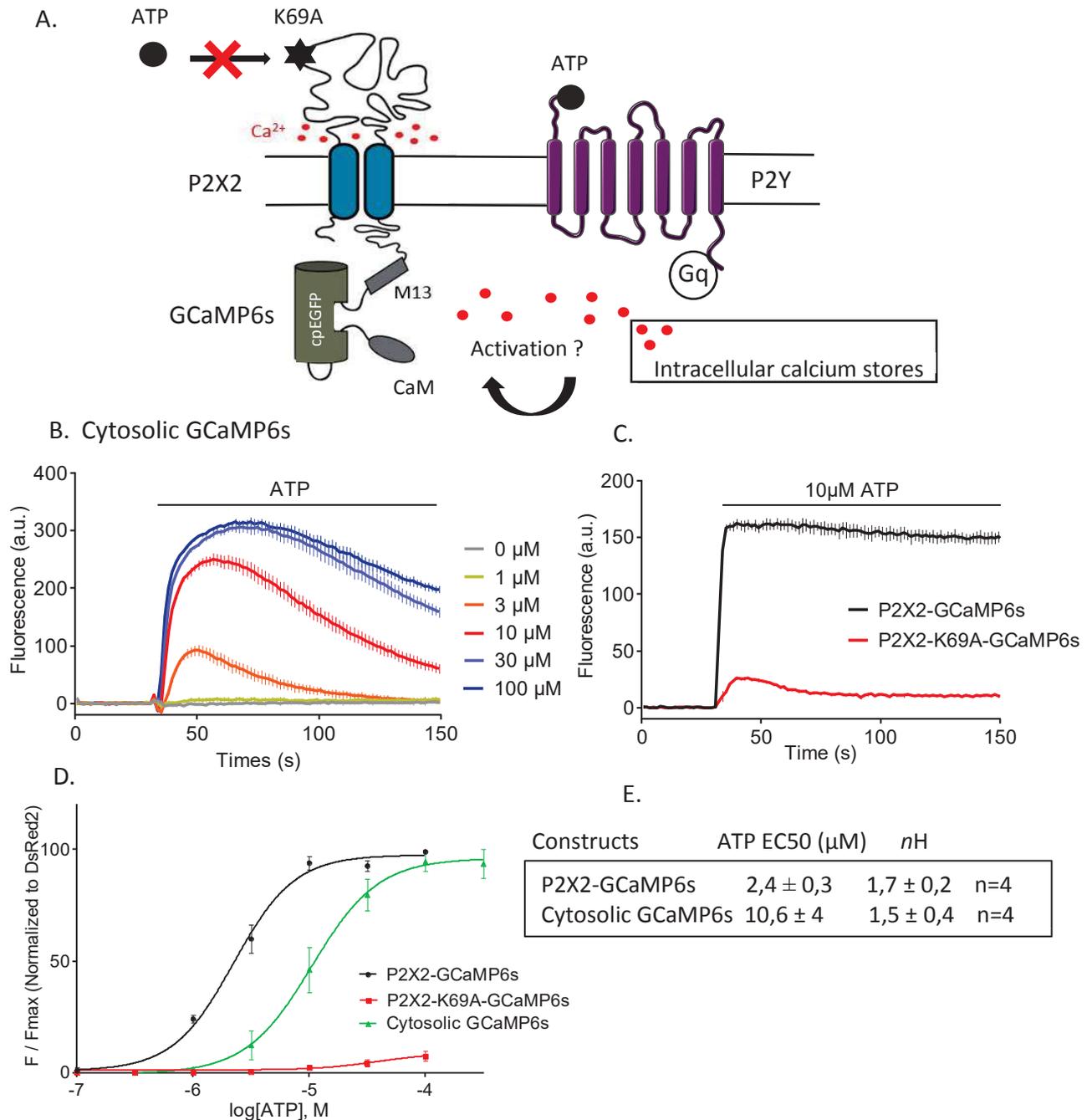
Une augmentation de calcium intracellulaire peut provenir de différentes sources. Elle peut faire suite à l'activation de RCPG couplés à la protéine Gq. En effet, l'activation de la protéine Gq va conduire à l'activation de la PLC qui va, à son tour, augmenter la production d'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ). L' $\text{IP}_3$ , via l'activation de ses récepteurs situés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, va entraîner la libération de calcium réticulaire et engendrer une augmentation de sa concentration cytoplasmique. Parmi les récepteurs P2Y, les « P2Y1-like » sont couplés aux protéines Gq et vont entraîner une augmentation du calcium cytoplasmique. On sait que les cellules HEK expriment fortement plusieurs récepteurs P2Y endogènes, notamment P2Y1, P2Y2 et P2Y4<sup>409</sup>. L'objectif de cette expérience est donc d'activer ces récepteurs P2Y endogènes afin de voir si une libération de calcium des stocks intracellulaires peut entraîner une activation non spécifique de la GCaMP fusionnée au récepteur P2X2. Pour cela, des cellules HEK ont été transfectées avec un récepteur P2X2-GCaMP6s portant la mutation K69A au niveau du site de liaison pour l'ATP. La mutation de la lysine 69 en alanine ne permet plus la reconnaissance du site de liaison par l'ATP. Ce mutant, inactivable, n'entraîne donc pas l'activation de la GCaMP6s via le canal P2X2. Ce mutant est donc un contrôle de spécificité idéal permettant d'évaluer une contamination potentielle par d'autres sources de calcium. Dans notre cas, une application d'ATP à une concentration suffisante pour activer les P2Y endogènes va donc permettre d'estimer la contribution éventuelle du calcium libéré des stocks intracellulaires par l'activation de P2X2-GCaMP6s (Figure 28A).

Pour s'assurer que l'activation des P2Y endogènes entraîne une augmentation de calcium intracellulaire, nous avons tout d'abord appliqué des concentrations croissantes d'ATP sur des cellules HEK transfectées avec une GCaMP6s cytosolique. La Figure 28B montre une faible augmentation de la fluorescence dès 3  $\mu\text{M}$  et une forte augmentation de fluorescence dès 10  $\mu\text{M}$ . Notons que la cinétique d'augmentation de la fluorescence est plus lente, ce qui est caractéristique des réponses RCPG couplés aux protéines Gq.

Comme attendu, l'application d'ATP à 10  $\mu\text{M}$  sur des cellules exprimant P2X2-GCaMP6s entraîne une forte et rapide augmentation de la fluorescence. Au contraire, l'application d'ATP sur les cellules exprimant l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s n'entraîne qu'une infime augmentation transitoire de la fluorescence (Figure 28C). Ce résultat signifie que l'activation des récepteurs P2Y endogènes, et plus globalement la libération de calcium des stocks intracellulaires, n'entraîne pas l'activation de la GCaMP6 fusionnée au récepteur P2X2.

Les courbes dose-réponse et les EC50 sont représentées sur les Figures 28D et 28E. L'affinité apparente de l'ATP pour P2X2-GCaMP6s ( $\text{EC}_{50} = 2,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ,  $n = 4$ ) est cohérente avec les affinités décrites dans la littérature. Néanmoins, cette valeur est inférieure aux EC50 obtenues précédemment par électrophysiologie. Cette différence peut être expliquée par des conditions expérimentales différentes. En effet, toutes nos expériences sont réalisées à 37°C alors que les expériences électrophysiologiques sont réalisées à température ambiante, pouvant induire une différence sur l'efficacité de l'agoniste. L'affinité apparente de l'ATP pour les récepteurs P2Y mesurée à l'aide de GCaMP6s cytosolique ( $\text{EC}_{50} = 10,6 \pm 4 \mu\text{M}$ ,  $n = 4$ ) est clairement différente de celle observée pour P2X2-GCaMP6. Cet EC50 représente probablement une moyenne des EC50 des différents récepteurs P2Y endogènes exprimés par les cellules HEK. Enfin, et de façon intéressante, on peut observer que même des applications d'ATP à fortes concentrations (30 ou 100  $\mu\text{M}$ ), n'entraînent qu'une réponse fluorescente négligeable sur les cellules transfectées avec le mutant K69A. En effet, ces réponses représentent moins de 5 % de la réponse induite par P2X2-GCaMP6s. Ces résultats confirment la spécificité de réponse même après une forte activation des P2Y. De façon intéressante, des GCaMPs ciblées à la membrane (Lck-GCaMP) d'astrocytes avaient déjà montré leur capacité à sentir spécifiquement une augmentation de calcium sous-membranaire<sup>410</sup>. Nos résultats confirment donc une compartimentation nette entre les signaux calciques sous membranaire et les signaux calciques provenant des stocks intracellulaires.

P2X2-GCaMP6s n'est donc pas activé par une sortie de calcium du réticulum endoplasmique et permet donc de suivre spécifiquement l'activation des récepteurs P2X indépendamment des récepteurs P2Y suite à l'application d'ATP.



**Figure 28 : Spécificité de réponse de l'outil P2X2-GCaMP6s suite à l'activation des récepteurs P2Y endogènes exprimés par les cellules HEK**

(A) Schéma représentant les récepteurs P2Y endogènes des cellules HEK activées par l'ATP, conduisant à une libération des stocks intracellulaires de calcium pouvant potentiellement activer la GCaMP6s fusionnée au récepteur P2X2-K69A (mutation du site de liaison à l'ATP). (B) Tracés représentatifs des signaux fluorescents obtenus suite à des applications de doses croissantes d'ATP sur des cellules HEK transfectées avec une GCaMP6s cytosolique. (C) Tracés représentatifs des signaux fluorescents obtenus suite à une application d'ATP à 10  $\mu\text{M}$  sur des cellules HEK transfectées avec l'outil P2X2-GCaMP6s ou P2X2-K69A-GCaMP6s. (D) Courbes dose-réponse de fluorescence (aire sous la courbe) pour P2X2-GCaMP6s, GCaMP6s et P2X2-K69A-GCaMP6s (acquisition de la fluorescence toutes les 1,5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/538$ ). (E) Tableau des EC50 et nH (nombre de Hill) calculés par le logiciel Prism.

### II.1.3.3. Réponse fluorescente suite à l'activation d'autres récepteurs ionotropiques membranaires perméables au calcium (NMDA/TRPV1)

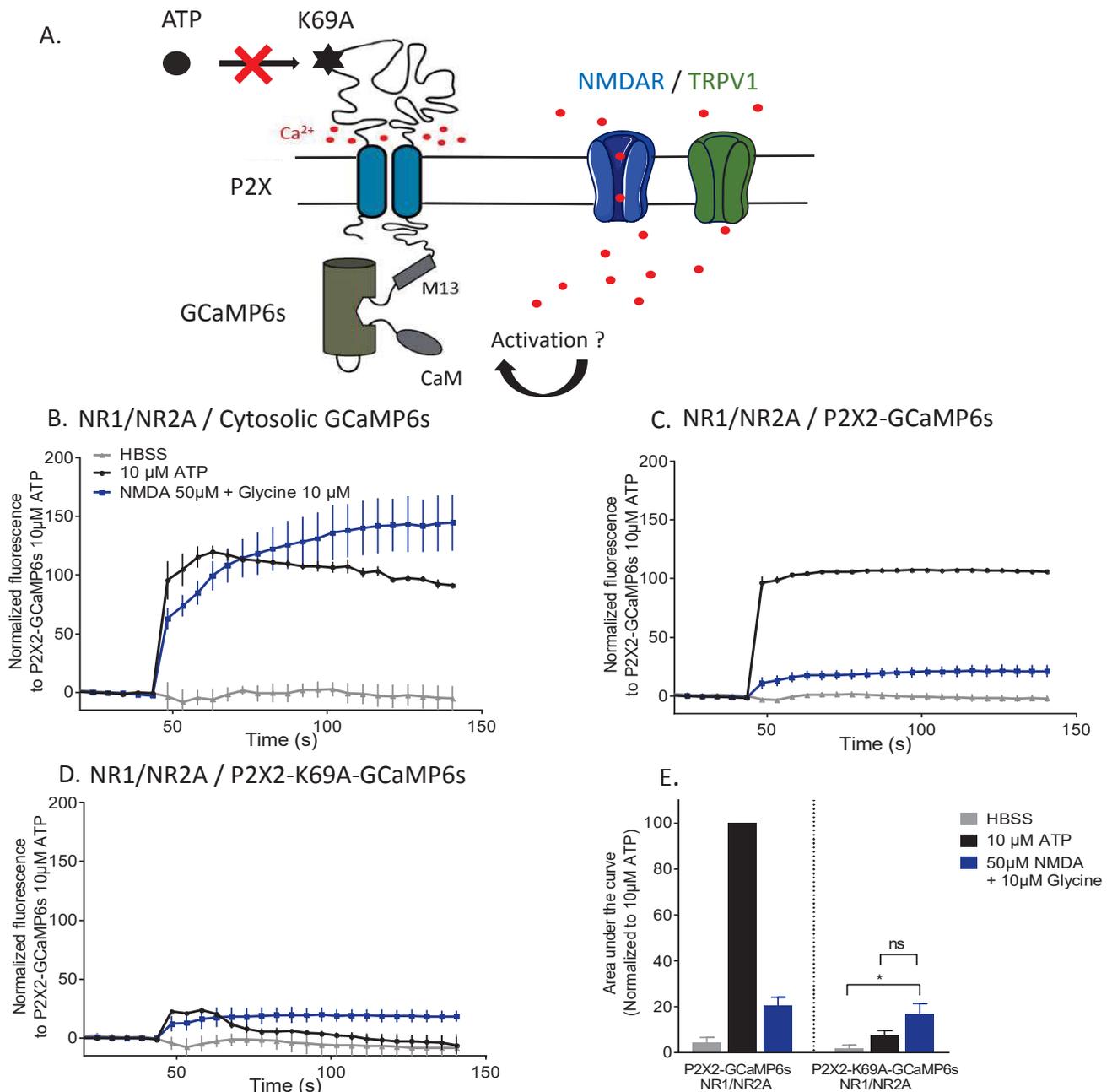
#### II.1.3.3.a. Co-transfection avec les récepteurs NMDA

Une deuxième source d'augmentation du calcium intracellulaire peut provenir de l'activation d'autres récepteurs canaux membranaires perméables au calcium tels que les récepteurs NMDA fortement perméable au calcium ( $Pf Ca^{++} = 14 \%$ )<sup>109</sup> (Figure 29A). Afin d'estimer la fluorescence non spécifique induite par l'activation de ces récepteurs, les sous-unités NR1 et NR2A ont été co-transfectées avec les outils P2X2-GCaMP6s et P2X2-K69A-GCaMP6s puis activés par une co-application de NMDA à 50  $\mu$ M et de glycine 10 à  $\mu$ M.

Comme précédemment, l'influx de calcium induit par l'activation du récepteur NMDA est mesuré indépendamment par co-transfection avec la GCaMP6s cytosolique (Figure 29B). Dans ces conditions, l'ATP, par l'activation des récepteurs P2Y, mais aussi le NMDA, par l'activation des récepteurs NMDA, entraînent une forte augmentation de la fluorescence due à une augmentation du calcium intracellulaire.

Dans les cellules co-transfectées avec NR1/NR2A et P2X2-GCaMP6s, l'application de NMDA entraîne une très faible réponse fluorescente comparée à celle induite par 10  $\mu$ M ATP (Figure 29C). Un résultat similaire est observé dans les cellules co-transfectées avec NR1/NR2A (Figure 29D) et P2X2-K69A-GCaMP6s, bien que dans cette situation la réponse à l'ATP soit abolie. Ces résultats montrent que l'influx de calcium médié par l'activation des récepteurs NMDA entraîne une faible activité de la GCaMP6s fusionnée au récepteur P2X2.

La quantification de l'aire sous la courbe des Figures 28B et C est représentée par diagramme en figure 29E. Les données représentées sont normalisées par la réponse induite par 10  $\mu$ M d'ATP dans des cellules co-transfectées avec les récepteurs NMDA et P2X2-GCaMP6s. Sur les cellules co-exprimant NR1/NR2A et P2X2-GCaMP6s, la fluorescence induite par l'activation des récepteurs NMDA est de  $20,3 \pm 3,8 \%$  par rapport à la réponse fluorescence maximale induite par l'activation de P2X2-GCaMP6s. Sur les cellules co-exprimant les récepteurs NMDA et P2X2-K69A-GCaMP6s, la fluorescence induite par l'activation des NR1/NR2A est de  $16,7 \pm 4,5 \%$ . Cette valeur correspond à la valeur réelle de fluorescence non spécifique puisque l'utilisation du mutant permet de s'affranchir totalement d'une libération potentielle d'ATP induite par l'activation des récepteurs NMDA. Cette réponse, bien que significativement supérieure à celle d'une réponse HBSS (p-value : 0,02), n'est pas significativement différente de la faible réponse induite par l'ATP sur le mutant P2X2-K69A-GCaMP6s (p-value : 0,18). En effet, dans ces conditions, l'activation des récepteurs P2Y endogène entraîne une réponse de  $7,6 \pm 2 \%$  de la réponse P2X2-GCaMP6s.



**Figure 29 : Spécificité de réponse de l'outil P2X2-GCaMP6s suite à l'activation des récepteurs NMDA exprimés à la membrane**

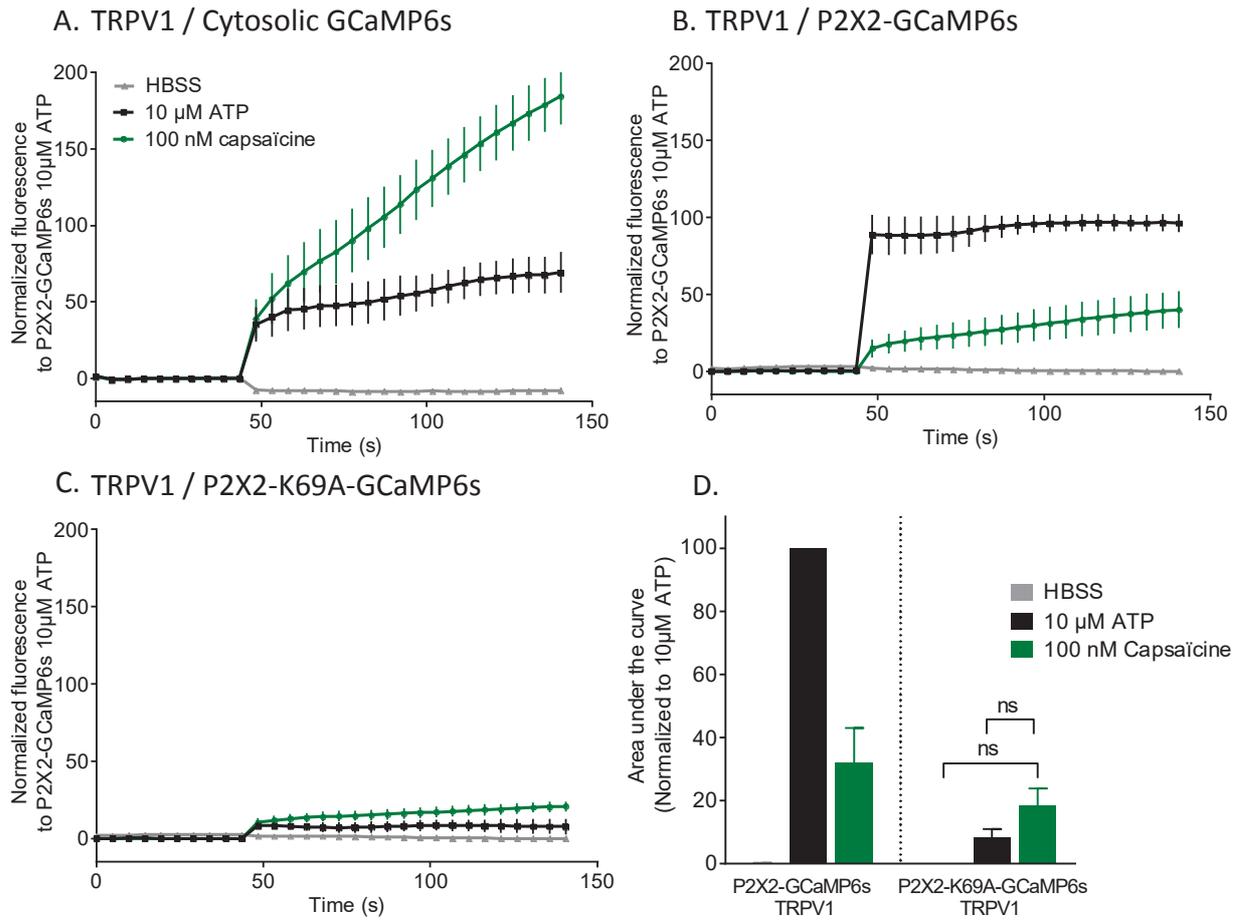
(A) Schéma représentant des récepteurs NMDA ou TRPV1 co-transfectés avec P2X2-K69A-GCaMP6s sur des cellules HEK. (B), (C) et (D) Signaux fluorescents obtenus suite à des applications d'HBSS, d'ATP 10  $\mu$ M ou de NMDA 50  $\mu$ M + 10  $\mu$ M Glycine sur des cellules HEK co-transfectées avec NR1/NR2A/GCaMP6s cytosolique (B); avec NR1/NR2A/P2X2GCaMP6s (C); NR1/NR2A/P2X2-K69A-GCaMP6s (D). Acquisition de la fluorescence toutes les 5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/538$ . Tracés représentant la moyenne de 3 expériences indépendantes normalisées par rapport à la réponse ATP 10  $\mu$ M de NR1/NR2A/P2X2-GCaMP6s. Chaque expérience est la moyenne d'un triplicat. (E) Quantification de l'aire sous la courbe pour chaque expérience normalisée par rapport à la réponse ATP 10  $\mu$ M de NR1/NR2A/P2X2-GCaMP6s. ANOVA, test de comparaison multiples (droite) 10  $\mu$ M ATP vs NMDA 50  $\mu$ M + 10  $\mu$ M Glycine : p-value : 0,177. HBSS vs NMDA 50  $\mu$ M + 10  $\mu$ M : p-value : 0,02.

#### II.1.3.3.b. Co-transfection avec les récepteurs TRPV1

Afin de confirmer les résultats obtenus avec les récepteurs NMDA, les mêmes co-transfections ont été réalisées avec les récepteurs TRPV1 perméables au calcium ( $Pf Ca^{++} = 4 \%$ )<sup>109</sup>. Dans ce cas, les récepteurs TRPV1 ont été activés par une application de capsaïcine à 100 nM.

Pour s'assurer que l'activation des TRPV1 entraîne une augmentation de calcium intracellulaire, ces derniers ont tout d'abord été co-transfectés avec une GCaMP6s cytosolique. Dans ces conditions, l'activation des récepteurs TRPV1 entraîne une forte augmentation de calcium intracellulaire (Figure 30A). L'activation des récepteurs TRPV1 co-exprimés avec P2X2-GCaMP6s entraîne une faible réponse fluorescente (Figure 30B). Cette réponse est de  $31,9 \pm 11 \%$  par rapport à la réponse fluorescente P2X2-GCaMP6s induite par 10  $\mu$ M d'ATP (Figure 30D). L'activation des récepteurs TRPV1 co-exprimés avec P2X2-K69A-GCaMP6s entraîne une plus faible réponse fluorescente (Figure 30C) d'environ  $18,4 \pm 5,4 \%$  (Figure 30D). Cette valeur n'est pas significativement différente d'une réponse HBSS (p-value : 0,38) ou d'une réponse suite à l'application d'ATP ( $8 \pm 2,9 \%$ ) (p-value : 0,76). La réponse fluorescente suite à l'activation des TRPV1 co-transfectés avec P2X2-K69A-GCaMP6s, représentant la réelle réponse fluorescente non spécifique, paraît donc être négligeable dans ce cas.

La réponse fluorescente induite par la capsaïcine a tendance à être supérieure lorsque TRPV1 est exprimé avec P2X2-GCaMP6s que lorsque TRPV1 est exprimé avec P2X2-K69A-GCaMP6s. Ce résultat peut être expliqué par plusieurs hypothèses. On peut tout d'abord émettre l'hypothèse que l'application de capsaïcine entraîne une libération d'ATP extracellulaire entraînant une activation des P2X2-GCaMP6s. Une deuxième hypothèse est un lien fonctionnel entre l'activation des récepteurs P2X2 et TRPV1. Bien que cela n'ait jamais été démontré pour P2X2, on sait que, sur des neurones sensoriels, P2X3 et TRPV1 peuvent avoir des interactions fonctionnelles facilitatrices<sup>411</sup>. Des études biochimiques et fonctionnelles permettraient de vérifier cette seconde hypothèse.



**Figure 30 : Spécificité de réponse de l'outil P2X2-GCaMP6s suite à l'activation des récepteurs TRPV1 exprimés à la membrane**

(A), (B) et (C) Signaux fluorescents obtenus suite à des applications d'HBSS, d'ATP 10  $\mu$ M ou de capsaïcine 100 nM sur des cellules HEK co-transfectées avec TRPV1/GCaMP6s cytosolique (A) ; TRPV1/P2X2-GCaMP6s (B) ; TRPV1/P2X2-K69A-GCaMP6s (C). Acquisition de la fluorescence toutes les 5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/538$ . Tracés représentant la moyenne de 3 expériences indépendantes normalisées par la réponse ATP 10  $\mu$ M de TRPV1/P2X2-GCaMP6s. Chaque expérience est la moyenne d'un triplicat. (D) Quantification de l'aire sous la courbe pour chaque expérience normalisée par à la réponse ATP 10  $\mu$ M de TRPV1/P2X2-GCaMP6s. ANOVA, test de comparaison multiples (droite) 10  $\mu$ M ATP vs NMDA 50  $\mu$ M + 10  $\mu$ M Glycine ; p-value : 0,76. HBSS vs NMDA 50  $\mu$ M + 10  $\mu$ M ; p-value : 0,38.

## II.1.4. Fusion et caractérisation sur les autres récepteurs P2X

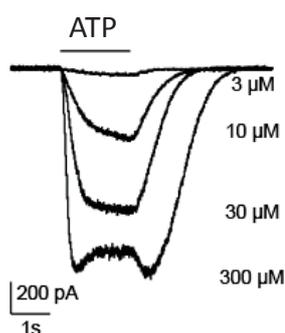
### II.1.4.1. Caractérisation de l'outil P2X4-GCaMP6s

La récepteur P2X4 est exprimé dans les cellules immunitaires ainsi que dans les cellules neuronales et est impliqué dans diverses pathologies telles que les douleurs neuropathiques. Néanmoins, aujourd'hui, le manque d'outil génétique ne permet pas de comprendre son implication dans un type cellulaire donné au cours d'une pathologie. Suivre l'activité des récepteurs P2X4 *in situ* paraît donc intéressant et nécessaire. Sur le même principe, P2X4 de souris et la GCaMP6s ont été fusionnés puis caractérisés dans les cellules HEK.

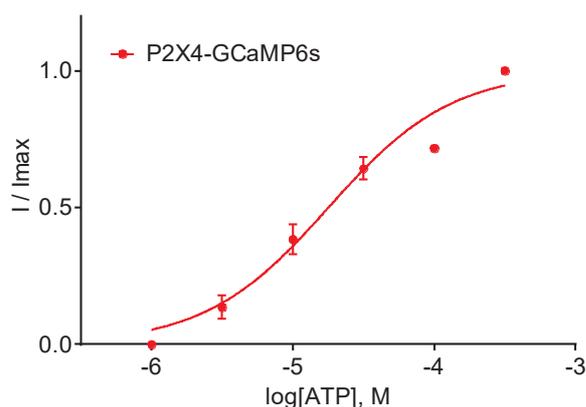
#### II.1.4.1.a. Validation électrophysiologique

Les courants ont été mesurés en configuration cellule entière sur des cellules HEK exprimant P2X4-GCaMP6s. Comme attendu un courant entrant est enregistré dès l'application d'ATP à 3  $\mu\text{M}$  (Figure 31A). Ce résultat suggère que la fusion de la GCaMP6s à la queue C-terminale de P2X4 ne perturbe pas la fonctionnalité du canal. L'EC50 calculée (Figure 31B et 31C) est de  $17,9 \pm 4,3 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ), ce qui est semblable à ce qui est décrit dans la littérature<sup>134</sup>.

A. P2X4-GCaMP6s



B.



C.

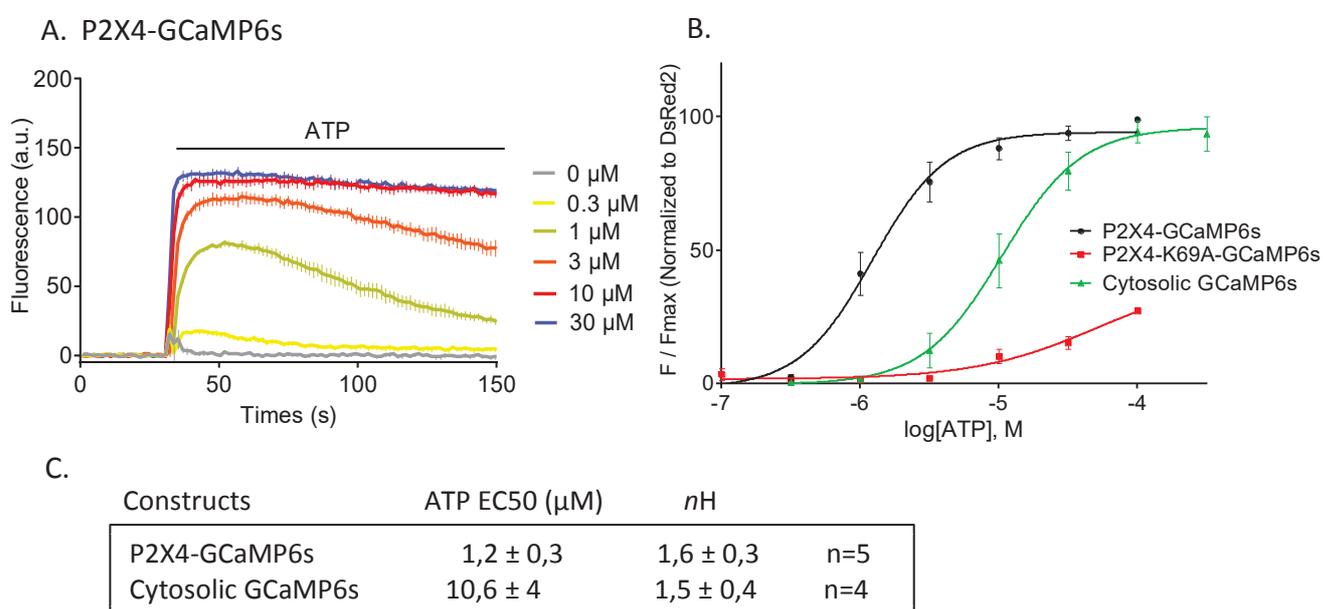
Constructs	ATP EC50 ( $\mu\text{M}$ )	nH	
P2X4-GCaMP6s	$17,9 \pm 4,3$	$1 \pm 0,2$	n=5

**Figure 31 : Caractérisation électrophysiologique de l'outil P2X4-GCaMP6s**

(A) Tracés représentatifs des courants obtenus suite à un enregistrement de cellules HEK (configuration cellule entière) transfectées avec les constructions P2X4-GCaMP6s suite à l'application de doses croissantes d'ATP (temps d'application 3 secondes). (B) Courbe dose-réponse pour P2X4-GCaMP6s. (C) EC50 et nH calculés par le logiciel Prism.

### II.1.4.1.b. Détection de la fluorescence suite à l'application d'ATP

De la même façon que pour P2X2, l'émission de fluorescence de la GCaMP6s au cours du temps suite à l'application de différentes concentrations d'ATP a été mesurée. La Figure 32A montre une augmentation de fluorescence dès l'application de 0,3  $\mu\text{M}$  d'ATP. Cette augmentation de fluorescence, rapide, sature dès 10  $\mu\text{M}$  d'ATP. Ce résultat montre que l'outil P2X4-GCaMP6s est capable de rendre compte de l'activité du récepteur P2X4 en temps réel. La courbe dose-réponse indique un EC50 de  $1,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ) (Figure 32B et C) ce qui est en accord avec les données disponibles dans la littérature puisque le récepteur P2X4 est décrit comme légèrement plus affiné pour l'ATP que P2X2. Cette valeur est, encore une fois, significativement inférieure à celle mesurée par les méthodes électrophysiologiques. Les raisons sont probablement les mêmes que celles évoquées pour P2X2 (température de 37°C).



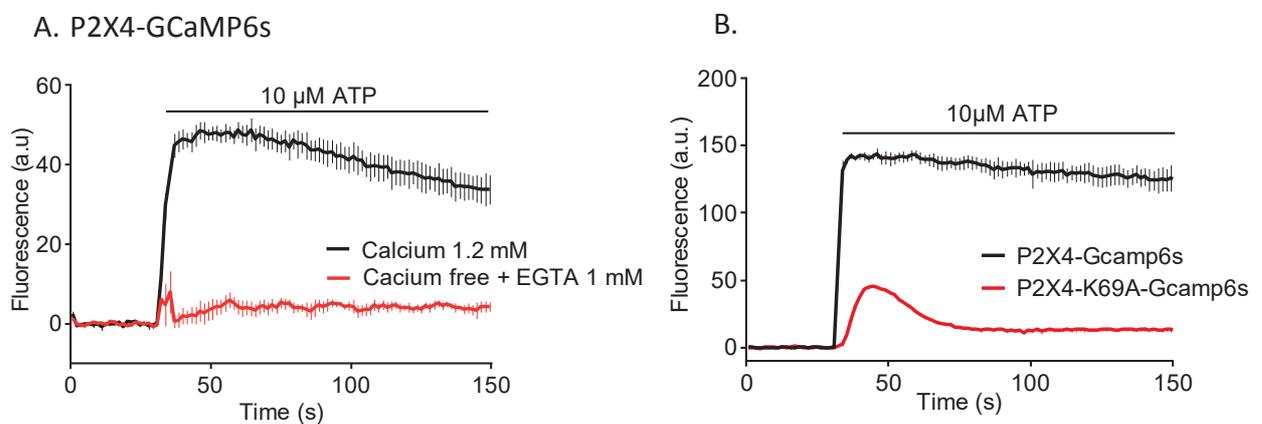
**Figure 32 : Détection de la fluorescence suite à l'application d'ATP sur des cellules HEK exprimant l'outil P2X4-GCaMP6s**

(A) Tracés représentatifs des signaux fluorescents obtenus suite à des applications de doses croissantes d'ATP sur des cellules HEK transfectées avec P2X4-GCaMP6s (Acquisition de la fluorescence toutes les 1,5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/538$ ). (B) Courbes dose-réponse de fluorescence (aire sous la courbe) pour P2X4-GCaMP6s, GCaMP6s et P2X4-K69A-GCaMP6s. (C) Tableau des EC50 et nH calculés par le logiciel Prism.

#### II.1.4.1.c. Spécificité de l'outil P2X4-GCaMP6s

De la même façon que pour P2X2-GCaMP6s, des contrôles de spécificité ont été réalisés. Une première expérience a permis de confirmer une activation de la GCaMP6s dépendante du calcium extracellulaire (Figure 33A). Pour ce faire, un milieu extracellulaire sans calcium contenant un chélateur de calcium (EGTA 1mM) a été appliqué lors d'une stimulation à l'ATP. Alors que la stimulation de l'outil P2X4-GCaMP6s avec 10  $\mu$ M d'ATP dans un milieu classique contenant 1,2 mM de calcium entraîne une forte augmentation de la fluorescence, aucune réponse fluorescente n'est enregistrée dans un milieu sans calcium + EGTA 1 mM. Ce résultat montre que l'activation de la GCaMP6s fusionnée à P2X4 est dépendante de l'influx de calcium extracellulaire par le canal.

Pour évaluer la contamination du signal fluorescent par une libération de calcium des stocks intracellulaires, la réponse du mutant du site de liaison à l'ATP, P2X4-K69A-GCaMP6s, a été étudiée (Figure 33B). Dans ce cas, l'activation non spécifique de la GCaMP6s fusionnée est faible mais légèrement supérieure à celle observée pour l'outil P2X2-GCaMP6s. Elle est de l'ordre de 10 % de la réponse P2X4-GCaMP6s suite à une stimulation avec 10  $\mu$ M d'ATP. Les récepteurs P2X4 sont majoritairement localisés au sein des vésicules intracellulaires (endosomes, lysosomes) avec des extrémités C-terminales exposées du côté cytoplasmique. Il est donc possible que la GCaMP6s, fusionnée à l'extrémité C-terminale des P2X4 intracellulaires, soit en partie activée par une libération de calcium des stocks intracellulaires. Dans ce cas précis, l'utilisation du mutant K69A s'avèrera cruciale pour estimer cette faible réponse non spécifique dans différents contextes expérimentaux.



**Figure 33 : Spécificité de l'outil P2X4-GCaMP6s**

(A) Tracés représentatifs de réponses fluorescentes de P2X4-GCaMP6s suite à une stimulation avec 10  $\mu$ M d'ATP dans un milieu classique (courbe noire) ou dans un milieu 0  $\text{Ca}^{2+}$  + EGTA 1 mM (courbe rouge). (B) Tracés représentatifs des signaux fluorescents obtenus suite à une application d'ATP 10  $\mu$ M sur des cellules HEK transfectées avec P2X4-GCaMP6s ou P2X4-K69A-GCaMP6s. Acquisition de la fluorescence toutes les 1,5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/538$ .

#### II.1.4.2. Fonctionnalité sur les autres récepteurs P2X

Théoriquement, la GCaMP6s peut être fusionnée à toutes les sous-unités P2X pour suivre leur activité car elles sont toutes perméables au calcium<sup>109</sup>. La GCaMP6s a donc été fusionnée à la queue C-terminale des récepteurs P2X1, P2X3, P2X5, P2X6 et P2X7 de rat.

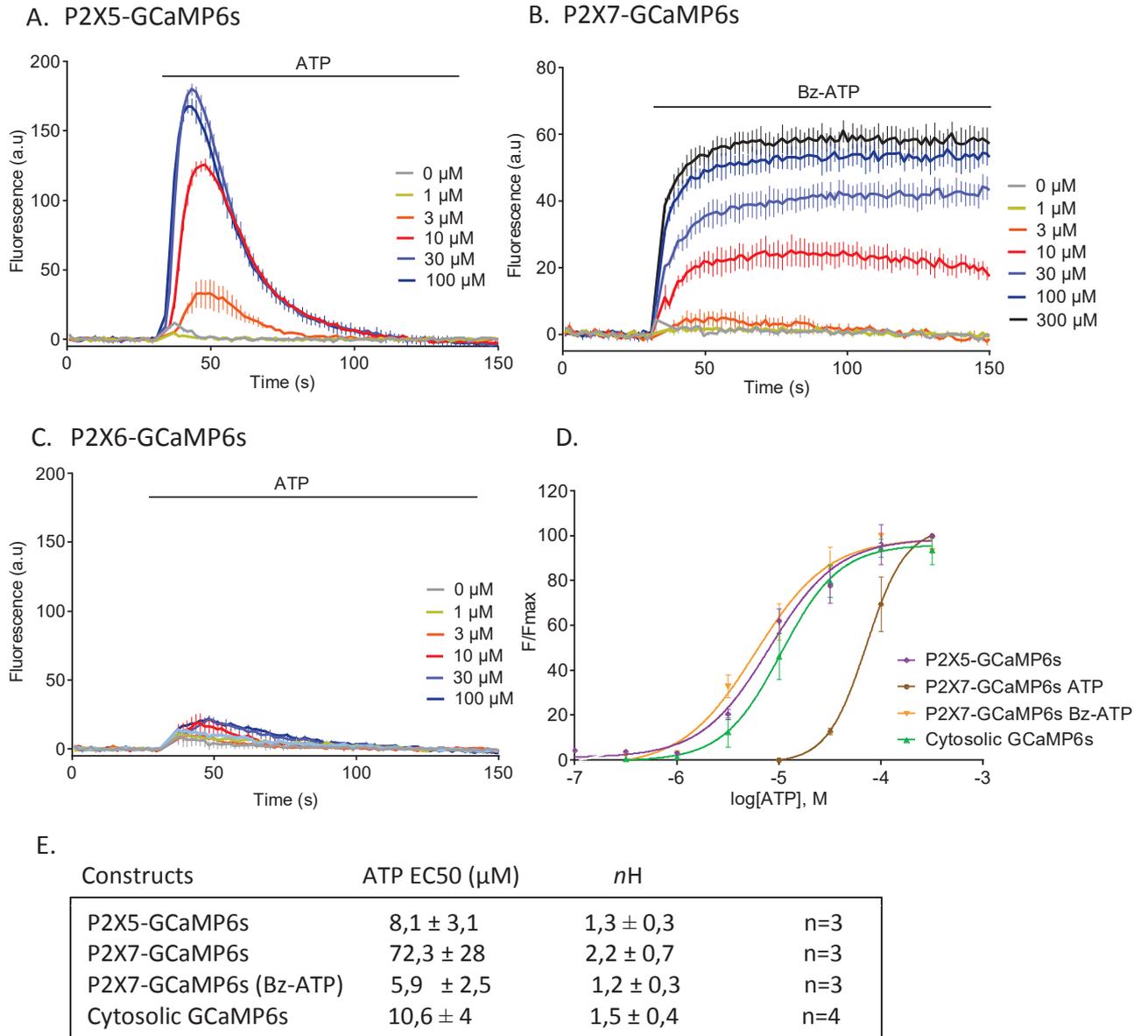
L'application d'ATP sur l'outil P2X5-GCaMP6s entraîne une augmentation de la fluorescence dès 3  $\mu\text{M}$  qui sature à partir de 30  $\mu\text{M}$  (Figure 34A). L'EC50 calculée est de  $8,1 \pm 3,1 \mu\text{M}$ , proche des EC50 décrites dans la littérature (Figure 34E). Contrairement à P2X2 et P2X4, l'application continue de doses saturantes d'ATP induit une réponse qui s'inactive en présence d'ATP. Cette observation peut être le reflet d'une désensibilisation. Néanmoins, la mesure des courants électrophysiologiques du récepteur P2X5 de rat décrit des courants de faible amplitude avec une faible désensibilisation. Dans notre cas, la fluorescence observée est de forte amplitude (semblable à P2X2) et diminue rapidement. Deux hypothèses peuvent être émises. L'outil pourrait permettre de révéler des propriétés du récepteur non mises en évidence par les méthodes électrophysiologiques, ou bien la fusion du récepteur pourrait, dans ce cas, induire une modification des propriétés de ce dernier. Il est difficile de conclure quant à ce résultat et la mesure combinée des courants électrophysiologiques et des signaux de fluorescence pourraient en partie répondre à cette question.

Pour l'outil P2X7-GCaMP6s, de l'ATP et du Bz-ATP, un agoniste plus affiné que l'ATP lui-même, ont été appliqués. Dans les deux cas, les drogues induisent une réponse fluorescente stable au cours du temps (Figure 34B). Ce récepteur ne désensibilisant pas, l'enregistrement d'un signal fluorescent constant au cours du temps montre que la fusion de la GCaMP6s ne perturbe pas les propriétés de désensibilisation du récepteur P2X7. Les cellules exprimant P2X7-GCaMP6s répondent au Bz-ATP dès 3  $\mu\text{M}$  et saturent vers 100  $\mu\text{M}$ . La dose-réponse du Bz-ATP indique un EC50 de  $5,9 \pm 2,5 \mu\text{M}$  (Figure 34D et E). Comme décrit dans la littérature P2X7-GCaMP6s montre une affinité plus faible pour l'ATP (EC50  $72,3 \pm 28 \mu\text{M}$ ).

L'homotrimère P2X6 étant non fonctionnel. Comme attendu, l'application d'ATP à différentes concentrations n'entraîne pas d'augmentation significative de la fluorescence (Figure 34C).

Enfin, les récepteurs P2X1 et P2X3 sont connus pour s'inactiver très rapidement (100 ms) et avoir une réactivation très lente. Aucun signal fluorescent n'a été détecté pour P2X1-GCaMP6s et P2X3-GCaMP6s suite à une application d'ATP. Cela ne signifie pas que ces outils sont non fonctionnels. En effet, dans le protocole utilisé, le lecteur de plaques réalise une acquisition de la fluorescence toutes les 1,5 secondes. Dans ce cas, la cinétique d'application de l'agoniste et la fréquence d'échantillonnage de la fluorescence sont certainement trop lentes pour pouvoir enregistrer un signal de fluorescence. D'autres expériences d'imagerie calciques avec des temps d'acquisition très courts et une application rapide de l'agoniste sont nécessaires pour conclure quant à la fonctionnalité de ces deux outils.

Bien que des expériences supplémentaires soient nécessaires pour détecter l'activité de P2X1 et P2X3, l'outil P2X-GCaMP6s s'avère donc comme un outil fonctionnel et puissant permettant de suivre simplement l'activité des récepteurs P2X. Bien que relativement spécifique, l'utilisation des mutants du site de liaison à l'ATP paraît être nécessaire afin de s'assurer de la spécificité de la fluorescence observée.



**Figure 34 : Fusion du senseur calcique GCaMP6s aux autres sous-unités P2X**

Tracés représentatifs des signaux fluorescents obtenus suite à des applications de doses croissantes d'ATP sur des cellules HEK transfectées avec P2X25-GCaMP6s (A) ; P2X7-GCaMP6s (stimulation au Bz-ATP) (B) ; P2X6-GCaMP6s (C) ; (D) Courbes dose-réponse (aires sous la courbe) pour P2X5-GCaMP6s, P2X7-GCaMP6s et GCaMP6s. (E) Tableau des EC50 et nH calculés par le logiciel Prism. Acquisition de la fluorescence toutes les 1,5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/538$ .

## **II.2. Caractérisation fonctionnelle de l'outil P2X-GCaMP6s sur lignée astrocytaire 1321N1 et culture de neurones primaires hippocampiques**

### **II.2.1. Développement d'une stratégie lentivirale**

Certaines lignées cellulaires et cultures primaires ne permettent pas l'expression d'un transgène par les méthodes de transfections classiques. De plus, l'expression de transgènes sur cultures organotypiques ou *in vivo* nécessite le développement d'approches virales. Nous avons opté pour une stratégie lentivirale afin de pouvoir exprimer nos outils dans différents types de cellules difficiles à transfecter (lignée astrocytaire ou monocyttaire, neurones hippocampiques) et à terme sur des préparations pluricellulaires. Les différents lentivirus utilisés ont été produits au sein du laboratoire (cf. matériel et méthodes). La lignée cellulaire astrocytaire 1321N1 a été transduite de façon stable avec des lentivirus exprimant P2X2-GCaMP6s sous le contrôle du promoteur ubiquitaire EF1 $\alpha$  et suivi d'une protéine fluorescente rouge rapportrice DsRed2. Les neurones primaires d'hippocampe sont transduits avec des virus exprimant l'outil P2X-GCaMP6s sous le contrôle du promoteur CaMKII $\alpha$  spécifique des neurones excitateurs afin d'éviter son expression dans les astrocytes présents dans les cultures primaires.

