



Stratégie de marquage covalent du récepteur P2X7 natif pour microscopie super- résolutive

Benoît Arnould

► To cite this version:

Benoît Arnould. Stratégie de marquage covalent du récepteur P2X7 natif pour microscopie super-résolutive. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ087 . tel-03711330

HAL Id: tel-03711330

<https://theses.hal.science/tel-03711330>

Submitted on 1 Jul 2022

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE 414 - Sciences de la vie et de la santé

CNRS UMR7199

THÈSE présentée par :

Benoit ARNOULD

soutenue le 08 décembre 2021

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

Discipline/ Spécialité : Neurobiologie chimique

**Stratégie de marquage covalente du récepteur
P2X7 natif pour microscopie super-résolutive**

THÈSE dirigée par :

Dr. GRUTTER Thomas
Dr. SPECHT Alexandre

Docteur, Université de Strasbourg
Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme DELARASSE Cécile
Mr. GAUTIER Arnaud

Docteur, Sorbonne Université
Professeur, Sorbonne Université

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr. BARROT Michel
Mr. AUDINAT Etienne

Docteur, Université de Strasbourg
Docteur, Université de Montpellier

« La portée de la méthode scientifique est restreinte par la limitation de nos outils et par l'impénétrabilité intrinsèque des questions les plus profondes de la nature. »

Traduit et adapté de M. Gleiser.

REMERCIEMENTS

Je garderai à jamais un souvenir particulier des moments passés au laboratoire durant cette thèse. En premier lieu, un remerciement particulier est adressé à mes directeurs de thèse que sont Thomas Grutter et Alexandre Specht. Ils ont su m'encadrer et me guider tout en me laissant la liberté nécessaire pour pleinement m'épanouir dans leur laboratoire. J'espère les avoir rendus fiers du jeune scientifique que je suis devenu au fil de cette thèse. Thomas, merci pour le savoir que tu m'as transmis. Alex, en plus de tes conseils plus qu'avisés, je te remercie pour tous les moments informels que tu m'as accordés.

Durant ces trois ans, il a régné une ambiance particulière au laboratoire. Constamment animé et plein de bonne humeur, chaque membre a contribué à faire de cet endroit un lieu où j'ai sincèrement adoré vivre, rigoler et travailler.

Clément, même si tu as transformé l'HPLC en CPG une demi-douzaine de fois, tu as été un ami véritable durant ces quatre années passées ensemble. Je me sens immensément chanceux d'avoir pu faire cette thèse avec toi. Le duo que l'on a formé a rendu ces années inoubliables. Nos interactions « originales » vont me manquer.

Fédérico, même si tu fais migrer tes gels de Western blot à l'envers, tu as été d'un soutien moral et scientifique indéfectible. Fransisco, ta décontraction et tes fameux « don't worry dude » vont me manquer. Adeline, merci d'avoir assuré un rôle maternel ô combien difficile à tenir. Tu as été une vraie guide dans mon projet. Juliane, merci pour nos discussions scientifiques intéressantes.

Pour les conseils scientifique et la formation en microscopie super-résolutive, je remercie du fond cœur Eric Hosy et Pascal Didier, avec qui j'aurais adoré passer plus de temps.

J'adresse une dédicace à ma fidèle compagne, mais également ma famille et mes amis qui ont supporté mes mouvements d'humeurs durant cette thèse. Ils m'ont toujours soutenu et même s'il ils ne savaient pas toujours pourquoi, ils m'ont toujours apporté le réconfort dont j'avais besoin pour toujours aller de l'avant.

Un énorme merci aux doctorants des laboratoires voisins, particulièrement le laboratoire SOMHet et au beau Momo, ainsi qu'au laboratoire BFC et particulièrement à Tony, Victor et bien sûr Charlotte que je remercie de m'avoir aidée dans mes corrections. Vous avez tous contribué à l'ambiance fantastique qui m'a tant plu ces trois dernières années, je vous souhaite à tous le meilleur.

Pour finir, je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Chapitre 1 : Introduction bibliographique.....	9
<i>La signalisation purinergique.....</i>	<i>10</i>
1. <i>Signalisation purinergique dans le SNC : Introduction générale</i>	<i>12</i>
1.1 <i>Signalisation purinergique dans le neurodéveloppement</i>	<i>12</i>
1.2 <i>La signalisation purinergique dans le SNC adulte</i>	<i>15</i>
1.3 <i>Signalisation purinergique : Conclusions.....</i>	<i>27</i>
2. <i>Le récepteur P2X7.....</i>	<i>28</i>
2.1 <i>Généralités</i>	<i>29</i>
2.2 <i>Neurophysiopathologie</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
2.3 <i>Problématiques actuelles.....</i>	<i>31</i>
<i>Marquage de protéines.....</i>	<i>37</i>
1. <i>Méthodes courantes et exemples sélectionnés.....</i>	<i>38</i>
1.1 <i>Protéines de fusions</i>	<i>38</i>
1.2 <i>Acides aminés non naturels.....</i>	<i>42</i>
2. <i>Marquage guidé par un ligand</i>	<i>45</i>
<i>Microscopie super-résolutive.....</i>	<i>57</i>
1. <i>Limite de diffraction de la lumière.....</i>	<i>57</i>
2. <i>SIM, STED et ExM.....</i>	<i>63</i>
3. <i>SMLM et dSTORM.....</i>	<i>67</i>
<i>But de la thèse.....</i>	<i>72</i>
Chapitre 2 : Pyridinium-4-aldoxime : Organocatalyse	73
1. <i>Introduction</i>	<i>74</i>
2. <i>Ligands pyridinium oxime (PyOx)</i>	<i>78</i>
3. <i>Synthèse du pharmacophore et du ligand</i>	<i>80</i>
4. <i>Donneur d'acyle NASA.....</i>	<i>84</i>
5. <i>Pharmacologie de Lpeg0</i>	<i>86</i>
6. <i>Marquage d'affinité</i>	<i>87</i>
7. <i>Synthèse d'un nouveau composé NASA</i>	<i>89</i>
8. <i>LPeg7P.....</i>	<i>90</i>
9. <i>Discussion</i>	<i>93</i>
Chapitre 3 : N-Alkyl-N-Acylsulfonamide : Approche directe	95
1. <i>Introduction</i>	<i>96</i>
2. <i>Modélisation moléculaire.....</i>	<i>97</i>
3. <i>Synthèses.....</i>	<i>99</i>
4. <i>Pharmacologie</i>	<i>106</i>
5. <i>Marquage de P2X7 guidé par le ligand</i>	<i>107</i>
6. <i>Cinétique de marquage.....</i>	<i>108</i>
6.1 <i>Estimation de la constante de second ordre</i>	<i>110</i>
7. <i>Sélectivité du marquage</i>	<i>111</i>
7.1 <i>Analyse de la sélectivité par Western blot.....</i>	<i>111</i>
7.2 <i>Analyse de la sélectivité par microscopie</i>	<i>112</i>

8.	<i>Microscopie super-résolutive : cellules HEK293T</i>	124
9.	<i>Microglie BV-2</i>	125
10.	<i>Organisation nanométrique de P2X7</i>	131
10.1	<i>Analyse des clusters : introduction</i>	132
10.2	<i>Analyse des clusters</i>	135
Chapitre 4 : Discussion - Conclusion		138
1.	<i>Résumé des résultats présentés</i>	139
2.	<i>Marquage d'affinité</i>	140
2.1	<i>Conclusions générales</i>	140
2.2	<i>Perspectives</i>	141
3.	<i>Récepteur P2X7 et nanodomains</i>	146
3.1	<i>Cluster : significativité</i>	146
3.2	<i>Hypothèse concluante</i>	148
Chapitre 5 : Partie expérimentale		151
1.	<i>Biologie</i>	152
	<i>Culture cellulaire et transfection</i>	152
	<i>Electrophysiologie Patch-Clamp</i>	152
	<i>Pull Down, SDS-PAGE et Western blot</i>	153
	<i>Cytochimie</i>	154
	<i>Microscopie à fluorescence</i>	154
	<i>Analyse des données et statistiques</i>	155
2.	<i>Synthèse organique</i>	156
1.	<i>Synthèse des ligands catalytiques</i>	157
	<i>Synthèse du ligand alcyne 6</i>	157
	<i>Synthèse des extrémités oximes</i>	161
	<i>Synthèse du ligand LPeg0P et LPeg7P :</i>	165
	<i>Synthèse des donneurs d'acyles</i>	169
	<i>Ligand N-acyl-N-cyanomethylsulfonamide</i>	173
	<i>COOH-PEG₄-Boc</i>	173
	<i>Synthèse des réactifs de marquage LNASA</i>	176
Bibliographie		185

Liste des abréviations

ADP	Adénosine diphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
ARNm	ARN messenger
ARNsh	interférence courte d'ARN d'épingle à cheveux
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adenosine 5' triphosphate
ATP _e	ATP extracellulaire
BBG	Brillant Blue G
BSA	Albumine de sérum bovin
BzATP	2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate
CPN	Cellules progénitrices neurales
CSE	Cellule souche embryonnaire
CSN	Cellules souches neurales
DBCO	Dibenzocyclooctyne
DBSCAN	Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimide
DIEA	N,N-diisopropyléthylamine
DLT	Dépression à long terme
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMTMM	Chlorure de 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium
dSTORM	direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
EC ₅₀	Concentration pour activer 50 % de la réponse
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EM	Microscopie électronique
FHWM	Largeur maximale à mi-hauteur
FOCAL	Fast Optimized Aluster Algorithm for Localizations
FRET	Förster resonance energy transfer
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosine triphosphate
HATU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
IC ₅₀	Concentration pour inhiber 50 % de la réponse
iEDDA	Diels alder à demande inverse d'électron
K _D	Constante de dissociation

KI	Knock-in
k _L	Constante de marquage
KO	Knock down
LPS	Lipopolysaccharide
MβCD	Methyl-β-cyclodextrine
NA	Ouverture numérique
NASA	N-alkyl-N-acylsulfonamide
NcAA	Acide aminé non canonique
NO	Monoxyde d'azote
PALM	Potentialisation à long terme
PDB	Protein Data Bank
PFA	Paraformaldehyde
PLT	Potentialisation à long terme
PSF	Fonction d'étalement du point
QSAR	Relation structure-activité quantitative
RCPG	Récepteur couplé à la protéine G
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RP2X	Récepteur P2X
RP2Y	Récepteur P2Y
SAR	Relation structure-activité
SMLM	Single molecule localisation microscopy
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
TCO	Trans-cyclooctène
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TIRF	Microscopie de fluorescence par réflexion interne
TLR4	Toll-like receptor 4

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

La signalisation purinergique

Le cerveau est l'organe le plus complexe d'un individu. Il contrôle l'organisme par le biais de la moelle épinière et du système nerveux périphérique (SNP). C'est en son sein que sont traités les stimuli sensitifs et sensoriels (proprioception, odorat, vision...) ou encore les émotions (peur, douleurs...). Il est également responsable des fonctions telles que la mémoire (encodage, stockage et récupération), l'attention, le contrôle moteur... Ces processus varient de l'automatisme simple aux tâches cognitives les plus complexes. Si le cerveau a fasciné les scientifiques à travers les âges, le berceau de son étude est souvent attribué aux travaux des pionniers de la fin du XIX^e siècle, Santiago Ramón y Cajal et Camillo Golgi. Ils partagèrent le prix Nobel de physiologie ou médecine, en 1906, décerné pour leur découverte remarquable de la structure discontinue du système nerveux. La « doctrine du neurone » émise par Cajal explique un réseau constitué de cellules uniques interconnectées. Elle posera les bases de la neurophysiologie moderne. Les fonctions du cerveau sont entièrement dépendantes de son architecture. Une hiérarchie fine orchestre la dynamique des réseaux neuronaux et synaptiques, assurée par une communication entre neurones et cellules gliales via neuro- et gliotransmetteurs. La signalisation purinergique est récemment apparue comme un des acteurs majeurs de la communication au sein du système nerveux. Les premières observations des conséquences de nucléotides extracellulaires furent rapportées par Alan Drury et Albert Szent-Györgyi. Ils ont mis en lumière le rôle de l'adénosine dans le ralentissement du rythme cardiaque¹ en 1929. Il faudra attendre 1972 pour que Geoffrey Burnstock théorise les « nerfs purinergiques ». Dans une synthèse des travaux menés sur la physiologie des purines, il propose une voie de signalisation non cholinergique et non adrénergique. Il en décrit sa structure et sa distribution supposées ainsi que l'état de l'art de son électrophysiologie et de sa pharmacologie².

L'adénosine 5' triphosphate (ATP, schéma 1) est la monnaie d'échange de la vie. Omniprésente dans l'intégralité des cellules connues, son rôle de « molécule énergétique » est une des pierres angulaires de la biochimie. S'il est surprenant de prime abord de considérer l'ATP comme molécule de signalisation (gaspillage énergétique), un rationnel peut être aisément formulé en prenant pour exemple le recyclage de neurotransmetteurs. Ces molécules sont en charges de la transmission d'informations d'un neurone à un autre. Après leurs actions, elles seront dégradées puis recyclées. Cette opération va irrémédiablement coûter de l'énergie à la cellule concernée. Certaines molécules de communications, telles que le glutamate (neurotransmetteur excitateur le plus fréquent), valent énergétiquement bien plus qu'une molécule d'ATP. Son oxydation dans le cycle

de l'acide citrique régénère deux molécules d'ATP, en plus des substrats mitochondriaux qui portent ce bilan à neuf³. L'ATP, comme molécule de signalisation, apparaît alors comme une solution énergétiquement pertinente.

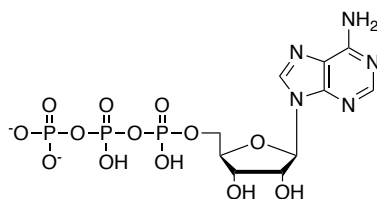


Schéma 1 Adénosine 5' triphosphate

La signalisation purinergique se compose de trois familles d'acteurs principaux. Les purines, les récepteurs dédiés et les ectonucléotidases :

Trois grandes catégories de purinorécepteurs sont aujourd'hui décrites. Ils varient selon leurs structures et leurs substrats. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) P1 fixe l'adénosine. Ils sont au nombre de quatre : A1, A2A, A2B et A3. La présence d'adénosine dans le milieu extracellulaire est en partie dépendante de l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire (ATP_e) par les ectonucléotidases membranaires, principalement CD39 et CD73. La première qui clive l'ATP en adénosine diphosphate (ADP) puis en adénosine monophosphate (AMP) et la seconde phosphohydrolyse l'AMP en adénosine. Les récepteurs métabotropes P2Y, RCPG également, forment une famille de huit sous-types (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14). Ils sont activés par différents nucléotides incluant l'ATP, l'ADP, ainsi que certains dérivés de l'uridine et autres purines moins courantes, non détaillées ici. La structure des récepteurs P1 et P2Y ne fait pas exception à l'organisation classique des RCPG, présentant sept hélices transmembranaires.

Enfin, les récepteurs ionotropes P2X sont quant à eux stimulés uniquement par l'ATP. Sept différents gènes P2X sont aujourd'hui décrits (P2X1-7). Ces protéines s'assemblent en structure homotrimérique (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5 et P2X7) ou hétérotrimérique (P2X2/3, P2X4/6, P2X1/5 et P2X2/6). Ces récepteurs membranaires s'ouvrent sous l'action de leur ligand extracellulaire, formant un pore non sélectif aux cations dans le sens de leurs gradients (Figure 1).

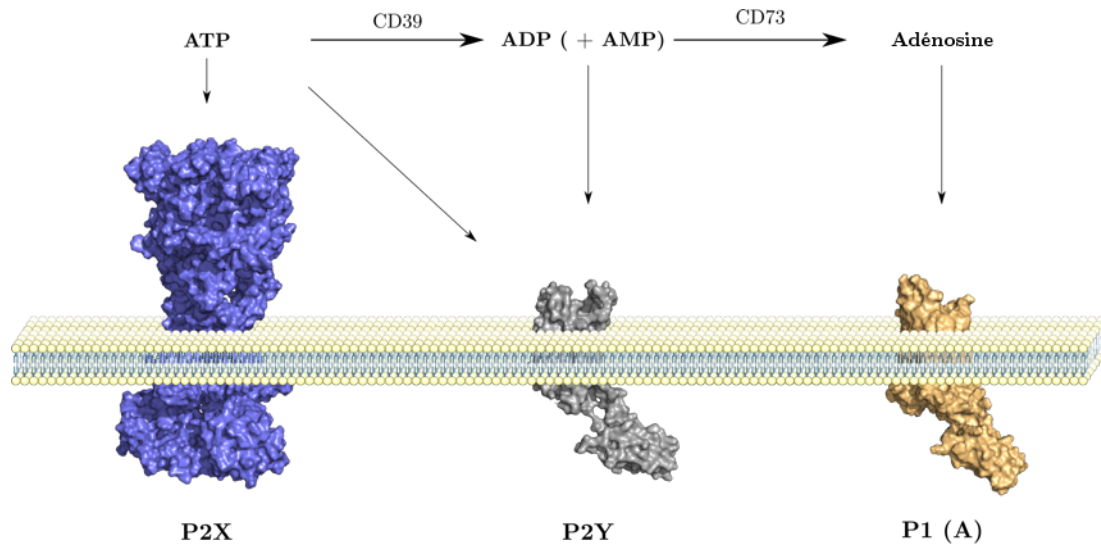


Figure 1 Structure des récepteurs purinergiques P2X (P2X7, code PDB : 6U9W), P2Y (P2Y12, code PDB : 4NTJ) et P1 (A2A, code : PDB 5NM2).

1. Signalisation purinergique dans le SNC : Introduction générale

Le cerveau est composé d'un système pluricellulaire agissant dans une symphonie captivante.

L'ATP et ses voies d'hydrolyses interviennent (directement ou indirectement) dans les délicates balances d'excitation et d'inhibition qui façonnent les circuits neuronaux, mais aussi dans les fonctions non neuronales. La régulation ultra-fine de cette signalisation est assurée par la différence de concentration intracellulaire (3-10 mM) et extracellulaire (20-50 nM) d'ATP. Une très faible fluctuation entraînera des conséquences majeures sur ce ratio, permettant une sensibilité extraordinaire.

La section suivante passe en revue les différents niveaux de complexité des fonctions purinergiques (normales et pathologique) dans le système nerveux central (SNC) en s'appuyant sur des exemples jugés pertinents.

1.1 Signalisation purinergique dans le neurodéveloppement

La significativité de la signalisation purinergique au sein du SNC commence à être mesurée. Cette dernière apparaît très tôt dans le développement du télencéphale. L'omniprésence de cette forme de signalisation dans les étapes de développement postnatal témoigne de son importance biologique.

Prolifération et différenciation des cellules souches

Les purinorécepteurs apparaissent aux premières étapes de l'embryogenèse. On les retrouve ainsi dès la gastrulation et la formation des feuillets embryonnaires. Chez le poussin, les purinorécepteurs font partie des premiers récepteurs membranaires fonctionnels à être exprimés⁴. Différents P2Y et P2X sont traduits par les cellules souches embryonnaires (CSE) de souris (notamment P2Y1, P2Y2, P2X3 et P2X4). Ces derniers sont décrits ayant un rôle de régulation de la prolifération⁵. Dans ce modèle cellulaire, Glaser *et al.* ont montré une forte expression de P2X7, conjointement à une activité élevée. Ce récepteur maintient la prolifération des CSE. Leurs différenciations en cellules neurales s'accompagnent d'une diminution de son expression (et de son action)⁶. P2X7 a également été étudié dans l'embryon de rat, au sein de régions hautement prolifératives (ventriculaire et subventriculaire) montrant une densité élevée de cellules progénitrices neurales (CPN)⁷. Ces cellules dérivant des cellules souches neurales (CSN) multipotentes prénatales (présentes également dans les premières étapes postnatales) sont des cellules communément utilisées dans l'étude développementale du système nerveux et du télencéphale embryonnaire. La stimulation de P2X7 y induit une différenciation en cellules neuronales qui voient alors l'expression membranaire de cette protéine réduite⁸.