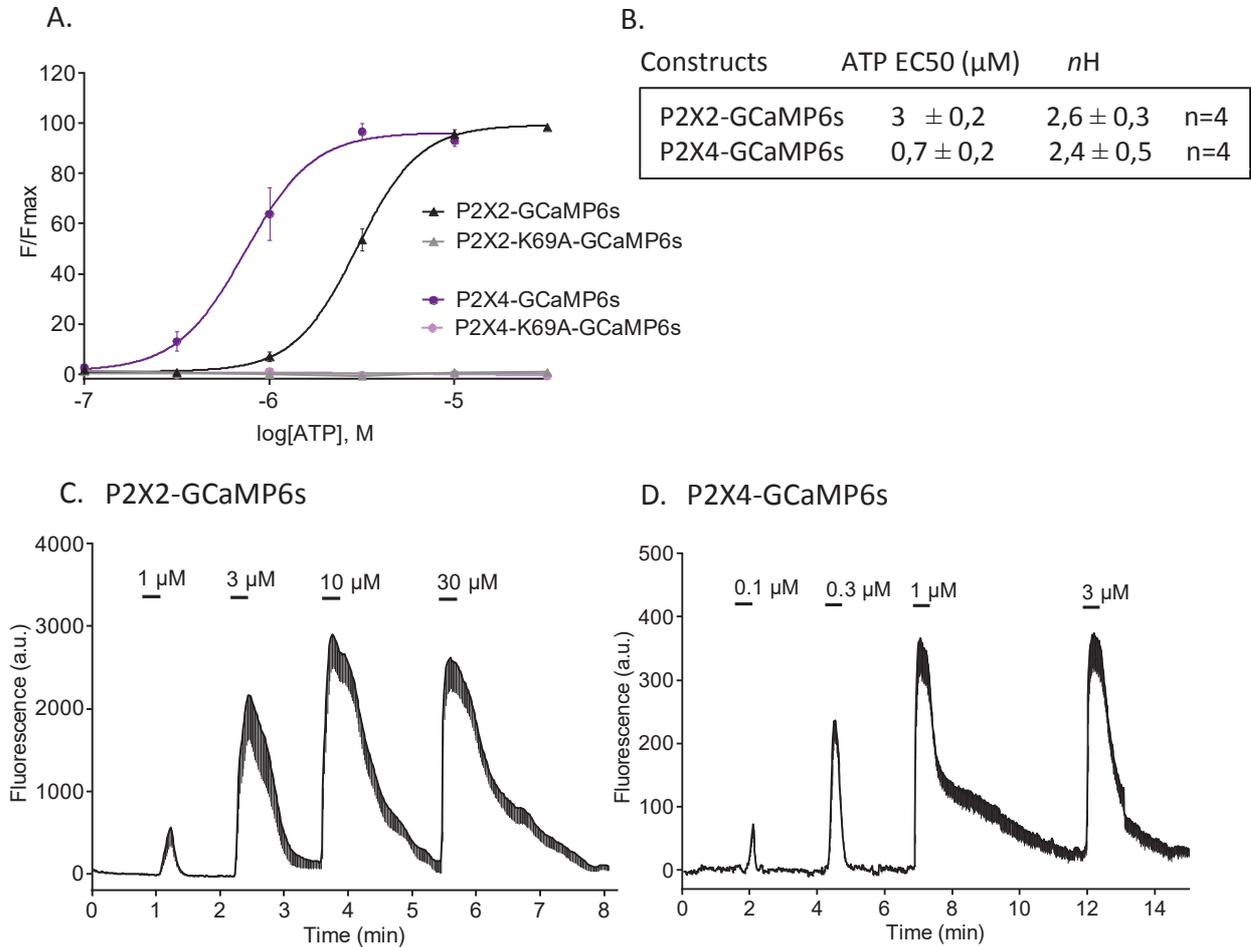
### **II.2.2. L'outil P2X-GCaMP6s dans la lignée astrocytaire 1321N1**

Nous avons utilisé la lignée 1321N1 car c'est une lignée cellulaire n'exprimant pas de récepteurs P2Y. C'est la lignée de choix utilisée pour caractériser pharmacologiquement les récepteurs P2X recombinants. Des courbes dose-réponse fluorescentes à l'ATP sont réalisées sur des cellules exprimant P2X2-GCaMP6s ou P2X4-GCaMP6s de façon stable, après transduction lentivirale (Figure 35A). Les EC50 observées pour P2X2-GCaMP6s et P2X4-GCaMP6s sont de  $3 \pm 0,2$  et  $0,7 \pm 0,2$   $\mu$ M respectivement (Figure 35B). Ces affinités pour l'ATP sont très proches de celles observées sur des cellules HEK transfectées. Ces résultats montrent que l'outil P2X-GCaMP6s peut être utilisé indifféremment sur différentes lignées cellulaires pour suivre l'activité des récepteurs P2X.

De façon intéressante, aucune réponse fluorescente n'est enregistrée sur les lignées exprimant P2X2-K69A-GCaMP6s ou P2X4-K69A-GCaMP6s (Figure 35B). Cette observation montre que la faible réponse fluorescente observée sur les cellules HEK exprimant l'outil P2X4-K69A-GCaMP6s est bien due à une libération de calcium intracellulaire en réponse à l'activation des récepteurs P2Y endogènes.

Les figures 35C et D illustrent des réponses fluorescentes enregistrées par vidéomicroscopie. Le poste vidéomicroscopie est équipé d'un système de perfusion permettant des applications rapides d'ATP, et donc une meilleure caractérisation des réponses fluorescentes que celle pratiquée en lecteur de plaques. Dans ces conditions, quelle que soit la concentration d'ATP appliquée, l'augmentation de fluorescence est réversible. La figure 35C, représente des cellules 1321N1 exprimant P2X2-GCaMP6s. Dans ce cas une réponse fluorescente est enregistrée de 1 à 30  $\mu$ M avec une réponse de 50 % située autour de 3  $\mu$ M. La Figure 35D

représente des cellules 1321N1 exprimant P2X4-GCaMP6s. Dans ce cas, une réponse fluorescente est enregistrée de 0,1 à 3  $\mu\text{M}$  avec une réponse de 50 % située entre 0,3 et 1  $\mu\text{M}$ . Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par les enregistrements en lecteur de plaques.



**Figure 35 : Caractérisation des outils P2X2-GCaMP6s et P2X4-GCaMP6s sur la lignée astrocytaire 1321N1**

(A) Courbes de dose-réponse fluorescentes (aires sous la courbe) à l'ATP pour P2X2-GCaMP6s, P2X2-K69A-GCaMP6s, P2X4-GCaMP6s, P2X4-K69A-GCaMP6s. Acquisition de la fluorescence toutes les 1,5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/538$ . (B) Tableau des EC50 et nH indiqués par le logiciel Prism. (C) et (D) Tracés représentatifs de signaux fluorescents enregistrés en vidéomicroscopie pour P2X2-GCaMP6s (moyenne de 8 cellules) (B), et pour P2X4-GCaMP6s (moyenne de 11 cellules) (C). Temps d'application : 10 secondes. Acquisition : 500 ms à 1 Hz,  $\lambda_{\text{em/exc}} = 485/538$ . Analyse par le logiciel Image J.

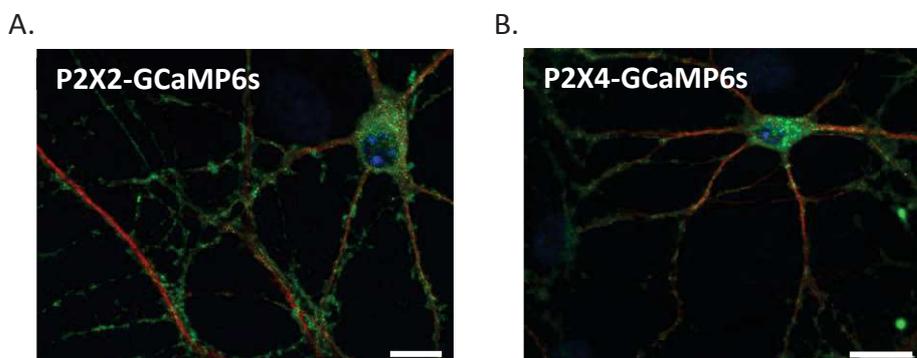
### II.2.3. L'outil P2X-GCaMP6s dans les neurones hippocampiques en culture primaire

#### II.2.3.1. Expression et localisation des outils P2X2-GCaMP6s et P2X4-GCaMP6s dans les neurones

Les récepteurs P2X2 neuronaux sont principalement exprimés à la membrane et une étude a montré qu'ils jouaient le rôle de senseurs d'activité neuronale<sup>146</sup>. Les récepteurs P2X4 neuronaux, quant à eux, sont principalement exprimés au niveau des lysosomes intracellulaires et pourraient jouer un rôle dans les phénomènes de LTP et de plasticité synaptique<sup>153</sup>. Il paraît donc important de valider l'utilisation de ces outils sur des neurones primaires hippocampiques. Comme indiqué précédemment, ces neurones hippocampiques primaires ont été transduits par des virus exprimant P2X2-GCaMP6s ou P2X4-GCaMP6s sous le contrôle du promoteur CaMK2 $\alpha$ .

Afin de vérifier que la fusion de la GCaMP6s ne perturbe pas la localisation neuronale de ces deux récepteurs, des triples marquages immunocytochimiques ont été réalisés (Figure 36). Le marquage rouge est un marquage anti-MAP2 (protéines des microtubules) alors que le marquage vert est un marquage anti-GFP permettant de détecter la GCaMP6s fusionnée au récepteur. Enfin le marquage bleu (DAPI) permet de marquer les noyaux. Pour P2X2, le marquage vert est clairement membranaire autour du marquage MAP-2 (Figure 36A). Comme décrit dans la littérature, P2X2 semble être exprimé à la membrane et au niveau de varicosités membranaires ainsi que dans certaines petites structures pouvant s'apparenter à des boutons synaptiques<sup>146</sup>. Des approches biochimiques sont nécessaires pour confirmer cette observation. Pour P2X4 (Figure 36B), on observe principalement un marquage ponctiforme intracellulaire vert (plus visible au niveau du corps cellulaire). Cette observation est en accord avec une localisation intracellulaire généralement décrite pour les récepteurs P2X4<sup>80</sup>.

Ces marquages immunocytochimiques montrent donc que la localisation subcellulaire de P2X2 et P2X4 n'est pas affectée par la fusion de la GCaMP6s et permet d'envisager l'utilisation de ces outils pour étudier l'activité des récepteurs P2X dans les neurones.



**Figure 36 : Immunocytochimie outils P2X2-GCaMP6s et P2X4-GCaMP6s exprimés dans des neurones primaires hippocampiques**

Triple immunomarquage réalisé sur des neurones primaires d'hippocampes à DIV14, après transduction à DIV7 de P2X2-GCaMP6s (A), ou de P2X4-GCaMP6s (B). Marquage bleu : DAPI ; marquage rouge : anticorps anti-MAP2 ; marquage vert : anticorps anti-GFP. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

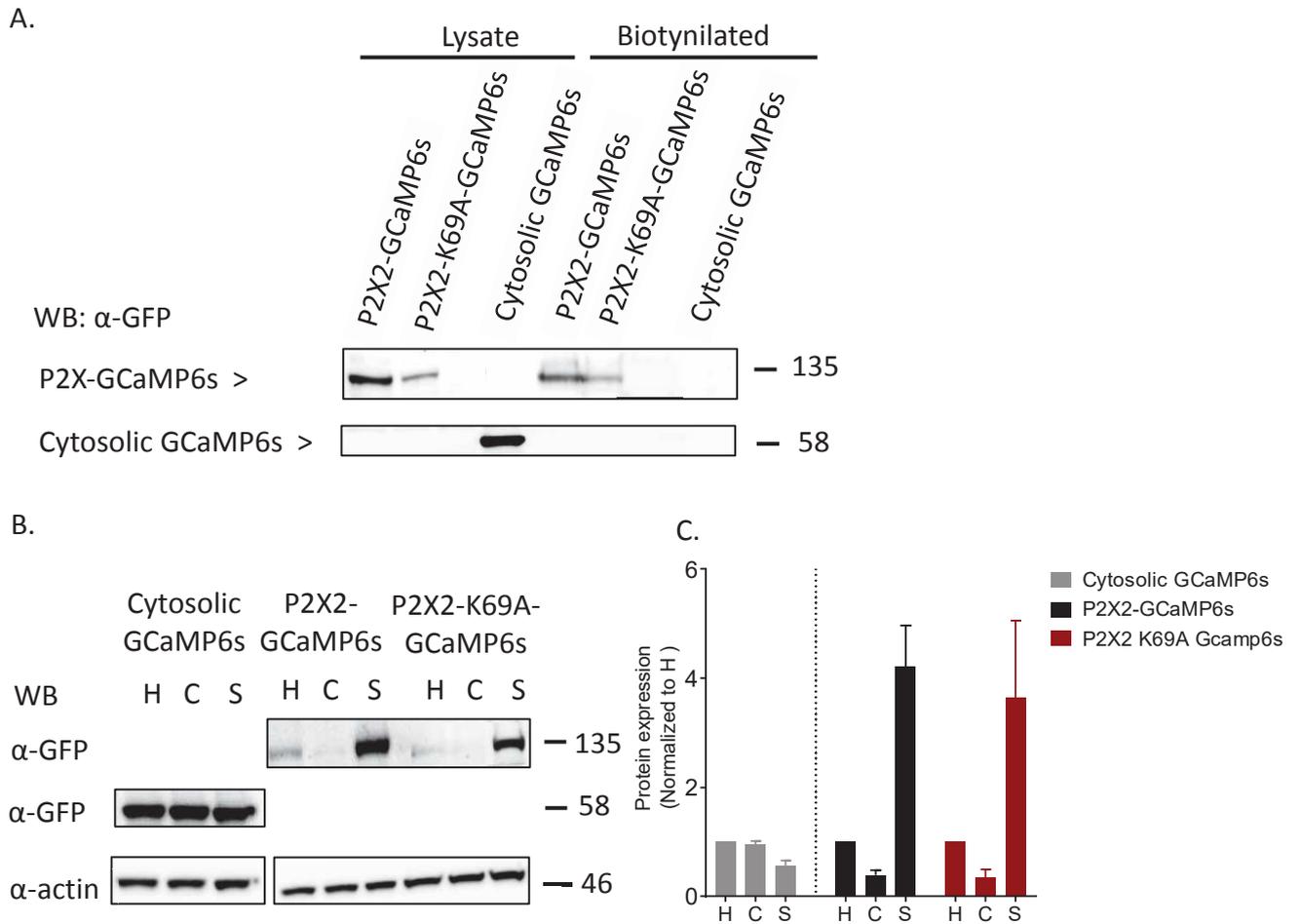
### II.2.3.2. Caractérisation biochimique de P2X2-GCaMP6s exprimé dans les neurones

Afin de confirmer les observations immunocytochimiques faites précédemment avec l'outil P2X2-GCaMP6s, des études biochimiques ont été réalisées pour détecter et confirmer son expression dans différents compartiments cellulaires.

Dans un premier temps, des études de biotinylation ont permis d'évaluer l'expression à la membrane de P2X2-GCaMP6s et P2X2-K69A-GCaMP6s (Figure 37A). L'expression dans le lysat correspond à la fraction globale de la protéine alors que les protéines biotinylées correspondent à la fraction de récepteurs présents à la surface membranaire de la cellule et donc accessibles pour le marquage par la biotine. La Figure 36A montre que ces récepteurs sont principalement à la membrane, confirmant les observations d'immunocytochimie. De façon intéressante, le fait que l'outil P2X2-K69A s'exprime de la même façon à la membrane que le récepteur non muté suggère que l'adressage membranaire de ces protéines est indépendant de leur activité. Enfin, pour s'assurer que la biotine ne marque que les protéines membranaires, des neurones ont été transduits avec une GCaMP6s cytosolique (non exprimée à la membrane). Dans ce cas, la GCaMP6s est uniquement détectée dans le lysat mais n'est pas biotinylée.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'enrichissement de nos outils à la synapse grâce à des préparations de synaptosomes. Cette méthode permet de comparer l'expression d'une protéine dans un homogénat totale (H) à une fraction cytosolique (C) et synaptique (S). Alors qu'une GCaMP6s cytosolique est exprimée de façon homogène dans le cytoplasme et à la synapse, l'expression de P2X2-GCaMP6s et P2X2-K69A-GCaMP6s est fortement enrichie à la synapse (Figure 37B). Les données, normalisées par l'homogénat pour chaque condition, montrent un enrichissement synaptique protéique d'environ quatre fois par rapport à l'homogénat total (Figure 37C). La fraction cytosolique, quant à elle est appauvrie par rapport à l'homogénat. Ces deux outils semblent donc être envoyés préférentiellement au niveau des synapses confirmant les observations immunocytochimiques. Le fait que le mutant P2X2-K69A-GCaMP6s soit aussi enrichi dans les membranes suggère que cette localisation est indépendante de l'activité.

Par manque de temps, ces études biochimiques n'ont pas été réalisées pour la construction P2X4-GCaMP6s. Au vu de la localisation décrite de P2X4 on s'attendrait dans ce cas-là à un enrichissement cytosolique.



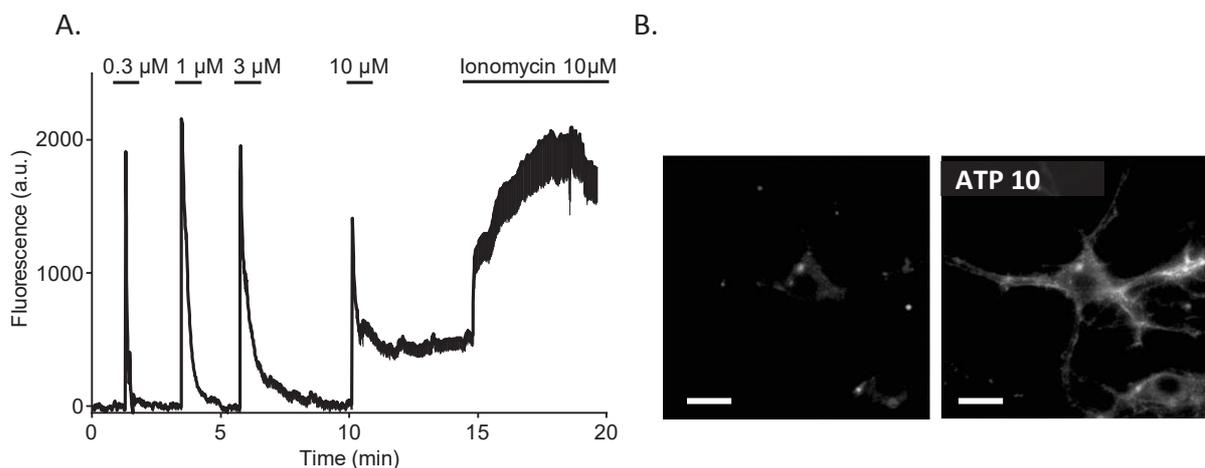
**Figure 37 : Caractérisation biochimique de l'outil P2X2-GCaMP6s exprimé dans des neurones primaires hippocampiques**

Les neurones primaires sont transduits à DIV7 et les analyses biochimiques sont réalisées entre DIV14 et DIV16 (7 à 9 jours post-transduction). (A) Les extraits protéiques du lysat ou des protéines biotinylées sont analysés après migration sur gel de polyacrylamide. Les protéines sont détectées grâce à un anticorps anti-GFP permettant de révéler la présence de la GCaMP6s cytosolique ou fusionnée à P2X2. (B) Des extraits protéiques sont centrifugés pour séparer l'homogénat protéique total de celui du cytosolique et du synaptique. Ces extraits sont analysés après migration sur gel de polyacrylamide. Les GCaMP sont détectés comme précédemment. Un anticorps anti-actine est utilisé pour normaliser les différentes conditions. (C) L'intensité de chaque bande est quantifiée (Image Lab), normalisée par l'actine, puis par l'expression de l'homogénat pour chaque condition (n = 6 pour GCaMP6s et P2X2-GCaMP6s et n = 3 pour P2X2-K69A-GCaMP6s).

### II.2.3.3. Caractérisation vidoémicroscopique de l'outil P2X2-GCaMP6s dans les neurones hippocampiques

L'activité de P2X2-GCaMP6s a été analysée en vidéomicroscopie dans les neurones transduits. Les variations de fluorescence induites par des applications d'ATP ont été enregistrées en fonction du temps. Différentes concentrations d'ATP ont été appliquées et une application finale avec 10  $\mu$ M de ionomycine (un ionophore calcique) a permis de comparer les réponses ATP à cette réponse maximale (Figure 38A). Sur les neurones primaires, l'application d'ATP à une faible concentration (300 nM) entraîne une augmentation quasi maximale de la fluorescence. Par rapport aux enregistrements obtenus dans la lignée 1321N1, les réponses fluorescentes sont beaucoup plus brèves bien que le temps d'application de l'agoniste soit le même (10 secondes). Ceci pourrait indiquer que la réponse de P2X2-GCaMP6s dans les neurones désensibilise plus rapidement que dans la lignée 1321N1. Bien que les pics de réponses atteignent le maximum pour de faibles concentrations d'ATP, l'aire sous la courbe de ces réponses paraît proportionnelle à la concentration d'ATP appliquée. Dès 10  $\mu$ M d'ATP, la fluorescence ne revient pas à sa valeur basale, suggérant une forte sensibilité des neurones à l'ATP. La Figure 38B illustre un neurone avant et après une stimulation à 10  $\mu$ M d'ATP. On observe une forte augmentation de la fluorescence principalement au niveau membranaire et plus particulièrement au niveau dendritique.

L'outil P2X2-GCaMP6s permet donc de suivre de façon simple et en temps réel l'activité des récepteurs P2X2. Pour l'outil P2X4-GCaMP6s, les quelques expériences réalisées n'ont pas permis d'enregistrer des signaux fluorescents analysables. En effet, les signaux observés, de très faible amplitude, n'ont pas permis de conclure quant à la sensibilité du récepteur à l'ATP. Des améliorations de l'expression du senseur et des protocoles utilisés apparaissent nécessaires pour suivre l'activité des récepteurs P2X4.



**Figure 38 : Réponse à l'ATP de l'outil P2X2-GCaMP6s exprimé dans des neurones primaires hippocampiques**

(A) Tracés représentatifs de signaux fluorescents enregistrés en vidéomicroscopie pour P2X2-GCaMP6s ( $n = 10$  neurones, 2 dendrites par neurone) après application de doses croissantes d'ATP (temps d'application 10 secondes) puis de ionomycine à 10  $\mu$ M (5 minutes). Temps acquisition 500 ms à 1 Hz,  $\lambda_{em/exc} = 485/538$ . Analyse par le logiciel Image J. (B) Images représentatives issues de vidéomicroscopie représentant un neurone avant et après stimulation avec 10  $\mu$ M d'ATP. Bar d'échelle : 20  $\mu$ m.

#### II.2.3.4. Libération d'ATP et activation de P2X2 suite à une dépolarisation au KCl

L'activité neuronale est connue pour entraîner une libération d'ATP dans le milieu extracellulaire<sup>412</sup>. De plus, P2X2 a été décrit comme un senseur d'ATP naturel à la membrane<sup>146</sup>. Au vu de la forte sensibilité du récepteur à l'ATP mesurée à l'aide de notre outil P2X2-GCaMP6s, nous avons émis l'hypothèse qu'une dépolarisation pourrait entraîner une libération d'ATP détectable par l'outil P2X2-GCaMP6s.

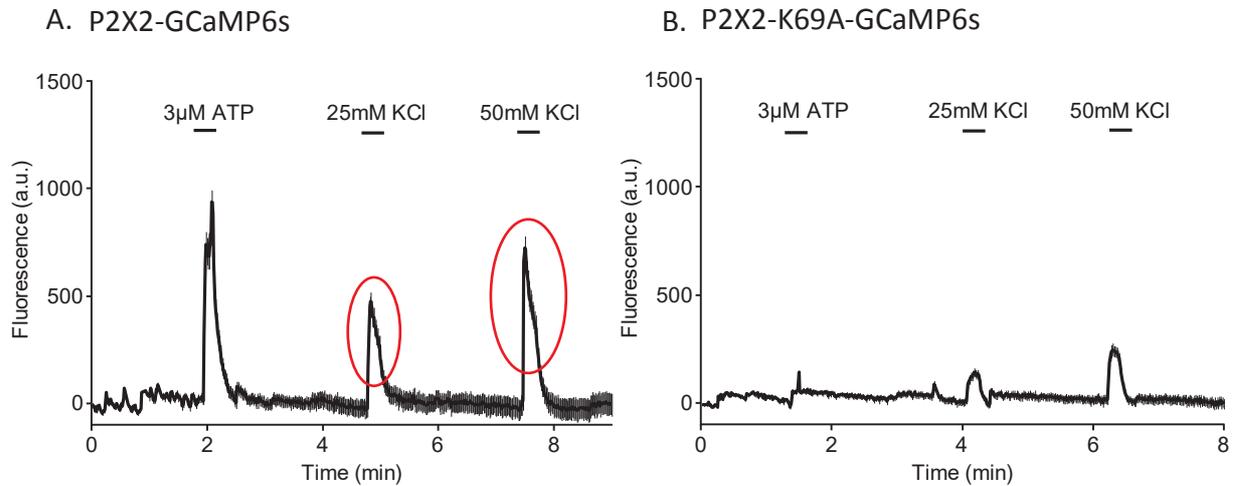
Pour tester cette hypothèse, des milieux contenant du KCl à 25 et 50 mM, permettant d'induire une dépolarisation, ont été appliqués sur des neurones exprimant P2X2-GCaMP6s (Figure 39A). Une première stimulation ATP à 3  $\mu$ M permet de s'assurer de l'expression du senseur, puis les milieux riches en KCl sont successivement appliqués. Comme attendue, l'ATP à 3  $\mu$ M entraîne une forte activité de récepteur P2X2. Les stimulations à 25 puis 50 mM de KCl entraînent toutes deux une réponse fluorescente soutenue, suggérant une activation de P2X2 induit par la dépolarisation membranaire.

Pour s'assurer que la stimulation ATP d'une part, et les stimulations KCl d'autre part, n'entraînent pas de réponses fluorescentes non spécifiques, le même protocole a été appliqué sur des neurones exprimant P2X2-K69A-GCaMP6s (Figure 39B). Dans ce cas, l'application d'ATP n'entraîne aucune augmentation de la fluorescence. Ce résultat signifie que les récepteurs purinergiques endogènes (P2X et P2Y) ne participent pas à la réponse fluorescente observée avec l'outil P2X2-GCaMP6s. L'application de KCl à 25 et 50 mM n'entraîne que de très faibles réponses fluorescentes. Ce résultat signifie que la majeure partie du signal observé après l'induction d'une dépolarisation au KCl correspond à une activité P2X2-GCaMP6s induite par une libération endogène d'ATP (signaux entourés en rouge sur la Figure 39A).

Ces résultats démontrent que l'outil P2X2-GCaMP6s peut être utilisé pour suivre l'activité du récepteur en condition de forte activité neuronale. Les propriétés de l'outil P2X2-GCaMP6s comme senseur exprimé à la membrane pourrait ainsi être utilisées pour étudier les mécanismes de la libération d'ATP dans un contexte d'activité neuronale.

Le manque de temps n'a pas permis de répéter plusieurs fois ces résultats. Il apparaît donc indispensable de refaire ces expériences pour confirmer les résultats obtenus. De plus, bien que les quantités de virus aient été adaptées suite aux études biochimiques, les derniers résultats présentés ne sont pas normalisés par l'expression du transgène. En effet les constructions CaMKII $\alpha$ -P2X2-GCaMP6s utilisées ne comportent pas de protéine fluorescente rouge rapportrice. De plus, la normalisation par la réponse ionomycine ne semble pas pertinente car elle n'est pas toujours saturante à 10  $\mu$ M (observations personnelles). Actuellement, les nouvelles constructions réalisées au sein du laboratoire comportent une protéine rapportrice fluorescente rouge mScarlet. Cette protéine mScarlet, récemment développée, possède des propriétés de brillances supérieures à toutes les protéines fluorescentes rouges actuellement disponibles<sup>413</sup>. Elle apparaît donc comme une protéine rapportrice idéale. De futures constructions CaMK2 $\alpha$ -P2X-GCaMP6s-P2A-mScarlet pourraient permettre une normalisation simple pour s'affranchir de potentielles différences d'expression des outils. Il paraît donc important d'obtenir ces constructions et les virus correspondants afin

de confirmer ces résultats et d'initier des expériences plus complexes sur les mécanismes de la libération d'ATP au niveau neuronal.



**Figure 39 : Libération d'ATP par les neurones hippocampiques exprimant l'outil P2X2-GCaMP6s suite à une dépolarisation au KCl**

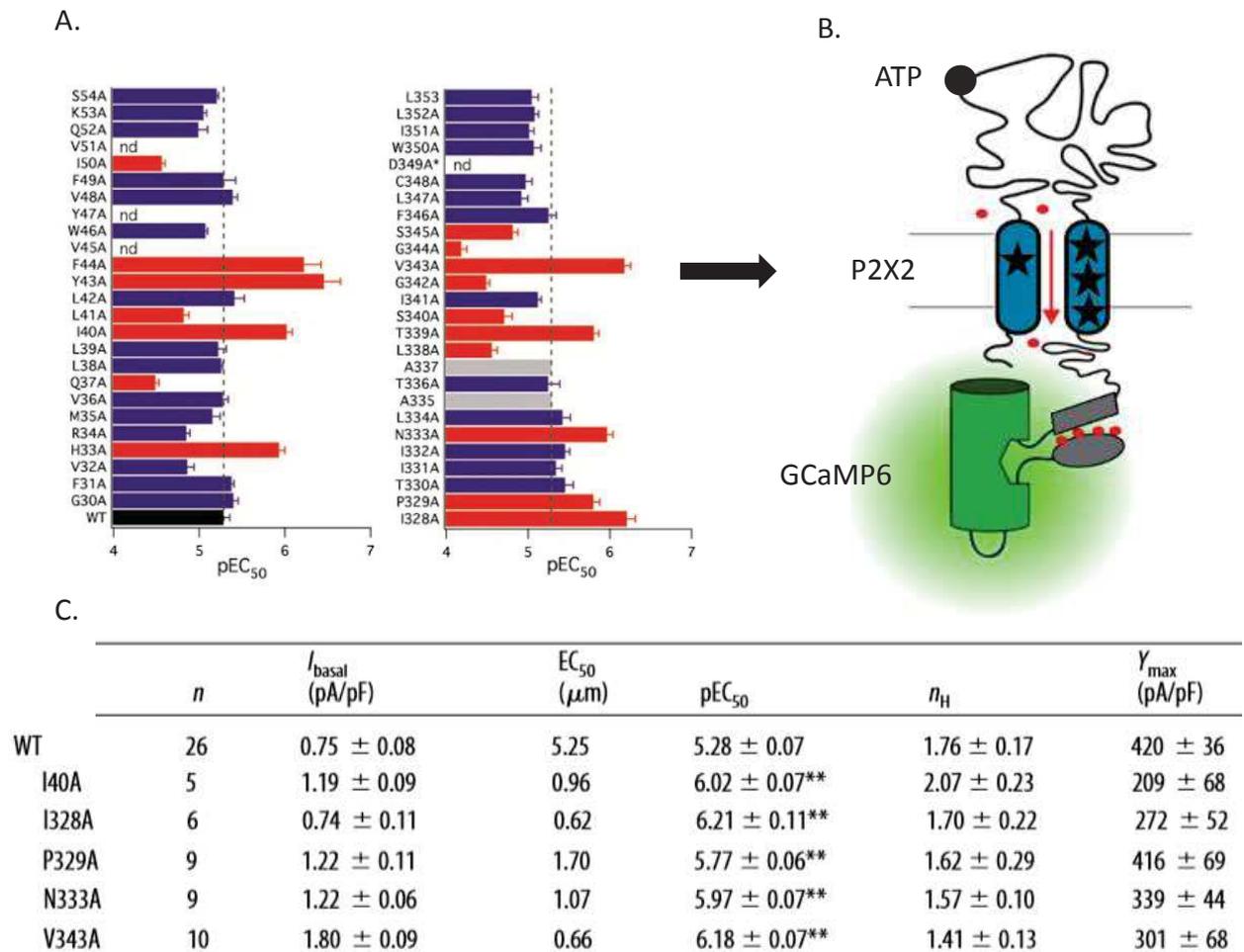
Signaux fluorescents enregistrés en vidéomicroscopie sur des neurones exprimant P2X2-GCaMP6s (A) ou P2X2-K69A-GCaMP6s (B). Analyse de 2 neurones, 5 dendrites par neurone après application de 3  $\mu\text{M}$  d'ATP, 25 mM de KCl puis 50 mM KCl (temps d'application 10 seconds) puis de ionomycine à 10  $\mu\text{M}$  (5 minutes). Temps d'acquisition 500 ms à 1 Hz,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/538$ . Analyse par le logiciel Image J.

### ***III. Développement d'un biosenseur de l'ATP extracellulaire à partir de l'outil P2X2-GCaMP6s***

#### **III.1. Développement d'un biosenseur de l'ATP**

##### **III.1.1. Choix du récepteur P2X2 et des mutants alanine**

Comme nous l'avons vu en introduction, peu d'outils permettent de détecter l'ATP extracellulaire avec une forte affinité et une bonne résolution spatio-temporelle. L'idée a donc été d'utiliser l'outil P2X-GCaMP6s dont le ligand naturel est l'ATP, afin de détecter sa présence extracellulaire. Parmi les récepteurs P2X, P2X2, de par sa forte expression membranaire et sa faible désensibilisation, semble être le candidat idéal pour le développement d'un biosenseur à l'ATP exprimé à la membrane. Comme décrit précédemment, la sensibilité de l'outil P2X2-GCaMP6s permet de détecter une gamme d'ATP de l'ordre de 1 à 10  $\mu\text{M}$ . Néanmoins, on sait qu'une libération d'ATP de quelques centaines de nanomolaire peut déjà entraîner l'activation de certains récepteurs P2Y ayant une forte affinité pour l'ATP. Augmenter la sensibilité à l'ATP de l'outil P2X2-GCaMP6s pour créer un biosenseur d'ATP fluorescent très sensible paraît donc pertinent. Pour cela, plusieurs mutants alanines transmembranaires, décrits dans une étude de mutagenèse, ont été sélectionnés (Figure 40A)<sup>414</sup>. Dans cette étude, les auteurs criblent, par des méthodes électrophysiologiques, quarante-neuf mutants alanines situés au niveau des segments transmembranaires. L'affinité à l'ATP, le courant basal en absence d'agoniste (activité constitutive) ainsi que les amplitudes de courant suite à l'activation par l'ATP sont décrits pour chaque mutant (Figure 40B). Ils mettent ainsi en évidence neuf mutants avec un fort gain d'affinité pour l'ATP. Parmi ces mutants, nous en avons sélectionné cinq ayant un gain d'affinité d'un facteur d'au moins trois par rapport au P2X2 sauvage (WT), une activité constitutive faible et une amplitude de courant proche de celle de P2X2 WT (Figure 39C pour les propriétés électrophysiologiques des 5 mutants). Au final, ces cinq mutants sélectionnés (un dans le TM1 et quatre dans le TM2) ont été indépendamment insérés dans l'outil P2X2-GCaMP6s (Figure 39B) par PCR.



**Figure 40 : Développement du biosenseur à l'ATP : insertion de mutations alanines dans les segments transmembranaires de l'outil P2X2-GCaMP6s**

(A) EC<sub>50</sub> mesurées par électrophysiologie des mutants alanines P2X2 du domaine transmembranaire 1 (TM1) (gauche) ou 2 (TM2) (droite)<sup>414</sup>. (B) Représentation schématique de l'insertion des mutants dans l'outil P2X2-GCaMP6s. (C) Caractéristiques des cinq mutants alanines sélectionnés<sup>414</sup>.

### III.1.2. Criblage et expression cellulaire des mutants sur cellules HEK

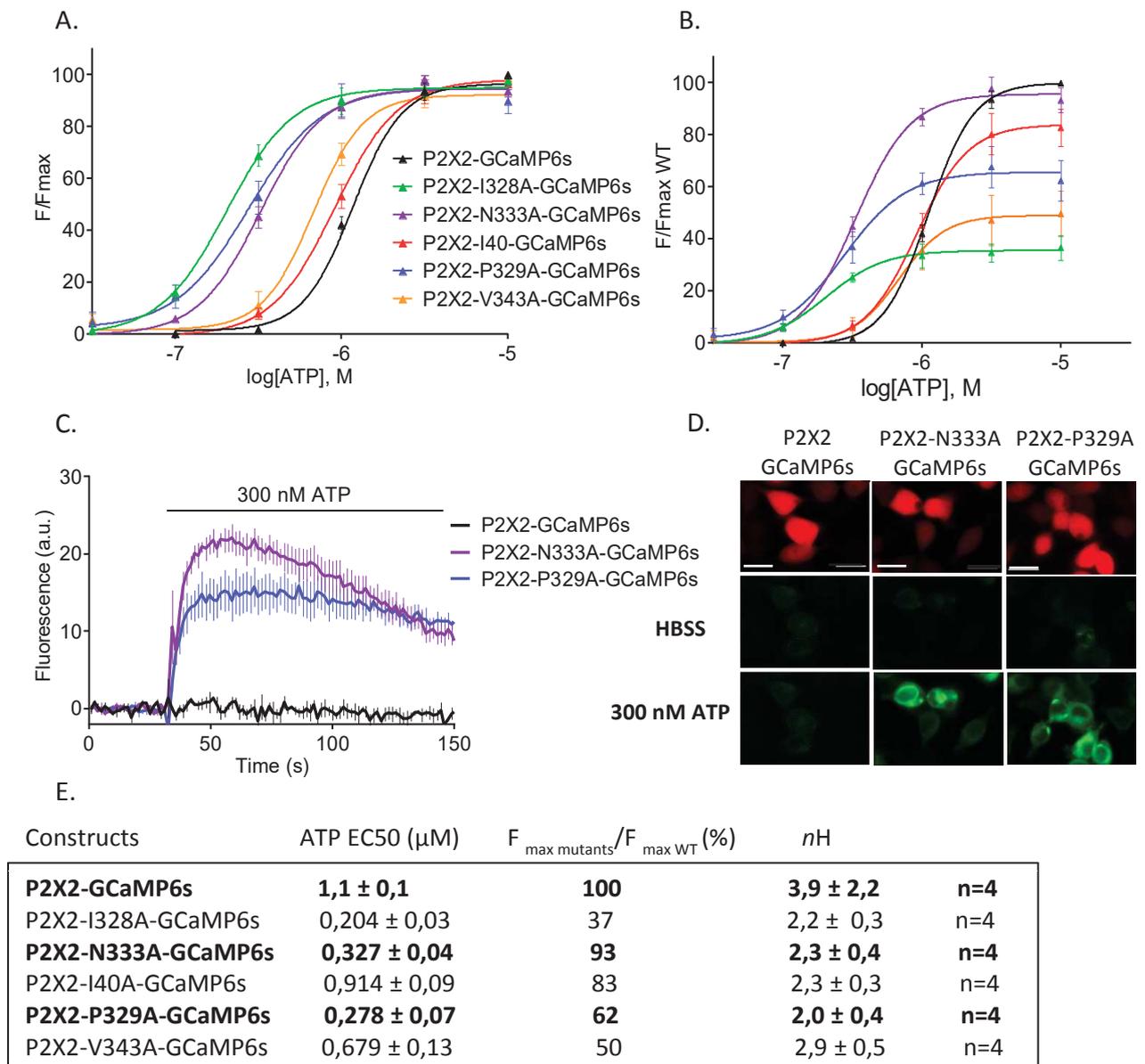
#### III.1.2.1. Criblage des mutants P2X-GCaMP6s

Les différents mutants P2X2-GCaMP6s ont été criblés grâce aux courbes dose-réponse à l'ATP. Les courbes dose-réponse normalisées par rapport à la réponse maximale du WT sont représentées en Figure 41B et celles normalisées par la réponse maximale de chaque mutant sont représentées en Figure 41A.

Tous les mutants possèdent un EC50 pour l'ATP significativement inférieure à celle du WT (courbe noire). Le récepteur sauvage possède une EC50 de 1,2  $\mu$ M alors que les mutants P2X2-I40A-GCaMP6s et P2X2-V343A-GCaMP6s possèdent des EC50 de 920 et 680 nM respectivement, ce qui représente un faible gain d'affinité. Les trois autres mutants, P2X2-I328A-GCaMP6s, P2X2-P329A-GCaMP6s et P2X2-N333A-GCaMP6s montrent une EC50 de 204, 277 et 334 nM respectivement, ce qui représente un fort gain d'affinité pour l'ATP par rapport au P2X2 WT (Figures 41A et E). D'après les réponses fluorescentes maximales rapportées à celle du P2X2 sauvage, le mutant I328A présente une réponse fluorescente maximale d'environ 40 % de la réponse maximale du WT, alors que les mutants V343A et P329A ont des réponses intermédiaires. Enfin les mutants I40A et N333A ont des signaux fluorescents proches de celui du P2X2 WT (Figures 41B et E).

La Figure 41C illustre le fort gain d'affinité pour l'ATP des mutants P2X2-N333A-GCaMP6s et P2X2-P329A-GCaMP6s. En effet, une augmentation de la fluorescence est observée suite à l'application de 300 nM d'ATP alors que P2X2-GCaMP6s n'est pas encore activé à cette concentration. La Figure 41D montre l'activation de ces mutants en vidéomicroscopie suite à une application de 300 nM d'ATP. Enfin, l'activation de ces mutants semble induire une augmentation de la fluorescence au niveau membranaire, comme le récepteur P2X2 WT.

Bien que les conditions expérimentales soient proches, des différences notables sont observées entre les EC50 estimées en électrophysiologie par rapport aux EC50 estimées en fluorescence suite à la fusion de la GCaMP6s. Par exemple, le mutant P2X2-V343 est décrit comme l'un des plus affins pour l'ATP. Fusionné à la GCaMP6s, ce mutant ne montre qu'un faible gain d'affinité par rapport au récepteur sauvage fusionné à la GCaMP6s. De même, les EC50 des mutants N333A et P329A déterminées en électrophysiologie sont différentes, alors que celles déterminées par fluorescence sont très proches. Ces modifications de propriétés sont probablement dues à des modifications suite à la fusion de la GCaMP6s. Il est à noter qu'ici aussi les EC50 déterminées en fluorescence sont plus faibles que celles déterminées en électrophysiologie. La caractérisation électrophysiologique des mutants fusionnés à la GCaMP6s pourrait donc s'avérer intéressante afin de confirmer les propriétés de ces mutants fusionnés à la GCaMP6s.



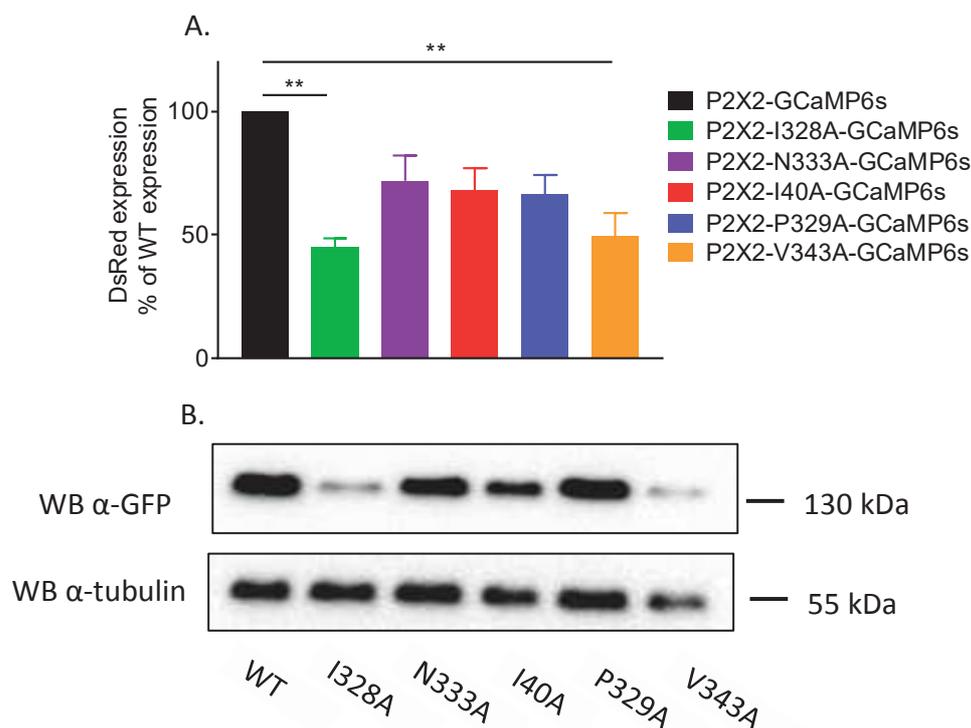
**Figure 41 : Caractérisation des différents mutants alanines sur cellules HEK et sélection de deux biosenseurs à l'ATP : P2X2-N333A-GCaMP6s (PNG) et P2X2-P329A-GCaMP6s (PPG)**

(A) et (B) Courbes dose-réponse (aires sous la courbe) à l'ATP pour P2X2-GCaMP6s (noir), P2X2-I328A-GCaMP6s (vert), P2X2-N333A-GCaMP6s (violet), P2X2-I40A-GCaMP6s (rouge), P2X2-P329A-GCaMP6s (bleu), P2X2-V343A-GCaMP6s (orange). Les courbes dose-réponse sont normalisées par rapport à la réponse maximale de chaque condition (A) ou par rapport à la réponse maximale de P2X2-GCaMP6s (B). (C) Tracés fluorescents représentatifs pour P2X2-GCaMP6s, P2X2-N333A-GCaMP6s et P2X2-P329A-GCaMP6s suite à une stimulation d'ATP 300 nM. Acquisition de la fluorescence toutes les 1,5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/540$ . (D) Images représentatives issues de films réalisés en vidéomicroscopie sur des cellules HEK exprimant les outils P2X2-GCaMP6s, PNG ou PPG. Expression de la protéine rapportrice fluorescente rouge mScarlet (en haut)  $\lambda_{\text{exc/em}} = 535/590$ , temps d'acquisition 200 ms. Comparaison de la fluorescence après une stimulation HBSS (gauche) et après une stimulation avec 10  $\mu$ M d'ATP (droite).  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/540$ . Temps d'acquisition : 500 ms. Bar d'échelle = 20  $\mu$ m. (E) Tableau des EC50, fluorescences maximales/WT et nH indiqués (calculés par Prism). Les EC50 obtenues sont toutes significativement différentes par rapport au WT (test de comparaison des lissages, p-value : 0,0001).

### III.1.2.2. Expression des mutants P2X-GCaMP6s

Le niveau de l'expression cellulaire des mutants P2X-GCaMP6s a été analysé. Les cellules HEK ont été transfectées avec des plasmides contenant le récepteur fusionné suivi d'une séquence codant pour une protéine rapportrice fluorescente rouge (Dsred2). La mesure de la fluorescence rouge est donc directement proportionnelle à l'expression du récepteur. Le signal DsRed2 normalisé par rapport au signal de P2X2-GCaMP6s montre que les mutants I328A et V343A ont une expression deux fois plus faible que celle du sauvage (p-value : 0,001 et 0,024 respectivement) (Figure 42A). Ce résultat est en accord avec les réponses fluorescentes maximales plus faibles observées pour ces mutants (autour de 40 % de la réponse fluorescente maximale du WT). L'expression des trois autres mutants a tendance à être légèrement inférieure au WT mais n'est pas significativement différente. Des western blots avec un anticorps anti-GFP pour détecter la GCaMP6s confirment les résultats obtenus avec les signaux DsRed2 (Figure 42B).

La faible expression des mutants P2X2-I328A-GCaMP6s et P2X2-V343A-GCaMP6s peut être due à différentes causes. Premièrement, une activité constitutive ou une trop forte sensibilité à l'ATP pourrait conduire à une mort cellulaire rapide et donc à une sélection des cellules ayant une faible expression du transgène. Cela pourrait être le cas du mutant I328A dont l'affinité pour l'ATP est très forte. Deuxièmement, une faible fluorescence pourrait être due à des problèmes d'expression et de trafic du récepteur à la membrane diminuant les signaux fluorescents détectés. Cela pourrait être le cas du mutant V343A qui possède de faibles signaux fluorescents malgré un faible gain d'affinité.

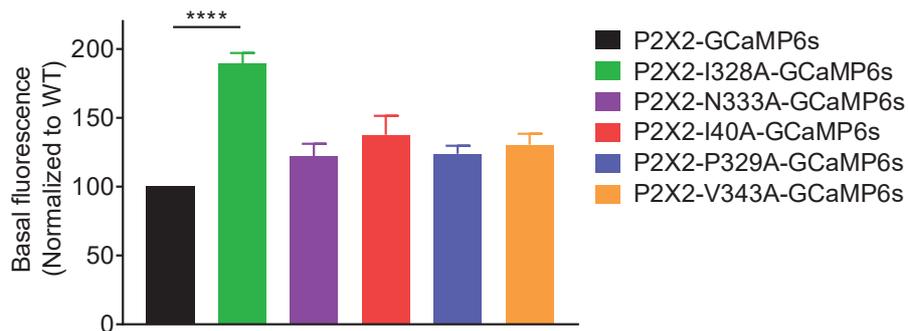


**Figure 42 : Expression des mutants P2X2-GCaMP6s**

(A) Expression de la protéine fluorescente rapportrice rouge DsRed2 ( $\lambda_{exc/em} = 535/590$ ) mesurée grâce à un lecteur de plaques. Données normalisées par l'expression du WT (100 %).  $n = 4$  transfections indépendantes, chaque  $n$  est la moyenne d'un triplicat. ANOVA 1 way :  $p$ -value : 0,014. Test de comparaisons multiples de Tukey: P2X2-GCaMP6s vs P2X2-I328A-GCaMP6s,  $p$ -value : 0,001. P2X2-GCaMP6s vs P2X2-V343A-GCaMP6s,  $p$ -value : 0,0024. (B) Western blot des mutants alanines. Les extraits protéiques sont analysés après migration sur gel de polyacrylamide. Les membranes obtenues sont incubées avec un anticorps anti-GFP permettant de révéler la présence de la GCaMP6s fusionnée au récepteur P2X2.

### III.1.2.3. Fluorescence basale des mutants P2X-GCaMP6s

Un dernier paramètre, la fluorescence basale, a été examiné pour caractériser ces mutants (Figure 43). Le mutant I328A possède une forte fluorescence basale (1,8 fois supérieures à celle du P2X2-GCaMP6s sauvage). Cette caractéristique confirme une activité constitutive ou une capacité de ce senseur à détecter l'ATP ambiante extracellulaire. Les autres mutants ont tendance à avoir une fluorescence basale supérieure à celle du P2X2 sauvage mais sans différences statistiques significatives.



**Figure 43 : Fluorescence basale des mutants P2X2-GCaMP6s**

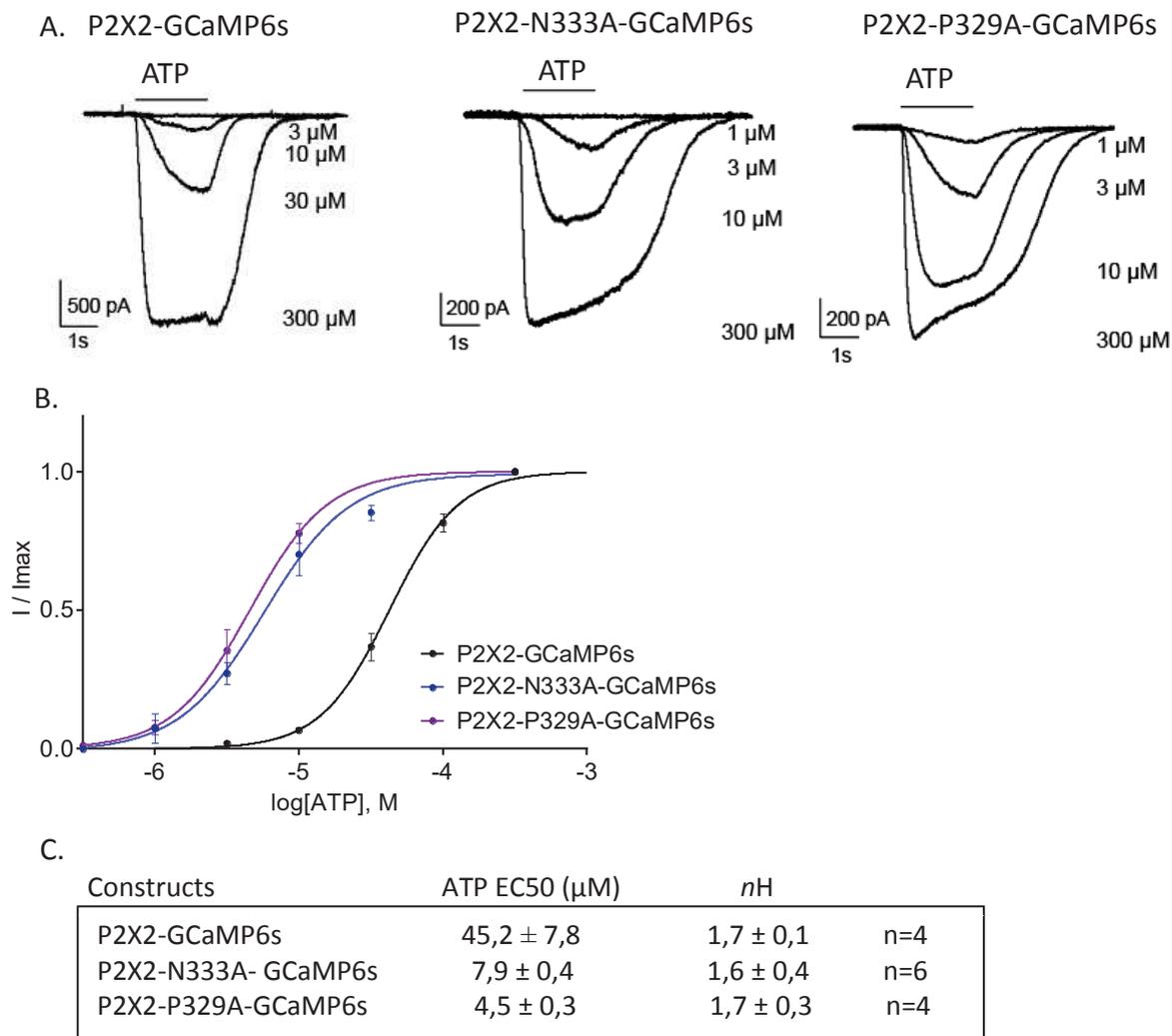
(A) Fluorescence basale de la GCaMP6s ( $\lambda_{exc/em} = 485/540$ ) mesurée grâce à un lecteur de plaques. Données normalisées par l'expression du WT (100 %). n = 4 transfections indépendantes, chaque n est la moyenne d'un triplicat. ANOVA 1 way : p-value : 0,0001. Test de comparaisons multiples Tukey: P2X2-GCaMP6s vs P2X2-I328A-GCaMP6s, p-value : 0,001.

#### III.1.2.4. Choix de deux mutants comme biosenseurs d'ATP potentiels

Les mutants I40A et V343A fusionnés à la GCaMP6s ont une affinité pour l'ATP peu différente de celle de P2X2-GCaMP6s. Ces derniers ont donc été rapidement écartés. Le mutant I328A possède une faible réponse fluorescente associée à une faible expression cellulaire. La forte fluorescence basale observée suggère une activité constitutive ou une sensibilité à l'ATP ambiante. Cela pourrait limiter son utilisation *in situ* ou *in vivo*. Ce dernier a donc aussi été écarté. Les mutants N333A et P329A ont une EC50 autour de 300 nM, une forte réponse fluorescente, une expression cellulaire satisfaisante et une faible fluorescence basale. Le choix s'est donc porté sur les constructions P2X2-N333A-GCaMP6s et P2X2-P329A-GCaMP6s comme biosenseurs potentiels pour détecter l'ATP extracellulaire. Dans la suite de l'étude, l'outil P2X2-GCaMPs et les deux biosenseurs à l'ATP, P2X2-N333A-GCaMP6s et P329-P2X2-GCaMP6s seront renommés PG, PNG et PPG respectivement.

#### III.1.3. Validation électrophysiologique des mutants PPG et PNG

Afin de valider les propriétés observées en fluorescence, les deux mutants sélectionnés ont été caractérisés par des méthodes électrophysiologiques. Les tracés électrophysiologiques (Figure 44A) et les courbes dose-réponse (Figure 44B) montrent une EC50 de 45  $\mu$ M pour P2X2-GCaMP6s et de  $7,9 \pm 0,4 \mu$ M et de  $4,5 \pm 0,3 \mu$ M pour les biosenseurs PNG et PPG respectivement (Figure 44C). Pour des raisons préalablement évoquées (expériences réalisées à température ambiante), ces EC50 sont supérieures à celles observées par les méthodes fluorescentes. Néanmoins, un fort gain d'affinité pour les deux mutants par rapport au WT est retrouvé.

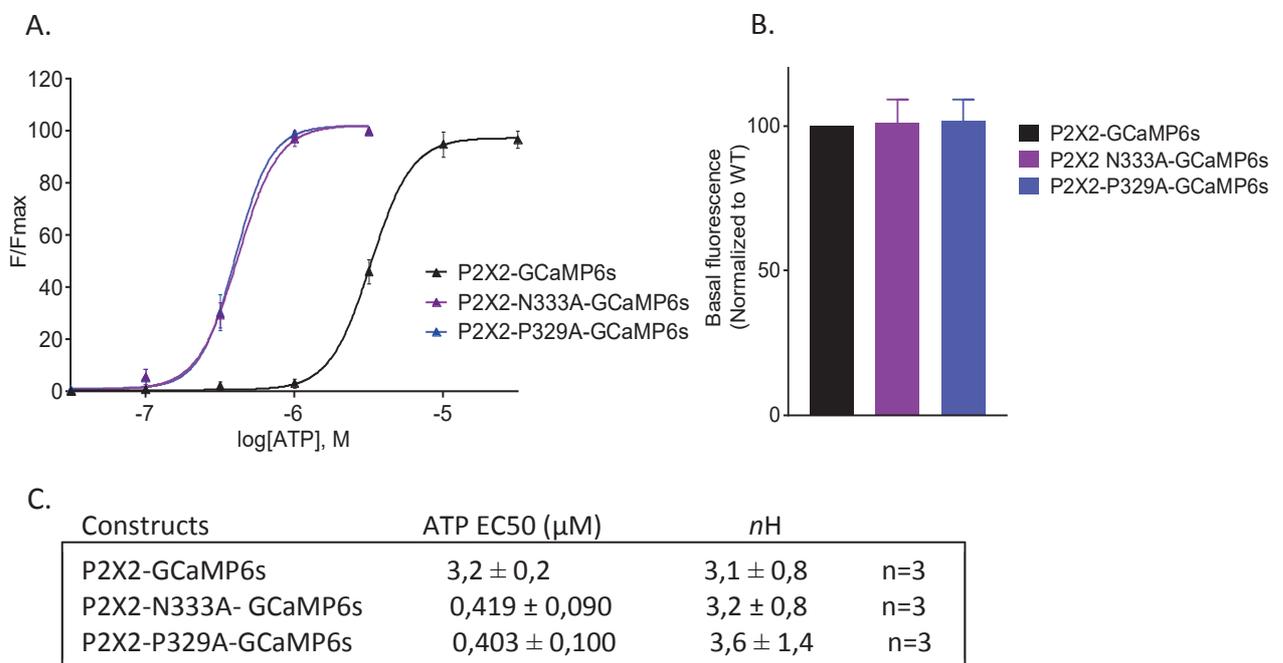


**Figure 44 : Caractérisation électrophysiologique des biosenseurs PPG et PNG**

(A) Tracés représentatifs des courants obtenus suite à un l'enregistrement de cellules HEK (configuration cellule entière) transfectées avec les constructions P2X2-GCaMP6s (gauche), P2X2-N333A-GCaMP6s (milieu) ou P2X2-N333A-GCaMP6s (droite) suite à l'application de dose croissante d'ATP (temps d'application 3 secondes). (B) Courbes dose-réponse correspondantes. (C) Tableau des EC50 et nH calculés par le logiciel Prism. Les EC50 obtenues pour les mutants sont significativement différentes de P2X2-GCaMP6s (test de comparaison des EC50, p-value  $\leq 0,0001$  pour les deux mutants). Les EC50 des deux mutants ne sont pas significativement différentes.

### III.1.4. Caractérisation des biosenseurs sélectionnés sur une lignée astrocytaire 1321N1

De la même façon que pour les outils P2X2-GCaMP6s et P2X4-GCaMP6s, les biosenseurs PNG et PPG ont été caractérisés sur des cellules 1321N1 exprimant de façon stable les deux mutants sélectionnés. Comme attendu, un fort gain d'affinité est observé pour les deux mutants par rapport au P2X2-GCaMP6s sauvage (Figure 45A). L'EC50 pour les biosenseurs PNG et PPG est de  $419 \pm 0,09$  nM et  $403 \pm 0,1$  nM respectivement (Figure 45C). Ces EC50 sont proches de celles calculées pour les cellules HEK. Le signal fluorescent basal de la GCaMP6s n'est pas différent entre les mutants et le sauvage (Figure 45B). Ces résultats suggèrent que ces biosenseurs peuvent être utilisés indifféremment dans divers types cellulaires pour étudier la libération d'ATP.

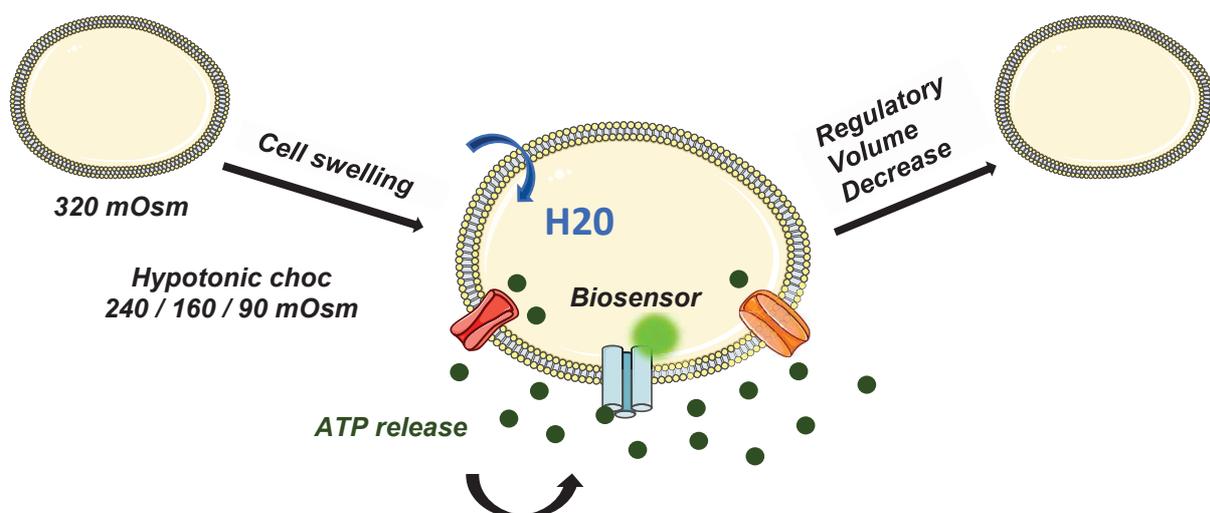


**Figure 45 : Caractérisation des biosenseurs PNG et PPG sur la lignée astrocytaire 1321N1**

(A) Courbes dose-réponse de la fluorescence (aire sous la courbe) pour P2X2-GCaMP6s, P2X2-N333A-GCaMP6s et P2X2-P329A-GCaMP6s exprimés de façon stable sur une lignée astrocytaire 1321N1. Acquisition de la fluorescence toutes les 1,5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/538$ . (B) Fluorescence basale de la GCaMP6s ( $\lambda_{exc/em} = 485/540$ ) mesurée grâce à un lecteur de plaques. Données normalisées par rapport à l'expression du WT (100 %). n = 4 transfections indépendantes, chaque n est la moyenne d'un triplicat. (C) Tableau des EC50 et nH calculés par le logiciel Prism. Les EC50 obtenues pour les mutants sont significativement différentes de celle de P2X2-GCaMP6s (test de comparaison des EC50, p-value  $\leq 0,0001$  pour les deux mutants).

### III.2. Preuve de concept *in vitro* : détection d'une libération endogène d'ATP après un gonflement cellulaire

Nous avons précédemment montré que les biosenseurs à l'ATP PNG et PPG étaient capables de détecter des applications d'ATP exogène de l'ordre de quelques dizaines de nanomolaires. Pour être utilisés dans un système plus intégré, ces biosenseurs doivent être en capacité de détecter une libération d'ATP endogène. Afin de démontrer la capacité de ces biosenseurs à détecter cette libération d'ATP, des chocs hypotoniques ont été appliqués. En effet, l'application d'un choc hypotonique, va entraîner un gonflement cellulaire rapide via une entrée d'eau par les aquaporines. Quelques minutes plus tard, l'activation de divers mécanismes actifs vont conduire à des échanges d'ions et permettre *in fine* le retour à un volume cellulaire initial. On sait depuis longtemps que les mécanismes de gonflement (swelling) et l'étape de retour à un volume cellulaire initial (Regulatory Volume Decrease : RVD) conduisent à une libération d'ATP dans le milieu extracellulaire (Figure 46)<sup>355</sup>. L'objectif ici est donc de montrer la capacité de nos biosenseurs à sentir cette libération endogène d'ATP. Pour ce faire, des chocs hypotoniques ont été appliqués sur différentes lignées cellulaires exprimant nos biosenseurs PNG et PPG.



**Figure 46 : Preuve de concept *in vitro* : détection d'une libération d'ATP endogène par les biosenseurs PNG et PPG suite à des changements osmotiques**

Suite à l'application d'un choc hypotonique, les cellules vont rapidement gonflées via une entrée d'eau par les aquaporines. Quelques minutes plus tard, l'activation de divers mécanismes actifs vont conduire à des échanges d'ions et permettre *in fine* le retour à un volume cellulaire initial. Les mécanismes de gonflement (swelling) et l'étape de retour à un volume cellulaire initial (Regulatory Volume Decrease : RVD) conduisent à une libération d'ATP dans le milieu extracellulaire. L'objectif est de montrer la capacité de nos biosenseurs à sentir une libération endogène d'ATP. Pour ce faire, des chocs hypotoniques ont été appliqués sur différentes lignées cellulaires exprimant nos biosenseurs PNG et PPG.

### III.2.1. Détection de la libération endogène d'ATP après un choc hypotonique appliqué sur cellules HEK

#### III.2.1.1. Détection de l'ATP

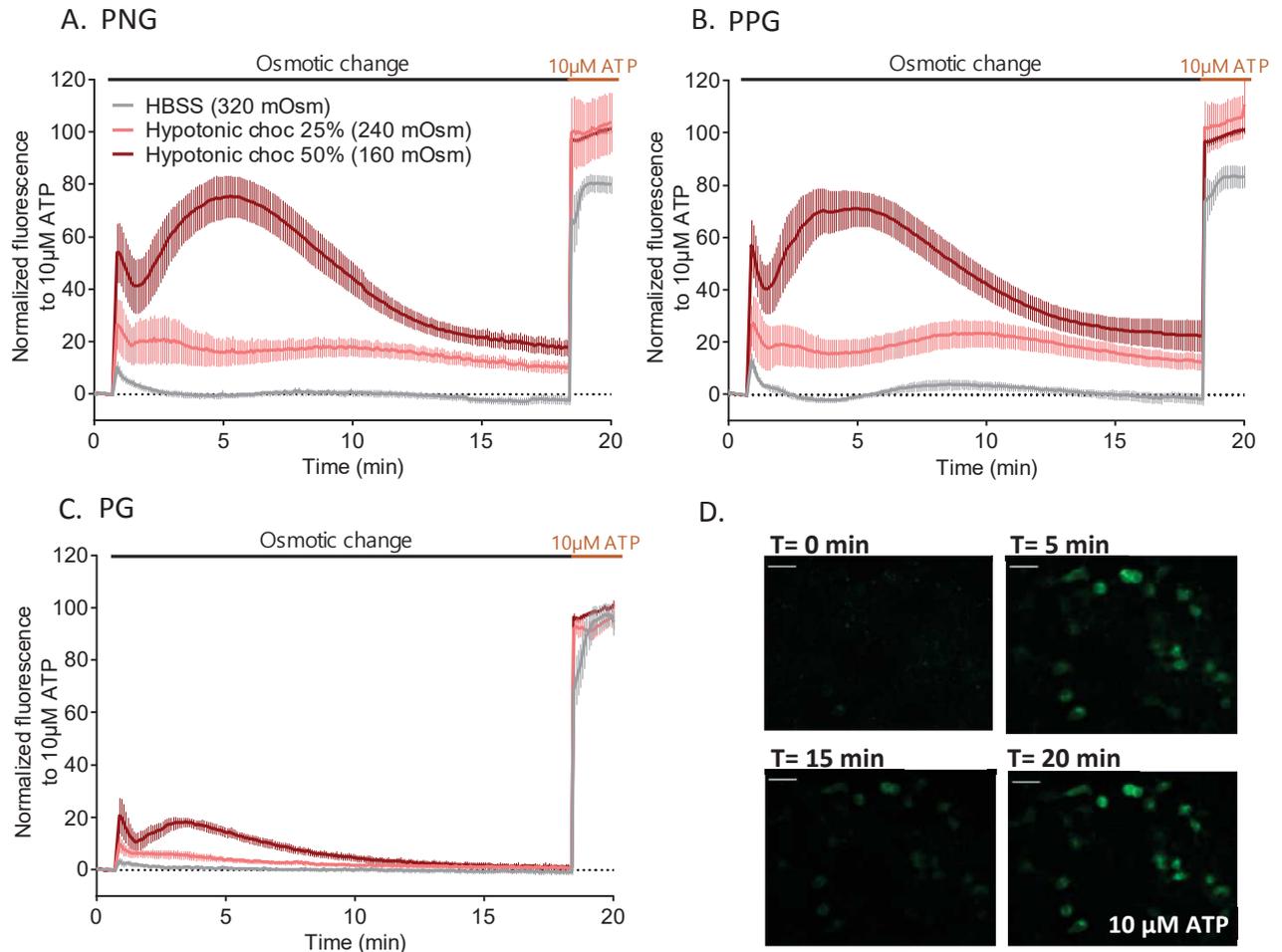
Les cellules HEK ont été transfectées avec l'outil PG ou les biosenseurs PNG ou PPG. Les cellules sont maintenues dans un milieu HBSS classique dont l'osmolarité est d'environ 320 mOsm. Des milieux hypotoniques ont été ajoutés pour atteindre une osmolarité finale de 240 mOsm ou de 160 mOsm (correspondant à des chocs hypo-osmotiques de 25 et 50 % respectivement). La fluorescence a été enregistrée pendant 20 minutes avant et durant le choc hypotonique. Une stimulation finale avec 10  $\mu$ M d'ATP a permis de normaliser les résultats par cette dose saturante d'ATP et d'estimer, en pourcentage, la réponse maximale induite par le choc hypotonique appliqué.

Sur des cellules exprimant le senseur PNG, une stimulation iso-osmotique n'entraîne pas d'augmentation de la fluorescence, alors qu'un choc hypotonique à 240 mOsm entraîne une faible augmentation de la fluorescence au cours du temps de  $18,1 \pm 1,8$  % de la réponse maximale (Figure 47A). Cette réponse est caractérisée par un premier pic de fluorescence rapide puis un plateau de 2 à 3 minutes post-stimulation. La fluorescence diminue légèrement puis montre une nouvelle légère augmentation autour de 10 minutes avant de diminuer définitivement au cours du temps. Un choc hypo-osmotique à 160 mOsm, quant à lui, entraîne une forte augmentation de la fluorescence au cours du temps. On retrouve un premier pic de fluorescence suivi cette fois-ci d'un deuxième pic large de fluorescence ( $78 \pm 8,1$  % de la réponse maximale) atteignant un maximum entre 4 et 5 minutes post-stimulation puis diminuant lentement au cours du temps. Comme attendu, les cellules exprimant le senseur PPG montrent des variations de fluorescence semblable ( $21,6 \pm 4,1$  % suite à un choc à 240 mOsm et  $76 \pm 6,7$  % suite à un choc à 160 mOsm) (Figure 47B). De façon intéressante, les cellules HEK exprimant l'outil PG, moins sensible à l'ATP, ont une plus faible capacité à détecter l'ATP extracellulaire (Figure 47C). En effet, l'application d'un choc hypotonique de 25 % (240 mOsm) n'entraîne qu'une infime réponse fluorescente (inférieure à 5 % de la réponse maximale) et un choc hypotonique de 50 % (160 mOsm) entraîne une faible réponse fluorescente de  $18,1 \pm 1,8$  % de la réponse maximale. Ce résultat suggère que la fluorescence observée par les biosenseurs PNG et PPG est due à une libération d'ATP endogène.

La Figure 47D illustre la fluorescence enregistrée par vidéomicroscopie à T0 (avant le choc), T5 (au pic de fluorescence), T10 (à la fin du pic de fluorescence) et T20 (stimulation ATP) pour des cellules HEK exprimant l'outil PNG. On peut clairement voir une réponse fluorescente à T5. De plus, la fluorescence observée est principalement membranaire, suggérant aussi que l'augmentation de fluorescence est bien due à une détection d'ATP extracellulaire.

Le premier pic transitoire de fluorescence observé pourrait correspondre à une libération d'ATP dépendante de la stimulation mécanique induite par l'ajout du milieu hypotonique ou bien correspondre à une libération d'ATP rapide suite au gonflement cellulaire. Le deuxième

large pic à T5 correspond probablement à une libération d'ATP dépendante de mécanismes actifs permettant la régulation du volume cellulaire.



**Figure 47 : Détection d'une libération d'ATP endogène suite à l'application de chocs osmotiques sur cellules HEK**

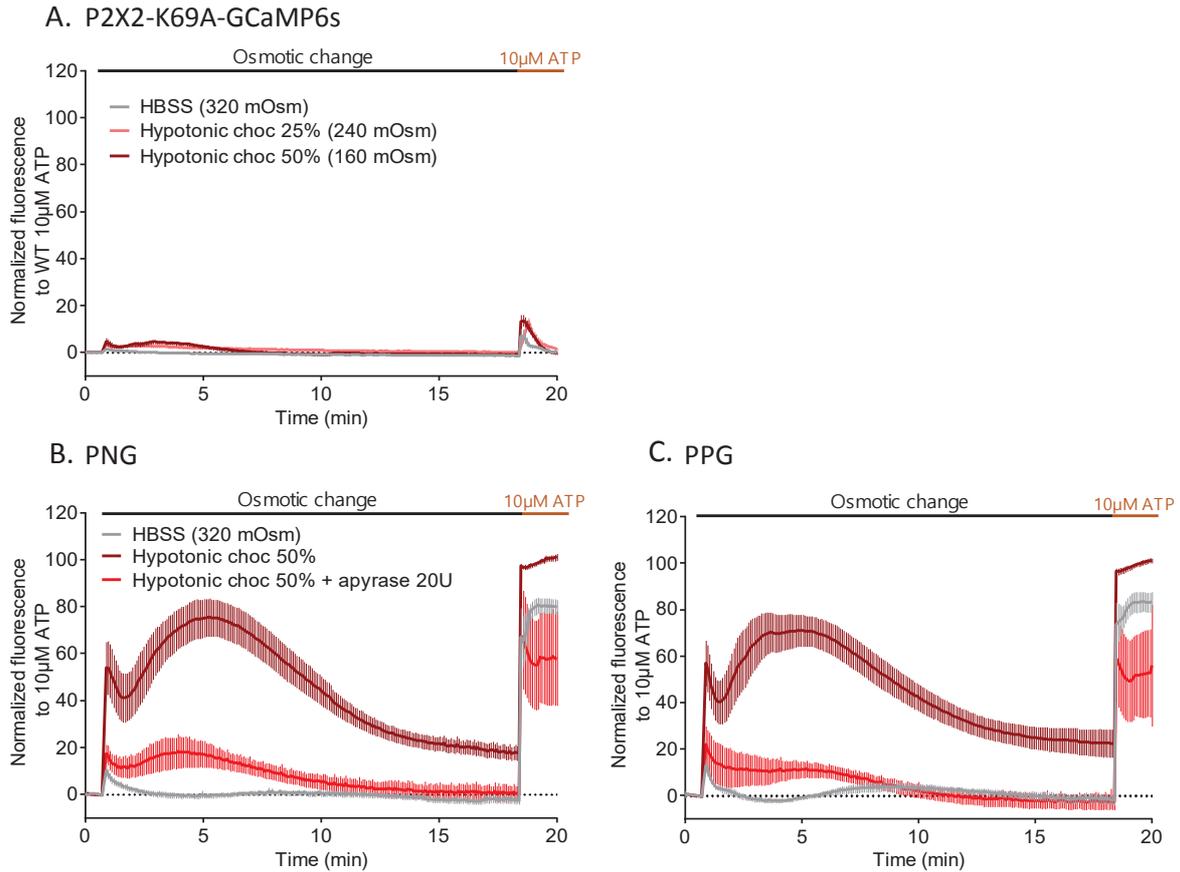
Enregistrement de la fluorescence au cours du temps (20 min) suite à l'application d'HBSS (320 mOsm) ou de milieux hypotoniques pour induire un choc hypotonique final de 25 % (240 mOsm) ou de 50 % (160 mOsm) suivi d'une stimulation finale à l'ATP 10 μM. Les courbes représentent la moyenne de 3 ou 4 transfections indépendantes. Chaque expérience est la moyenne d'un triplicat. Les données de chaque expérience sont normalisées par la réponse ATP 10 μM. Cellules HEK transfectées avec les outils PNG (A), PPG (B) ou PG (C). Acquisition de la fluorescence toutes les 7 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/540$ . (D) Images représentatives issues de films réalisés en vidéomicroscopie sur des cellules HEK exprimant l'outil PNG à T0, T5, T15 (fin du pic) et T20 (stimulation ATP).  $\lambda_{exc/em} = 485/540$ . Temps d'acquisition : 500 ms. Bar d'échelle = 20 μm.

### III.2.1.2. Spécificité et validation des biosenseurs

#### III.2.1.2.a. Spécificité de la fluorescence observée

Afin de valider que l'augmentation de fluorescence est due à une libération d'ATP endogène, deux contrôles ont été réalisés. Le premier consiste à utiliser le mutant P2X2-K69A-GCaMP6s (Figure 48A). Suite à l'application de chocs osmotiques de 25 et 50 %, aucune augmentation de fluorescence n'est détectée sur des cellules exprimant le mutant du site de liaison à l'ATP. Ce résultat montre que l'augmentation de la fluorescence est spécifiquement due à l'activation de PG et des biosenseurs. Le deuxième contrôle est l'utilisation d'apyrase, une enzyme permettant de dégrader spécifiquement l'ATP extracellulaire. Lors d'un choc osmotique à 160 mOsm, le traitement des cellules HEK par l'apyrase entraîne une forte diminution de la réponse fluorescente (Figure 48B et C). Ce résultat confirme que le signal fluorescent est dû à la libération d'ATP extracellulaire en réponse à la diminution de l'osmolarité. Le faible signal fluorescent résiduel est probablement dû à l'incapacité de l'apyrase à dégrader tout l'ATP avec une cinétique suffisamment rapide.

Ces deux contrôles montrent donc que l'augmentation de fluorescence observée est due à l'activation de nos biosenseurs par une libération d'ATP endogène.

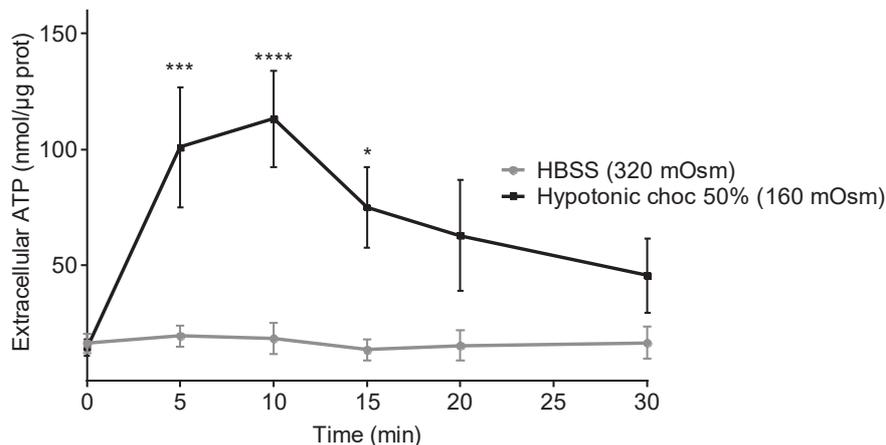


**Figure 48 : Spécificité de la fluorescence observée suite à un choc osmotique à 160 mOsm**

(A) Enregistrement de la fluorescence au cours du temps (20 min) suite à l'application d'HBSS (320 mOsm) ou de milieux hypotoniques pour induire une diminution de 25 % (240 mOsm) ou de 50 % de l'osmolarité (160 mOsm), suivie d'une stimulation finale à l'ATP 10 µM sur des cellules HEK exprimant P2X2-K69A-GCaMP6s. (B) et (C) Enregistrement de la fluorescence au cours du temps (20 minutes) suite à l'application d'HBSS (320 mOsm) ou de milieux 160 mOsm (50 %) avec ou sans apyrase pour les outils PNG (B) et PPG (C). Les courbes représentent la moyenne de 3 ou 4 transfections indépendantes. Chaque expérience est la moyenne d'un triplicat. Les données de chaque expérience sont normalisées à la réponse ATP 10 µM. Acquisition de la fluorescence toutes les 7 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/540$ .

### III.2.1.2.b. Validation par dosage de l'ATP par la méthode luciférine/luciférase

Afin de s'assurer qu'un choc hypotonique de 160 mOsm (50 %) induit une libération d'ATP indépendamment de l'expression de nos biosenseurs, une cinétique de la libération d'ATP a été réalisée grâce à la méthode bioluminescente classique basée sur l'utilisation du couple luciférine/luciférase (figure 49). Un premier point est dosé à T0 avant la stimulation, puis un dosage toutes les cinq minutes est réalisé. La libération d'ATP au cours du temps suit clairement les mêmes tendances que celles mesurées avec nos biosenseurs. L'analyse statistique met en évidence une augmentation significative de la libération d'ATP à 5, 10 et 15 minutes post-choc hypotonique. Néanmoins pour des raisons techniques (le milieu doit être récupéré puis l'ATP dosée), la mesure de la libération par ces méthodes est beaucoup moins précise et plus variable. Cette expérience montre aussi l'intérêt des biosenseurs dans leur capacité à détecter la libération d'ATP en temps réel avec une cinétique précise et une faible variabilité. Enfin, ce résultat écarte la possibilité que le capteur induise par lui-même une libération d'ATP.



**Figure 49 : Validation de la détection de l'ATP par nos biosenseurs grâce à une détection de l'ATP extracellulaire par les méthodes de bioluminescence classiques basées sur la luciférine/luciférase.**

Dosage de l'ATP par bioluminescence suite à l'application d'HBSS (320 mOsm) ou d'un milieu hypotonique (160 mOsm) sur des cellules HEK non transfectées. Une mesure est réalisée toutes les 5 minutes sur des plaques indépendantes. Chaque point est une moyenne de 7 expériences. Acquisition de la bioluminescence grâce à un lecteur de plaques. ANOVA two way ; Interaction : p-value : 0,0137, Temps : p-value : 0,073; Traitement : p-value : 0,0001. Test de comparaisons multiples : T5 : p-value : 0,0006, T10 : p-value 0,0001, T15 : p-value : 0,0290.

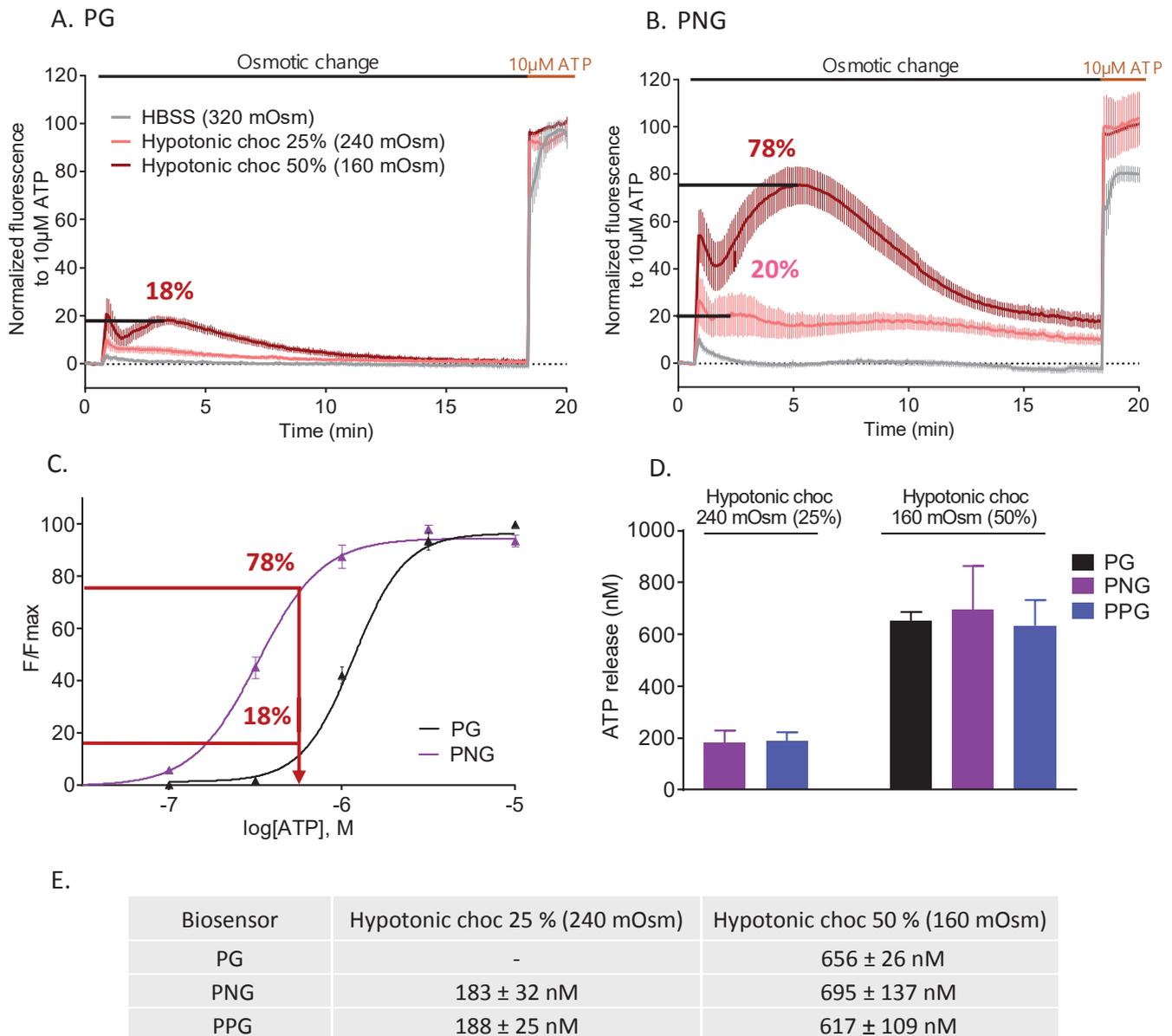
### III.2.1.3. PNG et PPG, des outils semi-quantitatifs

Dans un système où la réponse des biosenseurs a été préalablement calibrée par des courbes dose-réponse, ces outils peuvent être utilisés pour estimer la quantité d'ATP libérée. Dans notre cas, les réponses maximales ont été mesurées suite à la normalisation des données par une réponse d'ATP saturante (10  $\mu$ M) (Figure 50A et B). En rapportant la fluorescence maximale induite par chaque choc osmotique sur les courbes dose-réponse correspondantes à chaque senseur (Figure 50C), la quantité précise d'ATP libérée à la membrane peut être calculée grâce aux équations des courbes dose-réponse.

La quantité d'ATP libérée mesurée par l'outil PG suite à un choc osmotique de 25 % n'est pas calculée car la réponse est inférieure à 5 %. La quantité d'ATP libérée mesurée par les deux biosenseurs suite à un choc osmotique de 25 % est de  $183 \pm 32$  et  $188 \pm 25$  nM pour PNG et PPG, respectivement. Suite à un choc osmotique de 50 %, la réponse maximale de l'outil PG (18 %) correspond à une libération d'ATP de  $656 \pm 26$  nM. De façon intéressante, les réponses maximales des biosenseurs PNG (75 %) et PPG (70 %) correspondent à des libérations d'ATP très proches, de  $695 \pm 137$  et  $617 \pm 109$  nM, respectivement (Figure 50D et E).

Les résultats obtenus par les différents senseurs suite à un choc hypotonique de 25 et 50 % sont très proches. Cela permet de valider leur capacité à déterminer de façon précise la quantité d'ATP libérée. Avec une erreur standard de quelques dizaines de nM, la quantité d'ATP libérée suite à un choc osmotique de 25 % est donc de l'ordre de 180 nM, ce qui est suffisant pour induire l'activation de certains récepteurs P2Y. La quantité d'ATP libérée suite à un choc hypotonique de 50 % entraîne quant à elle une libération d'ATP entre 600 et 700 nM, suffisante pour activer certains récepteurs P2Y et même certains récepteurs P2X (P2X1, P2X3 et P2X4). Ce résultat apporte également une estimation de la quantité d'ATP présente au niveau de la membrane en condition contrôle, qui serait de l'ordre de la dizaine de nM.

Théoriquement ces deux biosenseurs de l'ATP sont capables de détecter des gammes d'ATP de 10 à 1000 nM. Expérimentalement nous montrons ici leurs capacités à détecter des libérations endogènes entre 100 et 800 nM. Ces valeurs correspondent aux gammes d'activation de certains récepteurs P2Y, ce qui en fait un outil puissant pour étudier la libération d'ATP dans ce contexte.



**Figure 50 : PPG et PNG, des biosenseurs d'ATP sensibles et semi-quantitatifs. Quantification de la libération d'ATP suite à des chocs osmotiques sur cellules HEK**

Estimation de la fluorescence maximale moyenne atteinte suite aux différents chocs osmotiques appliqués sur des cellules exprimant les outils PG (A) ou PNG (B). (C) Report de ces réponses maximales sur les courbes dose-réponse correspondantes pour calculer la quantité d'ATP libérée dans chaque condition. Pour chaque expérience, la quantité d'ATP libérée est calculée grâce à l'équation théorique du lissage de la courbe dose-réponse :  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope}))}$ . Les moyennes et les écarts types sont représentés en (D) et dans un tableau (E). Les chocs à 25 % représentent 3 expériences indépendantes, les chocs à 50 % représentent 6 et 3 expériences indépendantes pour PPG et PNG, respectivement.

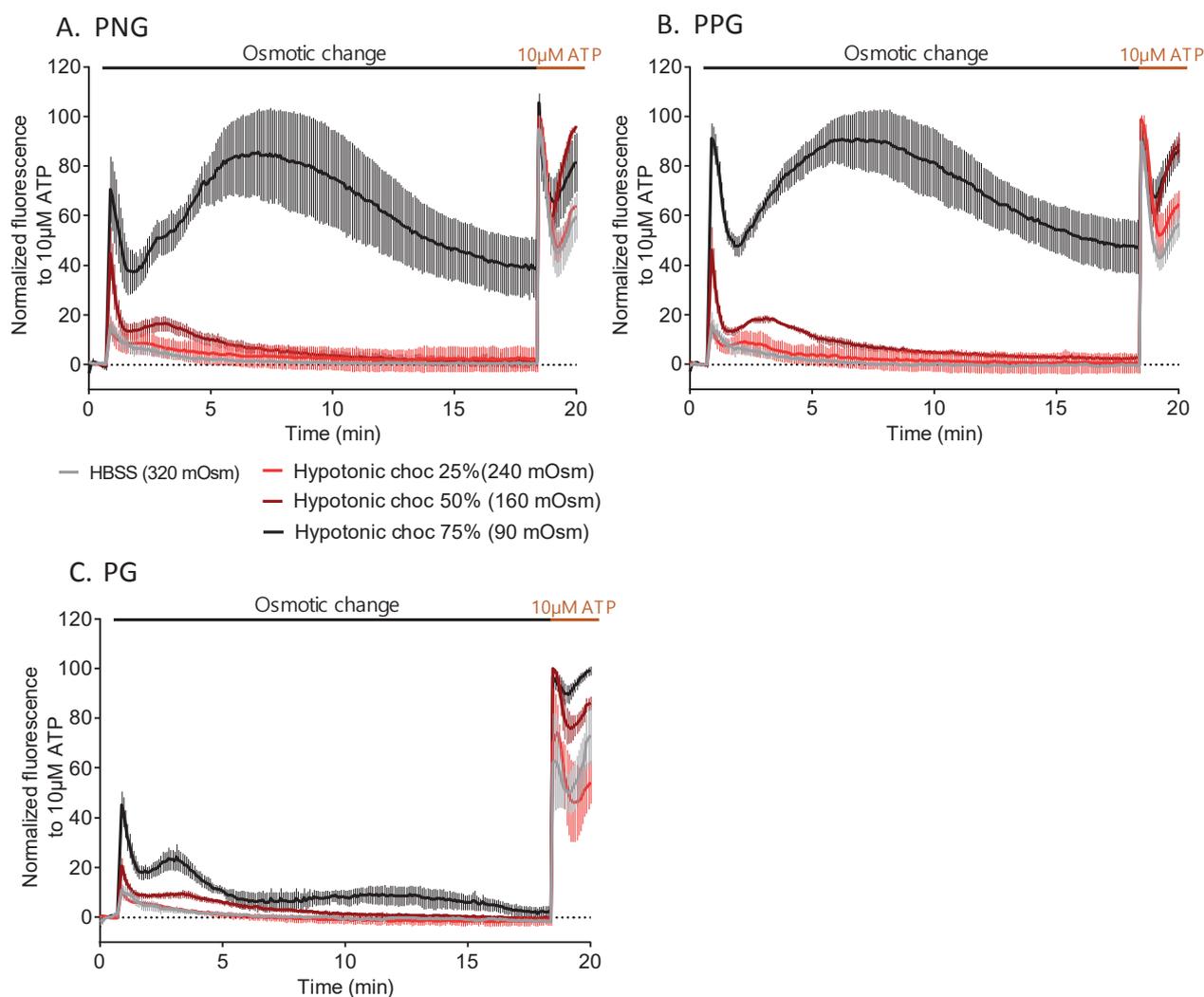
### III.2.2. Détection de la libération endogène d'ATP après un choc osmotique sur cellules astrocytaires 1321N1

#### III.2.2.1. Détection de la libération d'ATP après différents chocs osmotiques

Afin de valider les résultats obtenus sur des cellules HEK transfectées, les mêmes expériences ont été réalisées sur une lignée astrocytaire 1321N1 exprimant de façon stable nos biosenseurs.

Sur les cellules 1321N1 exprimant le senseur PNG (Figure 51A), une stimulation iso-osmotique et un choc hypotonique à 240 mOsm n'entraînent pas d'augmentation de la fluorescence. Un choc hypotonique à 160 mOsm entraîne une faible augmentation de la fluorescence ( $16,4 \pm 3$  % de la réponse maximale). Cette réponse est caractérisée par un pic initial de fluorescence assez fort suivi d'un plateau de 16 % de la réponse induite par 10  $\mu$ M d'ATP, de quelques minutes, avant de diminuer rapidement. Un choc hypotonique plus fort de 90 mOsm a donc été appliqué (soit un choc hypotonique de 75 %). Dans ce cas, une forte augmentation de la fluorescence au cours du temps est détectée. On retrouve le pic initial de fluorescence suivi d'une large augmentation de la fluorescence ( $84,7 \pm 17$  % de la réponse maximale) atteignant un plateau entre 5 et 7 minutes post-stimulation puis une lente diminution au cours du temps. Comme attendu, les cellules exprimant le senseur PPG montrent des réponses fluorescentes similaires suite à des chocs hypotoniques à 160 et 90 mOsm ( $18,1 \pm 1,3$  % et  $89 \pm 13$  % de la réponse maximale respectivement) (Figure 51B). Les cellules exprimant l'outil P2X2-GCaMP6s, moins sensible à l'ATP, ne montrent pas de réponses fluorescentes suite à des chocs hypotoniques de 240 et 160 mOsm et une faible réponse fluorescente ( $24,1 \pm 5,1$  % de la réponse de la réponse maximale) suite à une stimulation à 90 mOsm (Figure 51C).

De la même façon que pour les cellules HEK, les deux pics de fluorescences observés sur les cellules 1321N1 suite à un choc osmotique correspondent probablement à des phénomènes de libération d'ATP distincts. Cependant, pour des chocs hypotoniques à 160 mOsm, la libération d'ATP observée correspond à celle induite par un choc à 240 mOsm sur les cellules HEK. Les raisons de cette différence entre les deux lignées n'ont pas été investiguées. Soit les cellules 1321N1 sont plus résistantes aux chocs hypotoniques (propriétés mécaniques des membranes, expression des aquaporines...) et donc libèrent moins d'ATP pour un choc osmotique donnée, soit les récepteurs P2Y sont impliqués dans la libération d'ATP dans les cellules HEK, éventuellement par un mécanisme d'« ATP-induced ATP release ». L'utilisation d'antagoniste des récepteurs P2Y aurait pu aider à répondre à cette question.