Néanmoins, P2X7 n'est pas un acteur isolé ici. D'autres purinorécepteurs sont impliqués dans cette dynamique de prolifération et de différenciation des cellules souches. P2Y1 est par exemple décrit comme un protagoniste privilégié, notamment par sa capacité d'inhibition de prolifération⁹. Semblablement, l'augmentation de l'expression de P2X2 et P2X2/6 a été liée à la différenciation de CPN en neurones.

Cependant, la dissection de la fonction exacte des différents protagonistes protéiques est complexe, car ces derniers possèdent le même ligand. Il est ainsi plus aisé de caractériser le rôle développemental de l'ATP plutôt que de ses récepteurs respectifs. Pour généraliser, en 2007, Lin *et al.* ont démontré ses conséquences mitotiques dans les CSNs et les cellules progénitrices⁹, principalement par signalisation autocrine. Un an plus tard, Striedinger *et al.* décrivent, sur cellules progénitrices astrocytaires, un mécanisme paracrine et autocrine de modulation de la morphogénèse et la différenciation au sein des réseaux neuraux.

Toutefois, il serait simpliste de réduire le rôle des purines à la neurogenèse. L'induction de différenciation exposée plus haut concerne également les cellules gliales (principalement astrocytes, microglies et oligodendrocytes) et leurs précurseurs cellulaires associés. La littérature étant moins exhaustive sur ce sujet, ses détails ne seront pas discutés ici. En conclusion, la dynamique proliférative prénatale implique l'ATP extracellulaire dans un mécanisme paracrine et autocrine, permettant aux cellules neurales multipotentes de se différencier.

Neurones : Migration, connectivité et synaptogénèse

La cytoarchitecture du cerveau adulte est le produit d'une cascade d'évènements d'une complexité fascinante. Par souci de simplification, on peut approcher la maturation des circuits neuronaux comme ci-après : après leur différenciation, les neurones post-mitotiques migrent du tube neural vers leurs localisations définitives. Ces cellules vont former un réseau de connexions immatures par l'initiation de la neuritogénèse. Les neurites exploreront leur environnement par navigation axonale et croissance dendritique pour établir différents contacts avec leurs cibles. L'interdépendance de chaque cellule est cruciale dans ces processus. Enfin, la synaptogénèse stabilisera ces contacts. Elle aura pour but de maturer ces connexions qui formeront *in fine* les circuits cérébraux chez l'adulte. La signalisation purinergique intervient dans chacune de ces étapes où elle occupe un rôle de soutien et de contrôle.

RP2Y1 et son activation semblent être critiques durant la migration. Un knock-down (KO) génétique ainsi qu'une inhibition pharmacologique *in vivo* de ce récepteur révèlent une migration anormale des cellules progénitrices neurales intermédiaires¹⁰. L'application d'antagoniste du récepteur A2A provoque un effet semblable lors du développement de la souris¹¹.

La neuritogénèse quant à elle fait appel à un panel plus fourni de purinorécepteurs. On comptera notamment parmi eux le récepteur P2X7. Son inactivation (inhibition ou interférence courte d'ARN d'épingle à cheveux, ou ARNsh) induit une croissance axonale aberrante des neurones hippocampaux en culture. Les auteurs de cette étude rapportent une accélération de la vitesse de croissance ainsi qu'une arborescence plus complexe de ces axones¹². Quatre ans plus tard, les mêmes auteurs démontrent l'implication du récepteur P2Y1 et son agoniste, l'ADP, dans l'élongation axonale sur le même modèle de neurone. Curieusement, P2Y13 (lui aussi activé par l'ADP) montre un comportement antagoniste, concomitant avec l'activation de P2X7. Cet exemple est particulièrement intéressant, car il illustre la dépendance purinergique dans une étape critique de la neurogenèse, l'élongation axonale. Un ratio ADP/ATP extracellulaire contrôlé est indispensable lors du développement neuronal. Cette balance interroge le rôle neurodéveloppemental des ectonucléotidases et des processus de sécrétion extracellulaire d'ATP et d'adénosine.

Les conséquences des voies purinergiques dans la synpatogénèse ne sont pas encore élucidées. Quelques travaux préliminaires ont montré l'implication potentielle de P2Y2¹³ ou P2Y1¹⁴, sans pouvoir dégager un rôle clair et défini.

Purines et troubles neurodéveloppementaux

Au vu des différents aspects présentés ici, il apparaît évident qu'une défaillance du contrôle des voies de signalisations purinergiques dans un contexte neurodéveloppemental aura des conséquences majeures. Toutefois, le nombre d'études conduites sur ce sujet demeure limité. Fumagali *et al.* ont listé les pathologies dans lesquelles l'implication des purines (et des pyrimidines) est démontrée ou hypothétique¹⁵. Parmi elles on retrouve le trouble du spectre de l'autisme. Les fonctions de premier plan des purines ici permettent à certaines thérapies anti-purinergiques (suramine) de montrer des effets bénéfiques dans le comportement d'enfants atteints de ce trouble¹⁶. Ces résultats seraient entre autres dus à la régulation de l'expression de P2Y2 et P2X7. De plus, la suramine normaliserait la concentration des métabolites de purines (incluant l'ATP) dans les biofluides des enfants autistes. Les voies métaboliques de la signalisation purinergique apparaissent donc comme des éléments cruciaux dans les bases moléculaires du trouble du spectre de l'autisme¹⁵.

Les purines et leurs implications neuropathologies suscitent aujourd'hui un intérêt grandissant. Il subsiste encore beaucoup de zones d'ombres sur les conséquences de l'altération anormale de leurs voies biologiques. L'élucidation de ces dernières permettrait d'apporter des espoirs thérapeutiques contre les maladies neurodéveloppementales concernées (autisme, mais également schizophrénie¹⁷ ou encore leucomalacies périventriculaires¹⁸...).

1.2 La signalisation purinergique dans le SNC adulte

Les voies de signalisations purinergiques télencéphaliques évoluent avec les stades développementaux de l'individu. En conséquence, les purines sont omniprésentes parmi les messagers chimiques du CNS adulte. Leurs différents rôles sont fonction du type cellulaire dans lesquels elles sont exprimées. En 1992, Edwards *et al.* furent les premiers à démontrer une réponse synaptique rapide des neurones de l'habénula médiane suite à une application d'ATP¹⁹. Les quinze années suivantes ont ensuite été riches en démonstration de ce même rôle de neurotransmetteurs synaptiques et gliotransmetteurs (messagers chimiques libérés pour les cellules gliales) dans différentes régions du cerveau, impliquant les récepteurs P2X et P2Y. Néanmoins, dans leur revue sur la neuromodulation de l'ATP extracellulaire, Baljit S. Khakh et Alan North pointent du doigt les biais expérimentaux de ces conclusions (ATP comme neurotransmetteur). Leur argumentaire est basé sur les sélectivités indéterminées des agents pharmacologiques (agoniste et antagonistes) utilisés et l'absence de modèle KO²⁰. Pour les auteurs, les récepteurs P2X assurent principalement un rôle de neuromodulation. En dépit de la

rapidité de réponse de ces récepteurs canaux à leurs ligands (ouverture du pore en quelques millisecondes), la réponse biologique serait essentiellement lente et solidement liée à l'activité des cellules gliales. L'ATP_e aurait pour eux un rôle restreint à la modulation des fonctions neuronales, dont traite la section suivante. Cette fonction s'étend aux autres types cellulaires du SNC dont il sera question ci-après.

La neuromodulation par l'ATP

Cette partie s'appuie sur l'excellent travail de synthèse bibliographique effectuée par Paula Agostinho et al³.

Les fonctions spécifiques du cerveau sont assurées par des réseaux de neurones interconnectés par leurs synapses. Ces points de jonction intercellulaires si particuliers attirent depuis leurs découvertes une fascination indéfectible. Ils ont été définis par Santiago Ramón y Cajal à la fin du XIX^e siècle comme « les baisers protoplasmiques qui semblent constituer l'extase finale d'une histoire d'amour épique ». Ils assurent la communication chimique et électrique entre neurones pré- et postsynaptiques. Ces cellules ont la capacité de modifier ces synapses pour adapter leurs efficacités de transmissions, rompre des connexions ou en créer des nouvelles. La modulation persistante de la force synaptique liée à une activité répétée d'une synapse préexistante a été baptisée plasticité synaptique. L'état de l'art de ce phénomène encore mal compris ne sera pas détaillé exhaustivement ici. Brièvement, il implique des cascades d'événements cellulaires dans lesquels la synapse va renforcer son efficacité de transmission (Nombre de récepteurs aux neurotransmetteurs concernés, modification post-traductionnelle de protéines, recyclage de neurotransmetteurs, synthèse de nouvelles protéines...). Cette modulation est activité-dépendante. En d'autres termes, une fréquence minimum de potentiels d'actions parcourant cette synapse est requise pour enclencher la machinerie cellulaire conduisant à une plasticité. La potentialisation à long terme (PLT), phénomène de facilitation de transmission synaptique observé lors de stimulations par des potentiels d'actions répétés, est un des processus sous-jacents à la plasticité synaptique.

C'est au niveau de ces synapses, et dans les phénomènes qui modulent son efficacité de transmission, que sont attribuées la plupart des conséquences de la signalisation par l'ATP_e. Le registre des fonctions assignées à ce messenger est encore très largement incomplet, mais les travaux pionniers effectués dans l'hippocampe l'attribuent à une forme de facilitation synaptique à long terme. En effet, l'application de suramine (agents anti-purinergiques non sélectifs, discutés plus haut) inhibe cette facilitation²¹. Yamazaki *et al.* confirment l'implication de l'ATP dans la plasticité synaptique : par application locale de pulses d'ATP sur des neurones de la région CA1 de l'hippocampe, les auteurs de cette recherche ont induit une PLT, mais également l'effet antagoniste,

une dépression à long terme (DLT). Ils attribuent ces effets contradictoires aux différentes amplitudes des courants calciques évoqués par l'application d'ATP. Un faible influx de calcium induira une PTL lorsqu'un large influx mènera à la conséquence inverse²². Pankratov *et al.* précisent ces résultats en incriminant les récepteurs P2X. Ils montrent que l'inhibition de ces canaux ioniques permet de diminuer la fréquence nécessaire des potentiels d'actions pour provoquer une PLT. Les récepteurs P2X sont donc décrits dans cette expérience comme des filtres-bas dynamiques, supprimant les fréquences basses de potentiels d'actions afin de seuiller la PLT²³. Certains groupes de recherche se sont alors lancés dans la discrimination des sous-types de récepteurs supposés responsables de ces processus. C'est dans ce contexte que la génération de souris KO P2X4 a montré une diminution de la PLT dans la région CA1. Parallèlement, l'application d'ivermectine, qui potentialise les courants P2X4, facilite la PLT²⁴. D'autres récepteurs P2X semblent également impliqués dans les mêmes processus, cependant la littérature est moins complète à leurs sujets. C'est notamment le cas de P2X2 dans les interneurons de la région CA1²⁵ et P2X3 (CA1 et CA3)²⁶.

L'ensemble de ces expériences témoignent de l'influence des récepteurs P2X sur la modulation de la transmission synaptique, particulièrement en regard de la PLT et la DLT. Si encore de trop nombreuses zones d'ombres persistent sur les voies de signalisations de l'ATP au sein des neurones, c'est en partie dû au manque de moyen d'étude de celles-ci. Les principales méthodes disponibles aujourd'hui sont les approches génétiques classiques (mutations, délétions, insertions...) et pharmacologiques (modulateurs, agonistes et antagonistes). Ces outils chimiques et leurs potentiels thérapeutiques ont été discutés par Kenneth A. Jacobson et Christa E. Müller. Certains présentent des affinités et des sélectivités remarquables pour leurs cibles, nourrissant des espoirs cliniques²⁷. Les problématiques complexes que posent ces investigations nécessitent néanmoins des outils innovants. Certains groupes de recherches font preuve de créativité exceptionnelle. Par exemple, le groupe d'Éric Boué-Grabot est parvenu à générer une lignée de souris génétiquement modifiée pour l'étude fine du P2X4. Ils ont réussi à placer sous un contrôle conditionnel (protéine Cre) l'échange de la séquence d'internalisation de P2X4 par une protéine fluorescence mCherry. Cet outil génétique a permis à ce groupe d'interroger les fonctions cellulaires de P2X4. Ils concluront ainsi sur son implication dans des troubles neuropathologiques (anxiété et mémoire)²⁸.

L'étude des fonctions de l'ATP_e ne peut se faire sans prendre en considération ses métabolites (ADP, AMP et adénosine). En effet, les travaux de recherches précédemment cités ne discutent que trop peu des conséquences éventuelles de la phosphohydrolyse de l'ATP sur les résultats obtenus. Ce parti pris est bien évidemment rationnel et justifié par la complexité de la tâche que représente l'étude de l'ATP isolée. Toutefois,

avec le temps les modèles évoluent et deviennent plus complets dans leurs approches. L'indissociabilité de l'ATP et de ses métabolites est justifiée par son temps de demi-vie. Dans l'hippocampe, il suffit de 200 ms aux ecto-enzymes pour transformer la moitié de la concentration d'ATP en adénosine²⁹. Cette caractéristique lie fermement le destin biologique de ces molécules entre elles. Ces purines apparaissent donc comme indivisibles dans leurs fonctions.

L'adénosine comme neuromodulateur est bien mieux décrite dans ses subtilités physiologiques que l'ATP. Ce nucléoside peut être issu de réactions d'hydrolyse, mais les cellules peuvent également l'acheminer dans l'espace extracellulaire par des protéines membranaires spécialisées, les transporteurs de nucleosides³⁰. Il module la plasticité synaptique grâce à la balance d'activation entre A1 et A2A. Le premier est impliqué dans l'inhibition de la transmission synaptique lors de faibles fréquences de propagation de potentiel d'action. À l'inverse, l'activation de A2A assiste l'encodage d'information à long terme, en facilitant la libération de neurotransmetteurs et la transmission synaptique. Une interaction très intéressante a lieu entre ces deux récepteurs chez le rat adulte : Lopes *et al.* ont démontré en 1999 que le récepteur présynaptique A2A est en fait capable d'exercer un contrôle fonctionnel sur A1 pour atténuer sa réponse (cependant, cette emprise moléculaire n'apparaît pas chez les individus plus âgés)³¹. Les récepteurs A2A postsynaptiques sont aussi impliqués dans la facilitation de transmission en contribuant à la PLT depuis leurs localisations en aval du signal³². L'adénosine ici est en partie produite par la métabolisation de l'ATP au niveau synaptique. Le contrôle de l'activité des ectonucléotidases est critique pour la plasticité synaptique, et par extension pour les circuits neuronaux.

Ces quelques exemples illustrent succinctement certaines fonctions de l'adénosine dans les événements de la plasticité synaptique. Les particularités détaillées de ce messenger ne seront pas traitées ici, dépassant de loin la portée des travaux de cette thèse. Le lecteur curieux est renvoyé à la revue de Ana M. Sebastiao et Joaquim A. Ribeiro³³. Certains éléments complémentaires peuvent toutefois être trouvés dans la section dédiée à la gliotransmission.

Gliotransmetteurs et interactions glie-neurone

La section précédente s'est concentrée sur la communication purinergique interneuronale. Cependant, il ne s'agit pas de mécanismes réservés aux neurones. Dans le SNC, la signalisation purinergique occupe un rôle essentiel pour les cellules gliales également. Il a auparavant été question de l'ATP comme neurotransmetteur et neuromodulateurs. Mais dans une considération globale du cerveau, dans laquelle les neurones ne consistent que 50 % de la population cellulaire³⁴, la réponse purinergique des cellules gliales est fondamentale. Comme détaillé ci-après, l'ATP exerce un rôle primaire dans l'interaction

interastrocytes (*p. ex.* les vagues calciques), dans la modulation des réponses immunitaires des microglies et dans la communication de ces cellules avec les neurones. Afin d'alléger la prochaine section, les oligodendrocytes (responsables de la pose de gaines de myéline neuronales) et les cellules moins abondantes du SNC seront volontairement exclus.

Signalisation astrocytaire :

Les astrocytes sont les cellules de soutien du cerveau, c'est le type de cellules gliales le plus abondant dans le SNC. Entre autres fonctions variées, ils offrent un support structural et garantissent l'intégrité moléculaire de la synapse en régulant son environnement biochimique. Le terme de « synapse tripartite », donné dans les années 1990, rend compte de l'importance de la communication bidirectionnelle entre neurones et astrocytes au niveau synaptique. Ces cellules sont liées entre elles par des jonctions communicantes, formant les réseaux astrocytaires. Les astrocytes ne sont pas capables de se dépolariser pour transmettre un potentiel d'action. Ils utilisent un mécanisme spécifique basé sur l'augmentation de calcium intracellulaire appelé vagues calciques. Les jonctions communicantes permettent de propager ce signal par les connexines et confèrent une forme d'excitabilité aux astrocytes. Ces cellules sont donc capables de communiquer des informations chimiques à travers le réseau qu'ils composent, indépendamment des neurones³⁵, pour en moduler l'activité. C'est au niveau de ces vagues calciques que le rôle de l'ATP est le mieux décrit. C'est pourquoi cette voie est choisie pour illustrer la significativité de ce dernier dans la communication entre astrocytes.

L'ATP est relarguée dans le milieu extracellulaire lors de la propagation de ce signal³⁶. D'un intérêt particulier ici, P2X7 est soupçonné de directement ou indirectement permettre une perméation extracytosolique de l'ATP lors des vagues calciques^{37,38}. Il est aujourd'hui bien établi que les purinorécepteurs, et particulièrement le récepteur couplé aux protéines G P2Y1, sont capables de détecter une fluctuation fine d'ATP_e afin de déclencher une libération de calcium depuis les vésicules de stockage. L'ouverture de canaux P2X provoque en parallèle un influx de calcium depuis le milieu extracellulaire³⁹. Ces phénomènes sont suffisants pour entraîner l'initiation de vagues calciques (Figure 2). Conjointement avec d'autres molécules de signalisation, elles conduiront à une modulation des circuits neuronaux⁴⁰.

En conditions pathologiques, par exemple lors de lésions neuronales (ou autres cellules), une forte concentration d'ATP sera libérée, suffisante pour activer le récepteur P2X7. Ce dernier n'est que peu sensible à l'ATP (EC₅₀ : 0,1 – 1 mM). Son ouverture provoquera une entrée massive et prolongée de calcium dont l'issue sera généralement la mort cellulaire et/ou l'initiation d'un signal pro-inflammatoire⁴⁰. Dans ce cas de figure,

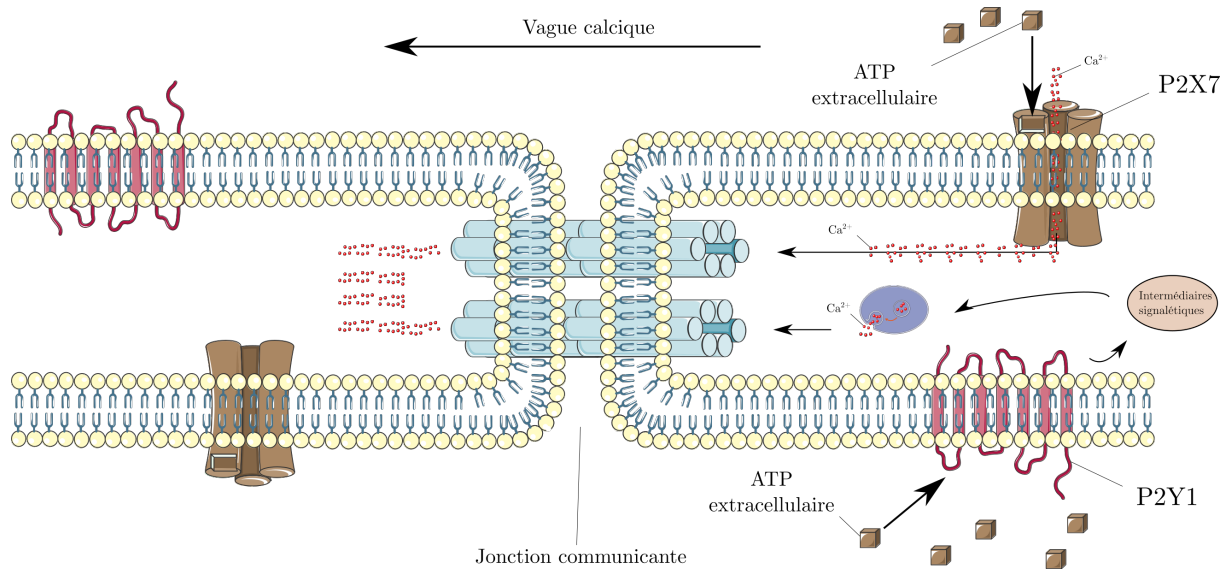


Figure 2 Illustration schématique des vagues calciques astrocytaires et du rôle des récepteurs purinergiques dans cette dernière.

la communication du signal se propagera au-delà du modèle de vagues calciques intrastrocytes pour signaler un danger aux cellules en périphérie, dont les microglies.