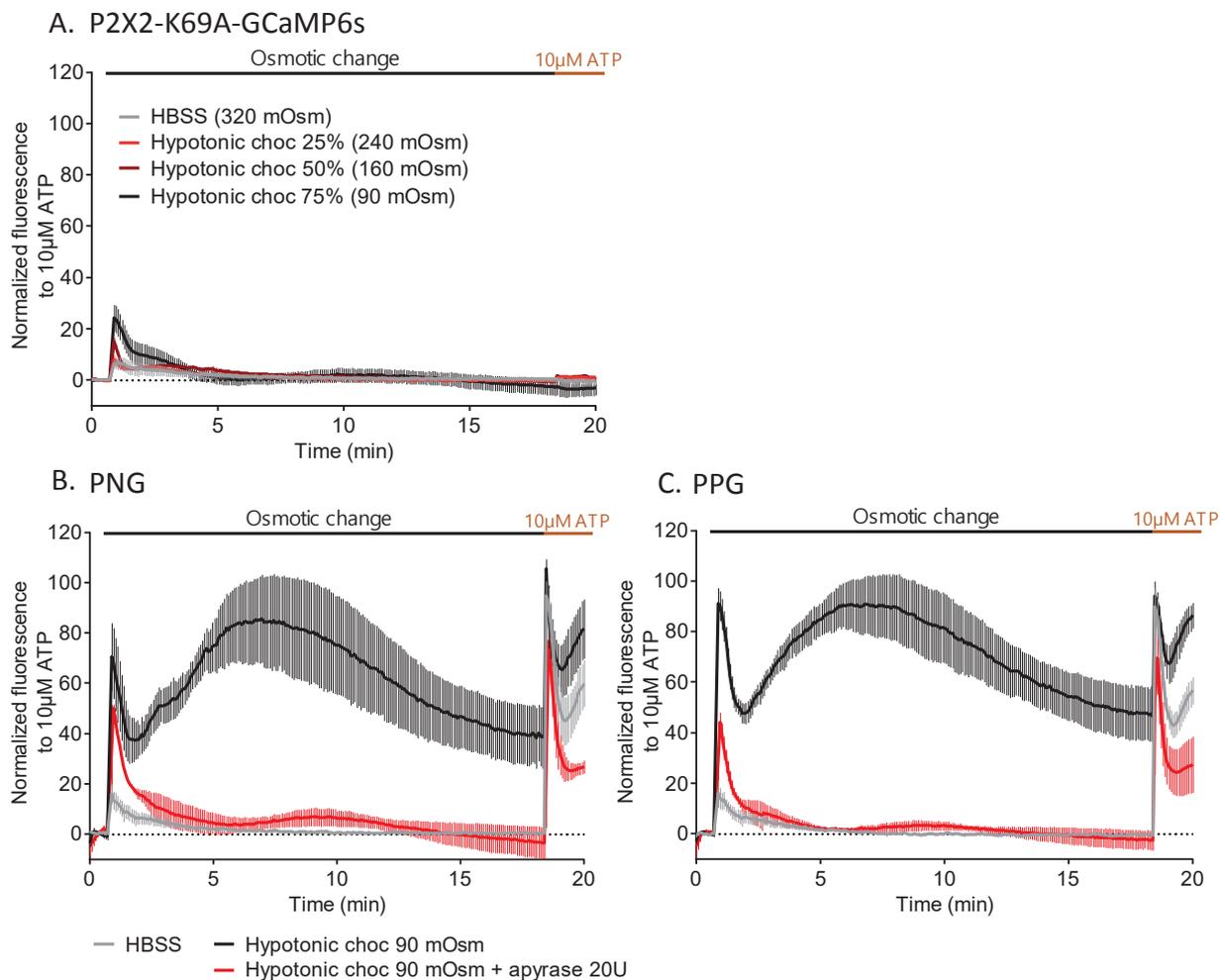


**Figure 51 : Détection d'une libération d'ATP endogène suite à l'application de chocs osmotiques sur lignée astrocytaire 1321N1**

Enregistrement de la fluorescence au cours du temps (20 min) suite à l'application d'HBSS (320 mOsm) ou de milieux hypotoniques pour induire un choc hypotonique finale de 25 % (240 mOsm), de 50 % (160 mOsm) ou de 75 % (90 mOsm) suivi d'une stimulation finale à l'ATP 10  $\mu$ M. Les courbes représentent la moyenne de 3 ou 4 expériences indépendantes, en triplicat. Les données de chaque expérience sont normalisées par la réponse ATP 10  $\mu$ M suite à un choc hypotonique de 90 mOsm (75 %). Cellules 1321N1 transduites avec les outils PNG (A), PPG (B) ou PG (C). Acquisition de la fluorescence toutes les 7 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/540$ .

### III.2.2.2. Spécificité de la fluorescence observée

De même que pour les cellules HEK, des contrôles de spécificité ont été réalisés. L'utilisation de l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s montre que l'application de chocs hypotoniques à 25 et 50 % n'induit pas de réponse fluorescente non spécifique (Figure 52A). A 75 %, un faible pic transitoire de fluorescence est observé, probablement dû à une entrée de calcium via d'autres canaux activés par le gonflement cellulaire. Ce pic est néanmoins très inférieur aux signaux observés pour nos senseurs. Le traitement à l'apyrase des cellules exprimant les biosenseurs PNG et PPG lors d'un choc hypotonique de 90 mOsm, entraîne une diminution partielle du 1<sup>er</sup> pic de fluorescence et une diminution totale du 2<sup>ème</sup> pic de fluorescence (Figure 52B et C). Ces résultats confirment donc que les chocs osmotiques induisent, comme dans les cellules HEK, une libération d'ATP par les cellules 1321N1.



**Figure 52 : Spécificité de la fluorescence observée suite à un choc osmotique à 90 mOsm**

(A) Enregistrement de la fluorescence sur 20 min suite à l'application d'HBSS (320 mOsm) ou de milieux hypotoniques de 240, 160 et 90 mOsm suivi d'une stimulation d'ATP 10 µM sur des cellules 1321N1 exprimant P2X2-K69A-GCaMP6s. (B) et (C) Enregistrement de la fluorescence sur 20 min suite à l'application d'HBSS (320 mOsm) ou de milieu 90 mOsm (75 %) avec ou sans apyrase pour les outils PNG (B) et PPG (C). Les données sans apyrase sont les mêmes que celles présentées en figure 50. Acquisition de la fluorescence toutes les 7 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/540$ .

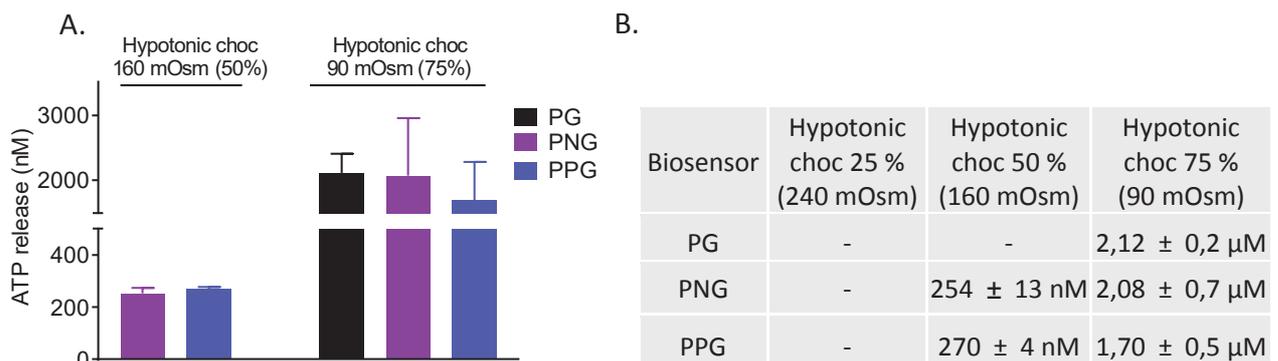
### III.2.2.3. Quantification de l'ATP libérée par les cellules 1321N1

La quantité d'ATP libérée mesurée avec l'outil PG suite à un choc osmotique de 50 % n'est pas calculé car la réponse est inférieure à 5 %. La quantité d'ATP libérée suite à un choc osmotique de 50 % est estimée à  $254 \pm 13$  et  $270 \pm 4$  nM mesurée avec les outils PNG et PPG, respectivement (Figure 53A et B).

Suite à un choc osmotique de 75 %, la réponse maximale mesurée avec l'outil PG ( $24,1$  %) correspond à une libération d'ATP de  $2,12 \pm 0,2$   $\mu$ M. Les réponses maximales des biosenseurs PNG ( $84,7$  %) et PPG ( $89$  %) correspondent à des libérations d'ATP de  $2,08 \pm 0,7$  et  $1,7 \pm 0,5$   $\mu$ M respectivement (figure 53A et B).

Les résultats obtenus par les senseurs PNG et PPG suite à un choc hypotonique à 50 % sont très proches. Cela résultat confirme leur capacité à déterminer de façon précise la quantité d'ATP libérée. Avec une erreur standard de quelques nM, la quantité d'ATP libérée suite à un choc osmotique de 50 % est donc de l'ordre de 260 nM. Ce résultat montre aussi que dans les mêmes conditions hypotoniques, les cellules astrocytaires 1321N1 libèrent près de trois fois moins d'ATP que les cellules HEK, illustrant les spécificités de chaque type cellulaire quant à la libération d'ATP en réponse à une variation de l'osmolarité.

La quantité d'ATP libérée suite à un choc hypotonique de 75 % entraine une libération d'ATP autour de 2  $\mu$ M. La quantification réalisée grâce à nos deux biosenseurs cache de grandes disparités. En effet, dans certaines expériences, la réponse fluorescente atteint la réponse maximale possible (environ 1.5  $\mu$ M, cf. courbe dose réponse des 1321N1), conduisant à une saturation du signal et donc potentiellement à une sous-estimation de la quantité d'ATP libérée. Bien que les biosenseurs PNG et PPG soient performants pour détecter une libération d'ATP comprise entre 0,1 et 1  $\mu$ M, le senseur PG, moins sensible, est plus adapté dans ce cas.



**Figure 53 : Quantification de la libération d'ATP suite à des chocs osmotiques sur cellules astrocytaires 1321N1**

Calcul de la quantité d'ATP libérée dans chaque condition en rapportant la réponse fluorescente maximale d'un choc hypotonique donnée sur les courbes dose-réponse du senseur considéré. Pour chaque expérience, la quantité d'ATP libérée est calculée grâce à l'équation théorique du lissage de la courbe dose-réponse :  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{Hillslope}))}$ . Les moyennes et les écarts types sont représentés en graphe (A) et dans un tableau (B).  $n = 4$  pour les chocs 50 %,  $n = 3$  pour les chocs 75 %.

## ***IV. Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la libération d'ATP dans un contexte de gonflement cellulaire suite à des changements osmotiques.***

### **IV.1. Mécanismes moléculaires impliqués dans la libération d'ATP sur des cellules HEK**

Comme décrit dans l'introduction, plusieurs mécanismes peuvent être responsables de la libération d'ATP. Parmi eux, différents canaux ont été décrits comme pouvant être perméables à l'ATP. Dans le contexte d'un changement de volume cellulaire suite à un choc hypotonique, quelques études mettent en évidence un rôle potentiel des pannexines ainsi que des canaux MACs<sup>415</sup>, bien que ces résultats restent débattus et doivent certainement dépendre du type cellulaire étudié. Certaines études suggèrent que les canaux LRRC8, récemment identifiés, pourraient être perméables à l'ATP<sup>350</sup>, bien que ce phénomène n'ait été décrit dans aucun contexte physiologique. On sait cependant que ces canaux sont activés durant un choc hypotonique et sont nécessaires à la phase de RVD conduisant au retour au volume cellulaire initial<sup>337</sup>. Dans ce contexte, l'objectif de cette troisième partie a été d'explorer la perméabilité à l'ATP des canaux LRRC8, grâce à l'utilisation du biosenseur PNG. Pour cela, différentes approches pharmacologiques et génétiques ont été utilisées.

#### **IV.1.1. Approches pharmacologiques**

##### **IV.1.1.1. Implication des Pannexines/Connexines et du canal LRRC8A**

Les expériences suivantes ont été effectuées dans les cellules HEK. La fluorescence est mesurée chaque minute pendant 70 minutes grâce à un lecteur de plaques. A 10 minutes, un choc hypotonique de 160 mOsm (50 %) est appliqué. Les différentes drogues sont appliquées en même temps que la solution hypotonique. A 60 minutes, une application d'ATP (10  $\mu$ M finale) a permis de normaliser les données. Les quantifications sont effectuées par mesure de l'aire sous la courbe entre 10 et 40 minutes. Deux inhibiteurs, la carbenoxolone (CBX) et le DCPIB ont été testés. La CBX est un inhibiteur non sélectif des hémi-canaux tels que les pannexines et les connexines. Cette drogue est généralement utilisée à une concentration de 50  $\mu$ M. Le DCPIB est décrit comme un inhibiteur sélectif des canaux LRRC8A permettant l'inhibition totale des courants dès 20  $\mu$ M<sup>416,417</sup>.

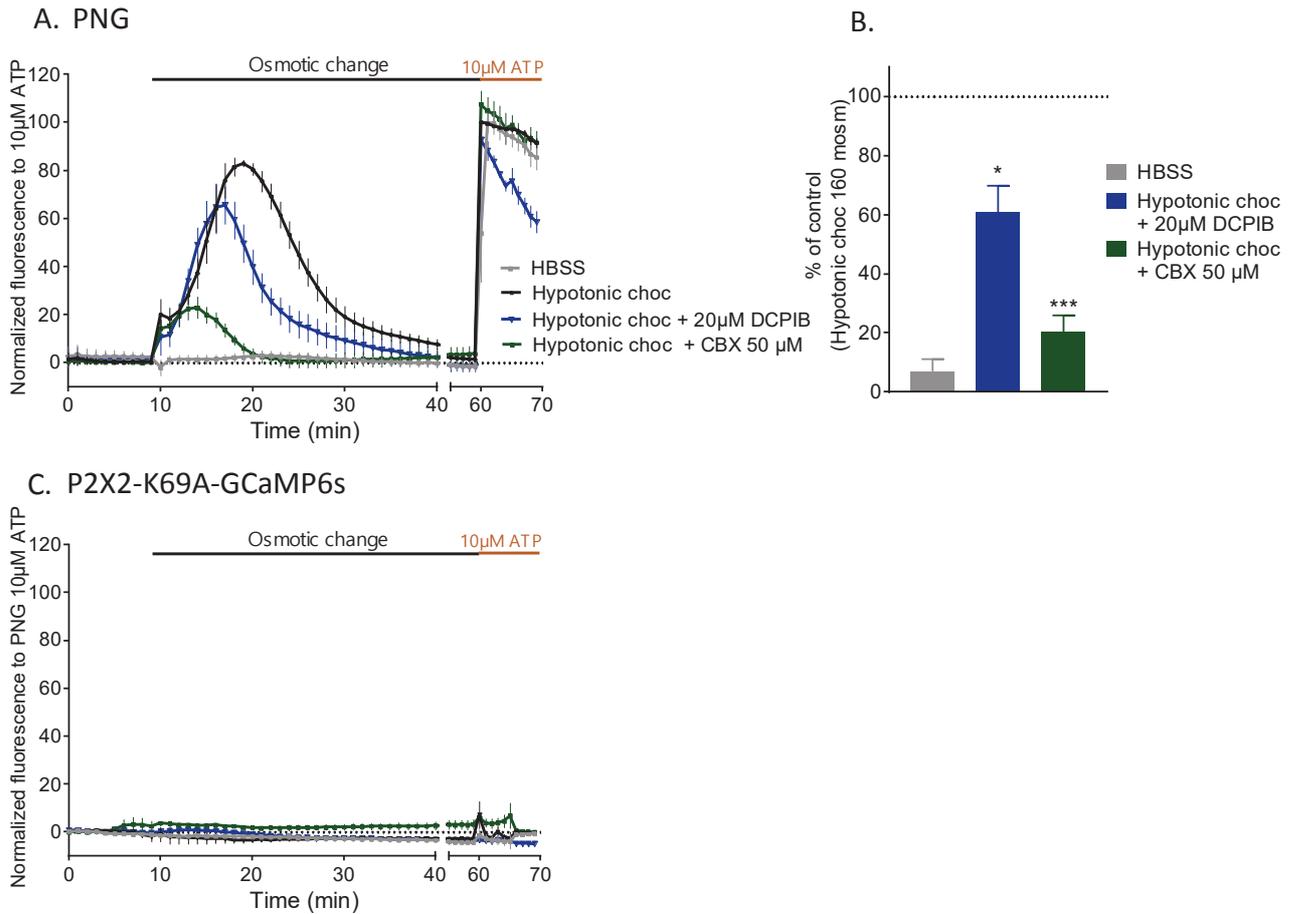
Comme décrit précédemment, l'application d'un choc osmotique entraîne une libération d'ATP au cours du temps. La libération augmente les dix premières minutes post-stimulation, atteint un pic à 10 minutes ( $81,5 \pm 4$  % de la réponse maximale) puis diminue lentement au cours de temps (courbe noire, figure 54A). L'application de DCPIB (20  $\mu$ M) lors du choc osmotique entraîne une diminution de la libération d'ATP (courbe bleue). En effet, la libération d'ATP atteint un pic de  $65,5 \pm 7,8$  % de la réponse 10  $\mu$ M d'ATP, 7 minutes après le choc hypotonique. La quantification de la libération d'ATP au cours du temps (aire sous la

courbe) montre que le traitement DCPIB (Figure 54B) induit une diminution significative de la libération d'ATP estimée à 40 % par rapport à la condition contrôle. Ces résultats suggèrent donc une implication des canaux LRRC8 dans la libération d'ATP lors du choc hypotonique.

L'application de CBX entraîne quant à elle une forte diminution de la libération d'ATP (courbe verte). Dans ce cas, la libération d'ATP atteint un pic de  $22,9 \pm 4,6$  % de la réponse ATP 10  $\mu$ M, 5 minutes après le choc hypotonique, puis diminue rapidement au cours du temps (Figure 54A). La quantification de l'aire sous la courbe indique une inhibition significative de la libération d'ATP de l'ordre de 80 % (figure 54B). Ce résultat suggère donc une implication des pannexines et/ou connexines dans la libération d'ATP lors du choc hypotonique à 160 mOsm.

Il est clairement reconnu que La CBX n'est pas un inhibiteur sélectif et une étude récente montre qu'elle peut aussi inhiber les canaux LRRC8<sup>350</sup>. Ceci implique que les hémicanaux et les canaux LRRC8, contribueraient chacun à environ 40 % de la libération d'ATP induite par le choc osmotique. La libération d'ATP résiduelle (environ 20 %) pourrait être due à d'autres mécanismes tels que l'activation d'autres canaux ou une libération par exocytose.

Le mutant P2X2-K69A-GCaMP6s a été utilisé dans les mêmes conditions pour s'assurer que le choc hypotonique et les inhibiteurs n'entraînent pas, par eux-mêmes, une réponse non spécifique ou une libération d'ATP. Dans ces conditions, aucun signal fluorescent n'est détecté (figure 54C).

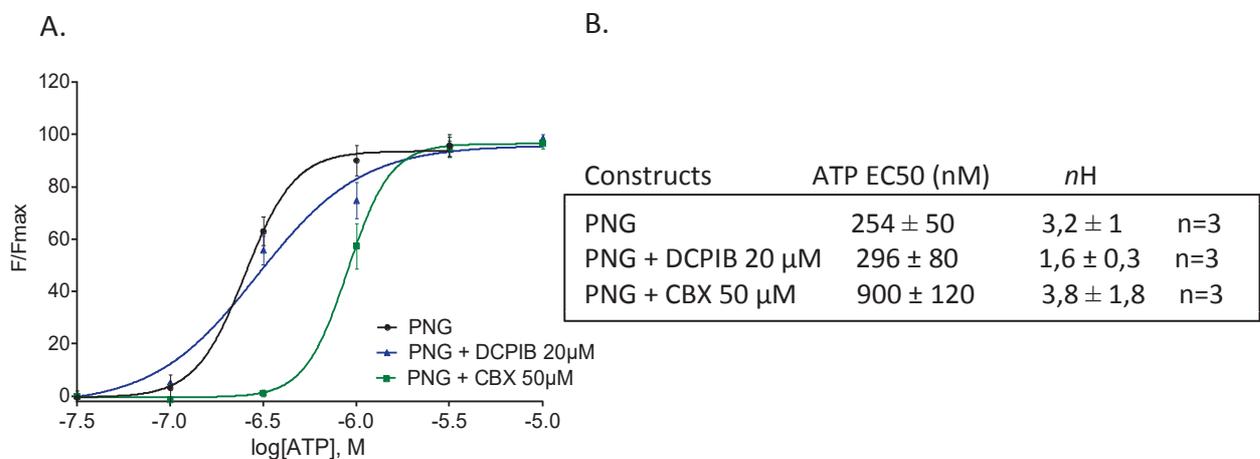


**Figure 54 : Implication des connexines/pannexines et du canal LRRC8A dans la libération d'ATP par les cellules HEK suite à un choc hypotonique de 50 % (160 mOsm)**

(A) Enregistrement de la fluorescence au cours du temps suite à l'application d'HBSS (320 mOsm) ou d'une solution hypotonique de 50 % (160 mOsm) en condition contrôle (courbe noire), en présence de 20  $\mu$ M DCPIB (courbe bleue) ou 50  $\mu$ M CBX (courbe verte); application finale d'ATP 10  $\mu$ M sur des cellules HEK exprimant le biosenseur PNG. Les données de chaque expérience sont normalisées par la réponse à l'ATP 10  $\mu$ M suite à un choc hypotonique de 160 mOsm (50 %). (B) Quantification (aire sous la courbe) de l'effet des traitements ; normalisation par rapport à la réponse 160 mOsm sans traitement. ANOVA 1 way : p-value  $\leq$  0,0001. Test de comparaisons multiples : Hypotonic choc vs Hypotonic choc + DCPIB 20  $\mu$ M : p-value = 0,0294, Hypotonic choc vs Hypotonic choc + CBX 50  $\mu$ M : p-value = 0,0001. (C) Même expérience sur des cellules HEK exprimant l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s. n = 4 transfections indépendantes en triplicat. Acquisition de la fluorescence toutes les minutes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em}$  = 485/540.

#### IV.1.1.2. Effet des drogues sur le senseur PNG

Le senseur PNG utilisé est un récepteur P2X2 muté. Il peut donc théoriquement être sensible à certaines drogues non spécifiques et entraîner un biais dans la mesure de la libération d'ATP. Pour tester l'effet des antagonistes sur l'activité du biosenseur, une courbe dose-réponse ATP a été réalisée en présence de CBX ou de DCPIB (Figure 55A). L'application de DCPIB ne modifie pas l'affinité apparente du senseur PNG pour l'ATP. Au contraire, l'application de la CBX entraîne une diminution significative de l'affinité apparente du senseur PNG pour l'ATP ( $EC_{50} = 900 \pm 120$  nM) (Figure 55B). Ce résultat suggère que l'effet de la CBX sur la libération d'ATP durant un choc osmotique est principalement dû à un effet non spécifique sur la sensibilité du senseur à l'ATP. Il est donc impossible de déterminer si les hemi-canaux sont impliqués ou non dans la libération d'ATP en conditions hypotoniques.



**Figure 55 : Effets des drogues CBX et DCPIB sur la sensibilité à l'ATP du senseur à l'ATP PNG**

(A) Courbes dose-réponse (aire sous la courbe) du senseur PNG en l'absence ou en présence de DCPIB 20 µM et CBX 50 µM sur cellules HEK transfectées (acquisition de la fluorescence toutes les 1,5 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/538$ ). (B) Tableau des EC50 et nH calculées par le logiciel Prism. Les EC50 obtenues en l'absence ou en présence de 50 µM CBX sont significativement différentes (test de comparaison des EC50, p-value  $\leq 0,0001$ ). Les EC50 obtenues en l'absence ou en présence de 20 µM DCPIB ne sont pas significativement différentes (test de comparaison des EC50, p-value  $\leq 0,2784$ ).

### IV.1.2. Approche génétique

Compte tenu des limites des outils pharmacologiques, une approche génétique a été utilisée pour confirmer le rôle du canal LRRC8A dans la libération d'ATP suite à un choc hypotonique. Dans les expériences suivantes, le choc hypotonique appliqué est de 50 % (160 mOsm) et le protocole mis en place est le même que celui précédemment décrit.

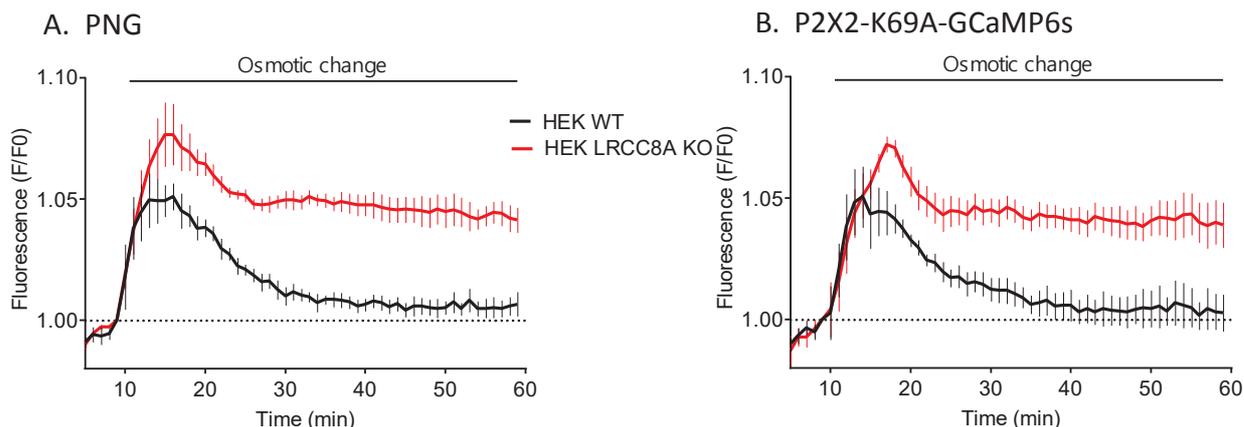
#### IV.1.2.1. Caractérisation de la lignée HEK LRRC8A KO

Une lignée HEK KO pour le gène *Irrc8a* a été utilisée. Cette lignée, ainsi que la lignée mère correspondante proviennent du laboratoire du Dr. Jentsch Thomas. Cette lignée a été générée par l'approche CrispR-cas9 ; elle correspond à une insertion de 55 nucléotides à la position T121 entraînant un décalage du cadre de lecture et une protéine tronquée non fonctionnelle<sup>336</sup>. La sous-unité LRRC8A étant indispensable pour la fonctionnalité du canal, tous les canaux LRRC8 seront non fonctionnels.

Pour s'assurer que le canal LRRC8 est non fonctionnel dans la lignée KO, la capacité des cellules à réguler leur volume suite à un choc osmotique a été analysée. En effet, la suppression du gène *Irrc8a* entraîne une incapacité des cellules à revenir à leur volume initial suite à un choc osmotique (phénomène de RVD). Pour estimer le volume cellulaire, nous avons utilisé une méthode fluorescente basée sur l'utilisation d'une calcéine fluorescente dans le vert. L'accumulation intracellulaire de cette molécule organique provoque l'auto-inhibition de sa fluorescence (phénomène de « self-quenching »). Le gonflement cellulaire induit par une baisse de l'osmolarité va entraîner une dilution de la molécule fluorescente, et donc une baisse de son auto-inhibition résultant en une augmentation de la fluorescence. Il est ainsi possible de suivre indirectement le volume cellulaire<sup>418</sup>.

Suite à un choc osmotique de 50 % (160 mOsm), les cellules HEK WT gonflent rapidement, atteignent un plateau entre 4 et 5 minutes, puis régulent lentement leur volume (RVD) pour retrouver leur volume initial 20 minutes après la stimulation (Figure 56). Dans les mêmes conditions, les cellules HEK LRRC8A KO gonflent aussi rapidement pour atteindre un plateau à 5 minutes. Ensuite, les cellules diminuent légèrement de volume pendant 10 minutes mais ne retrouvent jamais leur volume initial. La perte de capacité à réaliser le RVD confirme donc la perte de fonction des canaux LRRC8 sur la lignée HEK LRRC8A KO.

Ces expériences ont été réalisées sur des cellules HEK exprimant le senseur PNG (figure 56A) ou l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s (Figure 56B). Les changements de volume observés dans les deux cas sont similaires. Cela montre que le signal GCaMP6s n'affecte pas le signal calcéine qui est beaucoup plus fort. D'autre part, ce résultat montre que l'activité du biosenseur n'affecte pas les changements de volume induits par le choc hypotonique et valide son utilisation pour étudier de façon simultanée la libération d'ATP et les variations de volume cellulaire.



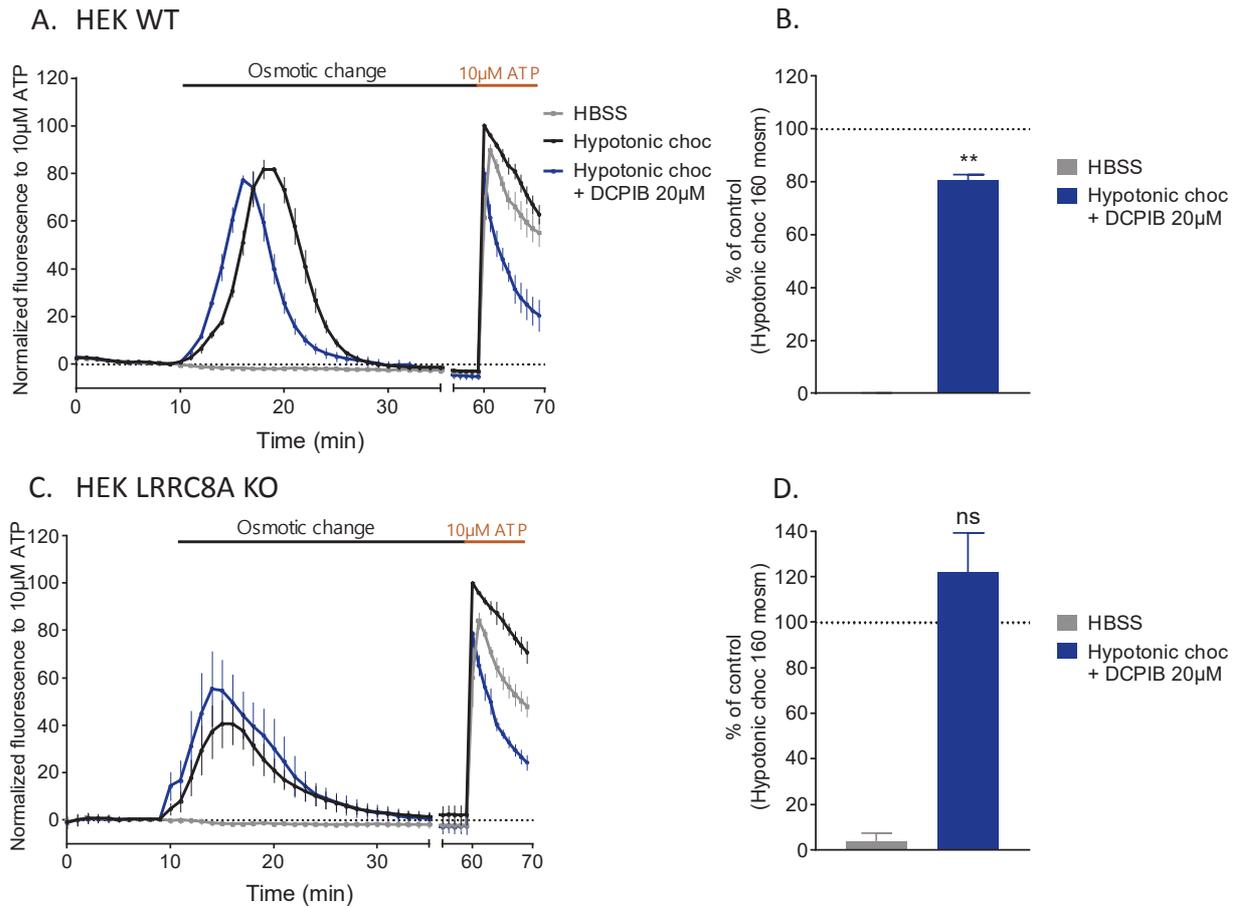
**Figure 56 : Analyse du volume cellulaire sur les lignées HEK et HEK LRCC8A KO par mesure de fluorescence de la calcéine**

Suivi du volume cellulaire au cours de temps suite à un choc osmotique de 160 mOsm sur cellules HEK pré-incubées 40 minutes avec la calcéine green-AM. A forte concentration, la fluorescence de la calcéine s'auto-inhibe (self-quenching). Lors du gonflement des cellules, l'inhibition diminue et la fluorescence augmente. La surface cellulaire est donc estimée en fonction du changement de fluorescence. Acquisition de la fluorescence toutes les minutes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/538$ .

#### IV.1.2.2. Libération d'ATP

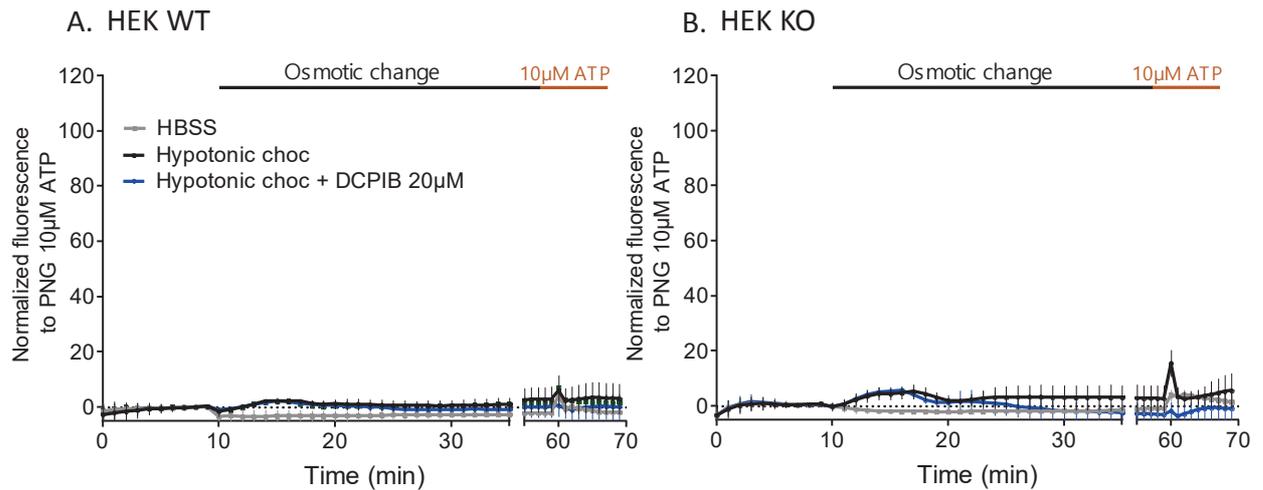
Les cellules HEK LRCC8A KO étant issues d'une lignée mère différente des cellules HEK précédemment utilisées, l'effet du DCPIB sur ces deux lignées a été ré-analysé. Sur la lignée HEK WT transfectée avec l'outil PNG, l'application du choc osmotique entraîne une augmentation de la libération d'ATP dont les caractéristiques sont similaires à celles précédemment observées. La libération augmente les dix premières minutes, atteint un pic à 10 minutes ( $82 \pm 2\%$  de la réponse 10  $\mu$ M ATP) et diminue lentement au cours de temps (courbe noire, figure 57A). Dans ce cas, l'application de DCPIB à 20  $\mu$ M lors du choc osmotique entraîne une faible diminution du pic de fluorescence ( $77\% \pm 2$ ) mais un raccourcissement dans le temps de la libération d'ATP. La quantification montre une diminution significative (environ 20%) de la libération d'ATP suite au traitement DCPIB. Pour des raisons inconnues, le traitement au DCPIB accélère légèrement la libération d'ATP (Figure 57C). Dans les cellules LRCC8A KO, la libération d'ATP n'est pas significativement modifiée par le traitement au DCPIB (Figure 57C et D), indiquant la spécificité du DCPIB pour le canal LRRC8.

Enfin, l'utilisation du mutant P2X2-K69A-GCaMP6S (Figure 58) montre que ni le choc osmotique, ni le DCPIB n'entraînent de réponse non spécifique sur ces deux lignées de cellules HEK.



**Figure 57 : Effet du DCPIB sur la lignée mère HEK et la lignée LRRC8A KO**

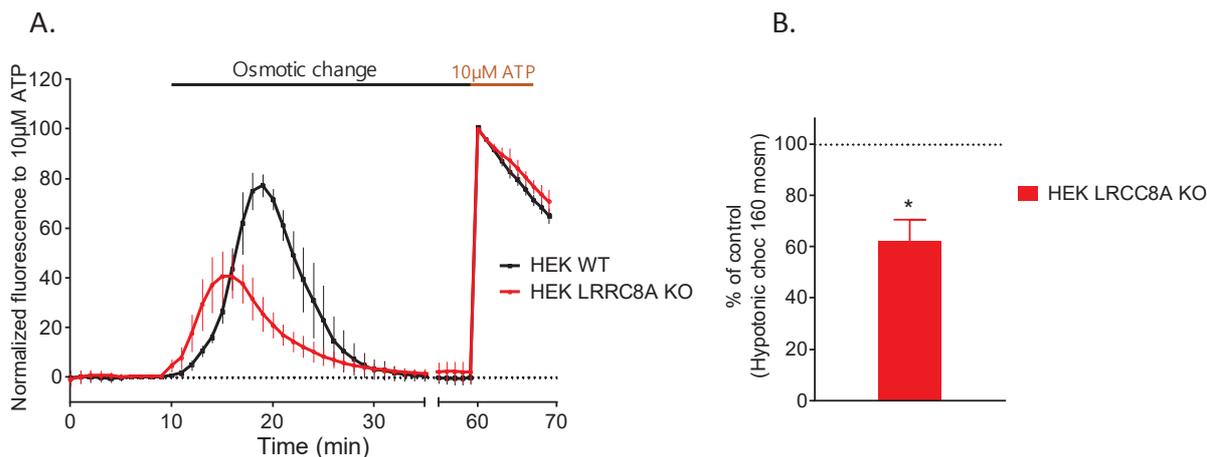
(A) Enregistrement de la fluorescence au cours du temps suite à l'application d'HBSS 320 ou 160 mOsm en absence (courbe noire) ou en présence de 20  $\mu$ M DCPIB (courbe bleue) suivie d'une application de 10  $\mu$ M d'ATP sur des cellules HEK exprimant le biosenseur PNG. (B) Quantification (aire sous la courbe) de l'effet du DCPIB, normalisée par rapport à la réponse 160 mOsm sans traitement. Test de comparaison à 100 : Hypotonic choc + DCPIB 20  $\mu$ M : p-value = 0,027. (C) Même expérience sur des cellules HEK LRRC8A KO. (D) Quantification (aire sous la courbe) de l'effet du DCPIB, normalisée par rapport à la réponse 160 mOsm sans traitement. Test de comparaison à 100 : Hypotonic choc + DCPIB 20  $\mu$ M : p-value = 0,3261. Les courbes représentent la moyenne 4 transfections indépendantes en triplicat. Les données de chaque expérience sont normalisées par la réponse 10  $\mu$ M ATP. Acquisition de la fluorescence toutes les minutes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/540$ .



**Figure 58 : Effet du DCPIB sur la lignée mère HEK et la lignée LRR8A KO transfectées avec l’outil P2X2-K69A-GCaMP6s**

Enregistrement de la fluorescence au cours du temps suite à l’application d’HBSS 320 ou 160 mOsm en absence (courbe noire) ou en présence de 20 µM DCPIB (courbe bleue) suivie d’une application de 10 µM ATP sur des cellules HEK WT (A) ou LRR8A KO (B) exprimant l’outil P2X2-K69A-GCaMP6s. Les courbes représentent la moyenne 4 transfections indépendantes en triplicat. Les données de chaque expérience sont normalisées par la réponse ATP 10 µM des cellules HEK correspondantes exprimant l’outil PNG (Figure 57). Acquisition de la fluorescence toutes les minutes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/540$ .

Enfin, si l’on compare directement la libération d’ATP entre les cellules WT et les cellules LRR8A KO (Figure 59), on voit clairement que la libération d’ATP est diminuée chez les cellules LRR8A KO. En effet, la libération d’ATP atteint un pic inférieur ( $40,5 \pm 8,8$  % de la réponse ATP 10µM) (Figure 59A). La quantification (aire sous la courbe) de la libération d’ATP des cellules KO (Figure 59B) montre une diminution significative de la libération d’ATP de 40 % comparée à celle des cellules WT. Ce résultat n’est pas significativement différent de l’inhibition d’environ 20 % induite par le DCPIB sur les cellules HEK WT. L’ensemble de ces résultats confirme donc l’implication partielle des canaux LRR8 dans la libération d’ATP induite par un choc hypotonique.

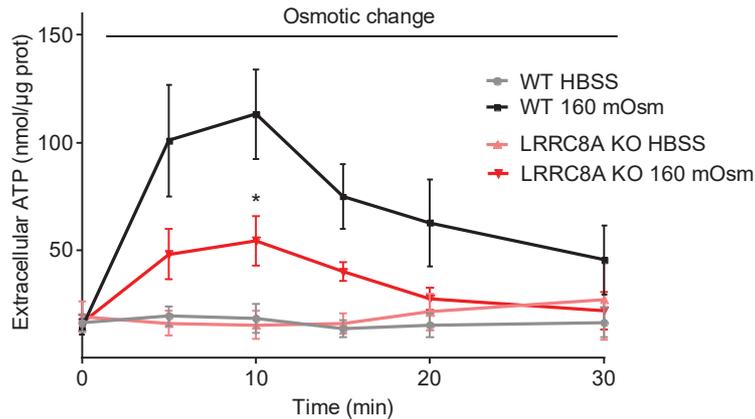


**Figure 59: Comparaison de la libération d'ATP entre les lignées HEK WT LRRC8A KO**

Enregistrement de la fluorescence au cours du temps suite à l'application d'HBSS 320 ou 160 mOsm sur des cellules HEK WT (noir) ou LRRC8A KO (rouge) exprimant le senseur PNG. Les courbes représentent la moyenne 4 transfections indépendantes en triplicat. Les données de chaque expérience sont normalisées par la réponse ATP 10 μM sur les cellules HEK considérées. Acquisition de la fluorescence toutes les minutes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{em/exc} = 485/540$ . (B) Quantification (aire sous la courbe) de la libération d'ATP par les cellules HEK KO, normalisée à la libération par des cellules HEK WT. Test de comparaison à 100 : (n = 4) hypotonique HEK LRRC8A KO : p-value = 0,02.

#### IV.1.2.3. Validation de l'implication des canaux LRRC8 par dosage de l'ATP par la méthode luciférine / luciférase

Pour valider l'implication des canaux LRRC8 dans la libération d'ATP, une cinétique de la libération d'ATP a été réalisée grâce à la méthode bioluminescente classique basée sur l'utilisation du couple luciférine/luciférase. Dans les deux cas, suite à un choc hypotonique, la libération d'ATP atteint un pic à 10 minutes puis diminue au cours du temps (Figure 60). La libération d'ATP est clairement affectée chez les cellules HEK LRRC8A KO (courbe rouge). L'analyse statistique (ANOVA two-way) met en évidence une diminution significative de la libération d'ATP 10 minutes post choc hypotonique, confirmant les résultats obtenus à l'aide du biosenseur PNG. Ces résultats valident donc la capacité de notre biosenseur à étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la libération d'ATP et confirment l'implication du canal LRRC8 dans la libération d'ATP induite lors d'une variation de l'osmolarité.



**Figure 60 : Validation de l'implication du canal LRRRC8 dans la libération d'ATP grâce à une détection de l'ATP extracellulaire par les méthodes de bioluminescence classiques basées sur la luciférine/luciférase**

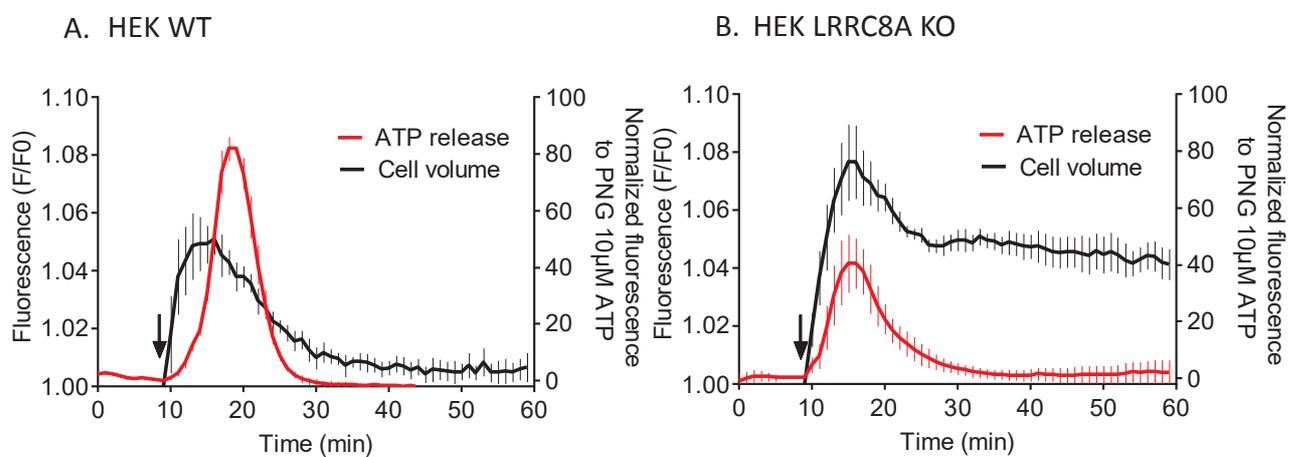
Dosage de l'ATP par bioluminescence suite à l'application d'HBSS 320 ou 160 mOsm dans des cellules HEK WT et HEK LRRRC8A KO non transfectées. Les mesures sont réalisées toutes les 5 minutes sur des plaques indépendantes. Chaque point est une moyenne de 7 expériences. Acquisition de la bioluminescence grâce à un lecteur de plaques. ANOVA two-ways entre WT 160 mOsm et LRRRC8A KO 160 mOsm: Interaction : p-value : 0,0435, Time : p-value  $\leq$  0,0001, Traitement : p-value : 0,0623. Test de comparaisons multiples : T5 : p-value : 0,0853, T10 : p-value 0,0432, T15 : p-value : 0,448.

#### IV.1.2.4. Rôle physiologique de la libération d'ATP par LRRRC8

Les études pharmacologiques et génétiques suggèrent donc que le canal LRRRC8 est impliqué dans la libération d'ATP. Pour la première fois, ces résultats mettent en évidence l'implication des canaux LRRRC8 dans la libération d'ATP dans un contexte de changement de volume. Ces canaux, en plus de leurs rôles primordiaux dans le RVD via l'entrée d'ions chlore, pourraient jouer d'autres rôles via cette libération d'ATP. Bien que ces résultats ne soient pas la preuve d'une perméabilité directe du canal à l'ATP, le diamètre estimé du canal et les études préalablement publiées suggèrent une perméabilité directe. Néanmoins, il n'est pas possible d'exclure que les canaux LRRRC8 puissent réguler indirectement une autre voie de libération de l'ATP (exocytose ou modulation de l'activité d'autres canaux perméables à l'ATP). Des enregistrements en canal unitaire de la perméabilité du canal à l'ATP pendant un choc osmotique permettraient de démontrer directement cette hypothèse.

La question du rôle physiologique de cette libération d'ATP reste entière. Au vu des quantités d'ATP libérées, un rôle autocrine plutôt que paracrine semble probable. Comme décrit en introduction, plusieurs études suggèrent un lien étroit entre la libération d'ATP et les phénomènes de RVD notamment via l'activation autocrine de certains récepteurs P2Y<sup>355,359</sup>. Bien que les expériences aient été faites indépendamment, on peut comparer les cinétiques de libération d'ATP et de changement de volume (estimées par la calcéine) puisque les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées. Les cellules HEK WT montrent une augmentation de volume rapide, alors que la libération d'ATP arrive plus tardivement, quand le gonflement cellulaire est à son maximum. Le pic d'ATP coïncide avec l'initiation de la phase de RVD. Cette

corrélation temporelle pourrait suggérer une implication de l'ATP dans le RVD (Figure 61A). Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus dans les cellules HEK LRRC8A KO. Dans ce cas, le pic de la libération d'ATP est en phase avec les variations de volume. Les cellules commencent ensuite une lente régulation de leur volume qui s'arrête rapidement au moment où l'ATP n'est plus libérée (Figure 61B). Dans ce cas, bien que la libération d'ATP résiduelle ne soit pas dépendante du canal LRCC8, cette observation est un argument supplémentaire en faveur d'un rôle de l'ATP dans la régulation du volume cellulaire. Enfin, dans ces conditions, les concentrations d'ATP libérées au niveau de la membrane (estimées autour de 700 nM grâce à notre senseur) sont amplement suffisantes pour activer la plupart des récepteurs P2Y sensibles à l'ATP ou à l'ADP. Des études supplémentaires pour confirmer ces hypothèses sont évidemment nécessaires.



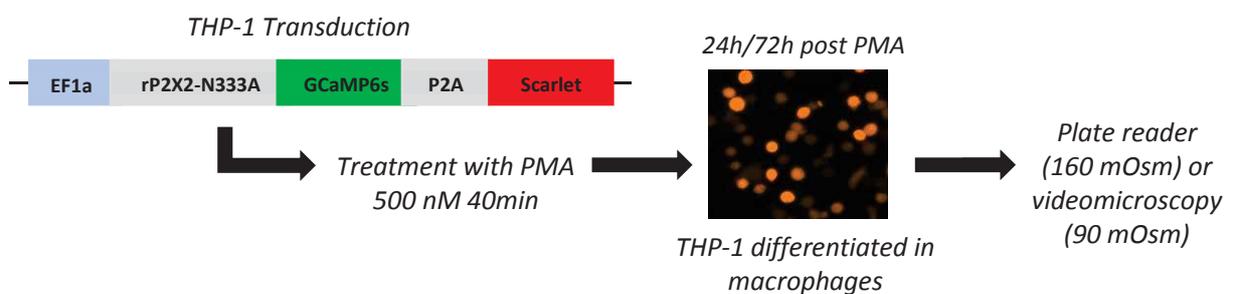
**Figure 61 : Corrélation temporelle entre la libération d'ATP et le phénomène de RVD**

Représentation sur le même graphique de la libération d'ATP mesurée au cours du temps par le senseur PNG (courbes rouges) et du volume cellulaire par mesure par la calcéine (courbes noires) sur cellules HEK WT (A) et LRRC8A KO (B). Ces deux paramètres ont été mesurés indépendamment et sont issus des données présentées en Figure 56 et Figure 59. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans ces figures.

## IV.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la libération d'ATP sur une lignée de monocytes THP-1 différenciés en macrophage

En condition de changements osmotiques, les canaux LRRC8 sont donc impliqués dans la libération d'ATP par les cellules HEK. L'expression de ce récepteur étant ubiquitaire, nous nous sommes demandé si cette propriété du canal est conservée dans d'autres types cellulaires. Pour répondre à cette question, le rôle du canal LRRC8 a été analysé sur une lignée de monocytes humains (THP-1) différenciés en macrophages. Dans la plupart des cellules immunitaires, la libération d'ATP et l'activation de la signalisation purinergique sont impliquées dans la modulation de nombreuses fonctions telles que la chimotaxie, la phagocytose ou encore la libération de cytokines conduisant aux processus inflammatoires. De plus, des études menées au sein du laboratoire par le Dr. Compan ont montré qu'un choc osmotique provoque l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la libération d'IL1 $\beta$ <sup>419</sup>. Des résultats préliminaires suggèrent également l'implication des canaux LRRC8 dans ces mécanismes. Caractériser le rôle de ces canaux dans la libération d'ATP sur cette lignée de macrophages paraît donc tout à fait pertinent.

Dans les expériences suivantes, une approche lentivirale a été utilisée afin de s'assurer qu'un nombre suffisant de cellules exprime nos différents outils (Figure 62). Le biosenseur PNG est exprimé de façon stable dans les cellules sous le contrôle du promoteur ubiquitaire EF1 $\alpha$ . Une séquence P2A permet en outre l'expression de la protéine rapportrice mScarlet<sup>413</sup>. Les monocytes THP-1 transduits sont traités pendant 40 minutes au PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), permettant leur différenciation en macrophages. Les expériences en lecteur de plaques sont réalisées 72 heures après le traitement au PMA.



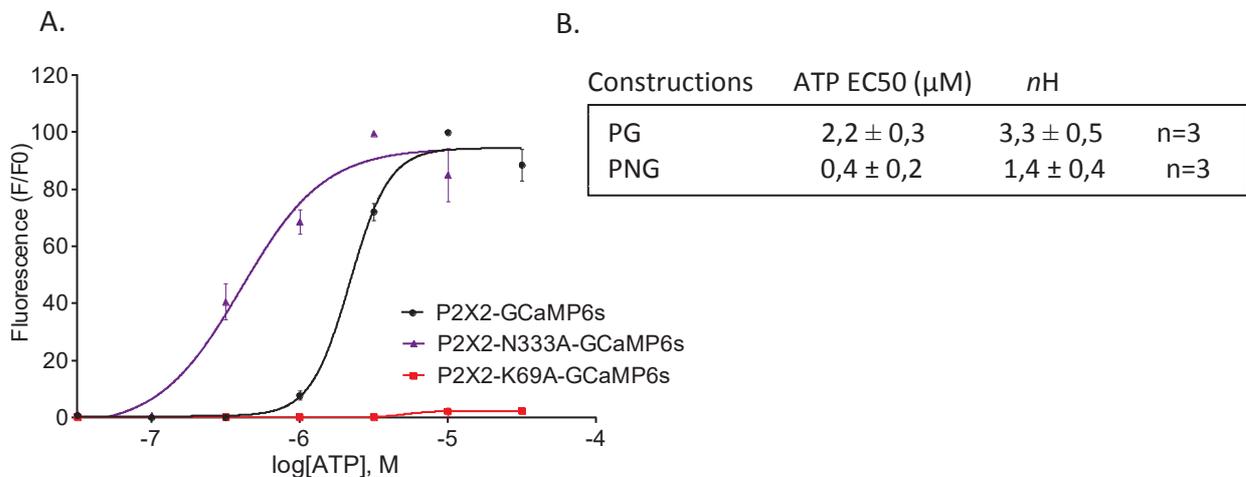
**Figure 62 : Protocole de transduction et de différenciation des THP-1 en macrophages**

Les biosenseurs sont transduits dans les cellules de façon à obtenir des lignées stables. Les senseurs sont exprimés sous le contrôle du promoteur ubiquitaire EF1 $\alpha$  ; une séquence P2A est ajoutée dans le cadre de lecture du senseur suivi du cDNA de la protéine fluorescente rouge mScarlet. La séquence P2A est une séquence peptidique auto-clivable qui permet l'expression indépendante des deux protéines à partir d'un ARN unique. Les monocytes THP-1 sont différenciés en macrophages par un traitement de 40 minutes avec 0,5  $\mu$ M PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). Les expériences sont effectuées 24 heures ou 72 heures après traitement.

## IV.2.1. Caractérisation des biosenseurs et détection de l'ATP sur les macrophages différenciés

### IV.2.1.1. Dose-réponse du biosenseur PNG exprimé dans les macrophages

Afin de s'assurer que les senseurs PG et PNG se comportent de la même façon que dans les autres lignées cellulaires, des doses-réponses ATP sont réalisées 72 heures après le traitement au PMA (Figure 63A). Les EC50 mesurées pour les senseurs PG ( $2,2 \mu\text{M} \pm 0,3$ ) et PNG ( $0,4 \mu\text{M} \pm 0,4$ ) ne sont pas différentes de celles obtenues dans les cellules HEK et 1321N1 (Figure 63B). De plus, les macrophages exprimant l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s ne montrent aucune réponse fluorescente suite à une stimulation par l'ATP.



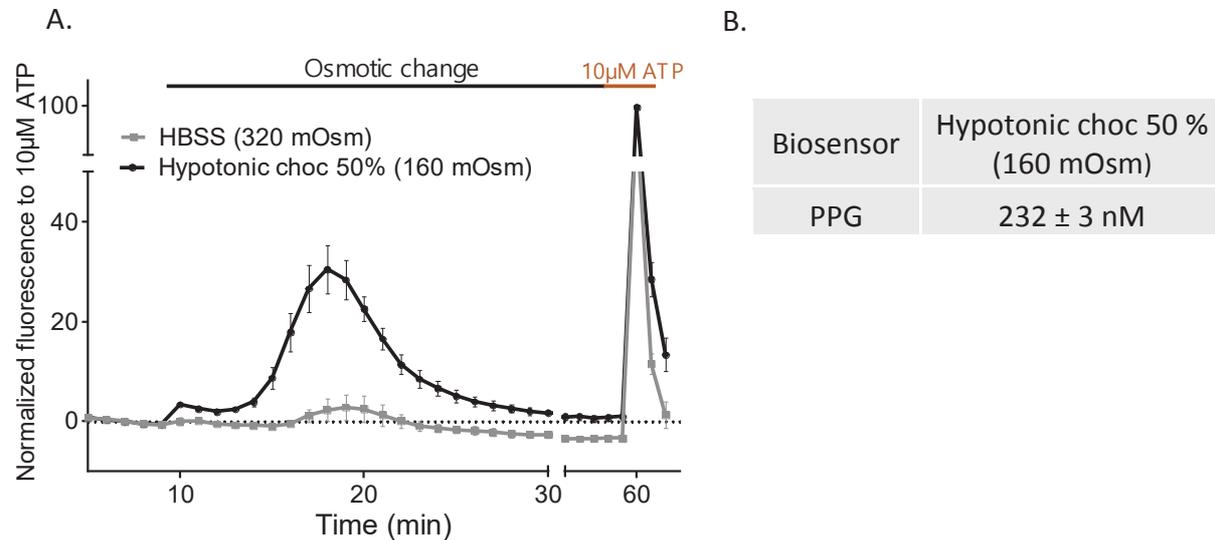
**Figure 63 : Dose-réponse des senseurs PG et PNG exprimés dans les macrophages**

(A) Dose-réponse à l'ATP (aire sous la courbe) pour PG, PNG et P2X2-K69A-GCaMP6s sur les cellules THP-1 différenciées en macrophages. Acquisition de la fluorescence toutes les 10 secondes pendant 3 minutes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/538$ ). (B) Tableau des EC50 et nH calculés par le logiciel Prism. Les EC50 obtenues sont significativement différentes (test de comparaison des EC50, p-value  $\leq 0,0001$ ).

### IV.2.1.2. Détection et quantification de la libération d'ATP en réponse à un choc hypotonique

Avant de s'intéresser aux mécanismes moléculaires impliqués dans la libération d'ATP, nous avons contrôlé la capacité de notre biosenseur à détecter une libération d'ATP. Suite à un choc hypotonique à 160 mOsm (50 %), une libération d'ATP, correspondant à  $30,5 \pm 4,8$  % de la réponse maximale induite par une application de  $10 \mu\text{M}$  d'ATP, est détectée (Figure 64A). Cette libération apparaît plus lente et plus courte que celle observée dans les autres types cellulaires. En effet, cette dernière commence 5 minutes après le choc osmotique, atteint un pic 9 minutes après la stimulation et retourne à un niveau basal 15 minutes après la stimulation. Dans ces conditions, la quantité d'ATP moyenne libérée à la membrane est de 232 nM (Figure 64B), ce qui est proche des valeurs calculées pour la lignée 1321N1. En se basant sur ce qui a été fait pour la lignée 1321N1, des chocs hypotoniques à 90 mOsm ont été appliqués. Dans ces conditions, 72 heures post-PMA, la libération d'ATP sature les capacités

du senseur et la réponse à une application de 10  $\mu\text{M}$  ATP s'écroule, probablement due à une sensibilité des macrophages aux forts changements osmotiques (observation personnelle). Le choix a donc été d'utiliser un choc à 160 mOsm, pour étudier l'implication des canaux LRRC8 dans la libération d'ATP.



**Figure 64 : Détection et quantification de la libération d'ATP extracellulaire endogène suite à un choc hypotonique de 50 % (160 mOsm)**

(A) Enregistrement de la fluorescence au cours du temps suite à l'application d'HBSS 320 et 160 mOsm, suivie d'une stimulation à 10  $\mu\text{M}$  ATP sur des cellules THP-1 différenciées en macrophages, exprimant de façon stable le biosenseur PNG. Les courbes représentent la moyenne 5 expériences indépendantes en triplicat. Les données de chaque expérience sont normalisées par la réponse ATP 10  $\mu\text{M}$  suite à un choc hypotonique de 160 mOsm (50 %). Acquisition de la fluorescence toutes les minutes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/540$ . Pour chaque expérience, la quantité d'ATP libérée est calculée grâce à l'équation théorique du lissage de la courbe dose-réponse :  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top}-\text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50}-X) * \text{HillSlope}))}$ ). Les moyennes et les écarts types sont représentés dans le tableau (B).

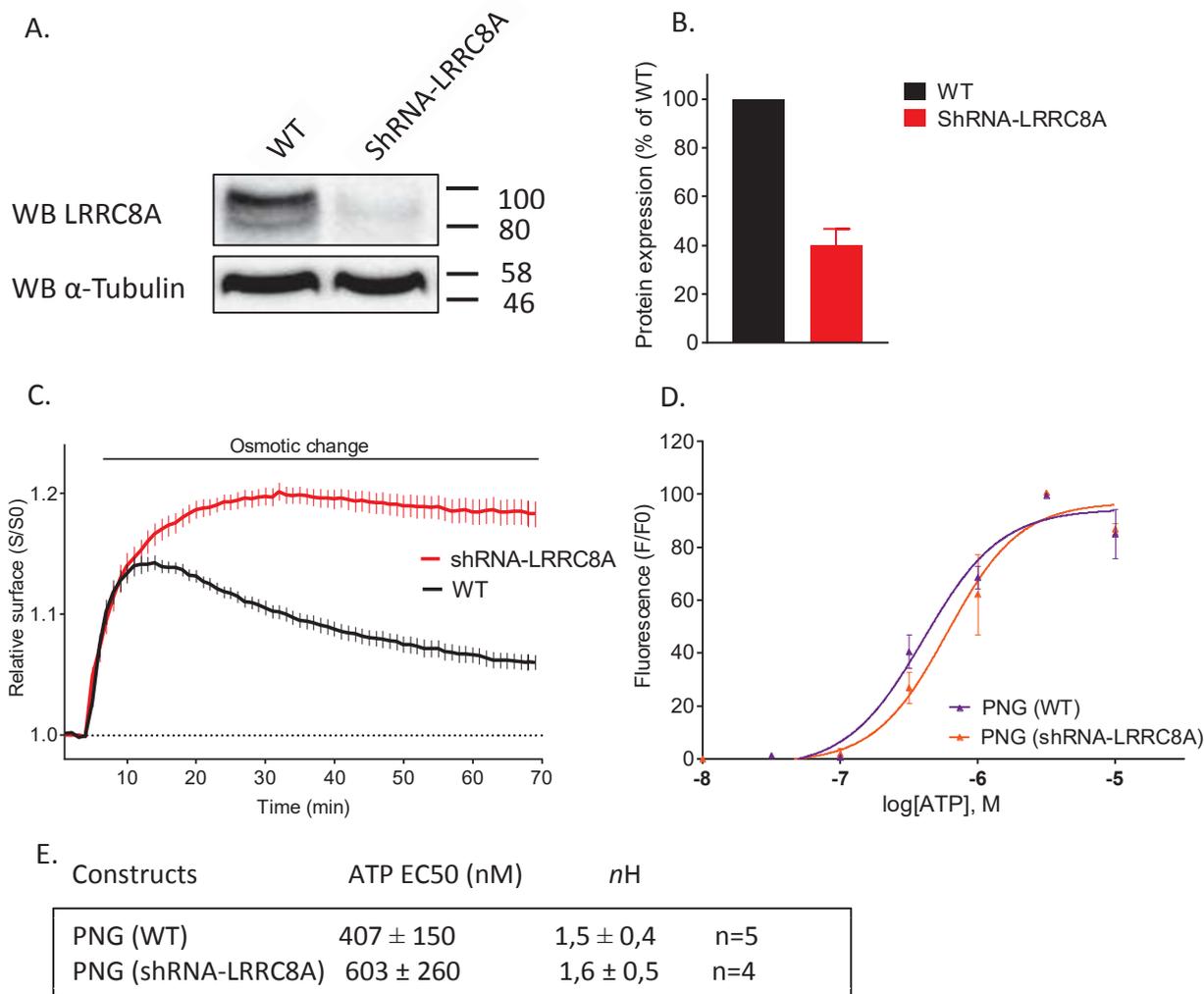
## IV.2.2. Implication du canal LRRC8

L'implication du canal LRRC8 a été examinée grâce à une approche pharmacologique (utilisation de l'inhibiteur DCPIB) et par une approche génétique d'ARN interférence basée sur l'expression lentivirale de shRNA (small hairpin RNA) qui ciblent spécifiquement les ARN messagers de la sous-unité LRRC8A et inhibent son expression protéique.

### IV.2.2.1. Création et caractérisation la lignée shARN-LRRC8A

Au sein du laboratoire, le Dr. COMPAN Vincent a criblé plusieurs shRNA dirigé contre l'ARNm de la sous-unité LRRC8A en se basant sur la capacité des cellules à réguler leur volume suite à un gonflement cellulaire. Une validation par western blot de l'inhibition de l'expression de la sous-unité LRRC8A a été pratiquée par la suite. Un shRNA a été sélectionné pour sa capacité à inhiber le RVD et à fortement diminuer l'expression de LRRC8A. Pour des raisons inconnues, la calcéine n'a pas permis de suivre correctement le volume cellulaire suite à un choc osmotique sur les macrophages, les expériences de mesure du volume ont donc été réalisées par vidéomicroscopie 24h post-PMA. Dans ces conditions, les cellules sont encore bien rondes et la surface cellulaire (proportionnelle au volume) peut être estimée grâce à la mesure de la fluorescence rouge de la protéine mScarlet.

Le western blot Figure 65A montre une forte diminution de l'expression de la protéine LRRC8A dans la lignée shRNA-LRRC8A (Figure 65A). Plusieurs WB ont été réalisés et quantifiés pour estimer le pourcentage moyen de diminution de l'expression de la protéine LRRC8A. La quantification montre ainsi une diminution moyenne de 60 % de la protéine par rapport à la lignée WT (Figure 65B). Contrairement aux lignées KO, une expression résiduelle de la protéine semble toujours présente. Nous avons donc analysé les variations de volume et la capacité de cette lignée à réaliser le RVD. Comme attendue, la phase de RVD de la lignée shRNA-LRRC8A est très clairement inhibée (Figure 65C). Ce résultat montre que la principale fonction du canal LRRC8 est altérée suite à une diminution de 60 % l'expression de la protéine endogène. Enfin, pour s'assurer que le shRNA ne perturbe pas l'expression et les propriétés de notre senseur, une dose-réponse à l'ATP a été réalisée. L'EC50 du biosenseur PNG dans la lignée shARN-LRRC8 n'est pas significativement différente de celle du senseur exprimé dans la lignée WT ( $407 \pm 150$  nM et  $603 \pm 260$  nM, respectivement) (Figure 65D). Cette nouvelle lignée peut donc être utilisée pour examiner le rôle du canal dans la libération d'ATP.

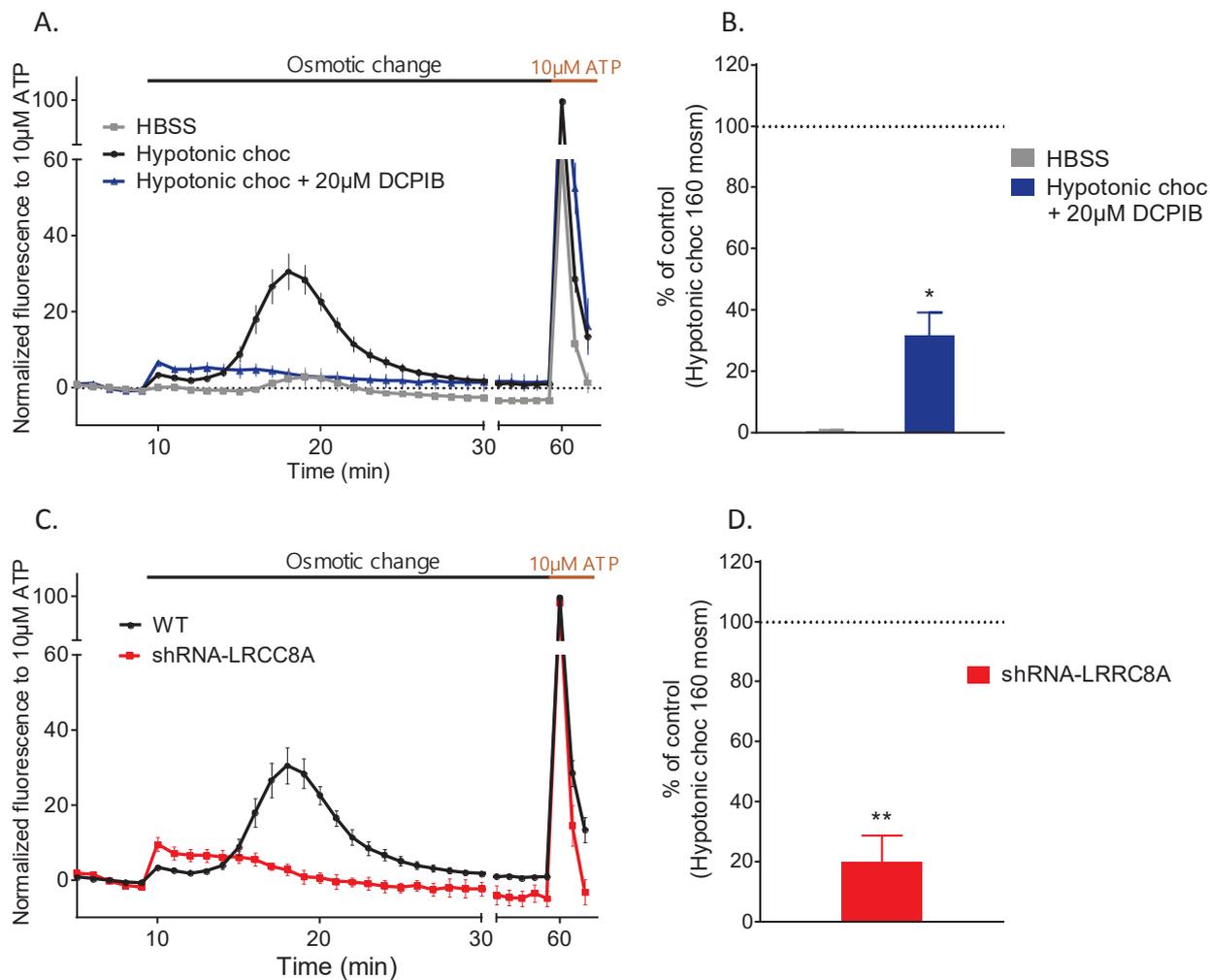


**Figure 65 : Caractérisation de la lignée THP-1 exprimant un shARN dirigé contre le canal LRRRC8**

(A) Western blot des lignées THP-1 WT et shARN-LRRRC8A. Les extraits protéiques sont analysés après migration sur gel de polyacrylamide. Les membranes obtenues sont incubées avec un anticorps anti-LRRRC8A permettant de révéler la présence du canal. (B) L'intensité de chaque bande est normalisée par rapport à l'actine est quantifiée (Image Lab) dans les deux lignées ( $n = 5$  pour chaque condition). (C) Les variations de volume induites par un choc osmotique de 160 mOsm sont estimées au cours de temps par mesure de la surface cellulaire détectée grâce à la fluorescence de la protéine mScarlet sur les macrophages WT ou LRRRC8A KO exprimant P2X2-K69A-GCaMP6s ( $n = 8$  expériences indépendantes,  $n = 20$  à 50 cellules). Expériences réalisées 24h post-PMA. La surface cellulaire est suivie par vidéomicroscopie et analysée grâce à une macro automatisée sur le logiciel Imaris. (D) Courbes dose-réponse à l'ATP (aire sous la courbe) pour P2X2-N333A-GCaMP6s exprimé dans des macrophages WT ou shRNA-LRRRC8A. Acquisition de la fluorescence toutes les 10 secondes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/538$ ). (E) Tableau des EC50 et nH indiqués par le logiciel Prism. Les EC50 obtenues pour les deux lignées de macrophage ne sont pas significativement différentes (test de comparaison des EC50, p-value : 0,073).

#### IV.2.2.2. Implication du canal LRRC8 dans la libération d'ATP

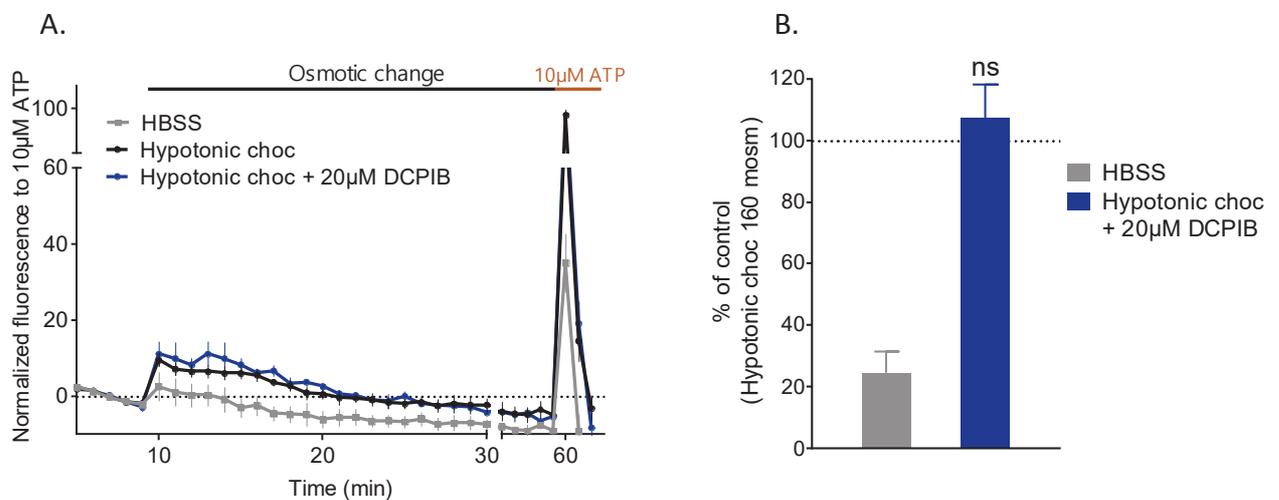
Comme précédemment décrit, une approche pharmacologique a d'abord été utilisée sur les cellules THP-1 WT. Le traitement par le DCPIB à 20  $\mu$ M au cours d'un choc hypotonique de 50 % (160 mOsm) entraîne une disparition totale des variations de fluorescence observées à 10 minutes post-choc hypotonique (Figure 66A). La fluorescence n'augmente que très légèrement dès l'application du choc hypotonique jusqu'à diminuer totalement 15 minutes après le choc. La quantification de l'aire sous la courbe dans les deux conditions indique une diminution de la quantité d'ATP libérée de 70 % (Figure 66B). Dans un second temps, l'utilisation de la lignée shARN-LRRC8A a permis de confirmer l'implication du canal (Figure 66C et D). La comparaison des signaux de fluorescence induits par le choc hypotonique dans les macrophages WT (courbe noire) et shRNA-LRRC8A (courbe rouge) démontre une forte diminution de la libération d'ATP dans la seconde lignée. Les cellules shRNA-LRRC8A montrent une très légère libération d'ATP qui apparaît lors de l'application du choc hypotonique. La quantification de l'aire sous la courbe montre une diminution de 80 % de l'ATP libérée par rapport aux cellules WT, confirmant le rôle primordial du canal dans la libération d'ATP lors d'un choc hypotonique.



**Figure 66 : Implication du canal LRRC8 dans la libération d'ATP suite à un choc hypotonique de 50 % (160 mOsm)**

(A) Enregistrement de la fluorescence au cours du temps suite à l'application d'HBSS 320 ou 160 mOsm, en l'absence (courbe noire) ou en présence de 20 μM DCPIB (courbe bleue) suivie d'une stimulation à 10 μM ATP. Les cellules exprimant le senseur PNG sont différenciées et utilisées 72h post-PMA. (B) Quantification (aire sous la courbe) de l'effet du traitement, normalisée par rapport à la réponse 160 mOsm sans traitement. Test de comparaison à 100 : Hypotonic choc + DCPIB 20 μM : p-value : 0,0115. (C) Même expérience sur des macrophages shRNA-LRRC8A. (D) Quantification (aire sous la courbe) de l'effet de la délétion de la sous-unité LRRC8A sur la libération d'ATP, normalisée par la libération d'ATP à 160 mOsm sans traitement. Test de comparaison à 100 : p-value : 0,0009. Les courbes représentent la moyenne de 5 expériences indépendantes en triplicat. Les données de chaque expérience sont normalisées par la réponse ATP 10 μM pour la lignée considérée. Acquisition de la fluorescence toutes les minutes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/540$ .

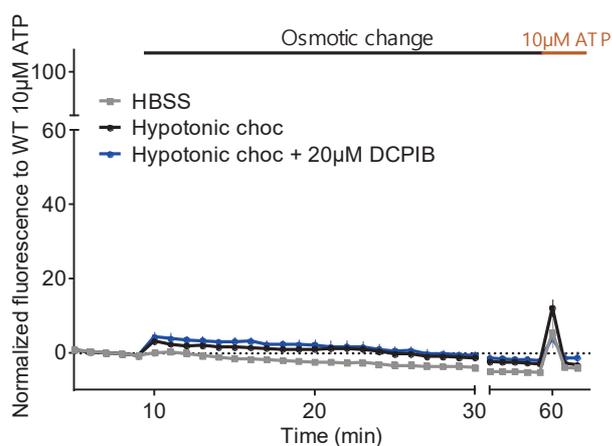
De la même façon que pour les cellules HEK, différents contrôles ont été réalisés. Tout d'abord, la libération d'ATP induite par un choc hypotonique sur la lignée shARN-LRRC8A n'est pas significativement modifiée par l'ajout de DCPIB. Ce résultat montre la spécificité d'action de la drogue sur le canal LRCC8 (Figure 67A et B). Deuxièmement, pour s'assurer de la spécificité des réponses fluorescentes observées, les deux lignées ont été transduites avec l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s. Pour la lignée WT, le choc hypotonique ainsi que le DCPIB n'entraînent pas de réponses fluorescentes significatives (Figure 68A). Pour la lignée shRNA-LRRC8A, une très légère augmentation de la fluorescence, non sensible au DCPIB est observée suite au choc hypotonique (Figure 68B). Cette petite réponse peut induire une surestimation de la réponse fluorescente et la libération d'ATP dans cette lignée. On peut donc penser que la réponse fluorescente induite par la libération d'ATP est surestimée dans la lignée shARN-LRRC8A.



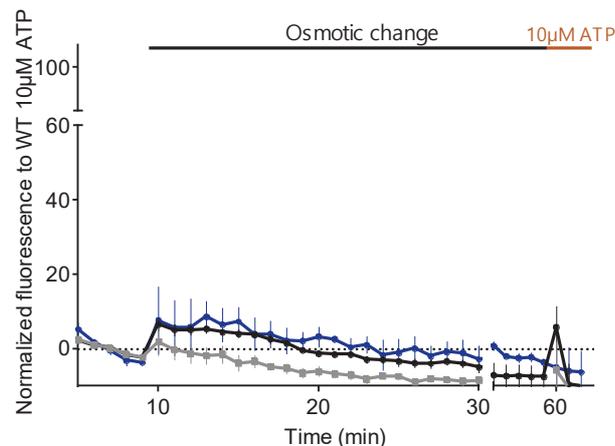
**Figure 67 : Effet du DCPIB sur la libération d'ATP suite à un choc hypotonique de 50 % (160 mOsm) dans la lignée shRNA-LRRC8A**

(A) Enregistrement de la fluorescence au cours du temps suite à l'application d'HBSS 320 ou 160 mOsm) en l'absence (courbe noire) ou en présence de 20 µM DCPIB (courbe bleue), suivie d'une stimulation finale à l'ATP 10 µM sur des macrophages exprimant le biosenseur PNG. Les courbes représentent la moyenne 5 expériences indépendantes en triplicat. Les données de chaque expérience sont normalisées par la réponse ATP 10 µM pour la lignée considérée. (B) Quantification (aire sous la courbe) de l'effet du DCPIB, normalisée par rapport à la réponse 160 mOsm sans traitement. Test de comparaison à 100 % : Hypotonic choc + DCPIB 20 µM : p-value = 0,613.

### A. WT macrophages



### B. shRNA-LRRC8A macrophages



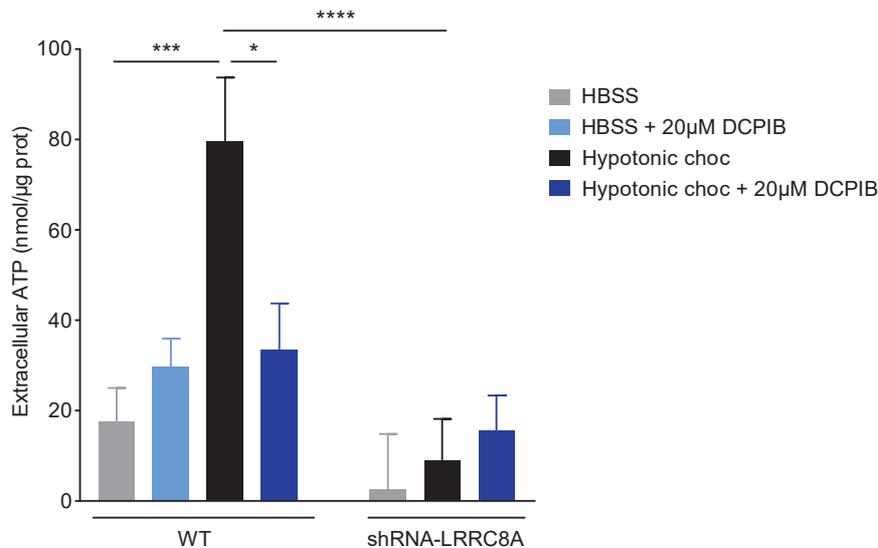
**Figure 68 : Effet du choc hypotonique 50 % et du DCPIB dans les lignées de macrophages WT et shRNA-LRRC8A transduites avec l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s**

Les mesures des variations de fluorescence des cellules exprimant l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s sont effectuées comme précédemment (Figure 66, 67). (A) macrophages WT, (B) macrophages exprimant le shRNA-LRRC8A. Les courbes représentent la moyenne 3 expériences indépendantes en triplicata ( $n = 3$ ). Les données de chaque expérience sont normalisées par la réponse ATP 10  $\mu\text{M}$  des macrophages WT exprimant l'outil PNG. Acquisition de la fluorescence toutes les minutes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/540$ .

#### IV.2.2.3. Validation par dosage de l'ATP par les méthodes de bioluminescence

Afin de valider définitivement l'implication du canal LRRC8 dans la libération d'ATP et de s'assurer que l'effet observé est indépendant de l'expression du senseur PNG, l'ATP a été mesurée avec une méthode de bioluminescence classique (Figure 69). Le pic de libération de l'ATP se situant aux alentours des 10 minutes après l'induction du choc hypotonique, l'ATP a été mesurée à ce temps-là sur les lignées WT et shRNA-LRRC8A, avec ou sans traitement au DCPIB 20  $\mu\text{M}$ . Un choc hypotonique de 160 mOsm induit une forte augmentation de la concentration d'ATP extracellulaire dans la lignée sauvage. Cette augmentation est significativement réduite suite au traitement par le DCPIB à 20  $\mu\text{M}$ . Pour la lignée shRNA-LRRC8A, aucune augmentation de la concentration d'ATP n'est détectée suite au choc hypotonique. Le DCPIB seul n'induit pas d'augmentation de la libération d'ATP. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents et confirment que la libération d'ATP induite par l'hypo-osmolarité est totalement absente sur la lignée shRNA-LRRC8A.

Encore une fois, les expériences précédentes ne démontrent pas une perméabilité directe à l'ATP du canal LRRC8. Elles montrent néanmoins clairement que les macrophages ont un défaut évident de libération d'ATP lorsque l'on inhibe ou diminue l'expression du canal LRRC8.



**Figure 69 : Validation de l'implication du récepteur LRRC8 dans la libération d'ATP par les macrophages grâce à une méthode de bioluminescence classique basée sur le couple luciférine/luciférase**

Dosage de l'ATP par bioluminescence 10 minutes après l'application d'HBSS 320 mOsm avec ou sans DCPIB ou de milieu 160 mOsm avec ou sans DCPIB. Expériences réalisées en parallèle sur les macrophages WT et shRNA-LRRC8A. Chaque point est une moyenne de 4 à 6 expériences indépendantes. Acquisition de la bioluminescence grâce à un lecteur de plaques. ANOVA : p-value : 0,002. Test de comparaisons multiples : HBSS WT vs Hypotonique choc WT : p-value : 0,0005. Hypotonique choc WT vs Hypotonique choc WT + DCPIB 20 µM : p-value : 0,0122. Hypotonique choc WT vs Hypotonique choc shRNA-LRRC8A : p-value : 0,0001.

### IV.2.3. Rôle de l'ATP libérée par les canaux LRRC8

#### IV.2.3.1. Mise au point expérimentale de l'approche de vidéomicroscopie

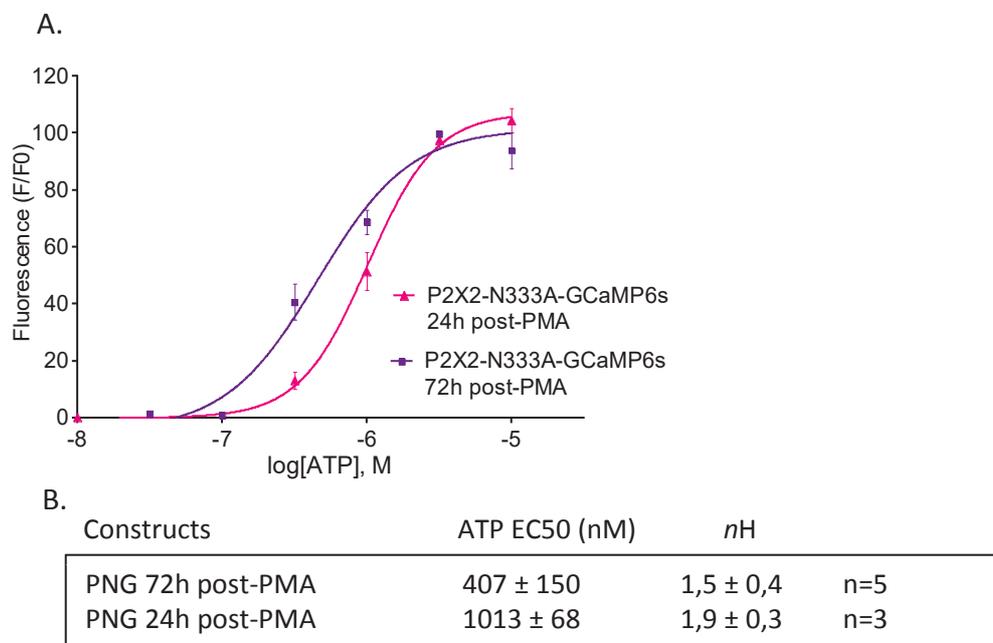
La mesure de la fluorescence par un lecteur de plaques s'est avérée très utile pour caractériser les outils PNG et PPG et démontrer l'implication du canal LRRC8 dans la libération d'ATP lors d'un choc hypotonique. Néanmoins, ces approches reflètent le signal global d'une population cellulaire, mais ne permettent pas une analyse plus fine, au niveau de la cellule unique.

Nous avons donc développé une approche de vidéomicroscopie afin de voir au niveau cellulaire s'il existe une corrélation temporelle entre la libération d'ATP et la régulation du volume cellulaire. Pour cela, la libération d'ATP a été mesurée grâce à l'activité du biosenseur (émission d'une fluorescence verte) et la surface cellulaire grâce à la mesure de la fluorescence de la protéine mScarlet (émission d'une fluorescence rouge). Une analyse automatisée grâce au logiciel Imaris a été utilisée. Des expériences préliminaires pratiquées à 24 et 72h post-PMA nous ont montré que ce type d'analyse ne peut être effectué qu'à 24h post-PMA. En effet, à ce temps les macrophages ont encore une forme ronde et la reconnaissance automatique des cellules par le logiciel est très performante. A 72h post-PMA, les cellules sont beaucoup plus étalées et de forme variable ce qui ne permet pas leur reconnaissance. De plus,

à 72h post-PMA, les cellules sont beaucoup plus adhérentes et les variations de surfaces induites par un choc osmotique beaucoup plus discrètes.

A 24h post-PMA, le senseur PNG ne détecte pas de libération d'ATP induite par un choc hypotonique à 160 mOsm. Nous avons comparé la sensibilité du senseur PNG 24h et 72h après le traitement PMA. La Figure 70 montre que 24 heures post-PMA, l'EC50 du senseur est significativement différente de celle mesurée 72h post-PMA ( $EC50_{24h} = 1013 \pm 68$  nM,  $EC50_{72h} = 407 \pm 150$  nM). La différence d'affinité apparente du senseur pour l'ATP est certainement responsable du fait que la libération d'ATP induite par un choc osmotique 50 % n'est pas détectée. En effet, une telle diminution de l'osmolarité induit une libération d'ATP qui a été estimée comme étant  $< 300$  nM, c'est à dire en dessous du niveau de seuil de détection du senseur PNG, 24h post-PMA.

Les expériences de vidéomicroscopie ont donc été réalisées 24h post-PMA, en utilisant un choc hypotonique de 75 % (90 mOsm) qui induit une libération d'ATP plus importante.

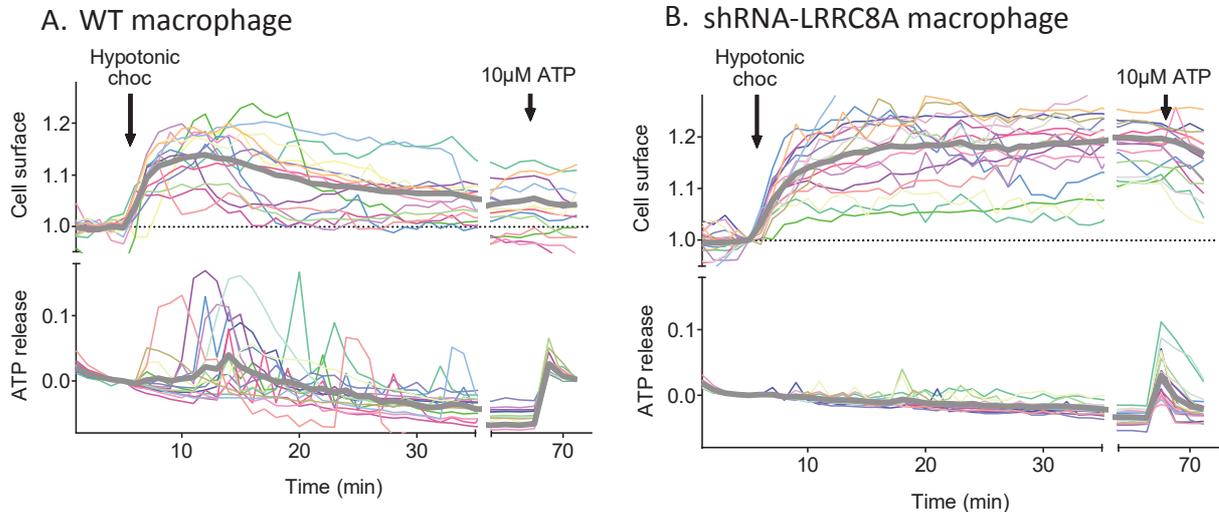


**Figure 70 : Modifications de la sensibilité du biosenseur suite au traitement par le PMA**

(A) Dose-réponse (aire sous la courbe) du senseur PNG exprimé dans des macrophages WT 24h ou 72h post-PMA. Acquisition de la fluorescence toutes les 10 secondes grâce à un lecteur de plaques, ( $\lambda_{exc/em} = 485/538$ ). (B) Tableau des EC50 et nH calculés par le logiciel Prism. Les EC50 obtenues pour les deux conditions étudiées sont significativement différentes (test de comparaison des EC50, p-value : 0,0001).

#### IV.2.3.2. Corrélation temporelle entre la libération d'ATP et le RVD

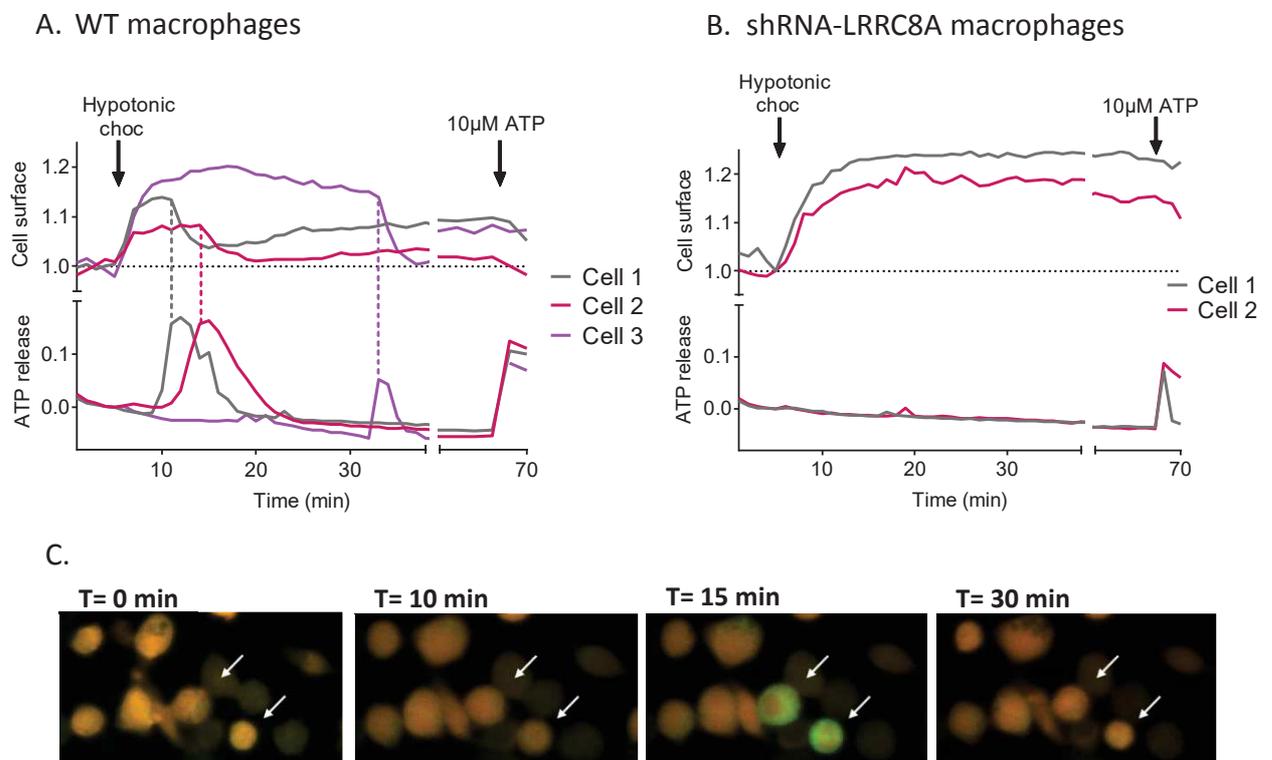
L'acquisition des signaux verts (GCaMP, activité du senseur) et rouges (mScarlet, surface cellulaire) est effectuée toutes les minutes, pendant 70 minutes. Le choc hypotonique est induit 5 minutes après le début des acquisitions ; une application de 10  $\mu$ M d'ATP est effectuée en fin d'acquisition. Pour chaque condition, 12-18 cellules sont analysées (Figure 71). L'analyse en population globale des résultats de vidéomicroscopie confirment ceux obtenus en lecteur de plaques. Dans les macrophages sauvages, le volume cellulaire augmente pour atteindre un pic 10 minutes post-stimulation puis les cellules diminuent de volume lentement au cours du RVD (courbe épaisse grise, figure 71A, panneau supérieur). Cependant, l'analyse individuelle de chaque cellule révèle une grande disparité de la cinétique des réponses, certaines cellules ne régulant leur volume que 20 à 25 minutes après l'induction du choc hypotonique. Une situation similaire est observée pour la libération d'ATP. L'analyse globale révèle un pic de libération de faible amplitude autour de 10 minutes post-stimulation (courbe épaisse grise, figure 71A, panneau inférieur), mais l'analyse des réponses individuelles montre clairement que ce résultat est dû à une variabilité importante de la cinétique des réponses. En ce qui concerne les macrophages shRNA-LRRC8A (Figure 71B), les cellules gonflent rapidement après le choc osmotique mais sont incapables de réguler leur volume (panneau supérieur). Ici également, une grande variabilité de l'intensité du gonflement cellulaire est observée. Dans ces cellules, aucune libération d'ATP n'est observée, confirmant le défaut de libération d'ATP des macrophages shARN-LRRC8A (panneau inférieur).