Signalisation microgliale

Les microglies sont les macrophages résidents du SNC, composant 5 à 10 % du total des cellules le composant⁴¹. Elles ont été découvertes et décrites par Pío del Río-Hortega en 1919 dans « Coloración rápida de los tejidos normales y patológicos con carbonato de plata amoniacal ». Ces cellules extrêmement dynamiques et ramifiées interagissent en permanence avec leurs microenvironnements à la recherche d'altération homéostatique. Lors de la détection d'un stress cellulaire, elles adapteront leur phénotype pour initier une réponse immunitaire adéquate (phagocytose, inflammation, réparation tissulaire...). Leurs fonctions de surveillance sont essentielles pour l'intégrité des circuits neuronaux et de leurs physiologies⁴². À l'image des macrophages, lors de la détection d'un motif de danger, deux schémas d'activation vont être envisagés. Le phénotype M1 engagera une initiation ou une propagation de la neuroinflammation via relargage de cytokines pro-inflammatoires, principalement les interleukines (IL)-1 β et IL-18 dans le parenchyme adjoignant. Si cet état persiste, il conduira à des effets nocifs, voire pathologiques, sur le SNC par induction de morts programmées de différents types cellulaires. Mais les microglies peuvent également adopter un phénotype M2, engagé dans la résolution de cette inflammation. Dans cette configuration, elles initient les mécanismes de réparation cellulaires, sécrètent des facteurs anti-inflammatoires et vont promouvoir la prolifération cellulaire.

La polarisation M1/M2 a été un paradigme persistant au sein de la communauté scientifique et n'a commencé à être remise en question que récemment. En 2016, Richard M. Ransohoff nuance cette description à la lumière des nouvelles technologies permettant l'étude des cellules microgliales. Il dénonce une vision simpliste et trop inspirée du comportement des macrophages. Il propose de reconsidérer les réponses microgliales dans un schéma plus moderne, approprié à la complexité de ces cellules⁴³. Il ne proposera cependant pas un nouveau paradigme, mais invite à une réflexion consensuelle.

Il a jusqu'ici été principalement question de l'ATP comme molécule physiologique, utilisée dans les processus cellulaires normaux. Mais dans le télencéphale, elle est souvent reconnue comme une molécule de dégâts cellulaire. En effet, si les rôles de soutien précédemment décrits sont essentiels pour les types cellulaires concernés, une forte concentration d'ATP_e est avant tout un motif de danger⁴⁴. Les microglies contrôlent en permanence les variations de cette concentration et s'activeront en réponse à un niveau trop élevé. Les quatre composants purinergiques principaux impliqués dans ces mécanismes sont P2X4, P2X7, P2Y12 et P2Y13. P2X4 est environ mille fois plus sensible à l'ATP que P2X7 (EC_{50} P2X4 $\approx$ 5 μ M contre $\approx$ 1-2 mM pour P2X7), hiérarchisant la réponse purinergique à l'ATP des microglies⁴⁵. Dans l'étude de la nociception^{1a}, P2X4 est un partenaire privilégié. Il joue un rôle prédominant dans les douleurs neuropathiques et dans les cas d'allodynie tactile suivant une lésion nerveuse, dans lesquels il se retrouve surexprimé à la membrane, avec une activité anormalement élevée. Son inhibition pharmacologique réduit les effets allodyniques dans un modèle murin de douleurs herpétique⁴⁶, et permet en outre de moduler positivement les douleurs neuropathiques induites par lésion du nerf sciatique chez le rat⁴⁷. Il est depuis peu suspecté d'être un modulateur critique du changement phénotypique des microglies inactivées. Son inhibition induirait un état pro-inflammatoire, et sa potentialisation conduit à une résolution de l'inflammation⁴⁸. On retrouve un schéma similaire pour P2Y12, également surexprimé dans les neuropathologies citées plus haut. Il montre des effets semblables au P2X4 lors de son inhibition pharmacologique et génétique⁴⁹. Mais les fonctions de P2Y12, profondément liées à P2Y13, s'étendent bien au-delà du spectre pathologique. De fait, ce duo est très fortement impliqué dans la chimiotaxie microgliale. Comme dit précédemment, ces cellules exhibent une dynamique unique dans le SNC. Elles sont capables de projeter des ramifications (pseudopodes) très motiles pour analyser leurs microenvironnements, mais également de migrer dans des compartiments spécifiques en réponse à des lésions. Ces deux formes de dynamismes sont régulées respectivement par P2Y13⁵⁰ et P2Y12⁵¹. Ceci suggère qu'un des facteurs régulant les comportements fondamentaux des microglies serait leurs sensibilité aux nucléosides. Elles sont capables

^{1a} Processus neural en réponse à des stimuli nocifs, menaçant l'intégrité de l'organisme.

d'enclencher les mécanismes complexes de remodelage du cytosquelette à la suite d'une légère fluctuation de la concentration homéostatique de ces derniers. Si les variations détectées sont dues à des lésions « sérieuses » comme une lyse cellulaire, la concentration d'ATP extracellulaire deviendra suffisante pour activer le P2X7. En effet, ce récepteur est relativement peu sensible à l'ATP et participe à la réponse graduée de la microglie lors de la détection d'un stimulus de danger. La concentration nécessaire pour activer ce dernier correspond approximativement à la concentration intracellulaire d'ATP. De ce fait, il est souvent considéré comme une « tour de garde », ayant la capacité de détecter les cytolyses proches. Son activation va alors induire une cascade d'évènements qui conduira à la mort cellulaire (par pyroptose et necroptose, principalement) et à l'excrétion de cytokines pro-inflammatoires. À l'image des astrocytes, il est suspecté de permettre la libération d'ATP afin d'amplifier le signal (communication autocrine). Mais on observe un comportement contradictoire de cette protéine, particulièrement dans son rôle mitotique : les microglies KO P2X7 exhibent une prolifération significativement réduite⁵². Cela suggère que malgré la réponse immédiate fournie par l'ouverture de P2X7 lors de sa liaison à l'ATP, certaines de ses conséquences s'inscrivent dans la durée. Ces aspects seront discutés dans le chapitre dédié à ce récepteur. Comme débattu plus haut, il est indispensable de rendre compte des effets de la métabolisation de l'ATP lors de l'étude de la signalisation purinergique dans un système. Cet aspect prend ici tout son sens : les microglies sont les cellules cérébrales les plus impliquées dans cette métabolisation⁵³. Ces dernières expriment fortement l'ectonucléotidase CD39 en charge de la phosphohydrolyse de l'ATP en ADP puis AMP, qui sera convertie en adénosine par CD73. Matyash *et al.* ont démontré en 2017 l'importance de ces deux protéines dans la ramification et l'arborescence microgliale par la réduction de ces comportements suivant la délétion de celles-ci⁵⁴. Ces données laissent supposer un rôle majeur des produits de dégradation de l'ATP dans les changements phénotypiques. En effet, les récepteurs A1A et A2A sont apparus comme des protagonistes clés de la modulation dynamique de la microglie. Mais si l'activation du premier a été décrite au sein de comportements anti-inflammatoires⁵⁵ et le second ayant l'effet antagoniste⁵⁶, le contrôle versatile du devenir microglial suivant leurs activations est encore mystérieux (Figure 3).

Les propriétés de la microglie (*c.-à-d.* la surveillance constante et la réponse morphologique) semblent donc impliquer l'expression fonctionnelle des ecto-enzymes (CD39 et CD73), qui initieront par leurs activités (ou l'absence de) les récepteurs P1 (A1A et A2A) et/ou P2 (P2X4, P2X7, P2Y12 et P2Y13). Jusqu'en 2018, il a existé une incertitude sur le rôle de l'ATP en condition physiologique. Il était suggéré que la surveillance par les microglies dépendait d'un niveau ambiant d'ATP à bas bruit. La concentration de ce dernier était régulée par les ecto-enzymes pour activer les purinorécepteurs

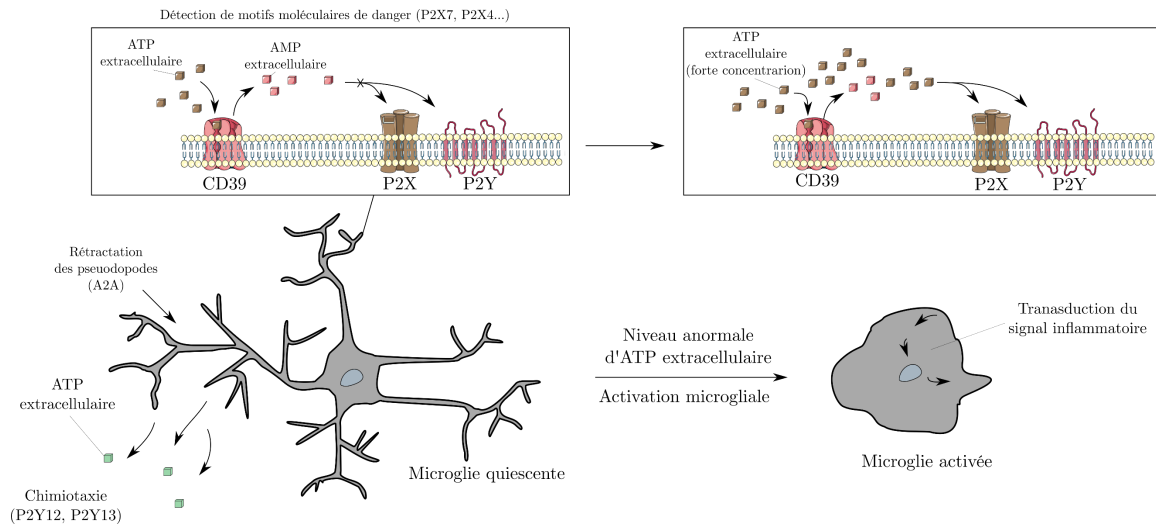


Figure 3 Illustration schématique simplifiée du rôle de la métabolisation de l'ATP par les microglies quiescentes et leurs activations suivant une exposition à l'ATPe.

responsables de la motilité cellulaire et du dynamisme des projections cytoplasmiques. Cela implique une excrétion constante d'ATP par les autres types cellulaires. Ce paradigme se base sur les effets de l'apyrase, une enzyme capable d'abaisser le niveau extracellulaire d'ATP. En induisant une hydrolyse exogène de l'ATP, les chercheurs ont observé une diminution rapide des processus endogènes des microglies *in vivo* et sur tranche de cerveau, ainsi qu'une réduction de leurs capacités de surveillance^{57,58}. Mais en 2018, Madry *et al.* dénoncent un artefact expérimental dans le rationnel de cette idée. Les auteurs montrent que les résultats dépendent en fait de la contamination de l'apyrase commerciale par des ions potassium, connus pour inhiber les comportements précédemment décrits⁵⁹. Cette étude a depuis remis en question plus d'une cinquantaine d'articles scientifiques et propose une nouvelle explication du contrôle des fonctions de surveillance de la microglie. La perturbation du potentiel de membrane au repos (-40 mV) a alors été incriminée. L'hyperpolarisation de la cellule induit l'activation des mécanismes immunitaires (phagocytoses, excrétion de cytokines...). L'influx de Ca^{2+} cytosolique, principalement imputable à l'activation des purinorécepteurs P2X4, P2X7 et P2Y12, est la force motrice de l'hyperpolarisation. Cette dernière est nécessaire pour la chimiotaxie des microglies⁶⁰. Les conséquences physiologiques de l'excitabilité microgliales n'ont été mises en lumière que très récemment. Par conséquent, ce champ d'études jouit d'un dynamisme et d'un engouement naissant de la part de la communauté scientifique spécialisée. Les tentatives de préciser le rôle des différents éléments qui régissent la réponse microgliale se trouvent souvent limitées par les méthodes d'études. Ces cellules sont profondément dépendantes des autres types cellulaires, si bien qu'isolées, elles montrent un phénotype rétracté, témoin d'une forme d'activation. Néanmoins, sans isoler le modèle étudié, l'interprétation de résultats pharmacologiques

est un exercice délicat. En particulier lorsque les cascades de transduction du signal se retrouvent dans les différents types cellulaires environnants. C'est donc entre autres au manque d'outils d'étude sélectif que l'on doit notre connaissance limitée de ces cellules fascinantes. Il est certain que l'avenir sera fertile en innovation et créativité.

Interaction glie-neurone

Les trois types cellulaires discutés plus haut (neurones, astrocytes et microglies) sont tous capables d'enrichir leurs milieux extracytoplasmiques en ATP (et adénosine) par différents moyens (hydrolyse de l'ATP, sécrétion vésiculaire...) et de répondre à un signal purinergique. La communication intercellulaire utilisant ce messenger ne fait plus aucun doute aujourd'hui, mais les démonstrations robustes de ses fonctions sont relativement peu courantes.

Au sein de la fente synaptique, l'interaction neurones-astrocytes est essentielle. Les astrocytes sont capables de détecter et de réagir à la libération de neurotransmetteurs. Cette détection s'accompagne d'une fluctuation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique et entraîne la libération de gliotransmetteurs comme l'ATP ou le glutamate. Ces derniers seront capables de moduler la transmission du signal nerveux en se fixant aux récepteurs pérисynaptique⁶¹. On compte parmi eux les récepteurs A2A présynaptiques des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe. Leurs activations augmentent l'efficacité de transmission synaptique⁶². Dans la même région, Shen *et al.* ont montré que l'accumulation de glutamate astrocytaire dans la synapse suivant une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est considérablement dépendant de l'activation autocrine du récepteur à P2Y1⁶³. Ces résultats sont tirés d'astrocytes exprimant une channelrhodopsin2 (ChR2), canaux ioniques sensibles à la lumière provoquant un courant calcique entrant lors d'une excitation lumineuse. Utilisant ce même outil, d'autres études ont permis de révéler que la libération d'ATP suivant une stimulation de ChR2 a des effets inhibiteurs sur les neurones pyramidaux (par activation des récepteurs A1) de l'hippocampe⁶⁴. L'ATP, comme gliotransmetteurs, peut donc activer le récepteur pro-excitateur P2Y1 ou provoquer l'effet inverse à travers sa métabolisation et le récepteur A1. L'ATP n'est pas le seul protagoniste de ces effets, mais module ce dernier. La complexité de la réponse astrocytaire par la libération de gliotransmetteurs est encore peu connue, mais c'est un champ de recherche en pleine expansion.

L'interaction microglie-astrocyte via la signalisation purinergique vient ajouter une strate de complexité organisationnelle. L'activation de P2Y1 astrocytaire peut être le résultat de détection de stimuli par la microglie, comme décrit par Pascual *et al.* en 2012. Dans cette expérience, le groupe de recherche a stimulé des microglies à l'aide de lipopolysaccharides (LPS), une biomolécule pro-inflammatoire. Ils ont observé une aug-

mentation des courants postsynaptiques excitateurs. À l'aide d'outils pharmacologiques, ils ont mis en lumière une voie de signalisation purinergique dans laquelle la microglie relargue de l'ATP suite à une stimulation pro-inflammatoire. La quantité modeste d'ATP est suffisante pour recruter des astrocytes et activer leurs récepteurs P2Y1. S'en suit alors une libération de gliotransmetteurs, l'ATP et le glutamate. C'est ce dernier qui agira sur les courants synaptiques⁶⁵. Ces événements suggèrent un rôle d'amplification du signal par les astrocytes lors de détection de danger par la microglie.

En conditions neuropathologiques, ces deux types cellulaires peuvent devenir réactifs. Il est admis que la microglie s'active généralement en amont, mais les phénomènes de coopérativité cellulaires ne sont pas clairs. Lors de lésion cérébrale traumatique, les microglies activées sont impliquées dans le changement phénotypique neuroprotecteur des astrocytes, dépendant de la sous-régulation du récepteur P2Y1. Ceci par l'émission de cytokine pro-inflammatoire et en augmentant l'activité des enzymes hydrolysant l'ATP, incluant CD39, privant P2Y1 de substrats⁶⁶. Mais cette communication microglie-astrocyte est bien évidemment bilatérale. Par exemple, lors d'une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ astrocytaire, une voie paracrine P2X7-dépendante peut être activée et induire une mort microgliale. L'ATP excrétée durant ces vagues calciques induit une libération d'IL-1 β vésiculaire par les microglies, sous un contrôle apparent de signal purinergique astrocytaire⁶⁷. La littérature est encore balbutiante sur les études *in vivo* de ces interactions et la significativité physiologique de ces dernières. Dues à l'extrême réactivité de ces types cellulaires (microglie en particulier), les méthodes d'analyses actuelles souffrent d'artefacts expérimentaux qui handicapent significativement les conclusions. Les microglies n'interagissent évidemment pas qu'avec les astrocytes. Ce sont les gardiennes dynamiques des neurones, en communication constante avec ces derniers. Les travaux modernes commencent à offrir des éléments de réponses sur les modalités de cette conversation moléculaire bilatérale. En 2012, une caractéristique de cette signalisation est découverte : la motilité des projections microgliales n'est pas aléatoire, mais guidée par une instruction neuronale. Lors d'une augmentation de l'activité d'un neurone, une connexine (la pannexin-1) est activée au niveau somatique. Cette protéine, capable de libérer de l'ATP dans le milieu extracellulaire, le place ici comme messenger potentiel privilégié. L'interaction neurone-microglie qui s'en suit régule alors l'activité neuronale⁶⁸, suggérant l'importance de cette réciprocité en condition physiologique. D'autres études supporteront ces résultats⁶⁹, mais c'est huit ans plus tard que l'équipe de Ádám Dénes et ses collaborateurs fourniront une explication moléculaire de cette interaction et suggéreront des fonctions neuroprotectrices et physiopathologique⁷⁰. Dans ces travaux, ils confirment la libération activité-dépendante d'ATP par les neurones via les pannexin-1. Plus important, ils démontrent que l'interaction microglie-

neurone se fait principalement au niveau somatique (corps cellulaire) et est dépendante de l'activité des mitochondries neuronales. Si les auteurs observent une communication au niveau du bouton synaptique, cette dernière est bien plus labile dans le temps. L'inhibition pharmacologique de P2Y₁₂ déstabilise la jonction somatique (sans affecter l'interaction dendritique). Celui-ci se retrouve aggloméré à cette jonction et son activité est liée de celles des mitochondries neuronales. Lors de lésion cérébrale, P2Y₁₂ est activé pour restaurer l'homéostasie des tissus atteints. Les auteurs concluent à un effet neuroprotecteur de la microglie P2Y₁₂-dépendant. Ils suggèrent que la libération continue de petites quantités d'ATP via des jonctions somatiques témoigne à la microglie la bien-portance des neurones. La présence de danger ou de stress cytotoxique va détruire ces jonctions et initier un comportement immunitaire activé de la microglie.