**Figure 71: Observation de la libération d'ATP par vidéomicroscopie suite à un choc hypotonique de 90 mOsm**

Suivi en vidéomicroscopie de la surface cellulaire (en haut) et de la libération d'ATP (en bas) pour les macrophages WT (A) ou shRNA-LRRC8A (B). La fluorescence de la protéine mScarlet ( $\lambda_{exc/em} = 535/590$ ) permet le suivi de la surface cellulaire. Choc osmotique de 90 mOsm sur macrophages WT (n = 12 cellules) ou shRNA-LRRC8A (n = 18 cellules), 24h post-PMA. Grâce au biosenseur PNG, la libération d'ATP est enregistrée ( $\lambda_{exc/em} = 485/540$ ) en alternance des acquisitions rouges. Une acquisition par minute. Le tracé de chaque cellule est représenté de différentes couleurs et la moyenne est représentée par la ligne épaisse grise. Les signaux de surface et les signaux de libération d'ATP sont analysés automatiquement grâce à une macro sur le logiciel Imaris.

L'analyse, cellule par cellule, montre clairement une corrélation temporelle entre la libération d'ATP et l'induction du RVD pour la plupart des cellules observées. En effet, pour la majorité des cellules, le volume augmente rapidement et atteint un plateau qui se maintient jusqu'à ce que la libération d'ATP se déclenche, sous forme d'un pic, moment à partir duquel la cellule débute le RVD. La Figure 72A montre la corrélation temporelle entre la libération d'ATP et l'initiation du RVD dans trois cellules représentatives. De façon intéressante, dans certaines cellules dont l'initiation du RVD est tardive, le pic de libération d'ATP reste corrélé avec la régulation du volume (cellule 3, figure 72A). La figure 72C illustre, en temps réel, l'évolution de deux cellules libérant de l'ATP au cours du changement osmotique. Pour les cellules shRNA-LRRC8A ne libérant pas d'ATP, aucune régulation de volume n'est observée (Figure 72B). Ces résultats étant observés pour la grande majorité des cellules analysées, ils suggèrent que l'ATP libéré durant le choc hypotonique est nécessaire à l'initiation de la phase de RVD.

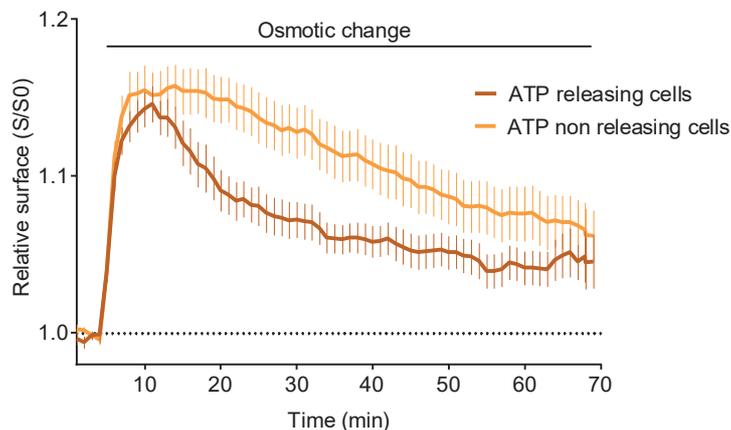


**Figure 72 : Corrélation temporelle entre la libération d'ATP et le RVD suite à un choc hypotonique de 90 mOsm**

Suivi en vidéomicroscopie de la surface cellulaire (en haut) et de la libération d'ATP (en bas) pour 3 macrophages WT (A) et de 2 macrophages shRNA-LRRC8A (B) illustrant la corrélation temporelle entre la libération d'ATP et la phase de RVD. Mêmes conditions et analyses que pour la figure 70. (C) Images (superposition des acquisitions vertes et rouges) illustrant la libération d'ATP puis le RVD pour deux macrophages (indiqués par les flèches blanches). Barre d'échelle : 20 µm.

#### IV.2.3.3. Modulation de la vitesse du RVD par la libération d'ATP endogène

Bien que répondant à une application d'ATP à 10  $\mu\text{M}$ , certaines cellules régulent leur volume au cours des 70 minutes mais aucune libération d'ATP n'est détectée. Dans ce cas, une hypothèse possible est que la libération d'ATP est trop faible pour être détectée par notre biosenseur PNG ( $\leq 300 \text{ nM}$  dans ces conditions expérimentales). Suivant notre hypothèse, l'ATP libérée conduit à l'initiation du RVD. Les cellules libérant plus d'ATP devraient donc réguler plus rapidement leur volume que les cellules ne libérant pas d'ATP ou peu d'ATP ( $\leq 300 \text{ nM}$ ). Le RVD des cellules libérant de l'ATP a donc été comparé à celui de la population de cellules ne libérant pas ou peu d'ATP (Figure 73). Les cellules des deux populations gonflent de façon similaire après le choc hypotonique et atteignent un plateau 10 minutes après la stimulation. Cependant la cinétique du RVD des cellules à faible libération d'ATP est beaucoup plus lente par rapport à celle des cellules libérant plus d'ATP, même si *in fine*, les deux populations retrouvent un volume identique. Ce résultat confirme l'implication de l'ATP dans la régulation du volume cellulaire et sa capacité à jouer sur la cinétique du RVD.

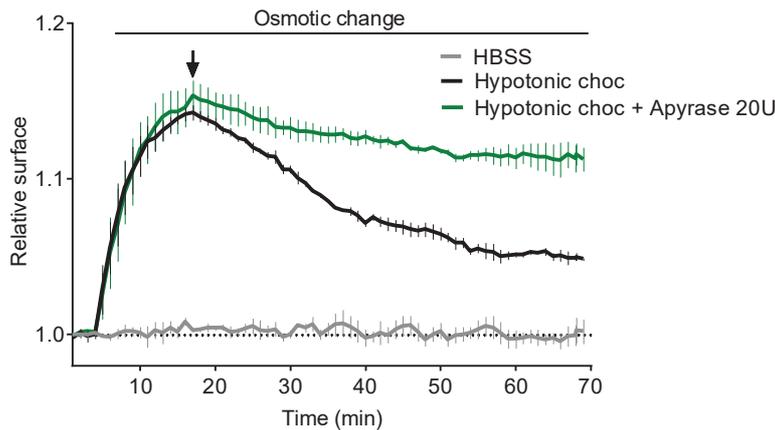


**Figure 73 : Augmentation de la vitesse du RVD pour les cellules libérant de l'ATP au cours d'un choc hypotonique de 90 mOsm dans des macrophages WT**

Suivi en vidéomicroscopie de la surface cellulaire de macrophages WT exprimant le senseur PNG grâce à la fluorescence de la protéine rapportrice mScarlet (1 acquisition/minute sur 70 minutes). Comparaison du volume cellulaire entre deux populations de macrophages soumis à un choc osmotique de 90 mOsm (75 %). La première population libère de l'ATP au cours du choc hypotonique (courbe marron,  $n = 19$  cellules) alors que pour la deuxième population, aucune libération d'ATP n'est détectée (courbe orange,  $n = 21$  cellules).

#### IV.2.3.4. Volume cellulaire suite à un traitement avec l'apyrase

Afin d'évaluer le rôle de l'ATP libérée au plateau et durant la phase de RVD, une application d'apyrase (qui dégrade l'ATP et l'ADP extracellulaire), a été effectuée 10 minutes après l'induction du choc hypotonique. L'application d'apyrase au pic du volume a pour conséquence d'inhiber la phase de RVD (Figure 74). Dans ce cas, les cellules n'entrent pas en RVD. Ce résultat montre que la libération d'ATP au pic du volume est nécessaire pour initier la phase de RVD.



**Figure 74 : Effet inhibiteur de l'apyrase sur le RVD suite à un choc hypotonique de 90 mOsm dans des macrophages sauvages**

Suivi en vidéomicroscopie de la surface cellulaire de macrophages WT exprimant l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s grâce à la fluorescence de la protéine rapportrice mScarlet (1 acquisition/minute sur 70 minutes). Suivi du volume cellulaire suite à l'ajout d'apyrase 20U au pic du volume (10 minutes post-choc hypotonique 90 mOsm, flèche noire) Les courbes représentent 3 expériences indépendantes (n = 3). Chaque expérience est la moyenne d'une analyse de 20 à 60 cellules.

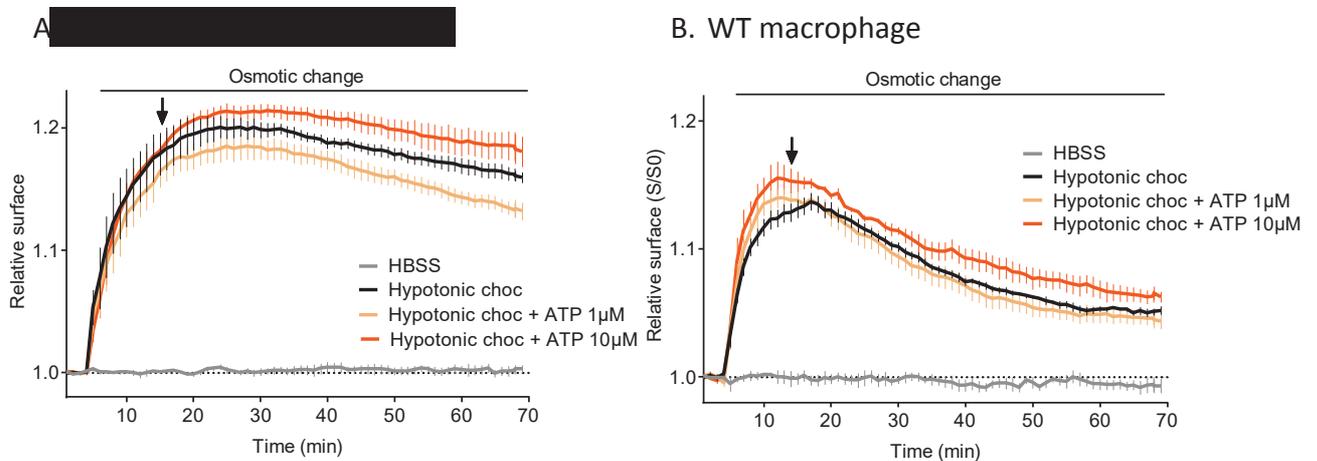
#### IV.2.3.5. Effet d'ajout exogène d'ATP

Bien que l'ATP soit nécessaire à la phase de RVD, une application exogène est-elle suffisante pour induire un RVD dans les macrophages shRNA-LRRC8A ? Pour répondre à cette question, des applications d'ATP de 1 et 10  $\mu$ M ont été effectuées au pic du changement de volume, induit par un choc hypotonique de 90 mOsm (Figure 75).

Dans les macrophages shRNA-LRRC8A, l'application d'ATP 10  $\mu$ M semble diminuer la vitesse de RVD alors que l'application d'ATP à 1  $\mu$ M semble augmenter la vitesse du RVD (Figure 75A). Néanmoins, ces modifications, légères, ne semblent pas suffisantes pour induire un RVD en l'absence du canal LRRC8. Il apparaît donc que l'ATP est nécessaire mais n'est pas suffisante pour induire le RVD.

De même, et de façon plus surprenante, l'application d'ATP à 1 ou 10  $\mu$ M sur les macrophages sauvages ne modifie pas la vitesse du RVD (Figure 75B). Ce résultat peut s'expliquer par une dégradation rapide de l'ATP exogène ou par un effet spécifique et local de l'ATP directement libérée au niveau de la membrane plasmique. L'utilisation d'ATP $\gamma$ S non hydrolysable pourrait permettre de tester cette hypothèse. Une autre possibilité serait que l'ATP exogène n'est pas

dégradée en ADP par les ectonucléotidases membranaires aussi vite que l'ATP libérée de façon endogène. L'ADP en activant préférentiellement certains P2Y, pourrait participer à la régulation du volume cellulaire. L'application d'ADP exogène permettrait de tester cette seconde hypothèse.

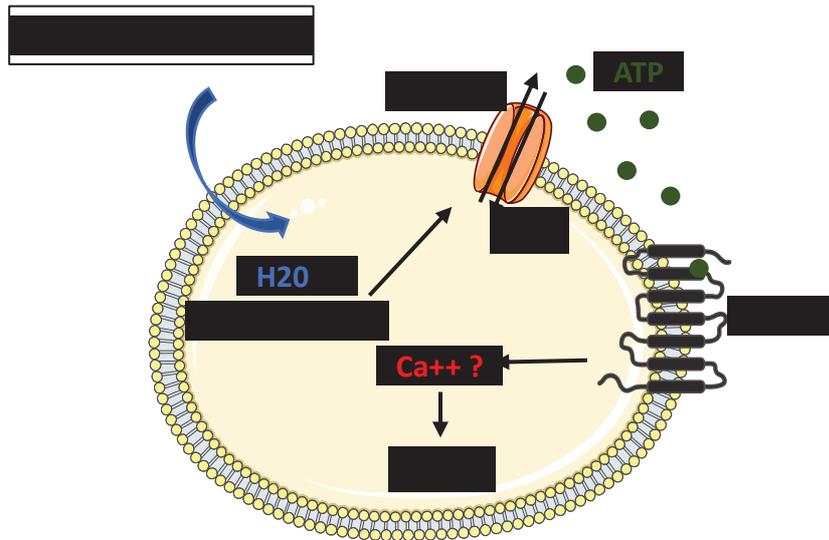


**Figure 75 : Effet de l'ATP exogène sur le RDV suite à un choc hypotonique de 90 mOsm dans des macrophages sauvages**

Suivi en vidéomicroscopie de la surface cellulaire de macrophages WT (A) et shRNA-LRRC8A (B) exprimant l'outil P2X2-K69A-GCaMP6s grâce à la fluorescence de la protéine mScarlet (1 acquisition/minute sur 70 minutes). La variation du volume cellulaire a été suivie en l'absence ou en présence de 1 et 10  $\mu\text{M}$  ATP appliqués 10 minutes post-choc hypotonique 90 mOsm (flèche noire). Les courbes représentent 4 expériences indépendantes ( $n=4$ ). Chaque expérience est la moyenne de 20 à 60 cellules.

#### IV.2.3.6. Hypothèse sur les voies moléculaires impliquées

Alors que les canaux LRRC8 sont indispensables à la phase de RVD, l'ATP libérée via l'activation de LRRC8 semble principalement être impliqué dans la vitesse du RVD. L'implication de l'ATP dans la régulation du volume cellulaire a été montrée dans plusieurs types cellulaires<sup>355,357,358</sup>. Nos résultats montrent, pour la première fois sur macrophages, que l'ATP est aussi impliquée dans la régulation du volume cellulaire suite à un choc hypotonique. Comme décrit en introduction, les voies généralement décrites sont dépendantes de l'activation des récepteurs P2Y et d'une augmentation de calcium intracellulaire. La quantité d'ATP libérée dans nos différentes conditions correspond à une activation possible de certains P2Y sensibles à l'ATP et à l'ADP. Basé sur nos résultats et les données de la littérature, le modèle représenté en Figure 76 peut être échafaudé. Bien que cette hypothèse n'ait pas pu être testée par manque de temps, l'utilisation d'antagonistes P2Y ainsi que de chélateurs du calcium intracellulaire pourrait permettre de préciser les voies de signalisation impliquées.



**Figure 76 : Hypothèse sur le rôle de l'ATP libérée dans la régulation du volume cellulaire**

L'ATP est impliquée dans la régulation du volume cellulaire suite à un choc hypotonique. Les voies moléculaires impliquées pourraient être dépendantes de l'activation des P2Y et d'une augmentation de calcium intracellulaire. La quantité d'ATP libérée dans nos différentes conditions est compatible avec une activation possible de certains récepteurs P2Y.

# *Conclusion*

## I. Les outils P2X-GCaMP6s

### I.1. Bilan sur les outils P2X-GCaMP6s

Afin de développer des biosenseurs de l'activité P2X, nous avons fusionné la protéine GCaMP6s aux récepteurs P2X2, P2X4, P2X5 et P2X7. La caractérisation électrophysiologique a montré que ces fusions sont fonctionnelles et ne semblent pas modifier les propriétés intrinsèques du canal. Ces outils sont capables d'émettre un signal fluorescent reflétant l'activité des récepteurs P2X. La fluorescence observée est très spécifique comme en atteste l'activité quasi nulle des mutants du site de liaison à l'ATP (P2X-K69A) en réponse à l'ATP ou à d'autres sources d'élévation du calcium intracellulaire. Nous n'avons pas pu démontrer la fonctionnalité des outils P2X1-GCaMP6s et P2X3-GCaMP6s du fait de la désensibilisation rapide de ces récepteurs. Des expériences supplémentaires, avec une fréquence d'acquisition rapide de la fluorescence et une application rapide des agonistes, seront nécessaires pour valider ces constructions. Les outils P2X2-GCaMP6s et P2X4-GCaMP6s ont été caractérisés sur différentes lignées cellulaires mais également sur des cultures primaires de neurones hippocampiques grâce à une approche lentivirale. Ces résultats démontrent la compatibilité de ces biosenseurs pour leur utilisation dans des systèmes plus intégrés tels que des tranches organotypiques ou même *in vivo*.

#### I.1.1. Avantages et limites des outils P2X-GCaMP6s

##### I.1.1.1. Avantages des outils P2X-GCaMP6s

Le principal avantage des outils P2X-GCaMP6s est leur capacité à être encodés génétiquement, théoriquement, dans n'importe quel type cellulaire par l'utilisation de promoteurs spécifiques. Par exemple, l'utilisation de lentivirus exprimant l'outil P2X2-GCaMP6s sous le contrôle du promoteur neuronal CaMKII $\alpha$  nous a permis d'exprimer spécifiquement cet outil dans des neurones primaires hippocampiques et de mettre en évidence, par le biais de l'activité de l'outil PG, une libération d'ATP par les neurones suite à une dépolarisation au KCl.

Un autre avantage non négligeable de ces outils est leur capacité à discriminer l'activité P2X de l'activité P2Y. En effet, contrairement aux senseurs calciques libres, les outils P2X-GCaMP6s permettent l'étude des récepteurs P2X sans être contaminés par les réponses « P2Y1-like », entraînant une libération de calcium des stocks intracellulaires.

Enfin, par rapport aux mêmes types d'outils précédemment développés (P2X-Caméléon), les outils P2X-GCaMP6s, de par les performances de fluorescence de la GCaMP6s, permettent une détection simplifiée de signaux qui ne nécessitent pas l'utilisation d'un microscope FRET. Les protéines GCaMPs étant plus petites que les protéines Caméléons (430 acides aminés contre 653 acides aminés), les défauts d'adressage de P2X-Caméléon mis en évidence au laboratoire ne semblent pas être observés sur les cellules exprimant l'outil P2X-GCaMP6s.

### I.1.1.2. Limites des outils P2X-GCaMP6s

La principale limite de ce genre d'outils est la toxicité engendrée par une activation soutenue des récepteurs P2X-GCaMP6s. En effet, certains P2X (dont P2X4) sont fortement perméables au calcium. Une surexpression de ces biosenseurs combinée à une activation basale par l'ATP ambiant pourrait entraîner une entrée de calcium faible mais constante conduisant à une cytotoxicité. Des contrôles sont donc nécessaires pour s'assurer que l'expression de l'outil n'est pas toxique. L'utilisation de méthodes lentivirales permettant une expression proche de l'expression endogène pourrait en partie limiter ces effets. Enfin la mise en place de stratégies permettant une expression inductible de nos outils paraît aussi intéressante.

## I.2. Les futures applications

### I.2.1. Utilisation de l'outil P2X2-GCaMP6s pour l'étude des récepteurs P2X neuronaux

Comme décrit en introduction, les récepteurs P2X neuronaux peuvent être exprimés au niveau dendritique et à la synapse (en pré et post-synaptique). Les récepteurs P2X post-synaptiques peuvent moduler, directement ou indirectement, les transmissions glutamatergiques et GABAergiques, via la modulation de l'activité des récepteur AMPA, NMDA et GABA<sub>A</sub><sup>420</sup>. Aujourd'hui on ne connaît pas précisément les caractéristiques spatio-temporelles d'activation des récepteurs P2X neuronaux.

Les travaux décrits dans cette thèse offrent la possibilité d'exprimer spécifiquement l'outil P2X2-GCaMP6s dans des neurones primaires hippocampiques et de suivre son activité en temps réel suite à l'application d'ATP, à une dépolarisation induite par le KCl, et éventuellement à une activité synaptique. De plus, nos études biochimiques ont mis en évidence un enrichissement synaptique de l'outil P2X2-GCaMP6s. L'utilisation de microscopes permettant l'acquisition de la fluorescence avec une forte précision spatio-temporelle devrait permettre d'utiliser ces outils pour suivre en temps réel leur activité à la synapse.

### I.2.2. Utilisation de l'outil P2X-GCaMP6s pour l'étude des récepteurs P2X en contexte pathologique

En conditions pathologiques, les récepteurs P2X jouent un rôle important dans les douleurs neuropathiques et inflammatoires. Dans un contexte de douleurs inflammatoires, les études menées au sein du laboratoire ont montré l'importance des récepteurs P2X4 dans les macrophages lors de phénomènes douloureux et d'hypersensibilité<sup>169</sup>. Une étude plus récente montre aussi que ces mêmes récepteurs sont exprimés au niveau des neurones sensoriels et pourraient aussi participer aux douleurs inflammatoires<sup>170</sup>. Aujourd'hui, l'utilisation d'animaux P2X4 KO n'a pas permis de discriminer si la part du phénotype observé est due aux P2X4 neuronaux ou aux P2X4 exprimés par les macrophages. Parallèlement au développement d'outils génétiques permettant la délétion de P2X4 spécifiquement dans un

type cellulaire, l'expression de l'outil P2X4-GCaMP6s dans ce contexte pourrait mettre en évidence une hyperactivité du récepteur dans un type cellulaire donné et apporter des informations cruciales quant à son activation spatio-temporelle.

Enfin, l'activation de P2X7 est centrale dans le développement de plusieurs pathologies dont les phénomènes inflammatoires. Les conditions exactes dans lesquelles ce récepteur, peu affiné pour l'ATP, s'active restent débattues. La capacité de l'outil P2X7-GCaMP6s à suivre l'activité de ce dernier pourrait permettre d'étudier plus en détail les conditions dans lesquelles ce récepteur s'active et conduit aux phénomènes inflammatoires.

Hormis ces deux exemples, les outils P2X-GCaMP6s pourront, plus généralement, permettre de caractériser l'activation spatio-temporelle des P2X et éventuellement aider à identifier de nouvelles fonctions de ces récepteurs.

### 1.2.3. Utilisation des outils P2X-GCaMP6s pour l'étude des hétéromères

Si mesurer l'activité des récepteurs P2X homomériques reste techniquement compliquée, suivre spécifiquement l'activité des récepteurs P2X hétéromériques est quasiment impossible. En effet, très peu d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques ont été développés pour cibler les hétéromères P2X. Des résultats préliminaires au sein du laboratoire ont montré que des co-transfections P2X / P2X-GCaMP6s engendrent des profils de réponse fluorescentes différents de ceux observés lorsque l'outil P2X-GCaMP6s est exprimé seul. Ces résultats suggèrent que ces outils ont la capacité de détecter l'activité des récepteurs hétéromériques. Des études supplémentaires, combinant l'utilisation de sous-unités mutantes (par exemple sur le site de liaison à l'ATP) aux outils P2X-GCaMP6s, seront nécessaires pour caractériser les réponses fluorescentes spécifiques des récepteurs hétéromériques. À terme, cette approche pourrait être un moyen séduisant pour mettre en évidence la présence et l'activité de certains récepteurs hétéromériques en système natif, mais également pour développer des approches de criblage pharmacologique des hétéromères.

### 1.2.4. Utilisation des outils P2X-GCaMP6s pour cribler de nouvelles drogues

Toutes les expériences sur cellules HEK ont été réalisées en plaque 96 puits et les signaux fluorescents enregistrés grâce à un lecteur de plaques. Une approche similaire en plaque 384 puits pourrait être utilisée afin de cribler et de caractériser de nouveaux agonistes et antagonistes.

## **II. Les biosenseurs d'ATP PNG et PPG**

### **II.1. Bilan sur les biosenseurs PNG et PPG**

Les propriétés des récepteurs P2X<sub>2</sub>, comme son expression membranaire, sa faible désensibilisation suite à l'application d'ATP et sa perméabilité calcique « modérée », en ont fait un candidat de choix pour la création de biosenseurs à l'ATP extracellulaire. L'insertion de mutations au niveau des TM de l'outil P2X<sub>2</sub>-GCaMP6s a permis de générer deux mutants, P2X<sub>2</sub>-N333A-GCaMP6s (PNG) et P2X<sub>2</sub>-P329A-GCaMP6s (PPG), dont l'affinité pour l'ATP est fortement augmentée. Les courbes dose-réponse montrent que ces biosenseurs sont capables de détecter une concentration théorique d'ATP de l'ordre de la centaine de nanomolaire (avec une EC<sub>50</sub> autour de 300/400 nM).

Ces deux biosenseurs ont permis de détecter la libération de faible quantité d'ATP endogène (autour de 200 nM) suite à l'application de différents chocs hypotoniques, et de mettre en évidence une forte variabilité cellulaire dans la libération d'ATP. Pour de fortes quantités d'ATP libérée, entre 1 et 10 µM, l'utilisation de l'outil PG, moins affin, paraît plus adapté.

#### **II.1.1. Avantages et limites des biosenseurs**

Théoriquement, un biosenseur d'ATP idéal doit permettre de détecter une molécule d'intérêt sans interférer avec la quantité de cette dernière, sans activer de signalisation cellulaire, sans être toxique et sans être sensible aux facteurs environnementaux. En réalité, peu d'outils répondent simultanément à ces critères et le choix d'un biosenseur dépend principalement de la question biologique posée et des moyens expérimentaux mis en œuvre pour y répondre. Dans ce cadre, il est tout à fait intéressant de résumer les avantages et inconvénients de nos outils PNG et PPG et de les comparer aux principales méthodes actuellement disponibles pour détecter l'ATP extracellulaire (Tableau 3).

##### **II.1.1.1. Avantages des biosenseurs à l'ATP PNG et PPG**

Comme pour les outils P2X-GCaMP6s, les biosenseurs PNG et PPG peuvent être encodés génétiquement dans un type cellulaire donné grâce à l'utilisation de méthodes virales et de promoteurs spécifiques.

Grâce aux biosenseurs PG, PNG et PPG, il est possible de détecter et quantifier une libération d'ATP comprise entre 0,1 et 10 µM. Si l'on prend en compte P2X<sub>7</sub>-GCaMP6s, ces outils couvrent une large gamme d'ATP de 100 nM à plus de 100 µM. Ils paraissent donc particulièrement adaptés à l'étude de la libération endogène d'ATP.

Les propriétés de la GCaMP6s et du récepteur P2X (forts signaux fluorescents et propriétés d'activation rapide de l'ordre de la dizaine de milliseconde) permettent une détection rapide, réversible et offrant une excellente résolution spatiale de la libération d'ATP. Ces propriétés sont particulièrement importantes puisque l'ATP extracellulaire est rapidement dégradée par

les ectonucléotidases membranaires. A l'aide de microscopes adaptés, ces outils devraient permettre la détection de l'ATP avec une résolution spatio-temporelle sans précédent.

Bien que ces outils ne soient pas ratiométriques, nous avons montré que, dans un système préalablement calibré (dose-réponse à l'ATP), ces derniers s'avèrent capables de quantifier assez précisément la quantité d'ATP libérée au niveau de la membrane, ce qui restait jusqu'à présent un challenge de taille.

#### II.1.1.2. Limites des biosenseurs à l'ATP PNG et PPG

Bien que spécifique de la libération d'ATP, dans certaines conditions de forte entrée de calcium par d'autres canaux membranaires, une faible fluorescence non spécifique ( $\leq$  à 20% de la fluorescence maximale) peut être quantifiée lors de l'utilisation du mutant P2X2-K69A-GCaMP6s.

De plus, ces biosenseurs, qui ont une forte affinité pour l'ATP, se sont avérés cytotoxiques dans certaines de nos expériences. Par exemple, dans les neurones primaires l'expression des outils PNG ou PPG par approche virale conduit à une mort neuronale une semaine après la transduction. Parallèlement, nous avons constaté que l'affinité de l'outil P2X2-GCaMP6s semble plus forte dans les neurones primaires par comparaison à d'autres types cellulaires. Il est donc possible que l'ATP extracellulaire ambiant entraîne une activation des senseurs conduisant à une entrée de calcium « constitutive » toxique pour les neurones. Actuellement, la mise en place de stratégies virales inductibles au sein du laboratoire pourrait, en partie, limiter cette toxicité induite par les biosenseurs.

Enfin, l'utilisation d'un canal endogène muté comme biosenseur d'ATP est un avantage comme un inconvénient. En effet, le senseur va naturellement être envoyé à la membrane par des mécanismes propres au récepteur P2X2. Néanmoins, on sait aujourd'hui, que l'expression et l'activité des récepteurs canaux, notamment des P2X2, peuvent être régulées par l'activité d'autres récepteurs canaux ou métabotropiques. Des interactions physiques et/ou fonctionnelles ont notamment été décrites entre les récepteurs P2X2 et les récepteurs AMPA, nicotiques, sérotoninergiques ou encore GABAergiques<sup>152,155</sup>. Ces interactions fonctionnelles pourraient induire des biais expérimentaux si des contrôles appropriés ne sont pas réalisés. Ces interactions étant souvent dépendantes de la partie C-terminale du récepteur P2X2, il est possible qu'elles soient perdues ou modifiées par la fusion de la GCaMP6s à la queue C-terminale.

Pour conclure, lors de l'utilisation du biosenseur, il est important de garder à l'esprit que « l'environnement biologique » peut influencer son activité. Des contrôles systématiques de calibration et l'utilisation du mutant K69A sont donc nécessaires afin d'éviter tout biais d'interprétation quant à la libération d'ATP.

<b>Technique</b>	<b>Utilisation</b> (Méthode de détection)	<b>Avantages</b>	<b>Désavantages</b>	<b>Ref.</b>
HPLC	In vitro (UV, fluorescence)	- Méthode non toxique - Mesure quantitative de l'ATP, l'ADP et l'AMP	- Pas de visualisation possible - Détection non membranaire - Faible reproductibilité	365
Luciférase libre	In vitro (luminescence)	- Forte sensibilité - Haute affinité pour l'ATP	- Imagerie avec faible résolution spatio-temporelle - Détection non membranaire	369,370
Luciférase ciblée à la membrane (pme-Luc)	In vitro / In vivo (luminescence)	- Bonne affinité pour l'ATP - Détection de l'ATP à la membrane	- Imagerie avec faible résolution spatio-temporelle - Nécessite l'ajout de luciférine exogène	388
Senseur ciblé à la membrane basée sur le FRET	In vitro / (In vivo) (fluorescence)	- Signaux forts - Quantification ratiométrique	- Faible affinité pour l'ATP - Sensible aux variations physiques extracellulaires	421
Biosenseurs ampérométriques et/ou enzymatiques	In vitro (courants, fluorescence)	- Forte sensibilité - Forte résolution temporelle	- Faible reproductibilité - Forte sensibilité aux facteurs externes	393,394, 401,409
Mutants P2X2-GCaMP6s (PNG et PPG)	In vitro / (In vivo) (fluorescence)	- Signaux forts - Bonne affinité - Bonne résolution spatio-temporelle - Détection de l'ATP à la membrane	- Spécificité (besoin du mutant P2X2-K69A) - Toxicité possible si forte expression du senseur	-

**Tableau 3 : Récapitulatif des avantages et limites des principales méthodes utilisées pour détecter l'ATP extracellulaire**

L'utilisation, les avantages, désavantages ainsi que les références (Ref.) correspondantes sont indiqués pour les principales méthodes permettant de détecter l'ATP extracellulaire. (In vivo) signifie que la preuve de concept in vivo n'a pas encore été amenée mais est théoriquement possible ou en cours.

## II.2. Les futures applications

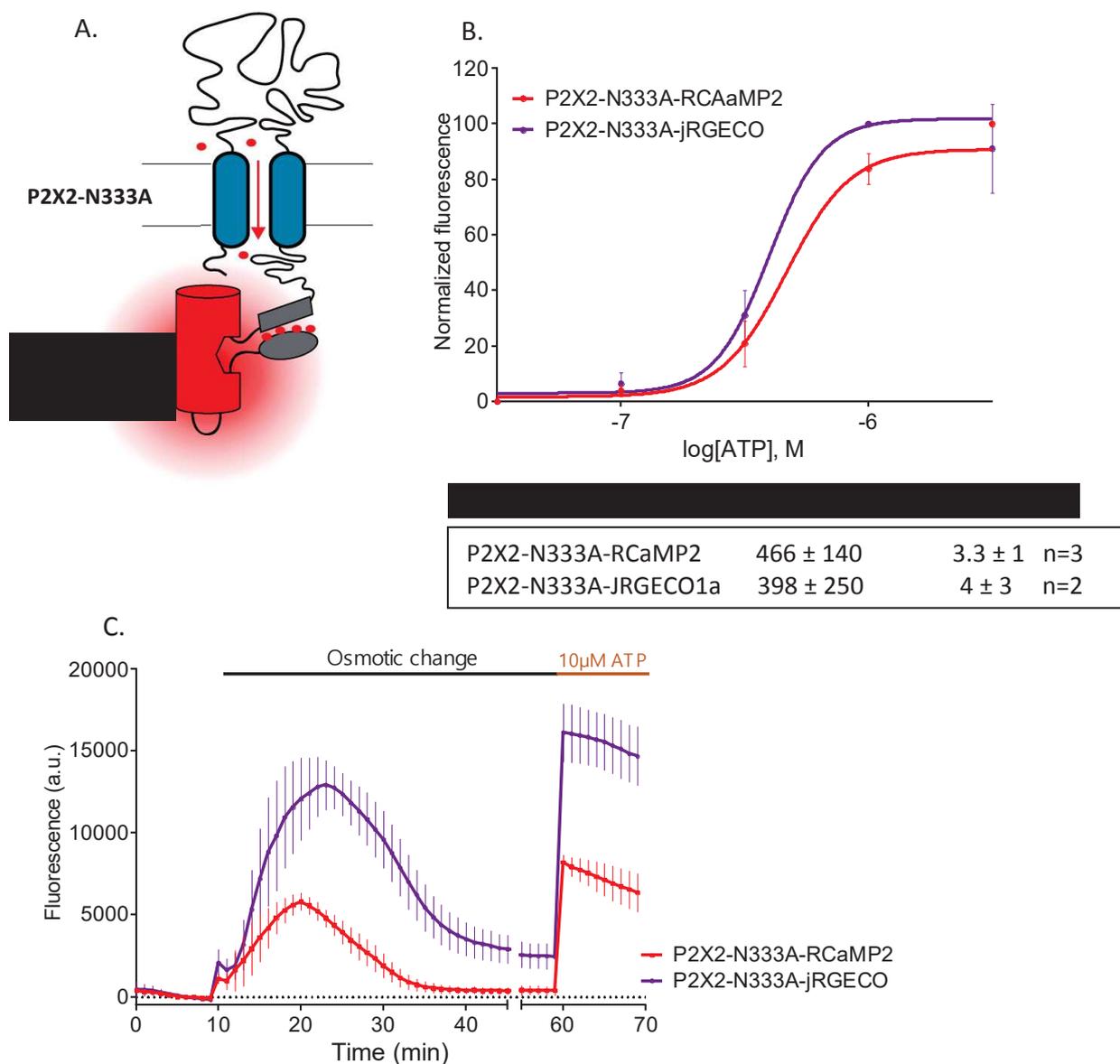
### II.2.1. Estimer la quantité d'ATP libéré et décrypter les mécanismes de la libération d'ATP *in vivo* en condition physiologique et pathologique

Aujourd'hui, les quantités d'ATP extracellulaires présentes *in vivo* au sein de différents organes en condition physiologiques et/ou pathologiques sont estimées mais restent débattues. De plus comme nous l'avons vu en introduction, les mécanismes moléculaires responsables de la libération d'ATP sont encore mal caractérisés. Nos biosenseurs représentent des outils de choix afin d'étudier avec plus de précision la libération d'ATP dans différents tissus en conditions physiologiques et/ou pathologiques.

Bien que les biosenseurs d'ATP développés dans cette étude n'aient pas été utilisés *in vivo*, une collaboration a été initiée au sein de l'institut avec le Dr. Jopling afin de créer une lignée transgénique de zebrafish exprimant le biosenseur PNG spécifiquement dans les macrophages. Grâce à l'utilisation d'un promoteur spécifique des macrophages (promoteur *mfap4*), une lignée de zebrafish est en cours de création et des résultats préliminaires supportent une expression du senseur dans les macrophages.

#### 1. Couplage avec l'optogénétique ou d'autres outils fluorescents

Un point important est de pouvoir utiliser ces biosenseurs en combinaison avec d'autres outils fluorescents. Les canaux rhodopsines ainsi que la plupart des outils fluorescents étant excités aux mêmes longueurs d'onde que la GCaMP6 (environ 470 nm), nous avons décidé de fusionner deux GECIs rouges récemment développés au mutant P2X2-N333A (Figure 77A). Ces GECIs rouges présentent des améliorations importantes de leurs propriétés de fluorescence qui les rapprochent des GCaMP6<sup>213,214</sup>. Nous avons ainsi développé deux nouveaux biosenseurs rouges, P2X2-N333A-RCaMP2 et P2X2-N333A-jRGECO1a. La caractérisation de ces outils sur cellules HEK montre des affinités pour l'ATP semblable à celle décrites pour l'outil PNG (EC50 entre 300 et 400 nM) (Figure 77B). De façon intéressante ces outils sont aussi capables de détecter une libération d'ATP endogène suite à l'application d'un choc hypotonique (Figure 77C). Ce résultat montre que ces outils peuvent être utilisés de la même manière que le biosenseur PNG. Enfin, la fusion P2X2-N333A-jRGECO1a semble particulièrement intéressante puisque les signaux fluorescents bruts induits par la libération d'ATP endogène sont pratiquement trois fois supérieurs à ceux observés pour la fusion P2X2-N333A-RCaMP2. Développer des biosenseurs rouges pourrait donc s'avérer très utile pour étudier les mécanismes de la libération d'ATP en combinaison avec différents outils optogénétique, en particulier les canaux rhodopsine. Enfin, pour une utilisation *in vivo*, les longueurs d'ondes proches du rouge sont généralement plus pénétrantes et moins toxiques, confirmant l'intérêt de développer de tels biosenseurs.



**Figure 77: Fusion et caractérisation des outils P2X2-N333A-RCaMP2 et P2X2-N333A-jRGECO1a sur cellules HEK**

(A) Schéma du récepteur P2X dont la partie C-terminale est fusionnée à la partie M13 de la RCaMP2 ou de la jRGECO1a<sup>213,214</sup>. La propriété de perméabilité au calcium du récepteur suite à son activation par l'ATP va entraîner l'activation des senseurs calciques fusionnés et l'augmentation réversible de la fluorescence. (B) Dose-réponse de la fluorescence de P2X2-N333A-RCaMP2 et P2X2-N333A-jRGECO1a en fonction de la concentration d'ATP (Pour chaque dose d'ATP, aire sous la courbe suite à une acquisition de la fluorescence toutes les 5 secondes pendant 3 minutes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/540$ ) et tableau des EC50 et nH calculés par le logiciel Prism. (C) Enregistrement de la fluorescence ( $F-F_0$ ) au cours du temps (70 min) suite à l'application d'un choc hypotonique de 50 % (160 mOsm) suivi d'une stimulation finale à l'ATP de 10  $\mu$ M sur des cellules HEK exprimant les biosenseurs P2X2-N333A-RCaMP2 et P2X2-N333A-jRGECO1a. Les courbes représentent la moyenne de 5 expériences indépendantes ( $n = 5$ ). Chaque expérience est la moyenne d'un triplicat. Acquisition de la fluorescence toutes les minutes grâce à un lecteur de plaques,  $\lambda_{exc/em} = 485/540$ .

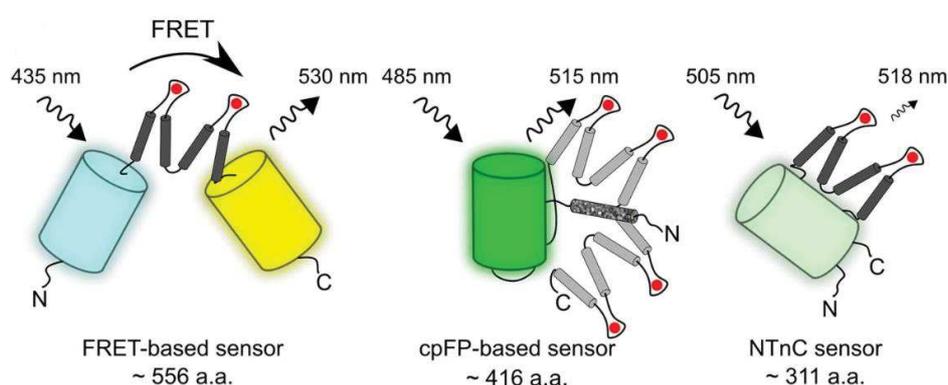
## II.2.2. Vers de nouveaux biosenseurs purinergiques améliorés ?

### II.2.2.1. Points d'améliorations possibles des outils PNG et PPG

Les caractéristiques de nos biosenseurs dépendent à la fois des propriétés physiques du canal P2X2 muté mais aussi des caractéristiques des sondes calciques fluorescentes utilisées. Ces deux parties pourraient être améliorées afin de pallier certaines limites actuelles.

Une des limites principales est l'entrée de calcium due à l'activation des senseurs. En raison de la forte affinité des protéines GCaMP6 pour le calcium, on pourrait imaginer diminuer la perméabilité calcique des récepteurs P2X2 mutés pour diminuer la toxicité de ces constructions sans toutefois affecter la brillance et la sensibilité du biosenseur. Des études de mutagenèse ont mis en évidence des mutations au niveau des segments transmembranaires entraînant une forte diminution de la perméabilité calcique des canaux P2X<sup>112</sup>. L'insertion de telles mutations sur nos biosenseurs PNG ou PPG pourrait permettre de diminuer la toxicité et/ou la signalisation calcique induite par l'ouverture du canal.

Des observations faites au sein du laboratoire ont montré que la fusion des senseurs calciques Caméléons (653 a.a) (senseurs basés sur le FRET) au récepteur P2X2 pouvait conduire à des défauts d'adressage du récepteur à la membrane plasmique. Dans notre cas, la fusion de la protéine GCaMP6s ne parait pas induire de tels défauts. Néanmoins, la GCaMP6s reste un partenaire de fusion de 416 résidus qui affecte probablement l'expression fonctionnelle du récepteur. Récemment, un nouveau type de GECIs a été caractérisé (Figure 78)<sup>423</sup>. Nommés NTnC, ce senseur calcique est basé sur la fusion de la Troponine C à la protéine fluorescente verte mNeon. Bien que les signaux de fluorescence aient une dynamique proche de celles des GCaMP6s, ils restent inférieurs en termes de brillance. L'amélioration de ce genre de GECIs pourrait s'avérer intéressante pour créer des biosenseurs plus petits et mieux exprimés à la membrane.



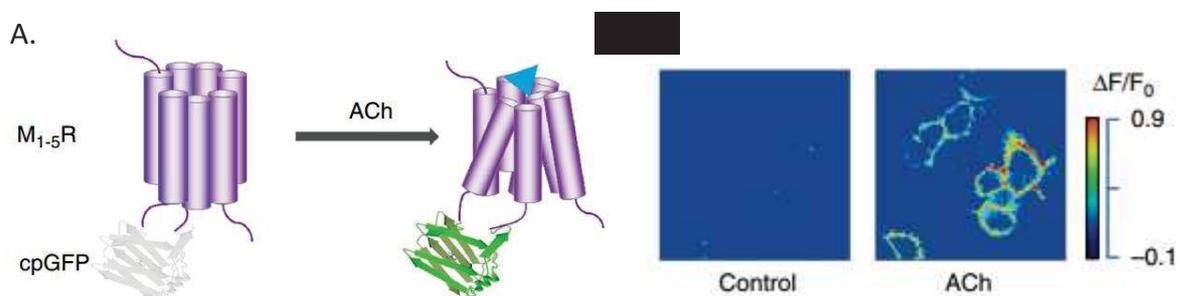
**Figure 78: Principaux types de senseurs calciques GECI disponibles classés selon leur taille (D'après Barykina et al<sup>426</sup>)**

Représentation des trois types de GECIs actuellement disponibles classés selon leur taille. Les senseurs basés sur le FRET comme les protéines Caméléons ont une taille importante (> 556 a.a.). Les protéines basées sur des hémifluorochromes permutés (cpFP) comme les GCaMP ont une taille intermédiaire alors que les nouveaux senseurs NTnC ont une plus petite taille (311 a.a.).

### II.2.2.2. Vers d'autres biosenseurs purinergiques fluorescents basés sur la fusion de cpEGFP aux récepteurs

Tout récemment, de nouveaux types de biosenseurs basés sur la fusion de récepteurs couplés aux G protéines à une GFP permutée (cpGFP) ont vu le jour<sup>424-426</sup>. Ces biosenseurs sont basés sur l'insertion de la cpEGFP dans la troisième boucle intracellulaire de différents GPCR. Les changements de conformations induits par la fixation du ligand et l'activation du récepteur vont entraîner un rapprochement des deux parties de la cpGFP et une augmentation réversible de la fluorescence. Ces senseurs ont d'abord été développés sur les récepteurs M3 de l'acétylcholine (senseur GACH)<sup>424</sup> (Figure 79) puis sur les récepteurs D2 de la dopamine (senseur Dlight1 et GRABDA)<sup>425,426</sup>. Des études ont montré, *in vitro* et *in vivo*, la capacité de ces différents senseurs à détecter en temps réel la libération de faibles quantités de ces neurotransmetteurs. De façon tout à fait intéressante, la fusion au niveau de la boucle intracellulaire perturbe la signalisation endogène des récepteurs et le couplage aux protéines G. Ces senseurs sont donc inactifs en termes de signalisation intracellulaire. Théoriquement, cette stratégie est applicable à tous les GPCR. Les auteurs du senseur Dlight1 en ont fait la preuve de concept *in vitro* sur les récepteurs  $\beta$  et  $\alpha$ -adrénergique, aux opioïdes ( $\kappa$  et  $\pi$ ), à la sérotonine (5HT2A) et à la mélatonine (MT2).

Dans ce contexte, on pourrait imaginer développer un senseur à l'ATP extracellulaire basé sur les récepteurs P2Y. L'avantage majeur de ces outils serait de pouvoir détecter l'ATP extracellulaire sans activer de signalisation intracellulaire. Cependant l'inconvénient est que les récepteurs P2Y sont activables par plusieurs ligands endogènes (ATP, ADP, UTP, ...).



**Figure 79: Développement de nouveaux biosenseurs à l'acétylcholine basé sur la fusion d'une cpEGFP aux récepteurs muscariniques (D'après Jing et al,<sup>427</sup>)**

(A) Principe des biosenseurs à l'acétylcholine. La cpEGFP est fusionnée à la troisième boucle intracellulaire. La fixation de l'acétylcholine va entraîner un changement de conformation des TM5 et TM6 induisant une augmentation de la fluorescence de la GFP permutée. (B) Observation d'une augmentation de la fluorescence sur cellules HEK exprimant le senseur GACH et stimulée avec 100  $\mu$ M d'Acétylcholine. Dans cet exemple, la cpGFP est fusionnée au récepteur muscarinique M3.

### **III. Rôle du canal LRRC8 dans la libération d'ATP**

#### **III.1. Bilan sur les résultats obtenus**

Le canal LRRC8A, nécessaire à la régulation du volume cellulaire suite à un choc hypotonique, a été décrit comme potentiellement perméable à l'ATP<sup>348</sup>. Néanmoins, avant cette étude, aucune ne s'était intéressée au rôle de ce canal dans la libération d'ATP dans un contexte de changement osmotique. Par des approches pharmacologiques et génétiques nous avons mis en évidence l'implication du canal LRRC8 dans la libération d'ATP dans des cellules HEK mais aussi dans une lignée de monocytes humains différenciés en macrophages. Dans les cellules HEK, la libération d'ATP suite à un choc osmotique semble partiellement dépendante des canaux chlorure (environ 60 %), suggérant que d'autres mécanismes de libération d'ATP sont mis en jeu dans ce type cellulaire. Dans les cellules THP-1 différenciées en macrophages, la libération d'ATP semble totalement inhibée suite à l'inhibition du canal LRRC8. Bien qu'une perméabilité directe du canal pour l'ATP ne soit pas prouvée, on peut conclure que le canal LRRC8 contribue à la libération d'ATP extracellulaire en conditions hypotoniques. L'expression du canal chlore étant ubiquitaire, il serait intéressant d'évaluer son implication au sein des différentes cellules du système nerveux et ce dans un contexte intégré. On sait par exemple qu'une forte activité neuronale peut conduire à un gonflement axonale<sup>324</sup> et même à une augmentation du volume astrocytaire<sup>323</sup>. L'implication du canal chlore et de sa perméabilité à l'ATP dans ce contexte reste aujourd'hui totalement inconnue. Les résultats obtenus amènent donc de nombreuses nouvelles questions dans un champ d'étude en pleine expansion.