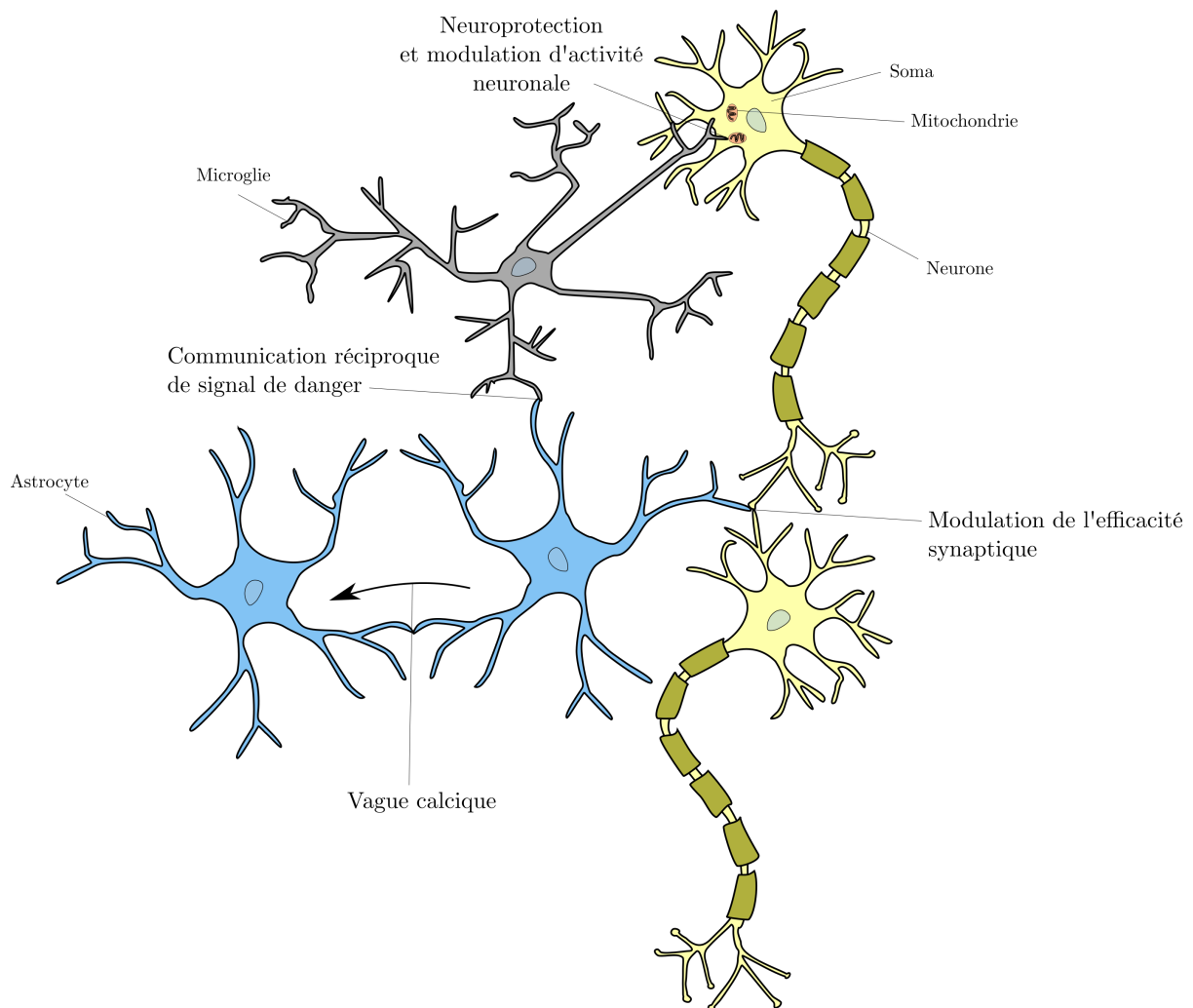


Figure 4 La signalisation purinergique dans les cellules du SNC : synthèse graphique simplifiée.

1.3 Signalisation purinergique : Conclusions

Cette introduction sur le système de signalisation purinergique et ses acteurs (récepteurs transmembranaires, transporteurs, ecto-enzymes...) a pour but de généraliser ses fonctions dans le télencéphale en fournissant quelques exemples. Les voies de transductions du signal liées aux purines sont nombreuses et leurs conséquences s'étendent du développement embryonnaire aux neuropathologies séniles. Leurs rôles dans le SNC sont variés (Figure 4), mais dans l'état actuel de nos connaissances, c'est au sein des microglies (et de leurs partenaires d'interactions) que s'illustrent les plus grandes conséquences de ces voies. C'est d'ailleurs la raison qui fait de l'ATP extracellulaire une molécule de danger. Malgré environ cent ans de recherche sur ses fonctions de messenger autocrine et paracrine, énormément de zones d'ombre persistent encore à ce jour.

L'explication tient d'une part de l'intérêt des chercheurs mondiaux dans ce champ, qui n'a explosé qu'à la fin des années 1990 (en démontrant les dates des articles précédemment cités). Ceci est bien évidemment justifié par l'action indirecte des purines sur les grandes fonctions cérébrales (neuromodulation, plasticité synaptique, organisation des réseaux de neurones... et plus généralement cognition, mémoire, apprentissage...), priorisant la recherche sur les acteurs primaires. Mais l'étude microgliale récente soutient un enthousiasme scientifique dans ce domaine.

D'autre part, les outils d'investigation sont limités, encore aujourd'hui. Par exemple, discriminer les protagonistes protéiques en fonction des types cellulaires est un exercice complexe. Les répertoires de purinorécepteurs exprimés par les différentes cellules qui peuplent le SNC sont très similaires. Les conclusions pharmacologiques sont par conséquent à nuancer. Les outils de fusion génétique (*p. ex.* protéines fluorescentes) offrent des perspectives prometteuses donc, mais ils introduisent par définition une variabilité biologique dans le comportement de la macromolécule étudiée. Dans ce domaine, l'optogénétique a permis des avancées exceptionnelles en autorisant un contrôle spatiotemporel de la polarisation de types cellulaires prédéfinis. Mais différentes méthodes innovantes commencent à voir le jour et permettront d'affiner nos connaissances, indispensables à de futurs espoirs de thérapie ciblant les voies des purines.

Parmi les perspectives cliniques, certaines protéines apparaissent comme candidats prometteurs. Il n'aura pas échappé au lecteur attentif qu'un récepteur a été subtilement mis en lumière dans cette introduction. Le P2X7 est une protéine aux comportements encore trop incertains, mais fortement impliqués dans la neuroinflammation et la propagation des maladies neurodégénératives. Un avant-goût des conséquences cellulaires de son activation a été donné dans la section traitant de la microglie. Cette protéine

est devenue iconique dans nombre de ses aspects, aussi physiologiques que pathologiques. Les mystères qui l'accompagnent et son potentiel clinique sont les deux raisons de son étude approfondie dans cette thèse.

2. Le récepteur P2X7

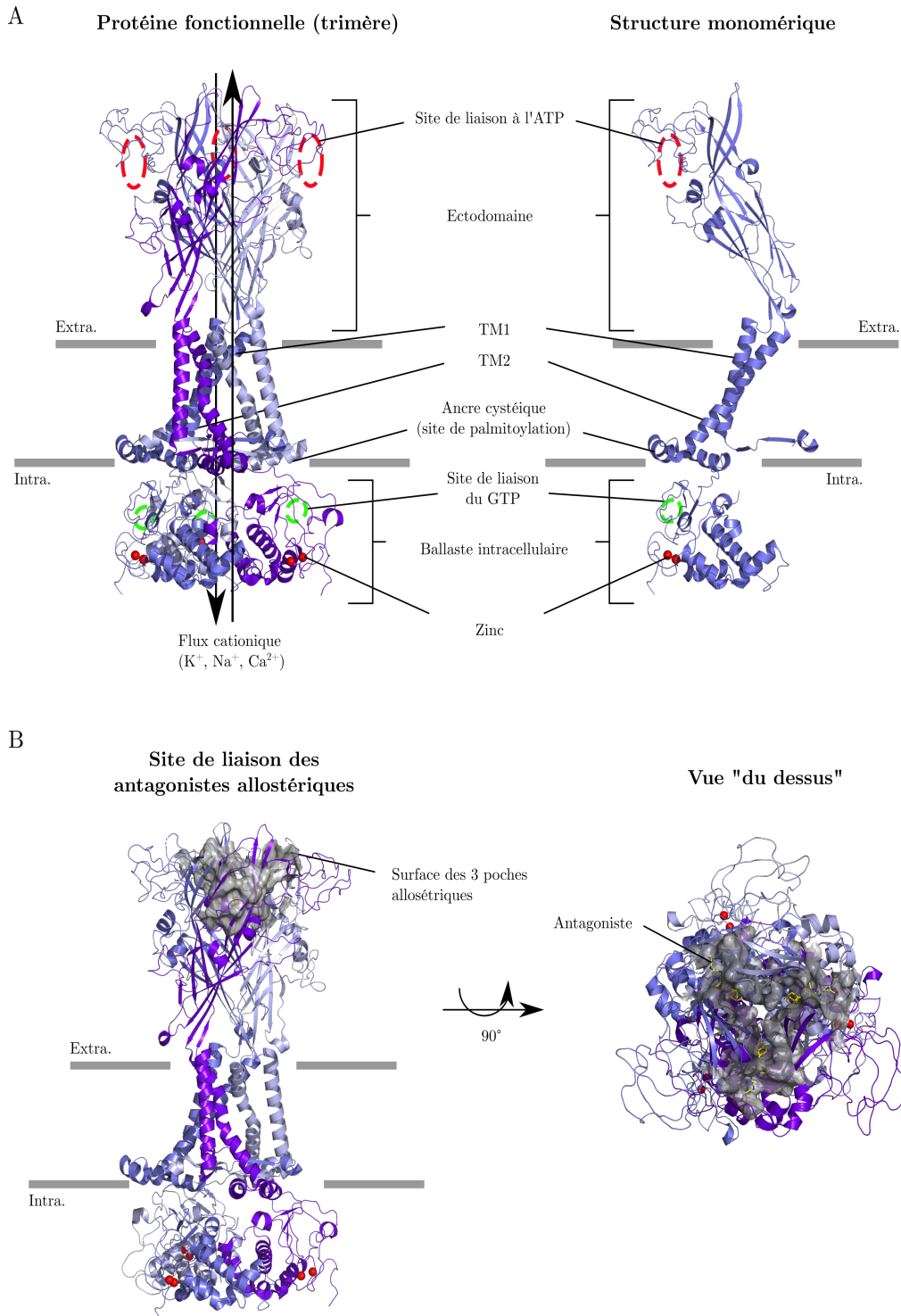


Figure 5 Structure du récepteur P2X7.

Certaines fonctions du récepteur P2X7 ont été brièvement introduites afin de les situer dans les rôles pléthoriques des purinorécepteurs. Une description plus précise de cette protéine captivante est proposée ici, comprenant ses aspects moléculaires, cellulaires et sa place dans les mécanismes neuroinflammatoires.

2.1 Généralités

Dans la famille des P2X, ce récepteur présente des particularités distinctives. À tel point que pendant un temps il a été nommé P2Z, étant considéré comme appartenant à une autre famille de récepteurs P2.

Le P2X7 partage beaucoup de caractéristiques structurales avec les P2Xs. Chaque sous-unité présente deux hélices hydrophobes transmembranaires, un ectodomaine responsable de la liaison à l'ATP et un domaine intracellulaire contenant les deux parties terminales. P2X7 est composé de 595 acides aminés, contre 379-472 pour les autres P2Xs. Cette disproportion se retrouve surtout sur la longue extrémité COOH-terminale intracellulaire. On doit son premier clonage à A. Surprenant, F. Rassendren, E. Kawashima, A. North et G. Buell en 1996⁷¹. Beaucoup de ces auteurs sont encore très actifs dans son étude. Les premières structures cristallines ont été publiées en 2016 par A. Karasawa et T. Kawate pour le P2X7 de panda géant⁷². Ces structures, liées à différents antagonistes ou dans l'état apo (fermé, sans ligand, code Protein Data Bank (PDB) 5U1L) n'incluent pas la partie intracellulaire. C'est en 2019 que McCarthy *et al.* publiera les coordonnées atomiques complètes du <P2X7 de rat, résolues par cryomicroscopie électronique⁷³ (code PDB 6U9W et 6U9V).

Les concentrations d'ATP nécessaires à l'activation de P2X7 sont inhabituellement élevées. Cette protéine peut également être activée avec le 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adénosine 5'-triphosphate (BzATP), dont l'EC₅₀ est alors 10 à 50 fois moins élevée (espèces-dépendant). Il est à noter que le BzATP est agoniste d'autres récepteurs purinergiques, il activera entre autres P2X4.

Différents inhibiteurs sont également décrits. Historiquement, le Brillant Blue G (BBG) a été le premier à être largement utilisé, malgré ses propriétés antagonistes envers certains récepteurs P2X (incluant ici encore le P2X4). Plus récemment, un panel d'antagonistes considérablement plus sélectifs a été découvert. Le complexe antagoniste-P2X7 et le rationnel structurel de l'inhibition ont été mis en avant par les recherches précédemment citées du groupe de T. Kawate. Les structures liées aux antagonistes AZ10606120 (code PDB 5U1W), A740003 (code PDB 5U1U) et A804598 (code PDB 5U1V) auront une importance particulière dans les travaux de recherches présentés ici. Les IC₅₀ de ces inhibiteurs dépendent de l'espèce étudiée et de l'expérience conduite, mais sont comprises entre 10 et 150 nM.

La structure de P2X7 peut présenter des variations intra- (épissage alternatif) et inter-individus (polymorphisme nucléotidique). On dénombre dix isoformes d'épissage alternatif, de P2X7A (la forme entière) à P2X7K⁷⁴, capable de s'inter-assembler. Les protéines ainsi formées arboreront alors des caractéristiques modifiées, particulièrement au regard de leurs sensibilités aux agonistes ou leurs habilités de former un macropore fonctionnel. Les polymorphismes nucléotidiques sont courants lors de l'expression de P2X7. Certaines mutations entraînées ont été caractérisées dans différentes neuropathologies, une revue détaillée est fournie en ref⁷⁵. Le domaine extracellulaire de cette protéine contiennent les sites de liaisons à l'ATP (Figure 5) ainsi qu'aux antagonistes allostériques précédemment discutés. Son domaine transmembranaire contient deux hélices alpha (nommément TM1 et TM2). Le domaine intracellulaire (ballast) renferme différentes propriétés importantes pour la régulation de ses fonctions. La palmitoylation ainsi que le complexe bi-nucléaire de zinc sont essentiels pour le trafic de cette protéine à la surface ainsi qu'à son adressage membranaire. Cependant le rôle de ce dernier n'est pas complètement défini. Enfin, un site de liaison à la guanosine triphosphate (GTP) et GDP est également présent. Le rôle de ce nucléotide et du complexe qu'il forme avec P2X7 n'est pas clair. Ces trois caractéristiques ne semblent pas impliquées dans les fonctions de canal ionique de P2X7, suggérant un rôle métabotrope ou d'interactions directes avec des protéines intracellulaires⁷³.

Chaque sous-unité de P2X7 se lie à une molécule d'ATP pour former un canal cationique. Ce dernier permet un efflux de K^+ et un influx de Na^+ et Ca^{2+} . Lors d'application prolongée d'ATP, ce canal va ouvrir un pore plus large (macropore, environ 8,5 Å) qui pourra accommoder le passage de cations jusqu'à 900 daltons. L'influx cationique est responsable de l'ouverture du canal ionique transmembranaire double-pore TWIK2, impliquant un efflux conséquent de potassium. Cette sortie massive d'ions K^+ est la force motrice de l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (NOD, LRR et protéine 3 contenant le domaine effecteur PYR) intracellulaire. Franceschini *et al.* suggèrent en outre une interaction spatiale (colocalisation microscopique et immunoprécipitation) de P2X7 et NLRP3⁷⁶. L'activation de cet inflammasome conduira à différents événements protéiques, dont la maturation de la pro-caspase-1 en caspase-1. Cette protéase est responsable du clivage des pro-interleukines pro-IL-1 β et pro-IL-18. Différents mécanismes seront ensuite disponibles pour la libération extracytoplasmique des interleukines produites (exosomes, microvesicules...) qui pourront transmettre et propager le signal inflammatoire. Cette cascade d'événements s'accompagne de libération d'ATP_e. P2X7 et ses partenaires d'interaction protéique sont de bons candidats pour expliquer ce mécanisme d'amplification autocrine du signal. Dans ce schéma, l'ATP pourra également être excrétée par voie vésiculaire. L'activation de P2X7 est

suspectée d'activer NF- κ B, un complexe protéique responsable de la transcription de protéine pro-inflammatoire, entre autres d'IL-1 β et de l'inflammasome NLRP3⁷⁷.

Ces événements conduiront ultimement à l'apoptose, pyroptose ou nécrose, formes de morts cellulaires programmées. Le choix du type de mort est fonction de la nature du stimulus de danger⁷⁸.

Un raccourci volontairement simpliste a été pris ici pour expliquer le rôle immunitaire de cette protéine. La libération d'IL-1 β est l'événement cellulaire le mieux décrit suivant l'activation de P2X7, mais une multiplicité de péripéties moléculaires implique cette protéine. Il n'en sera pas fait une synthèse détaillée, les résultats biologiques publiés sont encore trop épars.

Mais il convient de nuancer les effets cytotoxiques décrits pour rendre justice aux conséquences bénéfiques d'une stimulation basale. Cette dernière semble profiter aux métabolismes mitochondriaux en augmentant le stockage d'ATP⁷⁹, surexprimant des acteurs enzymatiques de la glycolyse, amplifiant les dépôts de glycogène... L'action de P2X7 sur le métabolisme énergétique n'est pas localisée sur quelques enzymes précises, mais sur le mécanisme dans son ensemble. Si bien qu'il permet la survie de cellules HEK293T en milieu dépourvu de glucose (et de sérum)⁸⁰. Dans le schéma global des actions de P2X7, son rôle prolifératif est à considérer, interrogeant alors une implication tumorale.

2.2 Problématiques actuelles

L'étude du récepteur P2X7 souffre du manque d'outils à disponibilité des chercheurs. Comme introduit précédemment, l'utilisation de BBG comme inhibiteur de cette protéine est récurrent. Mais on sait que cette méthode n'isole pas cette protéine du reste de la signalisation purinergique (antagoniste de plusieurs purinorécepteurs). Au même titre, l'agoniste BzATP n'est pas sélectif du récepteur P2X7. Il est aujourd'hui le meilleur outil pour activer P2X7, mais est également agoniste d'autres récepteurs (*i.e.* P2X4). Ce point est problématique, car dans beaucoup de pathologies, les rôles de chacune de ces protéines (P2X4 et P2X7) sont interreliés. De plus, d'autres moyens d'études très classiques tels que les anticorps ont échoué à montrer une sensibilité et une sélectivité satisfaisante. Enfin, la génération d'animaux KO a été pendant longtemps impossible, pour des raisons qui seront détaillées dans la section suivante.

Ce manque d'outils pharmacologiques, immunologiques et génétiques a contribué aux nombreuses incertitudes actuelles concernant P2X7. Un exposé des problématiques modernes et des limites méthodologiques d'études est proposé ci-après.

Pathologies

Les conséquences pathologiques qui accompagnent ce récepteur ne se réservent pas au système nerveux central. De nombreux exemples incluent le diabète de type 2, la polyarthrite rhumatoïde, la fibrose rénale, la néphrite⁸¹... Mais au regard du système nerveux central, ce dernier est fortement impliqué dans la maladie d'Alzheimer^{92–97}, la maladie de Parkinson^{98–100}, les douleurs neuropathiques^{82–85} mais également la dépression ainsi que différents troubles psychiatriques^{86–89}.

Il semble alors évident que le récepteur P2X7 est une cible thérapeutique très intéressante. En tant qu'acteur central de la neuroinflammation et de l'activation gliale, son blocage pharmacologique pourrait bénéficier à un nombre conséquent de pathologies. De nouveaux inhibiteurs hautement sélectifs ont été développés, certains ayant avancé en test clinique. Cependant, tous ont été discontinués, malgré des résultats préliminaires encourageants.

Ce récepteur fait néanmoins toujours partie des cibles majeures, notamment dans le traitement du glioblastome (tumeur cérébrale). L'inhibiteur AZ10606120 a montré des effets thérapeutiques supérieurs à la chimiothérapie classique pour entraver la prolifération tumorale (résultats humains *in cellulo* et *ex vivo*)⁸¹.

Les bornes étroites de nos connaissances des fonctions de cette protéine limitent les rationnels de développement médicamenteux. Différentes méthodes d'inhibition améliorent certaines conditions pathologiques. L'élaboration, encore inaboutie, de thérapies le ciblant est prometteur. Si aucune molécule n'a passé la barrière des tests cliniques, il est indispensable de continuer de front le travail de recherche fondamentale. En effet, il est très complexe de développer des thérapies innovantes (molécules inhibitrices/modulatrices, mais aussi anticorps, ARN-médicaments, thérapies géniques...) sans avoir de schéma précis du comportement de la cible en conditions normales et pathologiques. Dans ce sens, le récepteur P2X7 a été, et continue d'être, un mauvais élève : les méthodologies de recherches classiques ont si souvent échoué qu'il en est devenu iconique.

Délétion génétique et animaux KO

Les premières tentatives de générer des animaux KO ont été effectuées par Pfizer⁸² et GlaxoSmithKline (GSK)⁸³, respectivement en 2001 et 2005. Ces KO ont été produits par insertion de cassette génétique sur l'exon 13 (Pfizer) ou l'exon 1 (GSK). Mais ces modèles ont rapidement été remis en question. En 2005, J. Sánchez-Nogueiro *et al.* publieront une analyse du modèle KO de Pfizer, dans laquelle ils démontrent par Western-blot et immunocytochimie la présence d'une forme de P2X7 dans le cerveau de ces animaux⁸⁴. Nicke *et al.* feront de même pour les souris P2X7^{-/-} de GSK en 2009⁷⁴. Ces deux études mettent en avant l'épissage alternatif de P2X7, qui permet à ce dernier

d'échapper aux deux méthodes d'ablation génétique. Ainsi, les souris KO Pfizer expriment les isoformes P2X7B et P2X7C, quand les souris GSK expriment P2X7K⁸⁵. Ces isoformes n'avaient pas été détectées auparavant sur animaux sauvages, car ils sont bien moins exprimés que la forme principale, P2X7A. Ces spécimens ont toutefois produit des résultats précieux, permettant d'étudier la physiologie des isoformes P2X7.

Depuis, plusieurs modèles génétiques ont vu le jour. Metzger *et al.* en 2017 ont annoncé une souris KO conditionnelle accessible par Cre recombinase dont aucune forme d'épissage n'a échappé⁸⁶. Un autre modèle très intéressant a été publié par l'équipe d'Annette Nicke en 2018, dans lequel est décrit un knock-in (KI) d'une protéine fluorescente, Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) sur l'extrémité C-terminale de P2X7. Ici aussi, aucune version alternative d'épissage ne semble échapper à la modification génétique⁸⁷. Ces souris sont et seront d'une aide précieuse pour élucider les événements moléculaires impliquant P2X7, l'effet de sa délétion, son suivi dynamique ou encore son positionnement dans la cascade de signalisation au sein de modèles de physiopathologies induites (en plus de fournir un vrai contrôle négatif).

Les premières applications de ces souris, en particulier les deux derniers modèles discutés, a été l'étude de la localisation cellulaire du P2X7 dans le SNC central.

P2X7 neuronal

L'existence neuronale de P2X7 est sans aucun doute un des débats les plus animés parmi les spécialistes. La finalité de ce débat concernant particulièrement le mécanisme neuronal direct ou indirect de la neuroinflammation P2X7-dépendante.

L'origine du débat est directement liée aux manques d'outils sélectifs. Il a récemment (2017) donné lieu à un face-à-face bibliographique entre d'un côté Peter Illes, Tahir Muhammad Khan et Patrizia Rubini, défendant une position sceptique sur l'existence neuronale de P2X7⁸⁸. De l'autre, Teresa Miras-Portugal, Álvaro Sebastián-Serrano, Laura de Diego García et Miguel Díaz-Hernández affirment une présence fonctionnelle de ce récepteur à la surface des neurones⁸⁹. Afin de simplifier les arguments, il ne sera pas mentionné ici des preuves expérimentales reposant sur l'utilisation d'anticorps (peu fiable), des souris Pfizer et GSK lorsqu'elles ont été considérées comme KO « vrai » et d'agonistes/antagonistes aspécifiques seuls (*p. ex.* ATP, BBG, BzATP...).

Les premiers arguments en faveur de l'existence neuronale furent les expériences de RT-PCR et Western-blot, qui ont mis en avant la présence d'ARN messager (ARNm) codant pour P2X7 dans des neurones. Ces résultats furent ensuite confirmés par hybridation *in situ*. Mais si cette observation est bien acceptée, d'aucuns pourront remettre en doute la conséquence biologique de celle-ci. À juste titre, la découverte d'ARNm ne suffit pas à affirmer sa traduction en protéine. Il est probable que cette molécule soit

issue des stades primitifs des neurones post-mitotiques, dans lesquels P2X7 conduit la prolifération et l'élongation axonale (voir section dédiée).

L'équipe de Díaz-Hernández argumente une détection neuronale présynaptique basée sur l'inhibition de P2X7 à l'aide d'antagoniste spécifique (A-438079) bloquant l'augmentation intrasynaptique de calcium provoqué par une application de BzATP⁹⁰. De plus, l'inhibiteur AZ10606120 a été décrit comme diminuant les courants entrants évoqués par l'application d'ATP sur les terminaisons de la neurohypophyse⁹¹. Peter Illes *et al.* critiqueront ici la pureté neuronale (absence de glie) dans certains modèles. En effet, le marqueur neuronal utilisé pour en attester a été la synaptophysine, connue pour marquer également les astrocytes de cultures⁹².

Les modèles génétiques sont bien évidemment au centre du débat. Le KO conditionnel publié par Metzger *et al.* en 2017⁸⁶ a montré la présence d'ARNm-P2X7 neuronal, en particulier dans la zone hippocampale CA3. Cette observation n'est cependant pas suffisante et nécessite une preuve expérimentale de l'expression fonctionnelle de P2X7 (*p. ex.* électrophysiologie). Les souris produites par GenSat (Tg(P2rx7-EGFP)FY174Gsat), qui expriment une EGFP soluble sous le contrôle de l'expression de P2X7, montrent également une localisation neuronale de ce tag^{2a} fluorescent. Curieusement, les distributions de ces deux modèles sont très différentes, les souris de GenSat montrant une expression généralisée dans plusieurs zones du cerveau.

Une solution à ce problème a été publiée par Kaczmarek-Hajek *et al.*⁸⁷ en 2018 par la génération de souris KI P2X7-EGFP. Le groupe n'observe aucune distribution neuronale. Ceci malgré l'induction de nociception et d'inflammation (surexprimant P2X7 glial). Selon les auteurs, les différences de résultats avec les souris de GenSat s'expliquent par l'altération de mécanismes de régulation de l'expression protéique. Les souris de GenSat ont subi une modification sur l'intron 1, décrit comme essentiel dans la traduction de P2X7⁷⁴. L'expression de l'EGFP serait alors sous un contrôle P2X7-indépendant, expliquant la disparité de résultats. Cette interprétation est supportée par le développement et l'utilisation d'anticorps à domaine unique (sdAd, ou nanobody) spécifique de P2X7 par la même équipe⁸⁷. Ce sdAd n'a lui aussi pas été en mesure de montrer une présence de P2X7 neuronal (même après des stimuli nociceptifs).

Il semble donc que le débat tourne plutôt en faveur d'une expression non neuronale. Cependant, il ne peut être exclu que la quantité de P2X7 présents dans ces cellules soit en dessous de la limite de détection des méthodes utilisées. Afin de clôturer ce débat, des méthodes plus sensibles devront confirmer ces résultats.

Macropore et coopérativité protéique

^{2a} Anglicisme se référant à une sonde discriminable (étiquette)

Lors d'application continue d'ATP (ou de BzATP), P2X7 peut permettre à des cations organiques jusqu'à 900 Da (diamètre de 8,5 Å) de traverser la membrane plasmique. Une ouverture prolongée de ce macropore conduira à une mort programmée de la cellule. Mais les rôles physiologiques de la formation de ce macropore sont encore inconnus. Différents axes de recherche sont envisagés pour élucider cette question. Parmi eux, l'augmentation brusque de l'efflux local d'ion K^+ , ou la fusion membranaire⁹³.

La fonction est aussi inconnue que la structure exacte de ce pore. Un débat existe encore sur la coopérativité protéique. Certaines preuves expérimentales supportent l'idée d'un complexe multiprotéique (pannexin-1 a longtemps été un candidat probant) quand d'autres sont en faveur d'une perméation à travers P2X7, et donc d'une dilatation du pore du récepteur. Notre laboratoire a récemment publié un papier de recherche liant la fonction du macropore à un complexe multi-protéique⁹⁴.

Sans clarifier le rôle physiologique du macropore, celui-ci ne peut représenter une cible thérapeutique convaincante. Cette propriété renforce la difficulté d'étude de cette protéine, ajoutant une autre inconnue à l'élucidation de ses fonctions.

Les partenaires d'interaction de P2X7, en dehors du macropore, commencent à être identifiés. Dans la plupart des cas, la fonction biologique de l'interdépendance n'est pas claire. L'extrémité C-terminale semble être un hub central des interactions protéiques. Plus de 50 protéines ont été identifiées comme partenaires. La liste exhaustive est donnée en ref⁹⁵. P2X4 fait partie des protagonistes notoires, dû aux fonctions très proches qu'exercent ces deux récepteurs (activation de l'inflammasome NLRP3, sécrétion d'IL-1 β et IL-18...). Certains des partenaires semblent être impliqués dans différents rôles pro-inflammatoires (macropore, mais aussi, perméation calcique, réarrangement du cytosquelette, phagocytose...). À ce titre, comprendre et moduler ces interactions seront des atouts précieux dans le développement d'espoirs cliniques.

Dynamique et organisation nanométrique

Les conséquences du manque d'outils d'observation se répercutent sur notre connaissance nanométrique du comportement de P2X7. Sa dynamique (diffusion membranaire) autant que sa nano-organisation n'a été que très peu étudiée. Le seul modèle d'étude a été développé en 2013 par Shrivastava *et al.*⁹⁶ en transfectant un construit génétique P2X7-Dendra2, une protéine capable de photoconversion d'une fluorescence verte à rouge, dans des neurones. Grâce à cette méthode, les auteurs ont étudié le comportement de P2X7 dans le temps, au-delà de la limite de diffraction de la lumière.

Cette protéine s'agrège en « nanocluster » de 100 nm de diamètre, dont la dynamique est diminuée lors d'application d'ATP. Cette modulation dynamique a déjà été décrite pour d'autres P2X⁹⁷, mais ce résultat est le premier concernant P2X7.

Cependant, le modèle de transfection de protéines de fusion est loin d'être endogène et il convient de traiter ces observations avec prudence. Obtenir des données fiables et robustes avec une telle résolution demande une méthodologie de marquage non génétique sur modèle endogène.

Marquage de protéines

L'observation a toujours été une des plus grandes problématiques de la biologie (et des sciences expérimentales en général). Dans son sens purement scientifique, elle peut être définie comme le recueil de données analysables acquises lors d'une expérimentation.

Dans une méthodologie empirique, la mesure détermine le résultat. Mais celle-ci ne sera que la conséquence directe de la méthodologie employée. Il est courant d'user d'approches restrictives afin de limiter l'observation à un nombre de variables qui autorisera une interprétation rationnelle. Les conclusions seront alors projetées sur des constructions conceptualisées, simplistes et volontairement infidèles à la réalité, appelées modèles. Ceux-ci sont une base pour l'élaboration de théories expliquant un phénomène et seront souvent contradictoires entre eux, conformément à leurs fondements réductionnistes.

La description du monde par les théories scientifiques est donc soumise à la subjectivité expérimentale. C'est à ce sujet qu'Werner Heisenberg, célèbre physicien allemand, écrira « What we observe is not nature in itself but nature exposed to our method of questioning ».

La biologie moléculaire et cellulaire illustre parfaitement ce propos. L'observation de protéines au sein de milieu biologique nécessite de les isoler du protéome (et des autres biomolécules) lors de la mesure. Pour ce faire, il convient de marquer préalablement la cible avec une sonde adéquate afin de faire émerger un signal spécifique détectable. En conséquence, une grande partie du système doit être ignoré.

Le biologiste devra faire un choix éclairé sur (1) le type de sonde et (2) le moyen de marquer l'objet biologique d'intérêt dans les conditions de l'expérience. La section suivante s'intéressera principalement à ce dernier point, assumant (sauf indications contraires) que la sonde utilisée est un fluorophore organique pour microscopie à fluorescence.

Introduction et intérêts biologiques

La compréhension des processus biologiques requiert une vision dynamique de l'organisation cellulaire dans les conditions étudiées. Le marquage de protéine permet d'isoler une cible et d'en extraire les caractéristiques à différente échelle de résolution spatiale et temporelle. Ce dernier est nécessaire à la quasi-totalité des méthodologies de recherche biologique sur le vivant (cellules, organes ou organismes).

Les techniques à disposition des études biologiques sont considérables et prennent des formes très variées. Pour cette raison, il ne sera principalement mention ici que des

méthodes de marquages protéiques pour une application en microscopie à fluorescence. Ce choix se justifie par les avancées exceptionnelles apportées par ce type d'analyse. Elle permet de séparer la lumière émise par un échantillon de la lumière qu'émet une sonde (fluorophore), et donc d'isoler cette dernière du système, aussi complexe soit-il. Sa mise en place relativement simple admet une résolution spatio-temporelle inégalée et une observation non invasive. C'est devenu une méthode de choix lors d'étude de processus biochimique dû à sa relative simplicité de mise en place et la complexité des informations qu'elle fournit.

Les techniques d'imagerie à fluorescence fournissent de précieuses informations sur la distribution et la dynamique de cibles thérapeutiques potentielles. Elles mettent en évidence (ou réfutent) l'implication supposée de ces dernières dans des processus pathologiques. Elles offrent alors un rationnel d'inhibition ou de modulation thérapeutique rigoureux et primordial. De plus, elle permettra de préciser les paramètres cellulaires desdites protéines : distribution, intensité d'expression, diffusion/mobilité, turnover, partenaires d'interactions...⁹⁸.

1. Méthodes courantes et exemples sélectionnés

Conjuguer une sonde fluorescente à une cible biologique n'est pas un exercice aisé. Les paramètres gouvernant le choix de la méthodologie adéquate sont nombreux et dépendent pour beaucoup des résultats escomptés, mais aussi de l'accessibilité de ces dernières. Au regard du système utilisé (cellule, tissu, animal...) et de la cible étudiée, le concepteur de l'expérience devra estimer un compromis approprié.

La section suivante fait état de quelques méthodologies de marquages communes. Elles ont pour but d'introduire factuellement ce vaste sujet à l'aide d'exemples choisis. À ce titre, beaucoup d'approches seront volontairement ignorées, à l'instar des techniques immunologiques (*c.-à-d.* anticorps conjugués).

1.1 Protéines de fusions

Lorsque l'expérimentateur a un contrôle étendu sur son système biologique et à la possibilité d'éditer le génome, les protéines de fusions deviennent une technique très puissante. Ces chimères moléculaires sont formées par l'association de plusieurs gènes afin de créer une protéine complexe exhibant les propriétés de ses constituants.

Protéines fluorescentes

L'archétype des protéines fluorescentes est sans aucun doute la green fluorescent protein (GFP). Extraite de la méduse *Aequorea Victoria* en 1994, elle offrira le prix Nobel

de chimie de 2008 à O. Shimomura pour sa découverte, à M. Chalfie pour son application comme protéine de fusion et à R. Y. Tsien pour les modifications de cette dernière, introduisant alors une palette de couleurs différentes. D'autres organismes exprimant des protéines fluorescentes ont depuis été identifiés. Cela a permis certaines avancées majeures dans la modulation des paramètres photochimiques, en particulier la brillance^{3a}, les longueurs d'onde d'émission/absorption et l'encombrement. Le principe général est illustré par la Figure 6.

Ces protéines sont formées par des feuillets bêta entourant un fluorophore dans une forme de baril. La formation du fluorophore est issue de la modification post-traductionnelle de 3 acides aminés. La biosynthèse de ce dernier est dépendante du repliement protéique, qui oriente correctement les résidus catalytiques qui guideront la voie de synthèse du composé fluorescent. Ce point est particulièrement important, car il sous-entend que la protéine est capable d'autocatalyser les réactions nécessaires à sa maturation. À ce titre, elle ne dépendra d'aucun cofacteur ou enzyme. Il devient donc possible de l'exprimer dans n'importe quel type cellulaire⁹⁹.

La fusion de cette dernière avec une protéine cible offre le parachèvement de la sélectivité dans la biologie moderne. Le signal fluorescent ne sera, par définition, que sur sa cible. Enfin, cette méthode ne souffre d'aucun problème de perméabilité cellulaire, car le fluorophore est construit *in situ*. Il est à ce titre possible d'étudier des compartiments extrêmement précis et restreints.

Ces 20 dernières années ont été riches en démonstration de l'utilité biologique de cet outil, de la simple fusion génétique de gène plasmidique transfectés à l'organisme entier. L'introduction sur la signalisation purinergique et le récepteur P2X7 en fait mention régulièrement et témoigne de l'omniprésence de cet outil dans la recherche biologique.

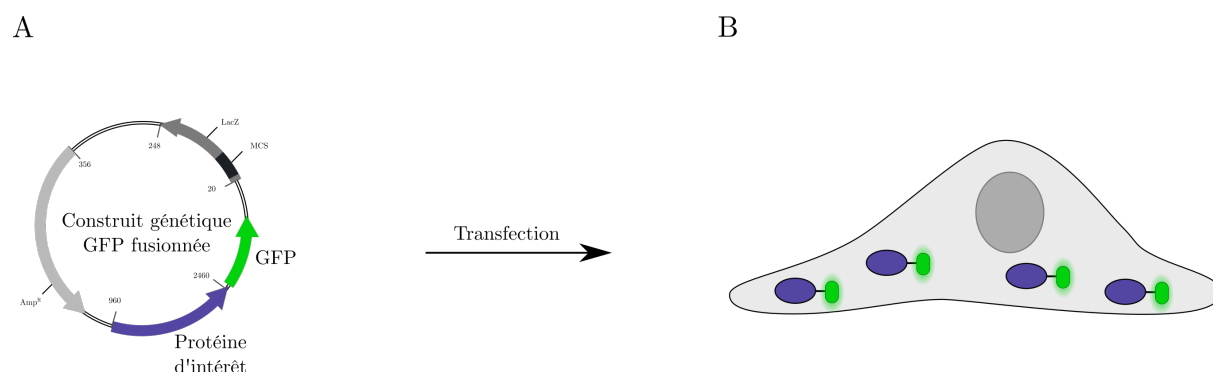


Figure 6 Principe général du marquage de protéine par fusion de protéines fluorescentes. A. Un construit génétique (plasmide) est modifié pour porter une fusion du gène de la protéine d'intérêt et de la protéine fluorescente. B. Ce dernier sera transfecté dans une cellule cible pour exprimer la protéine chimérique.