#### **III.2. Rôles potentiels de la libération d'ATP dépendante des récepteurs LRRC8**

Les résultats obtenus sur cellules HEK et macrophages montrent une forte corrélation temporelle entre la libération d'ATP et l'initiation de la phase de RVD. Cette observation et les données de la littérature suggèrent un rôle autocrine de l'ATP libérée dans la régulation du volume cellulaire suite à un choc hypotonique. Nos résultats montrent que les macrophages libérant plus d'ATP ont un RVD plus rapide, et que le traitement des cellules par l'apyrase inhibe fortement la phase de RVD. Ces résultats confirment l'implication de l'ATP dans la régulation du volume cellulaire. Ces résultats ont déjà été décrits sur plusieurs types de cellules épithéliales mais les mécanismes moléculaires sous-jacents restent flous. Au vu des quantités d'ATP libérées, une implication des récepteurs « P2Y1-like » menant à une augmentation du calcium intracellulaire n'est pas à exclure (hypothèse Figure 75). Des études supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Comme mentionné précédemment, des résultats obtenus au sein du laboratoire ont montré que l'activation d'un canal chlorure peut induire l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la libération d'IL-1 $\beta$ . L'ATP libérée lors de l'activation du canal LRRC8 pourrait-il participer à l'activation de l'inflammasome ? Au vu des quantités d'ATP libérées (de l'ordre du

micromolaire), l'activation de P2X7 semble peu probable. Néanmoins il n'est pas exclu que d'autres récepteurs purinergiques puissent participer à l'activation de l'inflammasome. Cette hypothèse nécessite des études supplémentaires.

Enfin, la signalisation purinergique, notamment via l'activation de certains récepteurs P2X et P2Y, joue des rôles multiples et variés au niveau des cellules immunitaires. Elle contrôle de nombreuses fonctions comme la différenciation, la migration, la phagocytose ou l'apoptose. Au vu du lien fonctionnel entre les canaux LRRC8 et la signalisation purinergique, étudier la perméabilité à l'ATP du canal dans ces différents contextes cellulaires pourrait s'avérer pertinent.

# *Matériels et Méthodes*

## ***I. Biologie moléculaire***

### **I.1. Fusion des protéines GCaMP6s, RCaMP2 et jRGECO**

L'ADNc de la GCaMP6s (plasmide Addgene #40753, pGP-CMV-GCaMP6s) a été sous-cloné par digestion enzymatique dans les plasmides lentiviraux pWPT-EF1 $\alpha$ -IRES-Dsred2 ou pWPT-EF1 $\alpha$ -P2A-mScarlet. La séquence IRES-Dsred2 est issue d'un plasmide de chez Clontech. La séquence P2A-mScarlet a été directement produite par synthèse de gène (pEX-A2-P2A-mScarlet, Eurofins Genomics).

Pour les fusions aux récepteurs P2X, la GCaMP6s a été amplifiée sans sa méthionine par PCR flanquée par les sites de restrictions Hind3 et Pme1 puis insérée dans le cadre de lecture de l'extrémité 3' des récepteurs P2X dans un plasmide pcDNA3-P2X (Hind3/Pme1). Par la suite, des sous clonages ont permis d'insérer les outils P2X-GCaMP6s dans les plasmides pWPT-EF1 $\alpha$ -IRES-Dsred2, pWPT-EF1 $\alpha$ -P2A-mScarlet ou pWPT-CaMKII $\alpha$ . Une stratégie similaire a été adoptée pour la fusion des protéines RCaMP2<sup>213</sup> (don de l'équipe du Dr. Perroy) et jRGECO1a<sup>214</sup> (plasmide Addgene#61563, pGP-CMV-jRGECO1a).

### **I.2. Mutagenèse sur P2X2-GCaMP6s**

Les mutants P2X2-K69A, P2X4-K69A, P2X2-N333A et P2X2-I328A ont été précédemment réalisés au sein du laboratoire. Les mutations, P2X2-P329A, P2X2-I40A et P2X2-V343A ont été insérées par PCR (Kit de mutagenèse dirigé Q5, NEB #E0552S) dans le récepteur P2X2 (plasmide pcDNA3). Les mutants P2X2-N333A-GCaMP6s et P2X2-P329A-GCaMP6s ont ensuite été sous clonés dans les plasmides lentiviraux pWPT-EF1 $\alpha$ -IRES-Dsred2 ou pWPT-EF1 $\alpha$ -P2A-mScarlet (Pme1/RsR2).

## ***II. Culture cellulaire, transfection et transduction***

### **II.1. Culture et transfection des cellules HEK**

Les cellules HEK293T, HEK LRRC8A KO et la lignée HEK mère associée sont cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) + glutamaX supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau foetal decomplémenté) (Invitrogen) et 1 % Penicillin-Streptomycin (PS) (10,000 U/mL) (Gibco). Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Pour leur entretien bihebdomadaire, les cellules sont rincées au tampon PBS (tampon phosphate salin) avant d'être traitées au Versène (Gibco) pour permettre leur détachement de la surface de culture. Les cellules sont ensuiteensemencées en plaques 6 puits puis transfectées 24h plus tard à la lipofectamine 2000 (Invitrogen), sauf si indiqué autrement. 24h post-transfection, les cellules sont réensemencées en plaques 96 puits prétraitées à la poly-O-Lysine (Sigma) (100 000 cellules/puits). 48h post-transfection, les expériences en lecteur de plaques ou en vidéomicroscopie sont réalisées.

Les cellules HEK sont transfectées avec 1 µg de plasmide codant pour les biosenseurs P2X-GECI et 500 ng pour la GCaMP6s cytosolique. Le plasmide TRPV1 est transfecté avec 60 ng d'ADN. Pour les expériences de co-transfection avec les sous-unités du récepteur NMDA, les cellules sont transfectées avec les plasmides codants pour NR1 (20 ng/35 mm) et NR2A (60 ng/35 mm) grâce à la technique de précipitation au phosphate de calcium directement en 96 puits. Les cellules sont cultivées en présence de l'antagoniste AP5 (100 µM) et les expériences sont réalisées 24h post-transfection pour limiter la toxicité cellulaire liée à la surexpression de ces récepteurs canaux.

## **II.2. Production de lentivirus**

Pour la production des lentivirus, les cellules HEK293T sontensemencées en boîte 15 cm à une confluence de 60-70 %. 24h après, les cellules sont transfectées grâce à la technique de précipitation au phosphate de calcium avec le plasmide d'intérêt et les plasmides codant pour les enveloppes virales (pMD2G = 5 µg, psPAX2 = 15 µg, plasmide d'intérêt = 20 µg). 6h post-transfection, le milieu est remplacé par un milieu DMEM 1 % SVF, 1 % PS. 72h post-transfection, le surnageant est récupéré puis filtré avec des filtres 0,45 µm (Millipore). A ce surnageant est ajouté du polyéthylène glycol (40 % PEG 600) 4X, puis le tout est incubé à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, les tubes sont centrifugés 30 minutes à 2600 g à 4°C et le culot est repris dans 100 µl de PBS. Des aliquots de 10 µl sont stockés à -80°C.

## **II.3. Culture et transduction de la lignée astrocytaire 1321N1**

La lignée astrocytaire 1321N1 est maintenue de la même façon et dans les mêmes milieux que les cellules HEK. Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à une confluence d'environ 50% (environ 1 million de cellules par puits). Le lendemain, les cellules sont transduites avec 6 µl de virus + 6 µl de LentiBlast, un agent favorisant la transduction des cellules (3 µl de LentiBlast A + 3 µl de LentiBlast B, Ozbioscience). Ces lignées, transduites avec des lentivirus vont exprimer de façon stable les biosenseurs. Elles vont ensuite être entretenues classiquement puis passées en plaques 96 puits (100.000 cellules /puits) pré-traitées à la poly-Ornithine grâce à l'utilisation de trypsine-EDTA 0,05 % (Gibco) au minimum après 10 jours post-transduction. Les expériences sont réalisées 24h après l'ensemencement.

## **II.4. Culture et transduction de la lignée monocyttaire THP-1**

Les THP-1 sont des monocytes humains cultivés en suspension dans un milieu RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté avec 10 % de SVF (Invitrogen) et 1 % PS (10,000 U/mL) (Gibco). Les cellules sontensemencées en plaques 6 puits à une confluence d'environ 50 % (environ 1 million de cellules). Le lendemain, les cellules sont transduites avec 6 µl de virus + 6 µl LentiBlast (3 µl de LentiBlast A + 3 µl de LentiBlast B). Ces lignées sont passées deux fois par semaine. 10 jours post transduction au plus tôt, les cellules sont centrifugées (1000 g) à température ambiante puis reprises dans le milieu de culture + 200 nM PMA (phorbol 12-

myristate 13-acetate) (Sigma) et ensemencées en plaque 96 puits à 140 000 cellules par puits. 40 minutes plus tard, le milieu est changé par du milieu culture. Les expériences en lecteur de plaques sont réalisées 72h post-PMA. Dans ce cas, un autre changement de milieu est réalisé la veille. Les expériences en vidéomicroscopie sont réalisées 24h post-PMA.

## **II.5. Création des lignées HEK LRRC8-KO et THP-1 shRNA-LRRC8A**

La lignée HEK LRRC8A KO est un don du Dr. Jentsh Thomas. Cette lignée a été générée par l'approche CrispR-cas9. Elle correspond à une insertion de 55 nucléotides à la position T121 entraînant un décalage du cadre de lecture et à une protéine tronquée non fonctionnelle.

La lignée THP-1 shRNA-LRRC8A a été obtenue suite à l'expression stable d'un shRNA contre le canal LRRC8A (Sigma. TRCN0000118623) par des méthodes lentivirales. Les cellules exprimant le shRNA ont été sélectionnées grâce à un gène de résistance à la puromycine (3 µg/ml).

## **II.6. Culture et transduction de neurones primaires hippocampiques**

Les cultures de neurones primaires d'hippocampes sont faites à partir de souris nouveau-nés (P0 à P3). Les hippocampes des nouveau-nés sont isolés puis conservés dans du milieu Hybernate-A + P/S (Thermofisher) froid (4°C) lors de la dissection. 500 µl de papaïne (Sigma) est ajoutée aux hippocampes puis ces derniers sont incubés 10 minutes à 37°C. 50 µl de DNase1 (Roche) est ajoutée et le tissu dissocié mécaniquement à la P1000, puis incubé 5 minutes à 37°C. 2 ml de milieu MC+ est ajouté et les neurones de nouveaux dissociés mécaniquement. Les débris sont séparés par gravité et la dissociation est répétée deux fois. Le milieu contenant les neurones dissociés est ensuite délicatement ajouté à 2 ml d'un milieu PBS-GAB-HEPES 4 % BSA. Le tout est centrifugé 7 minutes à 300 g. Le culot est repris dans 2,5 ml de milieu MC+ (par nouveau-né) et 1 ml est ensemencé par boîte 35mm (Ibidi). A DIV2 les neurones sont traités avec 1 µM final d'AraC pour éviter la prolifération astrocytaire. A DIV3, le milieu est remplacé par du milieu MC-. Les neurones sont transduits à DIV7 avec 6 à 10 µl du virus d'intérêt. Les expériences en vidéomicroscopie sont réalisées 8-10 jours post-transduction (entre DIV15 et DIV17).

Milieu MC- : milieu brainPhys (Stemcell technologies), B27 (gibco), Glutamax (100X, Invitrogen) et P/S. Milieu MC+ : Neurobasal-A (Thermofisher), B27 (gibco), Glutamax (100X, Invitrogen), P/S, SVF, Glutamine (100X, Invitrogen)

## ***III. Enregistrement et analyse des signaux fluorescents***

### **III.1. Expériences réalisées en lecteur de plaques**

Pour les cellules HEK, les expériences sont réalisées 48h post-transfection (ou 24h pour les expériences de co-transfection). Les cellules sont rincées puis pré-incubées 15 minutes dans 50 µL par puits de tampon FLEX à 37°C (HBSS 1X sans Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> (gibco), 20 mM HEPES pH7.4, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>), 5% CO<sub>2</sub>. Pour les expériences sans calcium, les

cellules sont pré-incubées avec un tampon FLEX sans calcium + 1mM EGTA final. Pour le choc hypotonique de 25 % ( $\approx 240$  mOsm), 25  $\mu$ l d'eau + 1,3 mM  $\text{CaCl}_2$  sont ajoutés dans les puits contenant 50  $\mu$ l de tampon FLEX. Pour le choc hypotonique de 50 % ( $\approx 160$  mOsm), 50  $\mu$ l d'eau + 1,3 mM  $\text{CaCl}_2$  sont ajoutés. La concentration osmotique des solutions est vérifiée grâce à un osmomètre. Pour les expériences de pharmacologie, les drogues DCPIB (Tocris, 20  $\mu$ M final) et CBX (Sigma, 50  $\mu$ M final) sont ajoutées à 2X au moment du choc hypotonique. La stimulation finale consiste à ajouter 10  $\mu$ l d'ATP 11X (110  $\mu$ M) dilué dans un tampon FLEX à la concentration osmotique correspondante. Pour les expériences de mesure du volume cellulaire, les cellules sont incubées 40 minutes avec 10  $\mu$ M de calcein Green-AM (HelloBio) puis rincées deux fois avec du tampon FLEX. Les mesures sont réalisées 20 minutes après ces lavages.

Pour les cellules 1321N1, les expériences sont réalisées en plaque 96 puits au plus tôt 10 jours post-transduction et 24h post-ensemencement. Les cellules sont incubées dans le même milieu FLEX. Les chocs hypotoniques sont appliqués de la même façon. Pour le choc hypotonique à 75% ( $\approx 90$  mOsm), 25  $\mu$ L de tampon sont retirés du puits et 75 $\mu$ L d'eau + 1,3 mM  $\text{CaCl}_2$  sont ajoutés.

Pour les THP-1 différenciées en macrophages, les expériences sont réalisées au plus tôt 10 jours post-transduction et 72h post-PMA. Un changement de milieu est réalisé 24h avant l'expérience. Les cellules sont rincées puis pré-incubées 15 minutes dans 50  $\mu$ L du tampon FLEX « Low  $\text{Ca}^{2+}$  » à 37°C, 5 %  $\text{CO}_2$  (tampon FLEX + 0.4 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Dans ce cas, les drogues sont pré-incubées au 1X 15 minutes avant l'expérience et sont ajoutées au 1X lors du choc hypotonique.

L'acquisition est réalisée avec deux lecteurs de plaques différents : une FLEXstation 3 (Molecular Devices) équipée d'injecteurs automatiques (acquisition toutes les 1.5 secondes,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/538$ ) ou un INFINITY 500 (TECAN) sans injecteur (acquisition toutes les 7 secondes,  $\lambda_{\text{exc/em}} = 485/538$ ). Les deux lecteurs permettent le maintien d'une température à 37°C tout au long de l'expérience.

### **III.2. Expériences réalisées en vidéomicroscopie**

Les expériences en vidéomicroscopie sur les cellules HEK, 1321N1 et neurones primaires sont réalisées grâce à un microscope à épifluorescence OLYMPUS IX70 (caméra Evolve Photometrics) équipé d'une plaque chauffante à 37°C et piloté par le logiciel Métamorphe. Le microscope est équipé d'un système de perfusion permettant l'application locale de drogue. Les cellules HEK et 1321N1 sont ensemencées à 50 % de confluence dans des boîtes 35 mm (Ibidi #81156) et le milieu FLEX utilisé est le même que celui décrit pour les expériences en lecteur de plaques. Les neurones primaires hippocampiques sont incubés avec un milieu extracellulaire ACSF (150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 3 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7.4, 10 mM D-Glucose). Les milieux à 25 mM et 50 mM de KCl sont compensés avec du NaCl. Le pH est ajusté

à 7,4 et l'osmolarité est vérifiée avec un osmomètre (330 mOsm). La fréquence d'acquisition est de 1 Hz ( $\lambda_{exc/em} = 485/540$ ).

Pour les cellules THP-1, les expériences de vidéomicroscopie sont réalisées grâce à un microscope à épifluorescence ZEISS AXIO OBSERVER 7 (caméra CMOS Hamamatsu ORCA) en champ plein inversé équipé d'une plaque motorisée et d'une chambre d'incubation (37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>) piloté par le logiciel ZEN. Les expériences sont réalisées 24h post-PMA dans un milieu « low Ca<sup>2+</sup> ». La fréquence d'acquisition est d'une image par minute pour chaque canal ( $\lambda_{exc/em} = 485/540$  pour le vert et  $\lambda_{exc/em} = 530/590$  pour le rouge).

### III.3. Analyses

Les données de vidéomicroscopie générées par Métamorphe pour le microscope OLYMPUS IX70 sont analysées sur Image J. Pour les THP-1, les données générées par le microscope ZEISS AXIO OBSERVER 7 sont analysées à l'aide du logiciel Imaris qui permet un suivi de l'intensité du signal vert et rouge. Une macro permettant la quantification de la surface cellulaire (signal rouge) a été spécialement créée. Toutes les données sont ensuite exportées sur des fichiers Excel ; les graphiques et les statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel Graphpad PRISM 7.

## IV. Biochimie

### IV.1. Préparation des extraits protéiques pour Western blot

Les cellules sont lavées 2 fois au PBS 1 mM calcium, 0,5 mM magnésium (PBS-CM) froid puis décollées dans un tampon de lyse (Cell Lysis Buffer (CLB) : 100 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,4, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100) contenant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases sans EDTA (PI) (Pierce). Les cellules sont ensuite incubées à 4°C sur glace pendant 30 minutes. Après une centrifugation 30 minutes à 15000 g à 4°C, les protéines solubilisées sont récupérées et leur concentration est mesurée par la méthode BCA.

### IV.2. Préparation des extraits protéiques pour synaptosomes

Pour la préparation des synaptosomes, les cellules cultivées en boîte 35 mm sont lavées au PBS-CM puis décollées dans 300 µl d'un réactif Syn-PER (Thermoscientific) + PI. Suite à une première centrifugation à 1200 g de 10 minutes à 4°C, le surnageant est récupéré et 30 µl sont conservés comme « homogénat ». Le reste du surnageant est soumis à une deuxième centrifugation à 15000 g pendant 20 minutes à 4°C qui permet de séparer la fraction cytosolique (C, surnageant) de la fraction synaptique (S, culot). La fraction S est resuspendue dans 30 µl de réactif Syn-PER + PI

### **IV.3. Préparation des extraits protéiques membranaires (biotnylation)**

Après deux rinçages avec du PBS-CM, les cellules sont incubées avec le composé sulfo-NHS-LC-biotin (4mM dans PBS-CM, Pierce) sur glace pendant 30 minutes avant d'être rincées 3 fois avec du PBS-CM supplémenté avec 10 mM Tris pH 7,4. Les cellules sont décollées dans du CLB + PI, incubées 30 min à 4°C avant d'être centrifugées à 13000 g pendant 10 min à 4°C. Une partie du surnageant est conservée (extrait totale = Lysate). Les protéines biotnylées sont ensuite purifiées à l'aide de billes magnétiques couplées à la Neutraavidin (Spherotech), 60 minutes à température ambiante. Après 3 lavages avec du CLB + PI, les protéines biotnylées sont éluées dans le tampon de charge dénaturant (tampon LDS-Page 4X Invitrogen) + 5 % de  $\beta$ -mercaptoéthanol puis chauffées 5 minutes à 95°C.

### **IV.4. Western blot**

Les extraits protéiques sont dilués dans le tampon de charge dénaturant (tampon LDS-Page 4X Invitrogen) + 5 % de  $\beta$ -mercaptoéthanol puis chauffés 10 minutes à 80°C et séparés sur gel gradient 4-12 % pré-coulé (Nu-PAGE). La migration se fait dans du tampon de migration MOPS. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose grâce au système iBlot (Life technology). Les membranes sont incubées dans un tampon de blocage (5 % lait écrémé, 0,1 % Tween-20 dans du PBS) 1h à température ambiante puis avec les anticorps primaires sur la nuit à 4°C (2h à RT pour l'anti-actine) : anti-GFP (Biolabs #TP401 1/1000), anti-LRRC8A (Sigma Prestige, #HPA016811 1/1000), anti- $\alpha$ -actin (DSHB #JLA20, 1/5000). Le jour suivant, les membranes sont rincées trois fois au PBS-T avant l'incubation (2h, à température ambiante) avec les anticorps secondaires couplés à l'enzyme HRP (anti-lapin (Jackson Immunoresearch #111-035-144), anti-souris (Cell signaling #7076S)). La révélation des membranes est réalisée par chimioluminescence avec un substrat WB pico ou femto selon l'intensité du signal (Thermo Scientific) Les signaux sont acquis à l'aide d'un ChemidocTouch (Biorad) et quantifiés par le logiciel ImageLab.

## ***V. Immunofluorescence***

Pour les expériences immunocytochimiques, les neurones sont cultivés en plaque 24 puits sur des lamelles de verres pré-traitées à l'acide chloridrique (1M HCl pendant 10h à 50°C suivie d'un rinçage à l'eau) avant le coating de ces dernières à la polyronithine/laminine. Les neurones sont transduits à DIV7 avec 2  $\mu$ l de lentivirus et fixés 10 jours post-transduction (DIV 17) à la PFA 4 % pendant 10 minutes. Après 3 rinçages avec du PBS pendant 5 minutes, les neurones sont perméabilisés et bloqués avec un tampon IF (3 % BSA, 0.1 % Triton X-100 dans du PBS) pendant 2h à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps primaires sur la nuit à 4°C, rincées 3 fois au tampon IF, puis incubées avec les anticorps secondaires 1h à RT. Suite à 3 rinçages PBS, un marquage Hoechst (1/1000) est réalisé 5 minutes à température ambiante dans de l'eau. Après un rinçage avec de l'eau, les lamelles sont montées sur lame à l'aide d'un milieu de montage (DAKO). Les anticorps suivants

ont été utilisés : anti-GFP (Biolabs #TP401 1/1000), anti-MAP2 (Sigma, #M4403, 1/2000), anti-mouse-A594 (Molecular Probes #A11020, 1/1000), anti-lapin-A488 (Molecular Probes #A11034, 1/1000). Les observations sont faites avec un microscope à épifluorescence ZEISS et les images traitées par le logiciel ZEN.

## **VI. Dosage de l'ATP par bioluminescence**

Les dosages d'ATP sont réalisés grâce au kit CellTiter-Glo® 2.0 Assay (Promega #G924A). Brièvement, les cellules HEK sontensemencées en plaques 24 puits la veille de l'expérience (250 000 cellules/puit). Une plaque estensemencée pour chaque temps : T0, T5, T10, T15, T20 et T30. T0 correspond à un point avant la stimulation. Les chocs osmotiques à 50 % sont appliqués (125 µl de tampon FLEX + 125 µl H2O + 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>) et 20 µl de milieu extracellulaire est récupéré au temps correspondant (5, 10, 15, 20, 30 min). 20 µl de réactif est ajouté au 20 µL de milieu (en plaque 96 puits). Les cellules sont incubées 5 minutes à température ambiante et agitées pendant 2 minutes et une lecture de bioluminescence est réalisée à l'aide du lecteur de plaques INFINITY F500 (TECAN). Les cellules sont ensuite récupérées et dosées par la méthode de BCA. La libération d'ATP peut donc être ramenée en nanomole par µg de protéine.

Les cellules THP-1 sont traitées au PMA,ensemencées en plaques 24 puits (500 000 cellules par puits) et l'ATP est dosée 10 minutes post-choc hypotonique comme décrit ci-dessus. Le DCPIB est appliqué 15 minutes avant le choc osmotique.

## **VII. Electrophysiologie**

### **VII.1. Culture des cellules HEK**

Les cellules HEK293T sont cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) supplémenté avec 10 % de SVF (Invitrogen), 1X GlutaMax, 100 U/mL de Pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen). Les cellules sont rincées au tampon PBS avant d'être traitées à la trypsine-EDTA (Invitrogen). Elles sontensemencées 1 heure avant la transfection sur des lamelles de verre prétraitées à la poly-L-Lysine (Sigma) déposées dans des plaques 6 puits et incubées à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. La technique de transfection utilisée est la précipitation au phosphate de calcium avec 1 µg de plasmide des différentes constructions et 0,3 µg de plasmide GFP. Le milieu de culture (DMEM) est remplacé par du milieu frais le lendemain et les cellules sont utilisées 24 heures après transfection.

### **VII.2. Electrophysiologie**

Les courants sont enregistrés par la technique du patch-clamp en configuration cellule entière sur les cellules exprimant la GFP. Les micropipettes (3 MΩ) contiennent une solution interne ajustée à pH de 7,3 par du NaOH et contenant : KCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EGTA 5 mM, tampon HEPES pH 7,4 10 mM. Le potentiel de membrane est imposé à -60 mV par

l'amplificateur EPC-10 (HEKA) et les enregistrements réalisés par le logiciel PATCHMASTER (HEKA). La solution externe, appelée NES (NaCl 140 mM, KCl 2,8 mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, glucose 10 mM et tampon HEPES 10 mM, pH 7,3), est additionnée ou non d'ATP. Le pH est ajusté par l'ajout de NaOH pour les fortes concentrations d'ATP (>300 μM).

# *Bibliographie*

1. Lohmann, K. Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* **17**, 624–625 (1929).
2. Fiske, C. H. & Subbarow, Y. PHOSPHORUS COMPOUNDS OF MUSCLE AND LIVER. *Science* **70**, 381–2 (1929).
3. Drury, A. N. & Szent-Györgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* **68**, 213–37 (1929).
4. EMMELIN, N. & FELDBERG, W. Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **3**, 273–84 (1948).
5. HOLTON, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol.* **145**, 494–504 (1959).
6. BUCHTHAL, F. & FOLKOW, B. Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiol. Scand.* **15**, 150–60 (1948).
7. BURNSTOCK, G., CAMPBELL, G., BENNETT, M. & HOLMAN, M. E. INHIBITION OF THE SMOOTH MUSCLE ON THE TAENIA COLI. *Nature* **200**, 581–2 (1963).
8. Martinson, J. & Muren, A. Excitatory and Inhibitory Effects of Vagus Stimulation on Gastric Motility in the Cat. *Acta Physiol. Scand.* **57**, 309–316 (1963).
9. Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. & Smythe, A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmacol.* **40**, 668–88 (1970).
10. Fredholm, B. B. *et al.* Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **362**, 364–74 (2000).
11. Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N. & Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**, 527–52 (2001).
12. Chern, Y., Chiou, J. Y., Lai, H. L. & Tsai, M. H. Regulation of adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a adenosine receptor-mediated cyclic AMP response: role for protein phosphatase 2A. *Mol. Pharmacol.* **48**, 1–8 (1995).
13. Feoktistov, I., Murray, J. J. & Biaggioni, I. Positive modulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels by adenosine A2b receptors, prostacyclin, and prostaglandin E1 via a cholera toxin-sensitive mechanism in human erythroleukemia cells. *Mol. Pharmacol.* **45**, 1160–7 (1994).
14. Munshi, R., Pang, I. H., Sternweis, P. C. & Linden, J. A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. *J. Biol. Chem.* **266**, 22285–9 (1991).
15. Palmer, T. M., Gettys, T. W. & Stiles, G. L. Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 16895–902 (1995).
16. Fredholm, B. B., Chen, J.-F., Masino, S. A. & Vaugeois, J.-M. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 385–412 (2005).
17. Schwarzschild, M. A., Agnati, L., Fuxe, K., Chen, J.-F. & Morelli, M. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **29**, 647–654 (2006).
18. Huang, Z.-L. *et al.* Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat. Neurosci.* **8**, 858–9 (2005).

19. Wei, C. J. *et al.* Regulation of Fear Responses by Striatal and Extrastriatal Adenosine A2A Receptors in Forebrain. *Biol. Psychiatry* **75**, 855–863 (2014).
20. Liu, X.-L. *et al.* Genetic inactivation of the adenosine A2A receptor attenuates pathologic but not developmental angiogenesis in the mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 6625–32 (2010).
21. Pardo, F. *et al.* Molecular implications of adenosine in obesity. *Mol. Aspects Med.* **55**, 90–101 (2017).
22. Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B. & Pacher, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 759–770 (2008).
23. Eltzschig, H. K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat. Med.* **17**, 1391–1401 (2011).
24. Fredholm, B. B., Chern, Y., Franco, R. & Sitkovsky, M. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog. Neurobiol.* **83**, 263–76 (2007).
25. Webb, T. E. *et al.* Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* **324**, 219–25 (1993).
26. Lustig, K. D., Shiau, A. K., Brake, A. J. & Julius, D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5113–7 (1993).
27. Nguyen, T. *et al.* Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 30845–8 (1995).
28. Chang, K., Hanaoka, K., Kumada, M. & Takuwa, Y. Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 26152–8 (1995).
29. Communi, D., Govaerts, C., Parmentier, M. & Boeynaems, J. M. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **272**, 31969–73 (1997).
30. Hollopeter, G. *et al.* Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **409**, 202–207 (2001).
31. Chambers, J. K. *et al.* A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J. Biol. Chem.* **275**, 10767–71 (2000).
32. Communi, D. *et al.* Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J. Biol. Chem.* **276**, 41479–85 (2001).
33. Zhang, K. *et al.* Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature* **509**, 115–8 (2014).
34. Zhang, D. *et al.* Two disparate ligand-binding sites in the human P2Y1 receptor. *Nature* **520**, 317–21 (2015).
35. Erb, L. *et al.* Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J. Biol. Chem.* **270**, 4185–8 (1995).
36. Hoffmann, K., Sixel, U., Di Pasquale, F. & von Kügelgen, I. Involvement of basic amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 in agonist and antagonist recognition of the human platelet P2Y(12)-receptor. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 1201–13 (2008).
37. Jiang, Q. *et al.* A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human

- P2Y1 receptor. *Mol. Pharmacol.* **52**, 499–507 (1997).
38. Mao, Y., Zhang, L., Jin, J., Ashby, B. & Kunapuli, S. P. Mutational analysis of residues important for ligand interaction with the human P2Y12 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **644**, 10–16 (2010).
  39. Ding, Z. *et al.* Arg333 and Arg334 in the COOH terminus of the human P2Y1 receptor are crucial for Gq coupling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C559–67 (2005).
  40. Brinson, A. E. & Harden, T. K. Differential Regulation of the Uridine Nucleotide-activated P2Y4 and P2Y6 Receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 11939–11948 (2001).
  41. Reiner, S. *et al.* beta-Arrestin-2 interaction and internalization of the human P2Y1 receptor are dependent on C-terminal phosphorylation sites. *Mol. Pharmacol.* **76**, 1162–71 (2009).
  42. Norambuena, A. *et al.* UTP controls cell surface distribution and vasomotor activity of the human P2Y2 receptor through an epidermal growth factor receptor-transregulated mechanism. *J. Biol. Chem.* **285**, 2940–50 (2010).
  43. Abbracchio, M. P. *et al.* International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol. Rev.* **58**, 281–341 (2006).
  44. Liverani, E., Kilpatrick, L. E., Tsygankov, A. Y. & Kunapuli, S. P. The role of P2Y<sub>12</sub> receptor and activated platelets during inflammation. *Curr. Drug Targets* **15**, 720–8 (2014).
  45. Cattaneo, M. The platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood* **117**, 2102–2112 (2011).
  46. Guzman, S. J. & Gerevich, Z. P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. *Neural Plast.* **2016**, 1–12 (2016).
  47. Sperlágh, B., Heinrich, A. & Csölle, C. P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release—an update. *Purinergic Signal.* **3**, 269–284 (2007).
  48. Köles, L. *et al.* Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **377**, 1–33 (2008).
  49. Araque, A. *et al.* Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* **81**, 728–39 (2014).
  50. Franke, H., Verkhratsky, A., Burnstock, G. & Illes, P. Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic Signal.* **8**, 629–657 (2012).
  51. Kuchibhotla, K. V., Lattarulo, C. R., Hyman, B. T. & Bacskai, B. J. Synchronous Hyperactivity and Intercellular Calcium Waves in Astrocytes in Alzheimer Mice. *Science (80-. )*. **323**, 1211–1215 (2009).
  52. Delekate, A. *et al.* Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat. Commun.* **5**, 5422 (2014).
  53. Haynes, S. E. *et al.* The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* **9**, 1512–1519 (2006).
  54. Koizumi, S. *et al.* UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* **446**, 1091–5 (2007).
  55. Fountain, S. J. & Burnstock, G. An evolutionary history of P2X receptors. *Purinergic Signal.* **5**, 269–72 (2009).
  56. Valera, S. *et al.* A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular

- ATP. *Nature* **371**, 516–9 (1994).
57. Rassendren, F. *et al.* The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* **272**, 5482–6 (1997).
  58. Kawate, T., Michel, J. C., Birdsong, W. T. & Gouaux, E. Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature* **460**, 592–598 (2009).
  59. Hattori, M. & Gouaux, E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485**, 207–212 (2012).
  60. Mansoor, S. E. *et al.* X-ray structures define human P2X3 receptor gating cycle and antagonist action. *Nature* **538**, 66–71 (2016).
  61. Karasawa, A. & Kawate, T. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *Elife* **5**, (2016).
  62. Kasuya, G. *et al.* Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel. *Nat. Commun.* **8**, 876 (2017).
  63. Bavan, S., Straub, V. A., Blaxter, M. L. & Ennion, S. J. A P2X receptor from the tardigrade species *Hypsibius dujardini* with fast kinetics and sensitivity to zinc and copper. *BMC Evol. Biol.* **9**, 17 (2009).
  64. North, R. A. Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol. Rev.* **82**, 1013–1067 (2002).
  65. Khakh, B. S. & North, R. A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* **442**, 527–32 (2006).
  66. Rettinger, J., Aschrafi, A. & Schmalzing, G. Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 33542–7 (2000).
  67. Torres, G. E., Egan, T. M. & Voigt, M. M. N-Linked Glycosylation Is Essential for the Functional Expression of the Recombinant P2X<sub>2</sub> Receptor<sup>†</sup>. *Biochemistry* **37**, 14845–14851 (1998).
  68. Vacca, F. *et al.* N-Glycans mutations rule oligomeric assembly and functional expression of P2X3 receptor for extracellular ATP. *Glycobiology* **21**, 634–43 (2011).
  69. Lenertz, L. Y. *et al.* Mutation of Putative N-Linked Glycosylation Sites on the Human Nucleotide Receptor P2X<sub>7</sub> Reveals a Key Residue Important for Receptor Function. *Biochemistry* **49**, 4611–4619 (2010).
  70. Ennion, S. J. & Evans, R. J. Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol. Pharmacol.* **61**, 303–11 (2002).
  71. Clyne, J. D., Wang, L.-F. & Hume, R. I. Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J. Neurosci.* **22**, 3873–80 (2002).
  72. Li, C.-Y. *et al.* Conserved extracellular cysteines differentially regulate the potentiation produced by Zn<sup>2+</sup> in rat P2X4 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **707**, 11–16 (2013).
  73. Ennion, S. J. & Evans, R. J. P2X(1) receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 611–6 (2002).
  74. Boué-Grabot, E., Archambault, V. & Séguéla, P. A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J. Biol. Chem.* **275**, 10190–5 (2000).

75. Stanchev, D. *et al.* Decrease of current responses at human recombinant P2X3 receptors after substitution by Asp of Ser/Thr residues in protein kinase C phosphorylation sites of their ectodomains. *Neurosci. Lett.* **393**, 78–83 (2006).
76. Kim, M., Jiang, L. H., Wilson, H. L., North, R. A. & Surprenant, A. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.* **20**, 6347–58 (2001).
77. Brown, D. A. & Yule, D. I. Protein kinase A regulation of P2X4 receptors: Requirement for a specific motif in the C-terminus. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1803**, 275–287 (2010).
78. Chaumont, S., Jiang, L.-H., Penna, A., North, R. A. & Rassendren, F. Identification of a Trafficking Motif Involved in the Stabilization and Polarization of P2X Receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 29628–29638 (2004).
79. Royle, S. J., Bobanović, L. K. & Murrell-Lagnado, R. D. Identification of a Non-canonical Tyrosine-based Endocytic Motif in an Ionotropic Receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 35378–35385 (2002).
80. Qureshi, O. S., Paramasivam, A., Yu, J. C. H. & Murrell-Lagnado, R. D. Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J. Cell Sci.* **120**, 3838–49 (2007).
81. Nicke, A. *et al.* P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* **17**, 3016–28 (1998).
82. Mio, K., Kubo, Y., Ogura, T., Yamamoto, T. & Sato, C. Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 998–1005 (2005).
83. Barrera, N. P., Ormond, S. J., Henderson, R. M., Murrell-Lagnado, R. D. & Edwardson, J. M. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J. Biol. Chem.* **280**, 10759–65 (2005).
84. Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P. & Stojilkovic, S. S. Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels. *Pharmacol. Rev.* **63**, 641–683 (2011).
85. Bo, X. *et al.* Pharmacological and Biophysical Properties of the Human P2X5 Receptor. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1407–1416 (2003).
86. Cox, J. A., Barmina, O. & Voigt, M. M. Gene structure, chromosomal localization, cDNA cloning and expression of the mouse ATP-gated ionotropic receptor P2X5 subunit. *Gene* **270**, 145–52 (2001).
87. Radford, K. M., Virginio, C., Surprenant, A., North, R. A. & Kawashima, E. Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors. *J. Neurosci.* **17**, 6529–33 (1997).
88. Cockayne, D. A. *et al.* P2X<sub>2</sub> knockout mice and P2X<sub>2</sub>/P2X<sub>3</sub> double knockout mice reveal a role for the P2X<sub>2</sub> receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J. Physiol.* **567**, 621–639 (2005).
89. Lalo, U. *et al.* P2X1 and P2X5 Subunits Form the Functional P2X Receptor in Mouse Cortical Astrocytes. *J. Neurosci.* **28**, 5473–5480 (2008).
90. Palygin, O., Lalo, U., Verkhatsky, A. & Pankratov, Y. Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca<sup>2+</sup> signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium* **48**, 225–31 (2010).
91. Compan, V. *et al.* P2X2 and P2X5 Subunits Define a New Heteromeric Receptor with P2X7-Like

- Properties. *J. Neurosci.* **32**, 4284–4296 (2012).
92. Saul, A., Hausmann, R., Kless, A. & Nicke, A. Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 250 (2013).
  93. Torres, G. E., Egan, T. M. & Voigt, M. M. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* **274**, 6653–9 (1999).
  94. Ennion, Hagan & Evans. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 35656 (2000).
  95. Jiang, L. H., Rassendren, F., Spelta, V., Surprenant, A. & North, R. A. Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 14902–8 (2001).
  96. Fischer, W. *et al.* Conserved lysin and arginin residues in the extracellular loop of P2X(3) receptors are involved in agonist binding. *Eur. J. Pharmacol.* **576**, 7–17 (2007).
  97. Roberts, J. A. *et al.* Cysteine Substitution Mutagenesis and the Effects of Methanethiosulfonate Reagents at P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>4</sub> Receptors Support a Core Common Mode of ATP Action at P2X Receptors. *J. Biol. Chem.* **283**, 20126–20136 (2008).
  98. Yan, Z., Liang, Z., Obsil, T. & Stojilkovic, S. S. Participation of the Lys313-Ile333 sequence of the purinergic P2X4 receptor in agonist binding and transduction of signals to the channel gate. *J. Biol. Chem.* **281**, 32649–59 (2006).
  99. Zemkova, H. *et al.* Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X<sub>4</sub> receptor functions. *J. Neurochem.* **102**, 1139–1150 (2007).
  100. Samways, D. S. K., Li, Z. & Egan, T. M. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 6 (2014).
  101. Kawate, T., Robertson, J. L., Li, M., Silberberg, S. D. & Swartz, K. J. Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. *J. Gen. Physiol.* **137**, 579–90 (2011).
  102. Samways, D. S. K., Khakh, B. S., Dutertre, S. & Egan, T. M. 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**, 13800–5 (2011).
  103. Khakh, B. S. & Henderson, G. Modulation of fast synaptic transmission by presynaptic ligand-gated cation channels. *J. Auton. Nerv. Syst.* **81**, 110–21 (2000).
  104. Smith, N. C. E. & Burnstock, G. Mechanisms underlying postjunctional synergism between responses of the vas deferens to noradrenaline and ATP. *Eur. J. Pharmacol.* **498**, 241–8 (2004).
  105. Ruppelt, A., Ma, W., Borchardt, K., Silberberg, S. D. & Soto, F. Genomic structure, developmental distribution and functional properties of the chicken P2X(5) receptor. *J. Neurochem.* **77**, 1256–65 (2001).
  106. Hille, B. *Ion channels of excitable membranes.* (Sinauer, 2001).
  107. Rogers, M. & Dani, J. A. Comparison of quantitative calcium flux through NMDA, ATP, and ACh receptor channels. *Biophys. J.* **68**, 501–6 (1995).
  108. Neher, E. The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. *Neuropharmacology* **34**, 1423–42 (1995).
  109. Egan, T. M. & Khakh, B. S. Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses. *J. Neurosci.* **24**, 3413–3420 (2004).

110. Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O. & Verkhratsky, A. Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex. *J. Physiol.* **542**, 529–36 (2002).
111. Samways, D. S. K. & Egan, T. M. Acidic amino acids impart enhanced Ca<sup>2+</sup> permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family. *J. Gen. Physiol.* **129**, 245–56 (2007).
112. Migita, K., Haines, W. R., Voigt, M. M. & Egan, T. M. Polar Residues of the Second Transmembrane Domain Influence Cation Permeability of the ATP-gated P2X<sub>2</sub> Receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 30934–30941 (2001).
113. Tatham, P. E., Cusack, N. J. & Gomperts, B. D. Characterisation of the ATP<sub>4</sub>- receptor that mediates permeabilisation of rat mast cells. *Eur. J. Pharmacol.* **147**, 13–21 (1988).
114. Nuttle, L. C. & Dubyak, G. R. Differential activation of cation channels and non-selective pores by macrophage P2z purinergic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 13988–96 (1994).
115. Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F. A., North, R. A. & Surprenant, A. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* **2**, 315–321 (1999).
116. Khakh, B. S., Bao, X. R., Labarca, C. & Lester, H. A. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat. Neurosci.* **2**, 322–30 (1999).
117. Pelegrin, P. & Surprenant, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X<sub>7</sub> receptor. *EMBO J.* **25**, 5071–82 (2006).
118. Li, M., Toombes, G. E. S., Silberberg, S. D. & Swartz, K. J. Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* **18**, 1577–83 (2015).
119. Riedel, T., Schmalzing, G. & Markwardt, F. Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X<sub>7</sub> receptor-operated single-channel currents. *Biophys. J.* **93**, 846–58 (2007).
120. Harkat, M. *et al.* On the permeation of large organic cations through the pore of ATP-gated P2X receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E3786–E3795 (2017).
121. North, R. A. Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol. Rev.* **82**, 1013–1067 (2002).
122. Smith, F. M., Humphrey, P. P. & Murrell-Lagnado, R. D. Identification of amino acids within the P2X<sub>2</sub> receptor C-terminus that regulate desensitization. *J. Physiol.* **520 Pt 1**, 91–9 (1999).
123. Allsopp, R. C. & Evans, R. J. The intracellular amino terminus plays a dominant role in desensitization of ATP-gated P2X receptor ion channels. *J. Biol. Chem.* **286**, 44691–701 (2011).
124. Lambertucci, C. *et al.* Medicinal chemistry of P2X receptors: agonists and orthosteric antagonists. *Curr. Med. Chem.* **22**, 915–28 (2015).
125. Lalo, U., Verkhratsky, A. & Pankratov, Y. Ivermectin potentiates ATP-induced ion currents in cortical neurones: Evidence for functional expression of P2X<sub>4</sub> receptors? *Neurosci. Lett.* **421**, 158–162 (2007).
126. Nörenberg, W. *et al.* Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X<sub>7</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.* **167**, 48–66 (2012).
127. Müller, C. E. Medicinal chemistry of P2X receptors: allosteric modulators. *Curr. Med. Chem.* **22**, 929–41 (2015).
128. Jacobson, K. A. *et al.* A pyridoxine cyclic phosphate and its 6-azoaryl derivative selectively

- potentiate and antagonize activation of P2X1 receptors. *J. Med. Chem.* **41**, 2201–6 (1998).
129. Baqi, Y. *et al.* Discovery of Potent Competitive Antagonists and Positive Modulators of the P2X2 Receptor. *J. Med. Chem.* **54**, 817–830 (2011).
  130. Alexander, K. *et al.* Allosteric modulation and accelerated resensitization of human P2X(3) receptors by cibacron blue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 1135–42 (1999).
  131. Jacobson, K. A. & Müller, C. E. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology* **104**, 31–49 (2016).
  132. Carter, D. S. *et al.* Identification and SAR of novel diaminopyrimidines. Part 1: The discovery of RO-4, a dual P2X3/P2X2/3 antagonist for the treatment of pain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 1628–1631 (2009).
  133. Jahangir, A. *et al.* Identification and SAR of novel diaminopyrimidines. Part 2: The discovery of RO-51, a potent and selective, dual P2X3/P2X2/3 antagonist for the treatment of pain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 1632–1635 (2009).
  134. Stokes, L., Layhadi, J. A., Bibic, L., Dhuna, K. & Fountain, S. J. P2X4 Receptor Function in the Nervous System and Current Breakthroughs in Pharmacology. *Front. Pharmacol.* **8**, 291 (2017).
  135. Bhattacharya, A. Recent Advances in CNS P2X7 Physiology and Pharmacology: Focus on Neuropsychiatric Disorders. *Front. Pharmacol.* **9**, 30 (2018).
  136. Coddou, C., Stojilkovic, S. S. & Huidobro-Toro, J. P. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Rev. Neurosci.* **22**, 335–54 (2011).
  137. Kaczmarek-Hájek, K., Lörinczi, É., Hausmann, R. & Nicke, A. Molecular and functional properties of P2X receptors—recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal.* **8**, 375–417 (2012).
  138. Sneddon, P., Westfall, D. P. & Fedan, J. S. Cotransmitters in the motor nerves of the guinea pig vas deferens: electrophysiological evidence. *Science* **218**, 693–5 (1982).
  139. Sneddon, P. & Burnstock, G. Inhibition of excitatory junction potentials in guinea-pig vas deferens by alpha, beta-methylene-ATP: further evidence for ATP and noradrenaline as cotransmitters. *Eur. J. Pharmacol.* **100**, 85–90 (1984).
  140. Evans, R. J., Derkach, V. & Surprenant, A. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* **357**, 503–505 (1992).
  141. Galligan, J. J. & Bertrand, P. P. ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons. *J. Neurosci.* **14**, 7563–71 (1994).
  142. Pankratov, Y. V, Lalo, U. V & Krishtal, O. A. Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J. Neurosci.* **22**, 8363–9 (2002).
  143. Jo, Y.-H. & Role, L. W. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J. Neurosci.* **22**, 4794–804 (2002).
  144. Jo, Y. H. & Schlichter, R. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat. Neurosci.* **2**, 241–5 (1999).
  145. Rubio, M. E. & Soto, F. Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J. Neurosci.* **21**, 641–53 (2001).
  146. Richler, E., Shigetomi, E. & Khakh, B. S. Neuronal P2X2 receptors are mobile ATP sensors that explore the plasma membrane when activated. *J. Neurosci.* **31**, 16716–30 (2011).

147. Gu, J. G. & MacDermott, A. B. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* **389**, 749–753 (1997).
148. Nakatsuka, T. & Gu, J. G. ATP P2X receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J. Neurosci.* **21**, 6522–31 (2001).
149. Khakh, B. S., Gittermann, D., Cockayne, D. A. & Jones, A. ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J. Neurosci.* **23**, 7426–37 (2003).
150. George, J., Cunha, R. A., Mulle, C., Am, T. & Ee, E. Microglia-derived purines modulate mossy fibre synaptic transmission and plasticity through P2X<sub>4</sub> and A<sub>1</sub> receptors. doi:10.1111/ejn.13191
151. Gordon, G. R. J. *et al.* Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat. Neurosci.* **8**, 1078–86 (2005).
152. Pougnet, J.-T. *et al.* ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron* **83**, 417–430 (2014).
153. Sim, J. A. *et al.* Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X<sub>4</sub> knock-out mice. *J. Neurosci.* **26**, 9006–9 (2006).
154. Lalo, U., Palygin, O., Verkhatsky, A., Grant, S. G. N. & Pankratov, Y. ATP from synaptic terminals and astrocytes regulates NMDA receptors and synaptic plasticity through PSD-95 multi-protein complex. *Sci. Rep.* **6**, 33609 (2016).
155. Jo, Y.-H. *et al.* Cross-talk between P2X<sub>4</sub> and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid, Type A Receptors Determines Synaptic Efficacy at a Central Synapse. *J. Biol. Chem.* **286**, 19993–20004 (2011).
156. Boué-Grabot, E., Emerit, M. B., Toulmé, E., Séguéla, P. & Garret, M. Cross-talk and co-trafficking between rho1/GABA receptors and ATP-gated channels. *J. Biol. Chem.* **279**, 6967–75 (2004).
157. Boué-Grabot, É., Toulmé, E., Émerit, M. B. & Garret, M. Subunit-specific Coupling between  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A and P2X<sub>2</sub> Receptor Channels. *J. Biol. Chem.* **279**, 52517–52525 (2004).
158. Lalo, U. *et al.* Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol.* **12**, e1001747 (2014).
159. Bleehen, T. & Keele, C. A. Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation. *Pain* **3**, 367–77 (1977).
160. Novakovic, S. D. *et al.* Immunocytochemical localization of P2X<sub>3</sub> purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury. *Pain* **80**, 273–82 (1999).
161. Xiang, Z. *et al.* Functional up-regulation of P2X<sub>3</sub> receptors in the chronically compressed dorsal root ganglion. *Pain* **140**, 23–34 (2008).
162. Jarvis, M. F. *et al.* A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X<sub>3</sub> and P2X<sub>2/3</sub> receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 17179–84 (2002).
163. Hemmings-Mieszczak, M., Dorn, G., Natt, F. J., Hall, J. & Wishart, W. L. Independent combinatorial effect of antisense oligonucleotides and RNAi-mediated specific inhibition of the recombinant rat P2X<sub>3</sub> receptor. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2117–26 (2003).
164. Cockayne, D. A. *et al.* Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X<sub>3</sub>-deficient mice. *Nature* **407**, 1011–5 (2000).

165. Tsuda, M. *et al.* P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **424**, 778–83 (2003).
166. Ulmann, L. *et al.* Up-Regulation of P2X4 Receptors in Spinal Microglia after Peripheral Nerve Injury Mediates BDNF Release and Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* **28**, 11263–11268 (2008).
167. Coull, J. A. M. *et al.* BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* **438**, 1017–1021 (2005).
168. Tsuda, M., Inoue, K. & Salter, M. W. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in &quot;small&quot; glia. *Trends Neurosci.* **28**, 101–7 (2005).
169. Ulmann, L., Hirbec, H. & Rassendren, F. P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J.* **29**, 2290–300 (2010).
170. Lalisie, S. *et al.* Sensory neuronal P2RX4 receptors controls BDNF signaling in inflammatory pain. *Sci. Rep.* **8**, 964 (2018).
171. Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L. & Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **47**, 15–31 (2017).
172. Dell’Antonio, G., Quattrini, A., Cin, E. D., Fulgenzi, A. & Ferrero, M. E. Relief of inflammatory pain in rats by local use of the selective P2X7 ATP receptor inhibitor, oxidized ATP. *Arthritis Rheum.* **46**, 3378–3385 (2002).
173. Chessell, I. P. *et al.* Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* **114**, 386–396 (2005).
174. Clark, A. K. *et al.* P2X7-Dependent Release of Interleukin-1 and Nociception in the Spinal Cord following Lipopolysaccharide. *J. Neurosci.* **30**, 573–582 (2010).
175. Kobayashi, K., Takahashi, E., Miyagawa, Y., Yamanaka, H. & Noguchi, K. Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model. *Neurosci. Lett.* **504**, 57–61 (2011).
176. Ying, Y.-L. *et al.* Over-expression of P2X7 receptors in spinal glial cells contributes to the development of chronic postsurgical pain induced by skin/muscle incision and retraction (SMIR) in rats. *Exp. Neurol.* **261**, 836–43 (2014).
177. Luchting, B. *et al.* Differential expression of P2X7 receptor and IL-1 $\beta$  in nociceptive and neuropathic pain. *J. Neuroinflammation* **13**, 100 (2016).
178. Chen, Y. *et al.* Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 16773–16778 (2008).
179. Burnstock, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front. Pharmacol.* **8**, 661 (2017).
180. Knutsen LJS, M. T. Adenosine and ATP in epilepsy. **In: Jacobs**, 423–447 (1997).
181. Clasadonte, J., Dong, J., Hines, D. J. & Haydon, P. G. Astrocyte control of synaptic NMDA receptors contributes to the progressive development of temporal lobe epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 17540–5 (2013).
182. Avignone, E., Ulmann, L., Levavasseur, F., Rassendren, F. & Audinat, E. Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. *J. Neurosci.* **28**, 9133–44 (2008).
183. Marchi, N., Granata, T. & Janigro, D. Inflammatory pathways of seizure disorders. *Trends*

- Neurosci.* **37**, 55–65 (2014).
184. Kim, J.-E. & Kang, T.-C. The P2X7 receptor-pannexin-1 complex decreases muscarinic acetylcholine receptor-mediated seizure susceptibility in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 2037–47 (2011).
  185. Jimenez-Mateos, E. M. *et al.* microRNA targeting of the P2X7 purinoceptor opposes a contralateral epileptogenic focus in the hippocampus. *Sci. Rep.* **5**, 17486 (2015).
  186. Amhaoul, H. *et al.* P2X7 receptor antagonism reduces the severity of spontaneous seizures in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology* **105**, 175–185 (2016).
  187. Doná, F. *et al.* Alteration of purinergic P2X4 and P2X7 receptor expression in rats with temporal-lobe epilepsy induced by pilocarpine. *Epilepsy Res.* **83**, 157–67 (2009).
  188. Engel, T., Jimenez-Pacheco, A., Miras-Portugal, M. T., Diaz-Hernandez, M. & Henshall, D. C. P2X7 receptor in epilepsy; role in pathophysiology and potential targeting for seizure control. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **4**, 174–87 (2012).
  189. Ulmann, L. *et al.* Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus. *Glia* **61**, 1306–19 (2013).
  190. Matsuzaki, M. *et al.* Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* **4**, 1086–92 (2001).
  191. Ellis-Davies, G. C. R. Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat. Methods* **4**, 619–28 (2007).
  192. Fehrentz, T., Schönberger, M. & Trauner, D. Optochemical Genetics. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50**, 12156–12182 (2011).
  193. Fortin, D. L. *et al.* Photochemical control of endogenous ion channels and cellular excitability. *Nat. Methods* **5**, 331–8 (2008).
  194. Yue, L. *et al.* Robust photoregulation of GABA<sub>A</sub> receptors by allosteric modulation with a propofol analogue. *Nat. Commun.* **3**, 1095 (2012).
  195. Adesnik, H., Nicoll, R. A. & England, P. M. Photoinactivation of Native AMPA Receptors Reveals Their Real-Time Trafficking. *Neuron* **48**, 977–985 (2005).
  196. Kramer, R. H., Mouro, A. & Adesnik, H. Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. *Nat. Neurosci.* **16**, 816–823 (2013).
  197. Banghart, M., Borges, K., Isacoff, E., Trauner, D. & Kramer, R. H. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat. Neurosci.* **7**, 1381–1386 (2004).
  198. Volgraf, M. *et al.* Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 47–52 (2006).
  199. Lin, W.-C. *et al.* Engineering a Light-Regulated GABA<sub>A</sub> Receptor for Optical Control of Neural Inhibition. *ACS Chem. Biol.* **9**, 1414–1419 (2014).
  200. Tochitsky, I. *et al.* Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Chem.* **4**, 105–111 (2012).
  201. McCray, J. A., Herbette, L., Kihara, T. & Trentham, D. R. A new approach to time-resolved studies of ATP-requiring biological systems; laser flash photolysis of caged ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 7237–41 (1980).

202. Amatrudo, J. M., Olson, J. P., Agarwal, H. K. & Ellis-Davies, G. C. R. Caged compounds for multichromic optical interrogation of neural systems. *Eur. J. Neurosci.* **41**, 5–16 (2015).
203. Lima, S. Q. & Miesenböck, G. Remote Control of Behavior through Genetically Targeted Photostimulation of Neurons. *Cell* **121**, 141–152 (2005).
204. Lemoine, D. *et al.* Optical control of an ion channel gate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 20813–20818 (2013).
205. Browne, L. E. *et al.* Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 521–6 (2014).
206. Tsien, R. Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* **19**, 2396–404 (1980).
207. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–50 (1985).
208. Tada, M., Takeuchi, A., Hashizume, M., Kitamura, K. & Kano, M. A highly sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging of neural activity *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Neurosci.* **39**, 1720–1728 (2014).
209. Ni, Q., Mehta, S. & Zhang, J. Live-cell imaging of cell signaling using genetically encoded fluorescent reporters. *FEBS J.* **285**, 203–219 (2018).
210. Miyawaki, A. *et al.* Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup>-based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882–887 (1997).
211. Baird, G. S., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11241–6 (1999).
212. Nakai, J., Ohkura, M. & Imoto, K. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **19**, 137–41 (2001).
213. Inoue, M. *et al.* Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nat. Methods* **12**, 64–70 (2015).
214. Dana, H. *et al.* Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *Elife* **5**, (2016).
215. Richler, E., Chaumont, S., Shigetomi, E., Sagasti, A. & Khakh, B. S. Tracking transmitter-gated P2X cation channel activation *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Methods* **5**, 87–93 (2008).
216. Parkinson, K. *et al.* Calcium-dependent regulation of Rab activation and vesicle fusion by an intracellular P2X ion channel. *Nat. Cell Biol.* **16**, 87–98 (2014).
217. Fountain, S. J. *et al.* An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **448**, 200–203 (2007).
218. Tallini, Y. N. *et al.* Imaging cellular signals in the heart *in vivo*: Cardiac expression of the high-signal Ca<sup>2+</sup> indicator GCaMP2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 4753–4758 (2006).
219. Chen, T.-W. *et al.* Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **499**, 295–300 (2013).
220. Cao, Q. *et al.* Calcium release through P2X4 activates calmodulin to promote endolysosomal membrane fusion. *J. Cell Biol.* **209**, 879–894 (2015).
221. Zhao, Y. *et al.* An expanded palette of genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *Science* **333**, 1888–

- 91 (2011).
222. Richler, E., Shigetomi, E. & Khakh, B. S. Neuronal P2X2 receptors are mobile ATP sensors that explore the plasma membrane when activated. *J. Neurosci.* **31**, 16716–30 (2011).
223. Toulme, E. & Khakh, B. S. Imaging P2X4 receptor lateral mobility in microglia: regulation by calcium and p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* **287**, 14734–48 (2012).
224. Xu, J. *et al.* Imaging P2X4 receptor subcellular distribution, trafficking, and regulation using P2X4-pHluorin. *J. Gen. Physiol.* **144**, 81–104 (2014).
225. Bankston, L. A. & Guidotti, G. Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *J. Biol. Chem.* **271**, 17132–8 (1996).
226. Van der Kloot, W. Loading and recycling of synaptic vesicles in the Torpedo electric organ and the vertebrate neuromuscular junction. *Prog. Neurobiol.* **71**, 269–303 (2003).
227. Joseph, S. M., Buchakjian, M. R. & Dubyak, G. R. Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 23331–42 (2003).
228. Okada, S. F., Nicholas, R. A., Kreda, S. M., Lazarowski, E. R. & Boucher, R. C. Physiological Regulation of ATP Release at the Apical Surface of Human Airway Epithelia. *J. Biol. Chem.* **281**, 22992–23002 (2006).
229. Lazarowski, E. R. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal.* **8**, 359–373 (2012).
230. Bankston, L. A. & Guidotti, G. Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *J. Biol. Chem.* **271**, 17132–8 (1996).
231. Hanada, H., Moriyama, Y., Maeda, M. & Futai, M. Kinetic studies of chromaffin granule H<sup>+</sup>-ATPase and effects of bafilomycin A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 873–8 (1990).
232. Burgoyne, R. D. & Morgan, A. Secretory Granule Exocytosis. *Physiol. Rev.* **83**, 581–632 (2003).
233. Chapman, E. R., An, S., Barton, N. & Jahn, R. SNAP-25, a t-SNARE which binds to both syntaxin and synaptobrevin via domains that may form coiled coils. *J. Biol. Chem.* **269**, 27427–32 (1994).
234. Zhang, X., Kim-Miller, M. J., Fukuda, M., Kowalchuk, J. A. & Martin, T. F. J. Ca<sup>2+</sup>-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Neuron* **34**, 599–611 (2002).
235. Imura, Y. *et al.* Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* **61**, 1320–1330 (2013).
236. Bowser, D. N. & Khakh, B. S. Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *J. Gen. Physiol.* **129**, 485–91 (2007).
237. Sawada, K. *et al.* Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 5683–5686 (2008).
238. Moriyama, Y., Hiasa, M., Sakamoto, S., Omote, H. & Nomura, M. Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signal.* **13**, 387–404 (2017).
239. Larsson, M. *et al.* Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cereb. Cortex* **22**, 1203–14 (2012).

240. Oya, M. *et al.* Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**, 145–51 (2013).
241. Song, D. *et al.* Role of the intracellular nucleoside transporter ENT3 in transmitter and high K<sup>+</sup> stimulation of astrocytic ATP release investigated using siRNA against ENT3. *ASN Neuro* **6**, 1759091414543439 (2014).
242. Baldwin, S. A. *et al.* Functional Characterization of Novel Human and Mouse Equilibrative Nucleoside Transporters (hENT3 and mENT3) Located in Intracellular Membranes. *J. Biol. Chem.* **280**, 15880–15887 (2005).
243. Sakamoto, S. *et al.* Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Sci. Rep.* **4**, 6689 (2014).
244. Nakagomi, H. *et al.* Urothelial ATP exocytosis: regulation of bladder compliance in the urine storage phase. *Sci. Rep.* **6**, 29761 (2016).
245. Masuda, T. *et al.* Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat. Commun.* **7**, 12529 (2016).
246. Kato, Y. *et al.* Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E6297–E6305 (2017).
247. Coco, S. *et al.* Storage and Release of ATP from Astrocytes in Culture. *J. Biol. Chem.* **278**, 1354–1362 (2003).
248. Pangršič, T. *et al.* Exocytotic Release of ATP from Cultured Astrocytes. *J. Biol. Chem.* **282**, 28749–28758 (2007).
249. Zhang, Z. *et al.* Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat. Cell Biol.* **9**, 945–953 (2007).
250. Kasymov, V. *et al.* Differential sensitivity of brainstem versus cortical astrocytes to changes in pH reveals functional regional specialization of astroglia. *J. Neurosci.* **33**, 435–41 (2013).
251. Dou, Y. *et al.* Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Res.* **22**, 1022–1033 (2012).
252. Shinozaki, Y. *et al.* Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Sci. Rep.* **4**, 4329 (2014).
253. Abraham, E. H. *et al.* The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 312–6 (1993).
254. American Society of Biological Chemists., Rockefeller Institute for Medical Research. & American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *The Journal of biological chemistry.* (American Society for Biochemistry and Molecular Biology).
255. Linsdell, P. & Hanrahan, J. W. Adenosine triphosphate-dependent asymmetry of anion permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J. Gen. Physiol.* **111**, 601–14 (1998).
256. Grygorczyk, R., Tabcharani, J. A. & Hanrahan, J. W. CFTR channels expressed in CHO cells do not have detectable ATP conductance. *J. Membr. Biol.* **151**, 139–48 (1996).
257. Roman, R. M. *et al.* Evidence for multidrug resistance-1 P-glycoprotein-dependent regulation of cellular ATP permeability. *J. Membr. Biol.* **183**, 165–73 (2001).
258. Ohshima, Y. *et al.*  $\gamma$ -Irradiation induces P2X7 receptor-dependent ATP release from B16

- melanoma cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1800**, 40–46 (2010).
259. Pellegatti, P., Falzoni, S., Pinton, P., Rizzuto, R. & Di Virgilio, F. A Novel Recombinant Plasma Membrane-targeted Luciferase Reveals a New Pathway for ATP Secretion. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3659–3665 (2005).
  260. Brandao-Burch, A., Key, M. L., Patel, J. J., Arnett, T. R. & Orriss, I. R. The P2X7 Receptor is an Important Regulator of Extracellular ATP Levels. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **3**, 41 (2012).
  261. Nielsen, M. S. *et al.* Gap Junctions. in *Comprehensive Physiology* (John Wiley & Sons, Inc., 2012). doi:10.1002/cphy.c110051
  262. Wei, C.-J., Xu, X. & Lo, C. W. CONNEXINS AND CELL SIGNALING IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 811–838 (2004).
  263. Bennett, M. V. L. & Zukin, R. S. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron* **41**, 495–511 (2004).
  264. Srinivas, M., Verselis, V. K. & White, T. W. Human diseases associated with connexin mutations. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1860**, 192–201 (2018).
  265. Goodenough, D. A. & Paul, D. L. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 285–94 (2003).
  266. Verselis, V. K. & Srinivas, M. Divalent cations regulate connexin hemichannels by modulating intrinsic voltage-dependent gating. *J. Gen. Physiol.* **132**, 315–27 (2008).
  267. HARRIS, A. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **94**, 120–143 (2007).
  268. Maeda, S. *et al.* Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* **458**, 597–602 (2009).
  269. Cotrina, M. L. *et al.* Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15735–40 (1998).
  270. Arcuino, G. *et al.* Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9840–5 (2002).
  271. Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C. G. & Charles, A. C. Intercellular Calcium Signaling in Astrocytes via ATP Release through Connexin Hemichannels. *J. Biol. Chem.* **277**, 10482–10488 (2002).
  272. Anselmi, F. *et al.* ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca<sup>2+</sup> signals across the inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 18770–18775 (2008).
  273. Pearson, R. A., Dale, N., Llaudet, E. & Mobbs, P. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* **46**, 731–44 (2005).
  274. Mironova, E., Peti-Peterdi, J., Bugaj, V. & Stockand, J. D. Diminished paracrine regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by purinergic signaling in mice lacking connexin 30. *J. Biol. Chem.* **286**, 1054–60 (2011).
  275. Huckstepp, R. T. R. *et al.* Connexin hemichannel-mediated CO<sub>2</sub>-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J. Physiol.* **588**, 3901–20 (2010).

276. Eltzschig, H. K. *et al.* ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ. Res.* **99**, 1100–8 (2006).
277. Verselis, V. K. Connexin hemichannels and cochlear function. *Neurosci. Lett.* (2017). doi:10.1016/j.neulet.2017.09.020
278. Kim, Y. *et al.* Connexins and Pannexins in cerebral ischemia. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1860**, 224–236 (2018).
279. Bennett, M. V. L. *et al.* Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res.* **1487**, 3–15 (2012).
280. Chever, O., Lee, C.-Y. & Rouach, N. Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* **34**, 11228–32 (2014).
281. Panchin, Y. *et al.* A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr. Biol.* **10**, R473-4 (2000).
282. Sosinsky, G. E. *et al.* Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels (Austin)*. **5**, 193–7
283. Baranova, A. *et al.* The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* **83**, 706–16 (2004).
284. Boassa, D., Nguyen, P., Hu, J., Ellisman, M. H. & Sosinsky, G. E. Pannexin2 oligomers localize in the membranes of endosomal vesicles in mammalian cells while Pannexin1 channels traffic to the plasma membrane. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 468 (2014).
285. Ishikawa, M. *et al.* Pannexin 3 functions as an ER Ca<sup>2+</sup> channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J. Cell Biol.* **193**, 1257–1274 (2011).
286. Dahl, G. ATP release through pannexon channels. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**, 20140191 (2015).
287. Boassa, D. *et al.* Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **282**, 31733–43 (2007).
288. Wang, J. *et al.* The membrane protein Pannexin1 forms two open-channel conformations depending on the mode of activation. *Sci. Signal.* **7**, ra69-ra69 (2014).
289. Workman, A. D. *et al.* CALHM1-Mediated ATP Release and Ciliary Beat Frequency Modulation in Nasal Epithelial Cells. *Sci. Rep.* **7**, 6687 (2017).
290. Locovei, S., Bao, L. & Dahl, G. Pannexin 1 in erythrocytes: Function without a gap. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 7655–7659 (2006).
291. Beckel, J. M. *et al.* Pannexin 1 channels mediate the release of ATP into the lumen of the rat urinary bladder. *J. Physiol.* **593**, 1857–71 (2015).
292. Furlow, P. W. *et al.* Mechanosensitive pannexin-1 channels mediate microvascular metastatic cell survival. *Nat. Cell Biol.* **17**, 943–52 (2015).
293. Locovei, S., Wang, J. & Dahl, G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* **580**, 239–244 (2006).
294. Pelegrin, P. & Surprenant, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* **25**, 5071–82 (2006).
295. Riteau, N. *et al.* ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated

- inflammasome activation. *Cell Death Dis.* **3**, e403–e403 (2012).
296. Sandilos, J. K. *et al.* Pannexin 1, an ATP Release Channel, Is Activated by Caspase Cleavage of Its Pore-associated C-terminal Autoinhibitory Region. *J. Biol. Chem.* **287**, 11303–11311 (2012).
297. Chekeni, F. B. *et al.* Pannexin 1 channels mediate ‘find-me’ signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* **467**, 863–7 (2010).
298. Yang, D., He, Y., Muñoz-Planillo, R., Liu, Q. & Núñez, G. Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. *Immunity* **43**, 923–932 (2015).
299. Adamson, S. E. *et al.* Pannexin 1 is required for full activation of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Mol. Metab.* **4**, 610–8 (2015).
300. Dreses-Werringloer, U. *et al.* A polymorphism in CALHM1 influences Ca<sup>2+</sup> homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer’s disease risk. *Cell* **133**, 1149–61 (2008).
301. Ma, Z. *et al.* Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) is the pore-forming subunit of an ion channel that mediates extracellular Ca<sup>2+</sup> regulation of neuronal excitability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E1963-71 (2012).
302. Moyer, B. D. *et al.* Expression of genes encoding multi-transmembrane proteins in specific primate taste cell populations. *PLoS One* **4**, e7682 (2009).
303. Sana-Ur-Rehman, H., Markus, I., Moore, K. H., Mansfield, K. J. & Liu, L. Expression and localization of pannexin-1 and CALHM1 in porcine bladder and their involvement in modulating ATP release. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **312**, R763–R772 (2017).
304. Siebert, A. P. *et al.* Structural and Functional Similarities of Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) Ion Channel with Connexins, Pannexins, and Innexins. *J. Biol. Chem.* **288**, 6140–6153 (2013).
305. Taruno, A. *et al.* CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* **495**, 223–6 (2013).
306. Finger, T. E. *et al.* ATP Signaling Is Crucial for Communication from Taste Buds to Gustatory Nerves. *Science (80- )*. **310**, 1495–1499 (2005).
307. Evans, J. H. & Sanderson, M. J. Intracellular calcium oscillations regulate ciliary beat frequency of airway epithelial cells. *Cell Calcium* **26**, 103–10 (1999).
308. Vingtdoux, V. *et al.* CALHM1 deficiency impairs cerebral neuron activity and memory flexibility in mice. *Sci. Rep.* **6**, 24250 (2016).
309. Sabirov, R. Z., Merzlyak, P. G., Islam, M. R., Okada, T. & Okada, Y. The properties, functions, and pathophysiology of maxi-anion channels. *Pflugers Arch.* **468**, 405–20 (2016).
310. Blatz, A. L. & Magleby, K. L. Single voltage-dependent chloride-selective channels of large conductance in cultured rat muscle. *Biophys. J.* **43**, 237–241 (1983).
311. Sabirov, R. Z. *et al.* The organic anion transporter SLCO2A1 constitutes the core component of the Maxi-Cl channel. *EMBO J.* **36**, 3309–3324 (2017).
312. Sabirov, R. Z., Dutta, A. K. & Okada, Y. Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J. Gen. Physiol.* **118**, 251–66 (2001).
313. Bell, P. D. *et al.* Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel.

- Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4322–4327 (2003).
314. Best, L. Study of a glucose-activated anion-selective channel in rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **445**, 97–104 (2002).
315. Liu, H.-T., Sabirov, R. Z. & Okada, Y. Oxygen-glucose deprivation induces ATP release via maxi-anion channels in astrocytes. *Purinergic Signal.* **4**, 147–154 (2008).
316. Dutta, A. K., Sabirov, R. Z., Uramoto, H. & Okada, Y. Role of ATP-conductive anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in ischaemic or hypoxic conditions. *J. Physiol.* **559**, 799–812 (2004).
317. Kajita, H. *et al.* A maxi Cl<sup>-</sup> channel coupled to endothelin B receptors in the basolateral membrane of guinea-pig parietal cells. *J. Physiol.* **488 ( Pt 1)**, 65–75 (1995).
318. Groschner, K. & Kukovetz, W. R. Voltage-sensitive chloride channels of large conductance in the membrane of pig aortic endothelial cells. *Pflügers Arch.* **421**, 209–17 (1992).
319. Toychiev, A. H. *et al.* Activation of maxi-anion channel by protein tyrosine dephosphorylation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **297**, C990-1000 (2009).
320. Sabirov, R. Z. & Okada, Y. ATP release via anion channels. *Purinergic Signal.* **1**, 311–328 (2005).
321. Sabirov, R. Z. & Okada, Y. Wide nanoscopic pore of maxi-anion channel suits its function as an ATP-conductive pathway. *Biophys. J.* **87**, 1672–85 (2004).
322. Wee, S., Peart, J. N. & Headrick, J. P. P2 purinoceptor-mediated cardioprotection in ischemic-reperfused mouse heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **323**, 861–7 (2007).
323. Liu, H.-T., Toychiev, A. H., Takahashi, N., Sabirov, R. Z. & Okada, Y. Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *Cell Res.* **18**, 558–65 (2008).
324. Fields, R. D. & Ni, Y. Nonsynaptic Communication Through ATP Release from Volume-Activated Anion Channels in Axons. *Sci. Signal.* **3**, ra73-ra73 (2010).
325. Jentsch, T. J. VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 293–307 (2016).
326. Cahalan, M. D. & Lewis, R. S. Role of potassium and chloride channels in volume regulation by T lymphocytes. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **43**, 281–301 (1988).
327. Hazama, A. & Okada, Y. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of volume-regulatory K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in cultured human epithelial cells. *J. Physiol.* **402**, 687–702 (1988).
328. Pedersen, S. F., Okada, Y. & Nilius, B. Biophysics and Physiology of the Volume-Regulated Anion Channel (VRAC)/Volume-Sensitive Outwardly Rectifying Anion Channel (VSOR). *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **468**, 371–383 (2016).
329. Voets, T., Droogmans, G., Raskin, G., Eggermont, J. & Nilius, B. Reduced intracellular ionic strength as the initial trigger for activation of endothelial volume-regulated anion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 5298–303 (1999).
330. Syeda, R. *et al.* LRRC8 Proteins Form Volume-Regulated Anion Channels that Sense Ionic Strength. *Cell* **164**, 499–511 (2016).
331. Shimizu, T., Numata, T. & Okada, Y. A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 6770–6773 (2004).

332. Akita, T., Fedorovich, S. V & Okada, Y. Ca<sup>2+</sup> nanodomain-mediated component of swelling-induced volume-sensitive outwardly rectifying anion current triggered by autocrine action of ATP in mouse astrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* **28**, 1181–90 (2011).
333. Akita, T. & Okada, Y. Characteristics and roles of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system. *Neuroscience* **275**, 211–231 (2014).
334. Varela, D., Simon, F., Riveros, A., Jørgensen, F. & Stutzin, A. NAD(P)H oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **279**, 13301–4 (2004).
335. Porumb, T., Yau, P., Harvey, T. S. & Ikura, M. A calmodulin-target peptide hybrid molecule with unique calcium-binding properties. *Protein Eng.* **7**, 109–15 (1994).
336. Voss, F. K. *et al.* Identification of LRRC8 Heteromers as an Essential Component of the Volume-Regulated Anion Channel VRAC. *Science (80- )*. **344**, 634–638 (2014).
337. Qiu, Z. *et al.* SWELL1, a Plasma Membrane Protein, Is an Essential Component of Volume-Regulated Anion Channel. *Cell* **157**, 447–458 (2014).
338. Gradogna, A., Gavazzo, P., Boccaccio, A. & Pusch, M. Subunit-dependent oxidative stress sensitivity of LRRC8 volume-regulated anion channels. *J. Physiol.* **595**, 6719–6733 (2017).
339. Schober, A. L., Wilson, C. S. & Mongin, A. A. Molecular composition and heterogeneity of the LRRC8-containing swelling-activated osmolyte channels in primary rat astrocytes. *J. Physiol.* **595**, 6939–6951 (2017).
340. Deneka, D., Sawicka, M., Lam, A. K. M., Paulino, C. & Dutzler, R. Structure of a volume-regulated anion channel of the LRRC8 family. *Nature* **558**, 254–259 (2018).
341. Hyzinski-García, M. C., Rudkouskaya, A. & Mongin, A. A. LRRC8A protein is indispensable for swelling-activated and ATP-induced release of excitatory amino acids in rat astrocytes. *J. Physiol.* **592**, 4855–4862 (2014).
342. Droogmans, G., Prenen, J., Eggermont, J., Voets, T. & Nilius, B. Voltage-dependent block of endothelial volume-regulated anion channels by calix[4]arenes. *Am. J. Physiol.* **275**, C646–52 (1998).
343. Ternovsky, V. I., Okada, Y. & Sabirov, R. Z. Sizing the pore of the volume-sensitive anion channel by differential polymer partitioning. *FEBS Lett.* **576**, 433–6 (2004).
344. Hisadome, K. *et al.* Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J. Gen. Physiol.* **119**, 511–20 (2002).
345. Van der Wijk, T., De Jonge, H. R. & Tilly, B. C. Osmotic cell swelling-induced ATP release mediates the activation of extracellular signal-regulated protein kinase (Erk)-1/2 but not the activation of osmo-sensitive anion channels. *Biochem. J.* **343 Pt 3**, 579–86 (1999).
346. Boudreault, F. & Grygorczyk, R. Cell swelling-induced ATP release is tightly dependent on intracellular calcium elevations. *J. Physiol.* **561**, 499–513 (2004).
347. Blum, A. E., Walsh, B. C. & Dubyak, G. R. Extracellular osmolarity modulates G protein-coupled receptor-dependent ATP release from 1321N1 astrocytoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C386–96 (2010).
348. Burow, P., Klapperstück, M. & Markwardt, F. Activation of ATP secretion via volume-regulated anion channels by sphingosine-1-phosphate in RAW macrophages. *Pflugers Arch.* **467**, 1215–26 (2015).

349. Bowens, N. H., Dohare, P., Kuo, Y.-H. & Mongin, A. A. DCPIB, the Proposed Selective Blocker of Volume-Regulated Anion Channels, Inhibits Several Glutamate Transport Pathways in Glial Cells. *Mol. Pharmacol.* **83**, 22–32 (2013).
350. Gaitán-Peñas, H. *et al.* Investigation of LRRC8-Mediated Volume-Regulated Anion Currents in *Xenopus* Oocytes. *Biophys. J.* **111**, 1429–1443 (2016).
351. Ducharme, G., Newell, E. W., Pinto, C. & Schlichter, L. C. Small-conductance Cl<sup>-</sup> channels contribute to volume regulation and phagocytosis in microglia. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 2119–30 (2007).
352. Schlichter, L. C., Sakellaropoulos, G., Ballyk, B., Pennefather, P. S. & Phipps, D. J. Properties of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels and their involvement in proliferation of rat microglial cells. *Glia* **17**, 225–36 (1996).
353. Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K. & Kohsaka, S. Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* **61**, 47–54 (2013).
354. Murana, E. *et al.* ATP release during cell swelling activates a Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> current by autocrine mechanism in mouse hippocampal microglia. *Sci. Rep.* **7**, 4184 (2017).
355. Wang, Y., Roman, R., Lidofsky, S. D. & Fitz, J. G. Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12020–5 (1996).
356. Dezaki, K., Tsumura, T., Maeno, E. & Okada, Y. Receptor-mediated facilitation of cell volume regulation by swelling-induced ATP release in human epithelial cells. *Jpn. J. Physiol.* **50**, 235–41 (2000).
357. Shinozuka, K. *et al.* Participation of ATP in cell volume regulation in the endothelium after hypotonic stress. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **28**, 799–803 (2001).
358. Espelt, M. V. *et al.* On the role of ATP release, ectoATPase activity, and extracellular ADP in the regulatory volume decrease of Huh-7 human hepatoma cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **304**, C1013–C1026 (2013).
359. Leal Denis, M. F. *et al.* Dynamic Regulation of Cell Volume and Extracellular ATP of Human Erythrocytes. *PLoS One* **11**, e0158305 (2016).
360. Darby, M., Kuzmiski, J. B., Panenka, W., Feighan, D. & MacVicar, B. A. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J. Neurophysiol.* **89**, 1870–7 (2003).
361. Mongin, A. A. & Kimelberg, H. K. ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C569–78 (2002).
362. Mongin, A. A. & Kimelberg, H. K. ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca<sup>2+</sup>-sensitive mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C204–13 (2005).
363. Rudkouskaya, A., Chernoguz, A., Haskew-Layton, R. E. & Mongin, A. A. Two conventional protein kinase C isoforms,  $\alpha$  and  $\beta$ I, are involved in the ATP-induced activation of volume-regulated anion channel and glutamate release in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* **105**, 2260–2270 (2008).
364. Khlyntseva, S. V., Bazel', Y. R., Vishnikin, A. B. & Andruch, V. Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides. *J. Anal. Chem.* **64**, 657–673 (2009).
365. Bhatt, D. P., Chen, X., Geiger, J. D. & Rosenberger, T. A. A sensitive HPLC-based method to

- quantify adenine nucleotides in primary astrocyte cell cultures. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **889–890**, 110–5 (2012).
366. Ho, T. *et al.* Vesicular expression and release of ATP from dopaminergic neurons of the mouse retina and midbrain. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 389 (2015).
367. Praetorius, H. A. & Leipziger, J. ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic Signal.* **5**, 433–446 (2009).
368. McElroy, W. D. The Energy Source for Bioluminescence in an Isolated System. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **33**, 342–5 (1947).
369. Lundin, A. Optimization of the firefly luciferase reaction for analytical purposes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **145**, 31–62 (2014).
370. Branchini, B. R. *et al.* An enhanced chimeric firefly luciferase-inspired enzyme for ATP detection and bioluminescence reporter and imaging applications. *Anal. Biochem.* **484**, 148–53 (2015).
371. Ziqiang Wang, †, Philip G. Haydon, ‡ and Edward S. Yeung\*, †. Direct Observation of Calcium-Independent Intercellular ATP Signaling in Astrocytes. (2000). doi:10.1021/AC9912146
372. Denburg, J. L. & McElroy, W. D. Anion inhibition of firefly luciferase. *Arch. Biochem. Biophys.* **141**, 668–75 (1970).
373. Gruenhagen, J. A., Lovell, P., Moroz, L. L. & Yeung, E. S. Monitoring real-time release of ATP from the molluscan central nervous system. *J. Neurosci. Methods* **139**, 145–52 (2004).
374. Gruenhagen, J. A. & Yeung, E. S. Investigation of G protein-initiated, Ca<sup>2+</sup>-dependent release of ATP from endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1693**, 135–46 (2004).
375. Boudreault, F. & Grygorczyk, R. Cell swelling-induced ATP release and gadolinium-sensitive channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, C219-26 (2002).
376. Liu, G. J., Werry, E. L. & Bennett, M. R. Secretion of ATP from Schwann cells in response to uridine triphosphate. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 151–60 (2005).
377. Beigi, R., Kobatake, E., Aizawa, M. & Dubyak, G. R. Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. *Am. J. Physiol.* **276**, C267-78 (1999).
378. Joseph, S. M., Buchakjian, M. R. & Dubyak, G. R. Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 23331–42 (2003).
379. Okada, S. F., Nicholas, R. A., Kreda, S. M., Lazarowski, E. R. & Boucher, R. C. Physiological Regulation of ATP Release at the Apical Surface of Human Airway Epithelia. *J. Biol. Chem.* **281**, 22992–23002 (2006).
380. Nakamura, M. *et al.* Cell-surface-localized ATP detection with immobilized firefly luciferase. *Anal. Biochem.* **352**, 61–67 (2006).
381. Pellegatti, P., Falzoni, S., Pinton, P., Rizzuto, R. & Di Virgilio, F. A Novel Recombinant Plasma Membrane-targeted Luciferase Reveals a New Pathway for ATP Secretion. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3659–3665 (2005).
382. Michaud, M. *et al.* Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science (80- )*. **334**, 1573–1577 (2011).
383. Pellegatti, P. *et al.* Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: In Vivo Imaging with Plasma Membrane Luciferase. *PLoS One* **3**, e2599 (2008).

384. Wilhelm, K. *et al.* Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat. Med.* **16**, 1434–1438 (2010).
385. Newman, E. A. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J. Neurosci.* **21**, 2215–23 (2001).
386. Yamamoto, K. *et al.* Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca<sup>2+</sup> waves at caveolae in vascular endothelial cells. *J. Cell Sci.* **124**, 3477–83 (2011).
387. Furuya, K., Sokabe, M. & Grygorczyk, R. Real-time luminescence imaging of cellular ATP release. *Methods* **66**, 330–344 (2014).
388. Morciano, G. *et al.* Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nat. Protoc.* **12**, 1542–1562 (2017).
389. Kueng, A., Kranz, C. & Mizaikoff, B. Amperometric ATP biosensor based on polymer entrapped enzymes. *Biosens. Bioelectron.* **19**, 1301–1307 (2004).
390. Llaudet, E., Hatz, S., Droniou, M. & Dale, N. Microelectrode Biosensor for Real-Time Measurement of ATP in Biological Tissue. *Anal. Chem.* **77**, 3267–3273 (2005).
391. Gourine, A. V., Llaudet, E., Dale, N. & Spyer, K. M. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature* **436**, 108–111 (2005).
392. Corriden, R., Insel, P. A. & Junger, W. G. A novel method using fluorescence microscopy for real-time assessment of ATP release from individual cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, C1420-5 (2007).
393. Chen, Y. *et al.* ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* **314**, 1792–5 (2006).
394. Wang, C., Huang, C.-Y. C. & Lin, W.-C. Optical ATP biosensor for extracellular ATP measurement. *Biosens. Bioelectron.* **43**, 355–61 (2013).
395. Imamura, H. *et al.* Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 15651–15656 (2009).
396. Nakano, M., Imamura, H., Nagai, T. & Noji, H. Ca<sup>2+</sup> Regulation of Mitochondrial ATP Synthesis Visualized at the Single Cell Level. *ACS Chem. Biol.* **6**, 709–715 (2011).
397. Zadrán, S. *et al.* Enhanced-acceptor fluorescence-based single cell ATP biosensor monitors ATP in heterogeneous cancer populations in real time. *Biotechnol. Lett.* **35**, 175–80 (2013).
398. Yaginuma, H. *et al.* Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Sci. Rep.* **4**, 6522 (2014).
399. Tantama, M., Martínez-François, J. R., Mongeon, R. & Yellen, G. Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio. *Nat. Commun.* **4**, 2550 (2013).
400. Zala, D. *et al.* Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell* **152**, 479–91 (2013).
401. Saito, K. *et al.* Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nat. Commun.* **3**, 1262 (2012).
402. Yoshida, T., Kakizuka, A. & Imamura, H. BTeam, a Novel BRET-based Biosensor for the Accurate Quantification of ATP Concentration within Living Cells. *Sci. Rep.* **6**, 39618 (2016).

403. Cheek, T. R. *et al.* Simultaneous measurements of cytosolic calcium and secretion in single bovine adrenal chromaffin cells by fluorescent imaging of fura-2 in cocultured cells. *J. Cell Biol.* **109**, 1219–27 (1989).
404. Osipchuk, Y. & Cahalan, M. Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells. *Nature* **359**, 241–4 (1992).
405. Hayashi, S., Hazama, A., Dutta, A. K., Sabirov, R. Z. & Okada, Y. Detecting ATP Release by a Biosensor Method. *Sci. Signal.* **2004**, pl14-pl14 (2004).
406. Brown, P. & Dale, N. Spike-independent release of ATP from *Xenopus* spinal neurons evoked by activation of glutamate receptors. *J. Physiol.* **540**, 851–60 (2002).
407. Obermuller, S. *et al.* Selective nucleotide-release from dense-core granules in insulin-secreting cells. *J. Cell Sci.* **118**, 4271–4282 (2005).
408. Huang, Y.-J. *et al.* The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 6436–6441 (2007).
409. Fischer, W., Franke, H., Gröger-Arndt, H. & Illes, P. Evidence for the existence of P2Y<sub>1,2,4</sub> receptor subtypes in HEK-293 cells: reactivation of P2Y<sub>1</sub> receptors after repetitive agonist application. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **371**, 466–472 (2005).
410. Shigetomi, E., Kracun, S. & Khakh, B. S. Monitoring astrocyte calcium microdomains with improved membrane targeted GCaMP reporters. *Neuron Glia Biol.* **6**, 183–191 (2010).
411. Stanchev, D. *et al.* Cross-inhibition between native and recombinant TRPV1 and P2X<sub>3</sub> receptors. *Pain* **143**, 26–36 (2009).
412. Fields, R. D. Nonsynaptic and nonvesicular ATP release from neurons and relevance to neuron-glia signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 214–9 (2011).
413. Bindels, D. S. *et al.* mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nat. Methods* **14**, 53–56 (2017).
414. Li, Z., Migita, K., Samways, D. S. K., Voigt, M. M. & Egan, T. M. Gain and Loss of Channel Function by Alanine Substitutions in the Transmembrane Segments of the Rat ATP-Gated P2X<sub>2</sub> Receptor. *J. Neurosci.* **24**, 7378–7386 (2004).
415. Islam, M. R., Uramoto, H., Okada, T., Sabirov, R. Z. & Okada, Y. Maxi-anion channel and pannexin 1 hemichannel constitute separate pathways for swelling-induced ATP release in murine L929 fibrosarcoma cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **303**, C924–C935 (2012).
416. Decher, N. *et al.* DCPIB is a novel selective blocker of I(Cl,swell) and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 1467–79 (2001).
417. Friard, J. *et al.* Comparative Effects of Chloride Channel Inhibitors on LRRC8/VRAC-Mediated Chloride Conductance. *Front. Pharmacol.* **8**, 328 (2017).
418. Crowe, W. E., Altamirano, J., Huerto, L. & Alvarez-Leefmans, F. J. Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. *Neuroscience* **69**, 283–96 (1995).
419. Compan, V. *et al.* Cell Volume Regulation Modulates NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity* **37**, 487–500 (2012).
420. Boué-Grabot, E. & Pankratov, Y. Modulation of Central Synapses by Astrocyte-Released ATP and Postsynaptic P2X Receptors. *Neural Plast.* **2017**, 9454275 (2017).
421. Conley, J. M., Radhakrishnan, S., Valentino, S. A. & Tantama, M. Imaging extracellular ATP with

- a genetically-encoded, ratiometric fluorescent sensor. *PLoS One* **12**, e0187481 (2017).
422. Vancraenenbroeck, R., Kunzelmann, S. & Webb, M. R. Development of a range of fluorescent reagentless biosensors for ATP, based on malonyl-coenzyme A synthetase. *PLoS One* **12**, e0179547 (2017).
423. Barykina, N. V. *et al.* A new design for a green calcium indicator with a smaller size and a reduced number of calcium-binding sites. *Sci. Rep.* **6**, 34447 (2016).
424. Jing, M. *et al.* A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for in vitro and in vivo studies. *Nat. Biotechnol.* **36**, 726–737 (2018).
425. Patriarchi, T. *et al.* Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science* **360**, eaat4422 (2018).
426. Sun, F. *et al.* A Genetically Encoded Fluorescent Sensor Enables Rapid and Specific Detection of Dopamine in Flies, Fish, and Mice. *Cell* **174**, 481–496.e19 (2018).
427. Bernier, L.-P., Ase, A. R. & Séguéla, P. P2X receptor channels in chronic pain pathways. *Br. J. Pharmacol.* (2017). doi:10.1111/bph.13957
428. Taruno, A. ATP Release Channels. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 808 (2018).

## Résumé

### **Développement de nouveaux biosenseurs fluorescents pour l'étude dynamique de la signalisation purinergique**

En dehors de son rôle de stockage de l'énergie cellulaire, l'adénosine-triphosphate (ATP) est également une molécule de signalisation extracellulaire qui agit sur deux familles de récepteurs, les récepteurs métabotropiques P2Y et les récepteurs ionotropiques P2X. Dans le système nerveux central, les récepteurs P2X et la signalisation purinergique sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la modulation de la transmission synaptique et la communication neurone-glie ainsi que dans diverses pathologies telles que les douleurs chroniques, l'épilepsie ou les maladies neurodégénératives. Enregistrer l'activité des récepteurs P2X *in situ* reste aujourd'hui encore difficile de par la paucité des outils pharmacologiques et de par les propriétés biophysiques particulières de ces récepteurs canaux. De surcroît, les mécanismes de libération de l'ATP sont encore mal caractérisés et la détection de cette molécule dans l'espace extracellulaire est limitée par la faible résolution spatio-temporelle des techniques disponibles. A ce jour, il n'existe aucune méthode satisfaisante permettant de suivre l'activité des récepteurs P2X ou détecter la libération d'ATP en temps réel. Pour pallier à ces manques, nous avons développé de nouveaux outils fluorescents basés sur la fusion du rapporteur calcique GCaMP6s aux récepteurs P2X.

Notre étude montre d'abord que ces biosenseurs P2X-GCaMP6s sont capables de rapporter spécifiquement et dynamiquement, en fluorescence, l'activité des récepteurs P2X dans différentes lignées cellulaires (HEK, astrocytes, macrophages), ainsi que dans des neurones hippocampiques en culture. Dans un deuxième temps, l'outil P2X2-GCaMP6s a été modifié afin de créer un biosenseur de haute affinité pour l'ATP extracellulaire. Deux mutants, dont l'affinité apparente est de l'ordre de la centaine de nanomolaire, ont permis de détecter et de quantifier une libération d'ATP endogène. En combinant l'utilisation de ces biosenseurs avec des approches pharmacologiques et génétiques, nous avons montré que lors d'un choc hypotonique l'activation du canal VRAC LRRC8 contribue à la libération d'ATP par les cellules HEK et par des monocytes humains différenciés en macrophages. Enfin, nous avons montré que la libération d'ATP lors du gonflement des cellules déclenchait le phénomène de régulation du volume cellulaire, permettant aux cellules de retrouver leur volume initial.

Ces biosenseurs fluorescents permettent donc de visualiser de façon dynamique l'activité des récepteurs P2X et la libération d'ATP. Ces outils étant compatibles avec des approches *in vivo*, ils devraient permettre une meilleure caractérisation des mécanismes moléculaires de la communication purinergique.

### **Development of new fluorescent tools to dynamically study purinergic signaling**

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is an extracellular signaling molecule acting on two major classes of membrane receptors, metabotropic P2Y receptors and ionotropic P2X receptors. In the central nervous system, P2X receptors are involved in diverse functions such as modulation of synaptic transmission or neuron-glia communication and are implicated in different pathologies including chronic pain, epilepsy or neurodegenerative diseases. Recording P2X receptor activity is difficult because of the paucity of pharmacological tools and because P2X receptors are prone to desensitization. In addition, measuring extracellular ATP concentration is challenging since the mechanisms and the source of ATP are still poorly characterized. In addition, classical ATP detecting approaches have clear spatial and temporal limitations. As a consequence, following P2X activity and visualizing or quantifying ATP release in real time remains challenging. To overcome these issues, we developed new fluorescent biosensors based on the fusion of the fluorescent calcium reporter GCaMP6s to P2X receptors.

We first determined that fluorescence specifically reports on the activity of the P2X2 channel in different cell line (HEK, astrocytes, macrophages) and in primary culture of hippocampal neurons. We next engineered P2X2 receptor to create high affinity ATP biosensors. We identified two mutants with EC50s for ATP in the 100 nanomolar range that allow for the detection and the quantification of endogenous ATP release evoked by cell swelling. Using pharmacological approaches and knock-out cells, we demonstrated the implication in ATP release of the recently identify volume-regulated anion channel, LRRC8A in HEK cells and differentiated human macrophages. Finally, we provided evidence that the LRRC8-dependant ATP release is necessary for the cellular regulation of volume decrease after swelling.

Our results show that these fluorescent ATP biosensors can be used to dynamically track P2X channel activity and can be used *in vivo* to decipher the molecular mechanisms involved in purinergic signaling.