^{3a} La brillance est définie comme le produit du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique de fluorescence

Les protéines fluorescentes ont par ailleurs été modifiées pour exhiber des propriétés photophysiques qui optimisent ou dépassent la « simple » fluorescence des GFP. Ces objets ont alors drastiquement fait évoluer les possibilités d'analyse. Le décalage des observations vers les longueurs d'ondes rouges et infrarouges ((E2-Crimson, mNeptune, ...)) permet par exemple l'imagerie intravitale. Grâce à la diminution d'absorbance des tissus dans ces zones du spectre et leur faible autofluorescence, les instruments d'imagerie peuvent pénétrer plus en profondeur dans l'échantillon étudié. De plus, la diversification des propriétés a permis de dépasser la limite de diffraction de la lumière imposée en microscopie optique. Certaines protéines fluorescentes sont capables de photoconversion (Dendra, Eos, ...), autorisant conséquemment l'observation nanométrique d'objet biologique. Ce sujet sera traité en détail dans la section dédiée à la microscopie super-résolutive. Enfin, quelques protéines fluorescentes peuvent également former des partenaires de FRET (Förster resonance energy transfer) afin d'identifier d'éventuelles interactions protéines-protéines.

Protéine « self-labeling »

En considération de l'évolution perpétuelle des techniques d'imagerie, les scientifiques sont devenus friands de méthodes de marquage toujours plus élaborées. Les enzymes dites « suicides » ont ainsi vu le jour. Ce sont des protéines conçues pour permettre une conjugaison covalente avec une petite molécule fonctionnalisée. L'intérêt premier de ces protéines de fusion repose sur la diversité des sondes chimiques qui peut être apportée sur la protéine d'intérêt.

Plusieurs méthodes sont décrites aujourd'hui et certaines sont devenues des solutions commerciales routinières. C'est notamment le cas d'HaloTag, développé par Promega en 2008¹⁰⁰. Cette enzyme est une modification de l'haloalcane dehalogenase bactérienne. Elle permet la capture covalente d'une sonde chimique par la bioconjugaison de son substrat, un chloroalcane. Dans les années 2000, le groupe de recherche de K. Johnsson

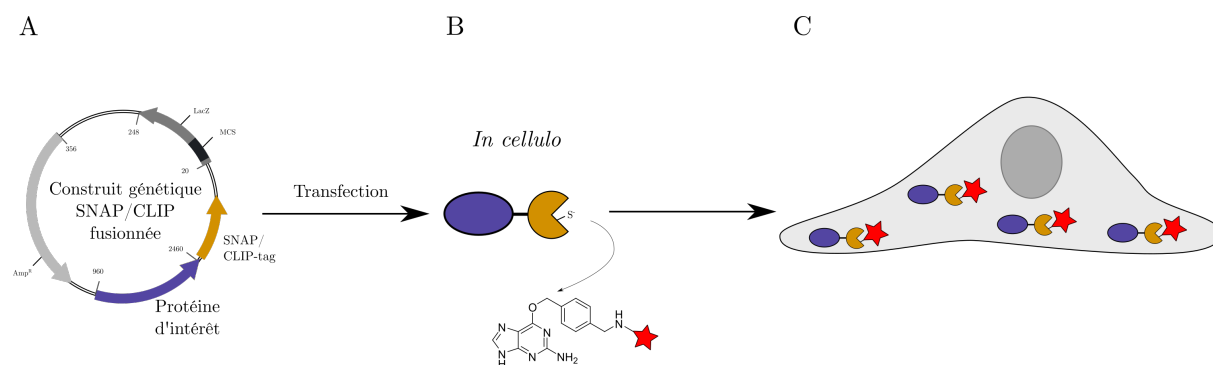


Figure 7 Principe général du marquage de protéine par enzyme suicide. Un plasmide modifié (A) est transfecté dans une cellule. Après expression de la protéine chimérique, l'enzyme réagira avec son substrat lié à une sonde (B) afin de marquer de façon covalente la protéine d'intérêt (C).

a développé le SNAP-tag et sa variante, le CLIP-tag. Ces biotechnologies, orthogonales entre elles, sont inspirées d'une enzyme responsable de la réparation du génome, la O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. Spontanément, une guanine peut être méthylée en O⁶-methylguanine. Le rôle de cette enzyme non catalytique est alors d'assurer le transfert de cet alkyle sur son propre site actif via une réaction S_N2^{4a}. Par évolution dirigée, ce groupe a réussi à éditer cette fonction pour développer le SNAP-tag. Cette enzyme se lie irréversiblement à la O⁶-benzylguanine, et atteste d'une cinétique ($k = 2.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et d'une sélectivité remarquable¹⁰¹. L'optimisation de cette technologie a aboli la réaction de la protéine sauvage avec l'ADN, offrant un outil de fusion génétique puissant et simple de mise en œuvre. Quelques années plus tard, le CLIP-tag sera mis au point. Cette approche s'inspire du SNAP-tag en diversifiant le ligand nécessaire à la conjugaison, ici la O²-benzylcytosine. Son avantage premier réside dans l'orthogonalité des substrats, permettant l'analyse multiprotéique¹⁰². Le principe général est illustré par la Figure 7.

Sur bien des points, les enzymes suicides se montrent supérieures aux protéines fluorescentes. Elles autorisent la conjugaison d'une protéine d'intérêt avec une diversité chimique virtuellement illimitée. À ce titre, elles ne se limitent pas à la microscopie optique, mais permettent le design d'expériences multiparamétriques complexes. Par exemple, l'utilisation de fluorophores sensibles au pH, à l'hydrophobicité ou encore à l'oxydation du milieu offre des capacités analytiques qui dépassent la résolution spatio-temporelle. De plus, l'emploi concerté de SNAP-tag et CLIP-tag permet la construction de biosenseurs FRET, l'exploration des interactions protéine-protéine et leur modulation.

Avantages et limites

Les méthodes de fusion protéique offrent une sélectivité extraordinaire, puisqu'exprimées avec la protéine d'intérêt. L'optimisation des techniques de biologie moléculaire permet à ces dernières de trouver leurs places dans la quasi-totalité des laboratoires de biologie. Compatible avec les études *in vivo*, elles sont parmi les outils d'étude protéique les plus puissants et complets. Néanmoins, elles présentent également certaines limitations. Ainsi, la sélectivité du marquage par enzymes suicides est dépendante du substrat et de ses fonctions chimiques. Par exemple, il est aujourd'hui décrit que certains fluorophores interagissent avec la membrane lipidique, créant une source de signal aspécifique¹⁰³.

Mais surtout, ces protéines sont encombrantes. D'un poids moléculaire conséquent (EGFP : 27 kDa, Halo-tag : 33 kDa, SNAP-tag : 19,4 kDa), elles limitent la dynamique

^{4a} Substitution nucléophile bimoléculaire. La réaction s'effectue selon un mécanisme concerté dans lequel l'attaque du nucléophile et le départ du groupe partant sont simultanés.

et les interactions de la protéine ciblée. Les souris P2X7-EGFP développées par le laboratoire d'A. Nicke illustrent bien ce point. Cette protéine de fusion a été insérée sur la partie C-terminale de la protéine cible. Cette extrémité est pourtant décrite comme gouvernant la majorité des interactions responsable des cascades signalétiques⁹⁵. La fusion de structure protéique à l'objet étudié aura des conséquences difficiles à prédire, mais introduira par définition des artefacts biologiques.

1.2 Acides aminés non naturels

Cette technique repose sur une méthodologie très élégante : remplacer un acide aminé naturel lors de la synthèse ribosomale par un variant structurel non canonique.

La synthèse protéique requiert un code apporté par l'ARNm sous forme de triplet nucléotidiques, appelé codon, permettant de traduire une séquence d'acides aminés. Ceux-ci sont apportés par le couple ARNt (ARN de transfert)/aminoacyl-ARNt synthétase au niveau du ribosome. Parmi les 64 codons possibles, 3 ne sont pas codants : UGA (opale), UAA (ocre) et UAG (ambre). Ce sont les « codons-stops », ou « non-sens », permettant de signaler au ribosome la fin de la séquence protéique.

Toutefois, le codon ambre n'est naturellement que peu présent dans la plupart des organismes. En conséquence, il est envisageable de synthétiser *in vitro* un couple ARNt/aminoacyl-ARNt synthétase décodant le codon ambre, processus dit de « suppression ». Ceci permet alors d'incorporer un acide aminé non canonique sur une protéine à un site spécifique. En 1989, l'équipe de P. Schultz en a fait une démonstration remarquable. Ils ont tout d'abord substitué un triplet nucléotidique par un codon ambre

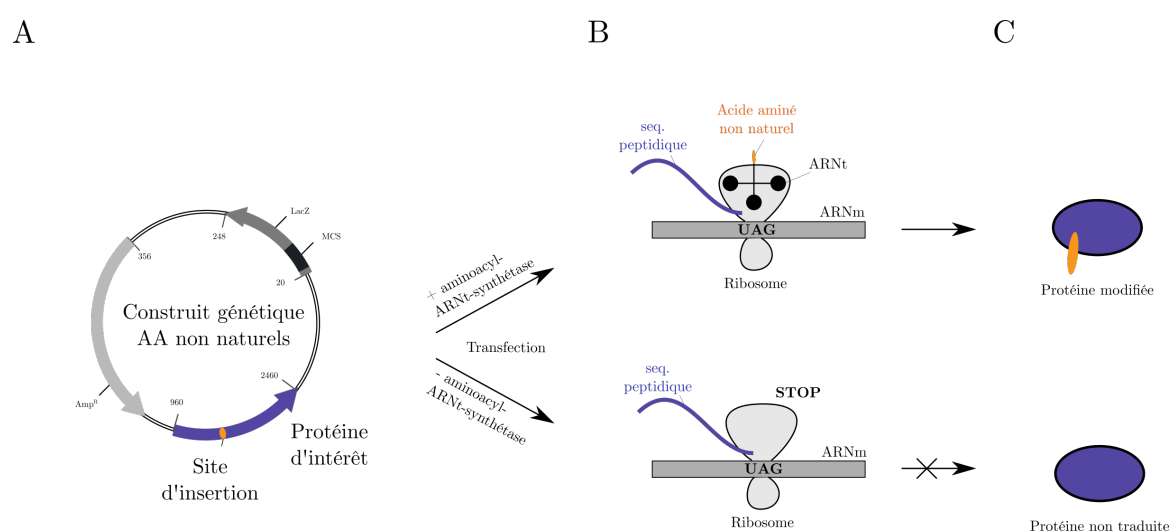


Figure 8 Principe général de l'incorporation d'acides aminés non naturels. Après transfection du gène muté (A), la présence du couple ARNt/aminoacyl-ARNt synthétase (B) dictera la synthèse de la protéine finale (C). Une chimie bioorthogonale permettra alors d'apporter une sonde détectable sur l'acide aminé cible (non montré ici).

dans la séquence d'une β -lactamase plasmidique. Ils ont ensuite aminoacylé un ARNt suppresseur avec un acide aminé non naturel *in vitro*. Enfin, ce plasmide a été transfecté dans une cellule hôte. En présence de l'ARNt aminoacylé, la protéine est alors traduite et incorporera au site de mutation l'acide aminé imposé. La privation de ce dernier induira l'arrêt de la synthèse protéique au codon non-sens (Figure 8). Cette méthodologie permet un contrôle fin de l'expression de la protéine cible¹⁰⁴ en plus d'une modification dirigée. Le couple ARNt/aminoacyl-ARNt synthétase additionnel est orthogonal à la machinerie traductionnelle en l'absence de codons ambre, garantissant une sélectivité optimale.

Cette approche s'étend alors au-delà du champ du marquage de protéine. L'incorporation d'acides aminés contenant des fonctions masquées placés sur des sites catalytiques permet l'activation ou l'inhibition de l'activité. Par exemple, une irradiation lumineuse peut révéler l'activité d'un résidu, masquée par un groupement photolabile. La littérature présente de nombreuses applications dans les cellules mammifères. Par exemple, D. Nguyen *et al.* ont photocagé une cystéine par ce procédé, et décrivent un contrôle spatial et temporel sur l'activité de l'enzyme ciblée¹⁰⁵. Une diversité chimique a depuis été introduite et étend les possibilités de modulations d'activité protéique.

Appliquer cette méthode pour le marquage protéique implique l'introduction de partenaire chimique de réactions bioorthogonales. C'est ainsi que les solutions commerciales ont été développées et optimisées. Elles ne nécessitent aujourd'hui que très peu de labeurs expérimentaux afin d'insérer une mutation par expansion du code génétique. La réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électron (iEDDA) a émergé comme un des meilleurs candidats. Rapide ($k \approx 1 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et sélective, elle implique une cycloaddition [4+2] entre un alcène tendu et une tétrazine. Cette dernière a un potentiel fluorogénique très intéressant. Certains fluorophores fonctionnalisés avec une tétrazine voient l'intensité de leur fluorescence drastiquement diminuée. La réaction avec un alcène tendu présent dans le milieu restituera la brillance originale. Les tétrazines sont des composés très attirants pour l'imagerie cellulaire. Elles réduisent significativement le signal aspécifique et autorisent par le fait des observations intracellulaires sans lavage de l'excès de fluorophore.

Expandre le code génétique par insertion d'un trans-cyclooctène (TCO) sur un site spécifique est aujourd'hui une des alternatives les plus puissantes pour conduire des expériences de microscopie super-résolutive¹⁰⁶.

Cette méthode est relativement simple de mise en œuvre sur culture cellulaire. Elle s'appuie pour beaucoup sur des solutions commerciales abordables pour la plupart des laboratoires possédant des équipements standards. Des protocoles détaillés sont également disponibles¹⁰⁷. Elle élimine les artéfacts introduits par les protéines de fusions et permet un marquage hautement sélectif (dépendant des propriétés de la sonde chimique

choisie). Enfin, elle autorise une étude dynamique et multiparamétrique. Plusieurs protéines peuvent être fonctionnalisées avec des partenaires de chimie bioorthogonales différentes.

Néanmoins malgré ses qualités indéniables, cette technique n'est pas exempte de limitations. Une des plus évidentes est la présence endogène du codon ambre. Si ce codon-stop est le moins abondant chez les mammifères, son occurrence naturelle induit une source directe d'aspécifisme (25 000 cadres de lecture ouverts au sein du génome humain)¹⁰⁸, en plus de la génération de protéines aberrantes. La cible étudiée devra donc être abondante et permettre un ratio signal/bruit satisfaisant. Cela limite donc son application sur les cibles protéiques peu exprimées. L'étude de protéines membranaire couplée à des fluorophores imperméants à la bicouche lipidique s'affranchit de ce point. Ensuite, le site d'incorporation ne peut pas être choisi au hasard. La modification structurale résultante impactera la flexibilité de la séquence peptidique. Les conséquences fonctionnelles doivent être minutieusement étudiées.

Enfin, le transfert du système de culture à l'animal n'est pas trivial. L'organisme doit être modifié pour exprimer la paire ARNt supprimeuse/aminoacyl-ARNt synthétase, fonctionnelle et orthogonale au mécanisme de traduction endogène. De plus, les cellules eucaryotes ont un système de dégradation des ARNm non-sens, spécifiquement dirigé contre les codons-stops présents dans les ARNm afin de les dégrader. Il convient alors de contrôler ce mécanisme¹⁰⁹. Enfin, l'acide aminé non naturel doit être distribué et disponible dans toutes les cellules étudiées de l'animal. Ceci limite le choix des fonctions introduites. Les acides aminés chargés ou encombrants sont alors défavorisés.

Malgré ces challenges, différentes équipes ont réussi ce tour de force. S. Greiss et J.W. Chin ont publié en 2011 l'expansion du code génétique du nématode *C. elegans*¹¹⁰. Récemment, S. Han *et al.* ont publié l'incorporation d'acides aminés chez *mus musculus*. Les perspectives et les opportunités qu'offre ce système sont extraordinaires. Certains le prédisent comme devenant l'outil le plus puissant dans l'étude protéique¹¹¹.

En dépit de la robustesse des résultats fournis par cette méthode, sa mise en œuvre au sein d'organismes pluricellulaires est laborieuse et encore peu répandue. Peu de groupes de recherche sont capables de considérer les observations *in* et *ex vivo* comme routinières. À ce titre, le développement de nouvelles approches admettant une modification sélective d'une protéine cible par l'introduction d'une diversité de fonctions chimiques devient un champ de recherche très actif. L'aboutissement ultime serait un marquage de protéine native, ne nécessitant aucune étape d'ingénierie génétique et n'induisant aucun artefact dans les fonctions biologiques.

2. Marquage guidé par un ligand

Circonvenir aux limitations des méthodes évoquées jusqu'ici n'est pas chose aisée. Quatre grandes problématiques ressortent de ces dernières : L'encombrement protéique, la modification génétique, la compatibilité avec l'étude *in vivo* et l'accessibilité (simplicité d'usage). Un tel cahier des charges ne laisse que peu de candidats éventuels. Ici, la biologie chimique dévoile quelques atouts. C'est au sein de cette discipline passionnante et relativement jeune qu'a été développé le marquage chimique de protéine guidé par un ligand. Cette approche se distingue par son remarquable potentiel. Elle permet de bioconjuguer une protéine native dans un milieu biologique multimoléculaire complexe. Cette méthode de choix est décrite dans la section suivante. Ses composants, applications et considérations expérimentales seront détaillés.

Principes généraux

Le marquage d'affinité guidé par un ligand permet de fonctionnaliser une protéine avec une sonde chimique pertinente. Ceci sur cellule ou tissu vivant et sans aucune modification génétique.

Dans la première preuve de concept apportée en 2009, I. Hamachi et son équipe décrivent les trois étapes nécessaires à cette méthodologie (Figure 9). (1) À un ligand L de faible constante de dissociation (K_D) est incorporé un électrophile clivable, lui-même lié à la sonde choisie. La reconnaissance du ligand pour sa cible protéique P induit la formation d'un complexe moléculaire ligand-protéine LP. (2) Ce dernier permet de convertir une réaction bimoléculaire en réaction pseudo-intramoléculaire, modifiant ainsi favorablement ses variables d'état (en particulier la concentration locale). La proximité induite conduit à la juxtaposition de l'électrophile et de l'acide aminé nucléophile endogène ciblé, facilitant la réaction de substitution nucléophile S_N2 (constante de vitesse k_L) qui transférera la sonde chimique sur le résidu. (3) Le ligand clivé se dissociera alors de la protéine marquée P^* et sera ensuite lavé du milieu¹¹².

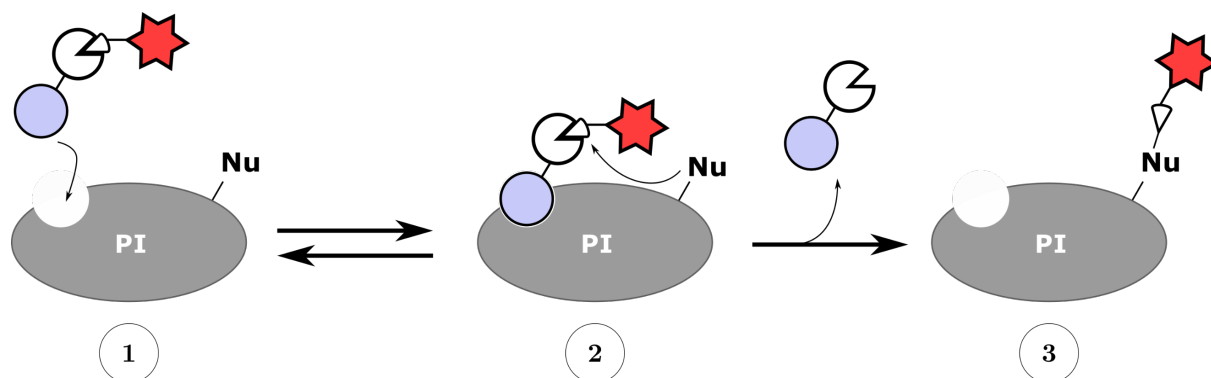
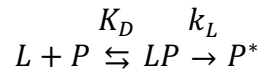


Figure 9 Illustration schématique du marquage de protéine guidé par l'affinité. PI : protéine d'intérêt. Nu : acide aminé nucléophile. Rond bleu : ligand de haute affinité. Étoile rouge : sonde chimique.

La réaction de marquage suit l'équation¹¹³ :



Équation 1

Soit :

$$[P]_0 = [P] + [PL] + [P^*] = [p] + [P^*] \text{ avec } [p] = [P] + [PL]$$

Équation 2

$$K_D = \frac{[L] [P]}{[LP]}$$

Équation 3

$$-\frac{d[p]}{dt} = k_L [PL]$$

Équation 4

Pour laquelle la solution est :

$$\ln \frac{[p]}{[P]_0} = -\frac{k_L \cdot t}{1 + \frac{K_D}{[L]}}$$

Équation 5

Dans le cas où $[L] \gg [P]_0$, la constante de pseudo-premier ordre k_{app} de la réaction est défini par :

$$\frac{[P] + [LP]}{[P]_0} = \exp(-k_{app} \cdot t)$$

Équation 6

Puisque :

$$P = [P]_0 - [P^*] \text{ et } P = [P] + [LP]$$

$$k_{app} = \frac{k_L}{1 + \frac{K_D}{[L]}}$$

Équation 7

Et

$$[P]_0 - [P]^* = \exp(-k_{app} \cdot t)$$

Équation 8

Donc :

$$[P]^* = [P]_0 (1 - \exp(-k_{app} \cdot t))$$

Équation 9

Où k_L et K_D seront établis expérimentalement.

Cette méthode permet donc le marquage covalent d'une protéine cible sans aucune modification préalable. De plus, elle garantit l'intégrité de ses fonctions endogènes. L'encombrement stérique qu'induit le ligand au sein du site actif de la protéine n'autorise celui-ci qu'à en modifier sa périphérie. Les résidus qui composent le site catalytique sont ainsi protégés. Cette notion est bien évidemment simplifiée pour un ligand allostérique.

Une variante du marquage guidé par un ligand a été décrite par Y. Koshi au sein du laboratoire de I. Hamachi : la catalyse guidée par l'affinité. Dans cette approche, un ligand est modifié à son extrémité accessible au solvant par un groupement catalytique. Le marquage s'effectuera en 3 étapes. (1) La reconnaissance spécifique du ligand pour sa cible. (2) Ce dernier sera alors en mesure, dans une réaction bioorthogonale, d'activer un donneur d'acyle exogène pour former un intermédiaire réactif à la surface du site de liaison. (3) Cet intermédiaire permettra alors l'acylation d'acides aminés nucléophile par effet de proximité. La protéine sera ainsi sélectivement conjuguée avec une sonde portée par le donneur d'acyle. Le ligand réintégrera un cycle catalytique.

Cette forme de marquage présente au moins deux avantages sur le marquage guidé par un ligand. Elle admet l'utilisation de groupements nucléophiles sur le ligand, qui serait décomposé dans la première version. Ensuite, le recyclage du ligand catalytique après l'étape de marquage permet théoriquement d'en réduire les concentrations nécessaires, bénéficiant à la spécificité du marquage (Figure 10).

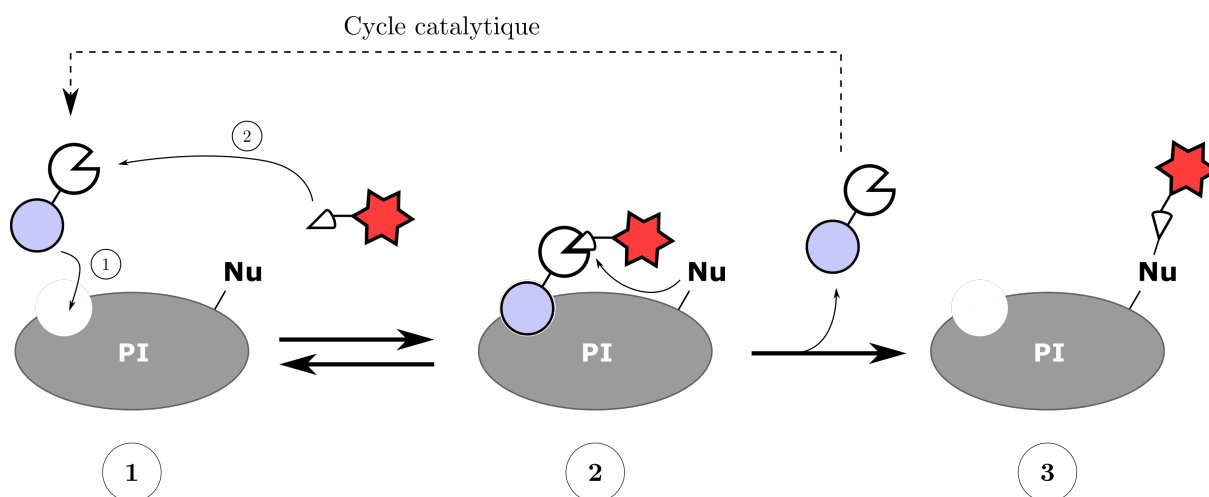


Figure 10 Illustration schématique du marquage de protéine par catalyse guidé par l'affinité. PI : protéine d'intérêt. Nu : acide aminé nucléophile. Rond bleu : ligand de haute affinité. Étoile rouge : sonde chimique.

Si l'outil optimisé est en pratique très simple d'utilisation, le design d'un réactif de marquage est un processus complexe qui demande des données préliminaires fiables et une attention particulière. La chimie guidée par un ligand comporte 4 points structurels critiques : un ligand de haute affinité, un électrophile, un lien chimique entre ces deux structures et la sonde. L'approche catalytique nécessite quant à elle le design de deux molécules : le ligand lié à l'extrémité catalytique, et son substrat qui comportera un donneur d'acyle et la fonction de marquage d'intérêt. Une analyse de chacune de ces caractéristiques est proposée ci-après. Les exemples d'applications fournis par la littérature ne sont pas encore suffisants pour poser des bases théoriques solides sur lesquelles un expérimentateur pourra s'appuyer pour la conception fiable d'un marquage chimique. À ce titre, cette analyse sera restreinte aux grandes lignes extraites des données empiriques disponibles sur les parties ligand, lien chimique, électrophile/catalyseur et sonde du réactif de marquage. Le développement de cette stratégie repose pour beaucoup sur une méthode essai-erreur. Toutefois, des principes généraux en émergent et permettront, à terme, de rationaliser au mieux cette approche.

Ligand

Le ligand est sans aucun doute la partie la plus importante de cette stratégie. C'est la garante de la sélectivité qui permet de guider le réactif pour permettre ou accélérer la réaction. Le K_D du ligand choisi se doit impérativement d'être de l'ordre du nanomolaire. En effet, Tamura *et al.* ont démontré ce point en 2018 lors du marquage de la protéine FKBP12. Une même stratégie chimique construite sur deux ligands d'affinité drastiquement différente montre que si le premier ($K_D = 20$ nM) est capable de marquer la protéine cible, le deuxième, peu affin ($K_D = 3,5$ μ M) exhibe une cinétique lente conjointement à une sélectivité déplorable¹¹³.

Dans un cas de figure idéal, le ligand choisi ne doit activer aucun processus biologique. Les temps d'incubation avec celui-ci peuvent varier de quelques minutes¹¹³ à une dizaine d'heures¹¹⁴. Le candidat adéquat ne modifiera pas le comportement de la protéine durant le laps de temps nécessaire. Les antagonistes allostériques de protéines quiescentes sont les meilleurs exemples ici.

Ensuite, un catalogue fourni d'informations structurelles est souhaitable. Bien que non indispensables, les coordonnées atomiques du complexe protéine-ligand sont un facteur de succès non négligeable. Ceux-ci permettent non seulement d'évaluer *in silico* les conséquences de différents liens chimiques entre le ligand et la fonction réactive, de « précibler » des acides aminés, mais surtout de guider le site de modification du ligand. Si ces données peuvent être couplées à des informations de relation (quantitative) structure-activité (QSAR), la fonctionnalisation du pharmacophore^{5a} en sera d'autant plus

^{5a} Motif chimique de la molécule responsable pour son activité biologique.

aisée. Puisque c'est sur la base de ce dernier que sera construite le réactif de marquage, il convient de s'assurer de n'altérer qu'au minimum son affinité lors de sa modification. Ces deux jeux de données (structure et QSAR) complémentaires sont importants, cependant des candidats peuvent être proposés à partir de l'un ou l'autre, séparément. C'est alors l'expérience qui devra guider l'expérimentateur dans la dérivation structurale optimale du composé initial.

Lien chimique

Le lien chimique détermine la distance entre le groupement réactif (électrophile ou catalyseur) et l'acide aminé. En d'autres termes, il est responsable de la proximité spatiale induite, fondement même de cette stratégie.

Trois caractéristiques se dégagent alors. Si la longueur et la rigidité apparaissent comme évidentes, la dernière est moins flagrante, au point qu'aucun auteur ne semble en avoir discuté. Il s'agit du recouvrement d'orbitales dans la réaction de marquage. La formation du complexe protéine-ligand impose un réarrangement spatial des deux partenaires. La flexibilité relative de ces derniers favorise un état du complexe de plus basse énergie, qui interdit alors certaines conformations¹¹⁵. Néanmoins, pour que la réaction chimique ait lieu, les orbitales du nucléophile et de l'électrophile doivent être adjacentes. Les contraintes stériques imposées doivent admettre l'angle d'attaque favorable à la réaction. Ainsi, les propriétés anisotropiques de la réaction sont déterminantes. Les paramètres de longueurs et de rigidité sont quant à eux mieux documentés, grâce à des données empiriques exploratoires fournies par T. Tamura, S. Tsukiji et I. Hamachi sur la protéine FKBP12. En étudiant l'effet sur un marquage guidé par l'affinité de six liens de nature chimique différente, ils ont mis en avant certains points. Incontestablement, une longueur idéale est nécessaire. Cependant, à distance égale la flexibilité du lien montre des propriétés moins intuitives. Il semble que réduire les degrés de liberté (pipérazine *vs* lien linéaire) bénéficie au marquage et à ses cinétiques. De plus, cette rigidité semble influencer directement sur la nature de l'acide aminé modifié par l'électrophile (tosylate). Un lien flexible tend à marquer une histidine et une glutamine en proportion grossièrement égale. Mais le rigidifier conduit à un marquage presque exclusif de l'acide glutamique¹¹⁶. Toutefois ces résultats semblent strictement dépendre du cas d'étude. Le même marquage sur une anhydrase carbonique offre des conclusions drastiquement opposées. Dans ce modèle protéique, un lien ethylènediamine se montre supérieur dans son efficacité et sa sélectivité de marquage des résidus ciblés, relativement à la pipérazine.

La disponibilité des acides aminés modifiables en périphérie du site de liaison varie d'une protéine à une autre. Le lien chimique se doit donc d'être adapté dans chaque

approche. Une prédiction *de novo* développée sur des bases structurales permet de rationaliser le criblage de différent lien, et d’alléger ainsi le labeur expérimental. La disponibilité de structure du complexe ligand-protéine facilitera la modélisation moléculaire *in silico* et sera ici d’une aide précieuse.

Une attention particulière devra être apportée aux protéines très dynamiques. Les techniques de biologie structurale ne prodiguent que des « images » statiques de l’objet ou du complexe étudié (exception faite de la résonance magnétique nucléaire, encore peu répandue). Il est aujourd’hui admis que la flexibilité d’une protéine est indispensable à sa fonction, au même titre que sa structure. Ainsi, les différents déterminants structuraux exhibent des rigidités locales propre¹¹⁷, influençant directement la disponibilité des résidus pour une réaction de marquage. Dans un tel cas de figure, la flexibilité du lien chimique doit favoriser l’accessibilité stérique du groupement réactif à l’acide aminé ciblé. Une rigidité imposée peut donc interdire l’effet de proximité.

En conclusion, la prédiction d’une bibliothèque de lien chimique peut être rationalisée sur la base des données structurales, de (Q)SAR et de dynamique du complexe ligand-protéine. Néanmoins, la résolution spatio-temporelle offerte par les outils actuels n’atteint pas la complexité de la réalité. La conception du lien chimique devra alors être optimisée par l’expérience.

Electrophile/catalyseur

Depuis la preuve de concept en 2009, une collection d’électrophile et de catalyseurs ont été décrit. Le laboratoire d’I. Hamachi en fait très régulièrement la synthèse dans des articles de revue publiés annuellement entre 2017 et 2020^{118,119,120,121}. C’est sur les fondements de ces travaux explicites que sera construite la section suivante.

Le choix de l’électrophile dans un marquage guidé par le ligand repose sur plusieurs critères, en particulier l’acide aminé canonique à modifier, la perméabilité membranaire imposée, le rapport signal sur bruit tolérable dans l’expérience et enfin la vitesse de marquage. Ce dernier paramètre revêt une importance capitale pour les protéines fréquemment renouvelées (turnover) ou ayant un temps de demi-vie court.

Ces critères s’appliquent également à l’approche guidée par l’affinité, où le groupement catalytique et le donneur d’acyle doivent respecter ce cahier des charges. Doit être rajouté ici un indice de cytotoxicité, car certains systèmes catalytiques reposent effectivement sur des métaux de transitions, connus pour leurs toxicités biologiques. Aujourd’hui, 10 électrophiles et 2 extrémités catalytiques ont été décrits. Ils sont listés dans la Figure 11 et le Tableau 1, incluant les références, les conditions d’utilisations, les acides aminés préférentiellement ciblés par ces derniers et une estimation du temps de marquage. Il est à noter qu’il n’est mention ici que des électrophiles/extrémités

catalytiques qui ont démontré une efficacité de marquage sur cellule vivante. Les groupements qui n'ont pas validé ce critère ne seront pas discutés.

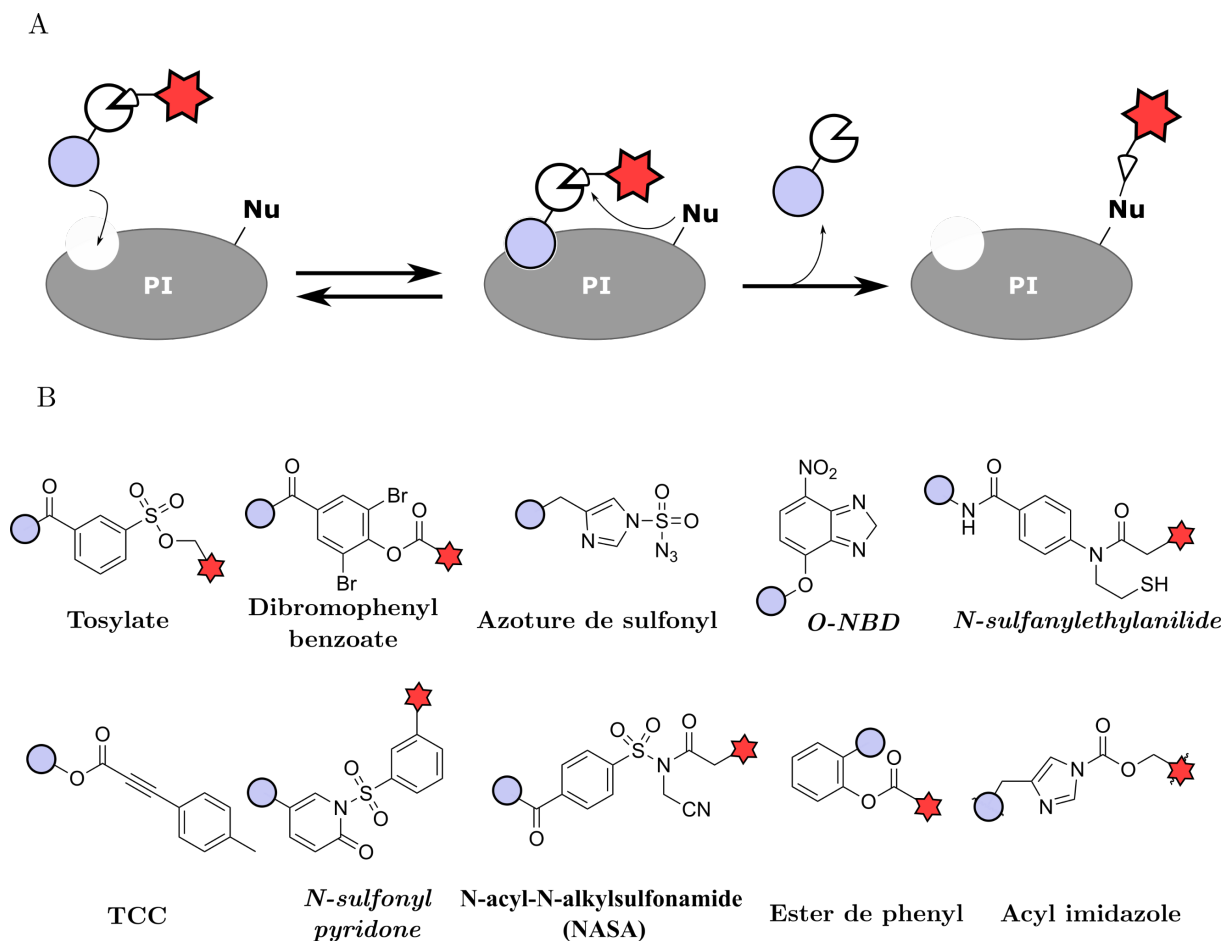


Figure 11 Marquage protéique d'affinité. A. Schéma général. B. Electrophiles décrits. PI : protéine d'intérêt. Nu : acide aminé nucléophile. Rond bleu : ligand de haute affinité. Étoile rouge : sonde chimique.

Electrophiles	Acides aminés marqués	Temps de marquage	Conditions	Ref.
Tosylate	His, Tyr, Cys, Glu, Asp	> 10 h	Culture cellulaire, tissu murin, lysat <i>in vivo</i>	112
Dibromophenyl benzoate	Lys, His	1 à 3 h	Culture cellulaire	122
Azoture de sulfonyl	Lys	1 h	Culture cellulaire	123
O-NBD	Lys	1 h	Culture cellulaire	124
N- sulfanylethylanilide	Lys	48 h	Culture cellulaire	125
TCC	Cys, Lys, His, Tyr, Trp	8 h	Culture cellulaire	126
N-sulfonyl pyridone	Tyr, Lys	10 min à 6 h	Culture cellulaire	127
NASA	Lys	10 min à 1 h	Culture cellulaire	113
Ester de phenyl	Lys	12 h	Culture cellulaire	128
Acyl imidazole	Lys, Ser, Tyr	3 à 6 h	Culture cellulaire, tissu cérébral murin	129

Tableau 1 Propriétés chimique des électrophiles décrit.

La localisation membranaire de la protéine imposera une sélection prédéfinie. Les sites de liaison extracellulaire ne souffriront d'aucune restriction ici, mais les cibles intracellulaires exigeront un éventail restreint de fonctions réactives. En premier lieu, le passage de la membrane plasmique impose une sélectivité particulière, le protéome accessible étant alors drastiquement diversifié. De plus, ce passage doit être autorisé par la structure du réactif de marquage. Parmi ces dernières, on compte le tosylate, le dibromophenyl benzoate, le NASA, le N-sulfonyl pyridone, le N-sulfonyl ethylanilide, l'ester de phenyl et la sonde TCC.

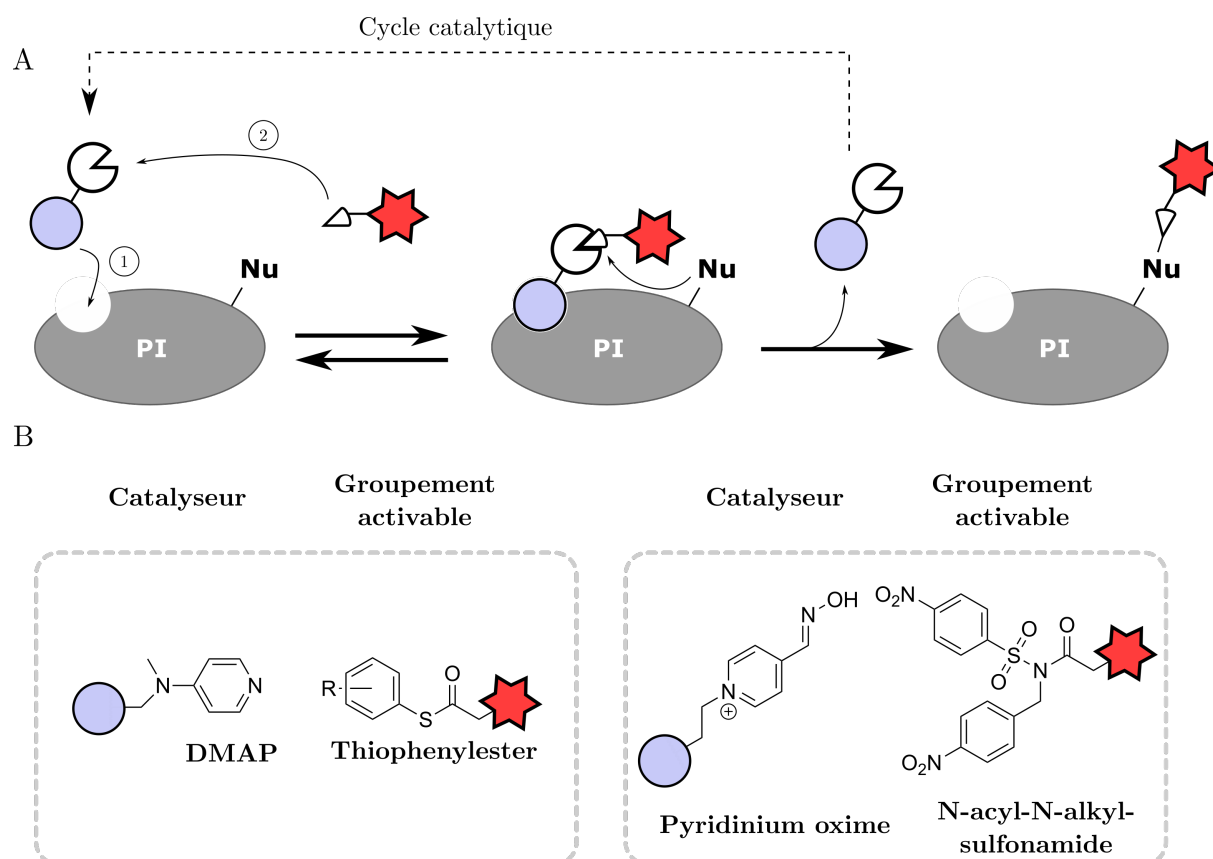


Figure 12 Marquage protéique organocatalysé. A. Schéma général de l'approche catalytique. B. Couple catalyseur-groupe-ment activable décrit.

Catalyseur	Groupe ment activable	Acide aminé marqué	Temps de marquage	Conditions	Ref
DMAP	Thiophenylester	Lys, Ser, Tyr	< 3 h	Culture cellulaire	¹³⁰
Pyridinium oxime	NASA	Lys, Ser	1 h	Culture cellulaire, tranche de cerveau	¹³¹

Tableau 2 Propriétés chimiques des couples catalyseurs-groupements activables décrits.

La sélectivité de chaque électrophile est un critère complexe à établir : Le ratio signal sur bruit n'est décrit que pour la protéine cible. Si cela semble évident de prime abord, il convient de le normaliser sur le niveau d'expression de la protéine. En effet, une protéine abondante offrira un signal robuste, mais ne garantit en rien la transférabilité de la méthode sur une protéine plus clairsemée. Une étude systémique de la sélectivité relative de chaque groupement réactif bénéficierait grandement à la communauté scientifique.

Enfin, la vitesse de réaction sera à déterminer en fonction du taux de renouvellement de la protéine, de son temps de présence à son site d'adressage ou encore de l'analyse. Un suivi de dynamique protéique exigera une cinétique rapide. À ce titre, l'électrophile NASA montre les K_D de réaction les plus élevés ($10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, similaire à ceux observés pour l'enzyme suicide SNAP-tag). Le couple pyridinium oxime – NASA, le O-nitrobenzoxadiazole ainsi que le l'azoture de sulfonyl montrent des vitesses de marquage tout à fait satisfaisantes puisqu'une heure suffit à un marquage exploitable.

Sonde de marquage

La sonde est l'objet observé ou révélé. À ce titre, une sélection éclairée permettra de réduire les artefacts de mesure induits par cette dernière. C'est par exemple un problème récurrent dans la grande famille des fluorophores organiques. Beaucoup de ceux-ci tendent à interagir avec les membranes biologiques, provoquant ainsi une forme de séquestration et *in fine* de faux-positifs¹⁰³. Une solution élégante à cette problématique a été proposée par T. Yamaguchi en 2013 et par H. Kojima en 2020 avec les réactifs O-nitrobenzoxadiazole et la sonde TCC, respectivement. Dans cette approche, la réaction de marquage forme un fluorophore (sonde turn-on), directement à la surface de la cellule. L'introduction d'une diversité chimique est alors plus complexe.

Le choix de la fonctionnalisation est l'étape qui admet le plus de créativité de la part du concepteur. En plus de fluorophores, l'introduction de partenaire de chimie bioorthogonale tel que le groupement azoture ou transcyclooctène est un choix judicieux. La biotine est aussi un outil très puissant, grâce à son interaction ultra-spécifique avec la streptavidine. Un large spectre de streptavidines bioconjuguées est commercialisé. De l'atome d'or pour la microscopie électronique à la bille d'agarose pour les expériences de Pull Down, elle fait partie des outils majeurs de la biochimie moderne.

Au-delà de la détection, la fonction introduite peut permettre la modulation de processus biologique. T. Tamura *et al.* ont fonctionnalisé une FKBP12 avec un groupement « photo-crosslinker » (diazirine), capturant ainsi une protéine proche après irradiations lumineuses. Ils ont ainsi mis en avant une interaction protéine-protéine avec mTOR¹¹⁶ (voir également¹³²).

Inspiré de cette méthode, différents biosenseurs ont alors vu le jour. L'insertion de sonde ^{19}F ^{112,133} ou de partenaire FRET¹³⁴ sont des exemples pertinents. La construction *in situ* de biosenseurs à partir de cette méthode de marquage (et d'autre, incluant le SNAP-tag précédemment décrit) a été discutée dans un article de revue par l'équipe d'I. Hamachi donné en ref¹³⁵ pour le lecteur curieux.

Considérations chimiques générales

Le chimiste critique déplorera certainement l'absence d'un examen structurel plus abouti du réactif (ou du couple) de marquage. Les paramètres comme la solubilité dans l'eau, la perméabilité membranaire, la localisation cellulaire et la stabilité en milieu biologique (intra- et extracellulaire) se généralisent à la structure de l'outil et non à ses sous-composants. À ce titre, elles seront discutées à part par souci de clarté.

Il est raisonnable de s'inspirer des règles basiques de la pharmacologie pour la structure finale du, ou des, composé(s) bioactif(s). L'insertion de groupement biologiquement instable (*par ex.* esters ou accepteur de Michael) nécessite bien évidemment une attention particulière.

L'hydrophobicité peut être contrôlée par l'ajout de groupement oligoéthylène glycol ou de charges nettes. Ces dernières peuvent permettre une sélectivité accrue des cibles extracellulaires. Si au contraire la perméabilité membranaire est exigée, diverses fonctions anioniques peuvent être masquées, notamment par acétylation. Ce groupement protecteur est alors un substrat des estérases et sera clivé dans le cytosol. La fluorescéine diacétate est un exemple répandu.

La stabilité en milieu biologique n'est pas aisée à évaluer par des modèles théoriques. On peut être tenté d'approcher la stabilité par la vitesse de la réaction. Cela se vérifie pour certains électrophiles : Le tosylate montre une stabilité supérieure au NASA, les

deux ayant de K_D réactionnel opposé (temps de marquage 10 h *vs* <1 h, respectivement). Cependant, les données expérimentales sont encore trop maigres pour une conclusion robuste. Ce point est particulièrement important pour les tissus denses, où les coefficients de pénétration sont amoindris et nécessitent une incubation longue, indépendamment de la cinétique de marquage.

Les considérations finales sont laissées à l'expérimentateur et à son expertise. Pour beaucoup, elles suivent les règles expérimentales de la chimie médicinale et du « drug design ».

Remarques concluantes

Le marquage protéique d'affinité est une stratégie qui a démontré un potentiel exceptionnel depuis les dix dernières années. Parmi ses plus grands succès, on compte le marquage sélectif de récepteur AMPA^{131,136} et μ -opioïd¹³⁷ natifs sur tranche de cerveau. Ces tours de force témoignent de la puissance de la méthode. Pouvant être fonctionnalisée sur demande, elle accommode virtuellement toutes les expériences conçues pour l'étude protéique.

Les démonstrations de sélectivité et de biocompatibilité des outils nourrissent un espoir de transfert de technologie *in vivo*. En effet, ces derniers points, couplés à la diversification des laboratoires travaillant sur la technique approchent l'échéance d'une preuve de concept réussie au sein d'animaux vivants.

Cette méthode répond en tout point aux problématiques décrites dans la première partie de ce manuscrit. Le récepteur purinergique P2X7 semble résister aux techniques et outils d'étude classique. L'efficacité et la sélectivité de cette approche détiennent alors le potentiel théorique d'étendre très largement le champ des connaissances sur cette protéine, au niveau micro- et nanoscopiques. Il doit cependant être noté qu'au moment de l'écriture de ce manuscrit, cette méthode n'a jamais été appliquée en microscopie super-résolutive. Cette dernière n'admet qu'un excellent rapport signal sur bruit.

Microscopie super-résolutive

Comme précédemment illustré par les propos de Werner Heisenberg, nous ne pouvons observer la nature qu'à travers le prisme de nos méthodes. Cela prend tout son sens dans les expériences d'imagerie biologique dans lesquelles l'interprétation des résultats est bien souvent soumise à la résolution des images fournies.

Si la microscopie optique est indubitablement la technique la plus usuelle dans les laboratoires de recherche, une fière place de second est détenue par la microscopie électronique (EM). *A contrario* de sa sœur à photons, la notion de résolution n'a ici pas vraiment de sens (lorsqu'appliqué à la biologie) : Les approches modernes permettent déterminer les coordonnées atomiques d'une biomolécule en solution. Le développement et l'application de cette méthode offriront par ailleurs le prix Nobel de chimie de 2017 à J. Dubochet, J. Frank et R. Henderson.

La microscopie électronique pourrait alors résoudre les processus biologiques les plus fins, sans réelle limite de résolution. Si l'idée est très attractive, elle n'est pas applicable dans l'état actuel. Le faisceau d'électrons nécessaire à la formation de l'image conduit à des dommages structurels de la cellule étudiée, amenant certains experts à conclure sur l'incapacité d'appliquer cette technique à l'étude de processus physiologiques¹³⁸.

C'est une des nombreuses raisons qui ont popularisé la microscopie optique à fluorescence. Cette dernière à l'avantage de pouvoir imager une cellule vivante sur plusieurs jours et d'être relativement simple de mise en place. Elle souffre toutefois d'une limitation majeure, sa résolution.

1. Limite de diffraction de la lumière

Il est proposé dans cette section d'appréhender les principes physiques qui justifient l'existence d'une limite de résolution d'un système optique, en particulier un microscope (mais est valable pour d'autres systèmes, tels qu'un télescope). Ces explications modestes supposeront certains principes sans les justifier et n'apporteront qu'un très maigre support mathématique aux propos tenus. Le physicien curieux et avide de détails est redirigé vers les travaux d'optique d'Emil Wolf^{139,140}, qui ont en partie inspiré la suite. On admettra des systèmes optiques parfaits, dépourvus de toute aberration ou imperfection.

Le premier concept essentiel pour comprendre cette limite imposée est la notion d'ondelette, telle que formulée par C. Huygens en 1678. Dans un principe éponyme, il explique que chaque point d'un front d'onde agit comme un point source pour la production d'une ondelette sphérique. En d'autres termes, il considère que n'importe quel point de l'espace qui reçoit une onde réémet une onde sphérique de même intensité,

même amplitude et de même phase. Cet artifice mathématique explique que la lumière se propage de point en point et non de façon continue.

En 1801, dans l'expérience qui porte maintenant son nom, T. Young a démontré la nature ondulatoire de la lumière¹⁴¹. En projetant un faisceau lumineux sur un écran à travers deux fentes, il observe un motif composé d'une alternance de franges sombres et éclairées (Figure 13). L'explication de l'apparition de cette « figure de diffraction » sur l'écran repose sur la diffraction de l'onde lumineuse. En respect du principe de Huygens introduit plus haut, des ondelettes sphériques se forment lorsque le faisceau passe à travers les fentes.

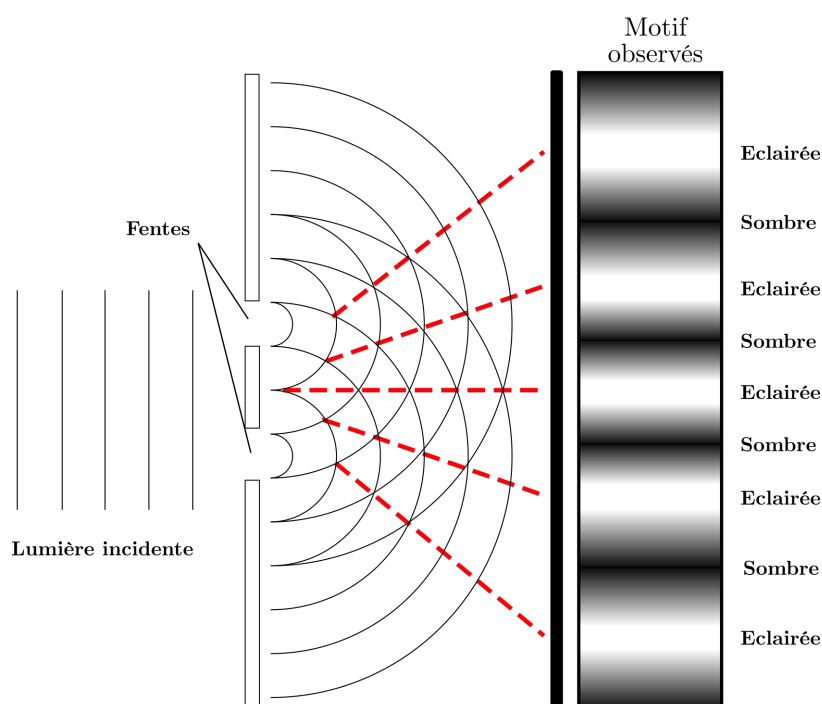


Figure 13 Figure d'illustration de l'expérience des fentes de Young.

Considérons ainsi le trajet de deux ondelettes, O1 et O2, issues chacune d'une fente distincte et qui rencontre l'écran au même point. Au niveau des fentes, O1 et O2 sont en phase. Si la distance à parcourir pour atteindre un point particulier de l'écran n'est pas la même pour chacune, elles seront alors déphasées. En conséquence, on observera le motif des interférences entre ces ondes sur l'écran : si la distance parcourue par O1 diffère d'exactly la moitié de longueur d'onde λ de la lumière par rapport à celle parcourue par O2, l'interférence entre les deux sera destructive et on observera une frange sombre, dû à la superposition d'ondes en opposition de phase (Figure 14A). Plus généralement, l'interférence destructive se produit lorsque la différence du trajet optique est un multiple pair de la moitié de la longueur d'onde. À l'inverse, une différence

de distance parcourue d'exactly la longueur d'onde (ou un multiple entier) fera apparaître une frange éclairée, car la superposition des ondes en phase produit une interférence constructive (Figure 14B).

Le cas intermédiaire fait appel à la notion de contraste, très utilisée en microscopie. Elle ne sera pas détaillée ici, mais le lecteur est dirigé sur la référence¹⁴² pour un article de revue pertinent.

Conséquemment, la nature des interférences est fonction de l'angle ϑ . Cette expérience permet de comprendre comment la longueur d'onde lie irrémédiablement les phénomènes de diffraction et d'interférence entre eux.

Une réflexion sur la formation d'image en microscopie peut alors être initiée sur la base de ces principes. Pour simplifier, on ne considère ici qu'un seul point source de l'échantillon imagé par le microscope. Huygens stipule alors que ce point sera une source d'ondelette sphérique. La lentille de l'objectif va permettre de faire converger ces dernières sur le plan de l'image. La majorité de la lumière se retrouvera donc concentrée au point central du plan, où les interférences constructives vont former une tache brillante. Mais une partie de ces ondelettes sera dirigée sur d'autres points du plan et de ces dernières résultera un motif de diffraction. Elles seront hors phase (interférence destructive), comme illustré par l'expérience des fentes de Young. On en conclut donc que l'image d'un point source par un objectif n'est pas un point, comme le dicterait l'optique géométrique, mais un motif de diffraction circulaire, appelé disque d'Airy (Figure 15A et B), qui s'accompagne de la figure d'interférence correspondante.

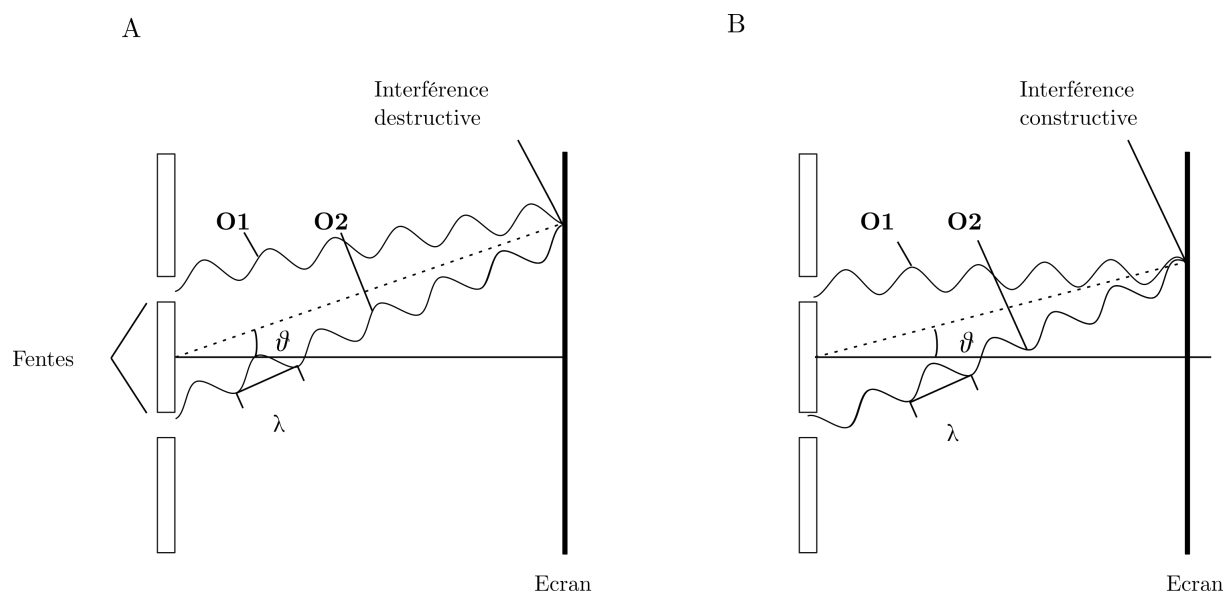


Figure 14 Illustration des interférences destructives et constructives en fonction de l'angle ϑ et de la longueur d'onde, λ .

Si cette tentative de simplification de phénomènes physiques complexes est fructueuse, le lecteur aura compris pourquoi la finesse du disque d'Airy est dépendante de la longueur d'onde λ et de l'angle ϑ , qui définit ici la moitié de l'angle maximal de collection de la lumière par l'objectif. En 1873, E. Abbe, un des pères de la microscopie, stipule

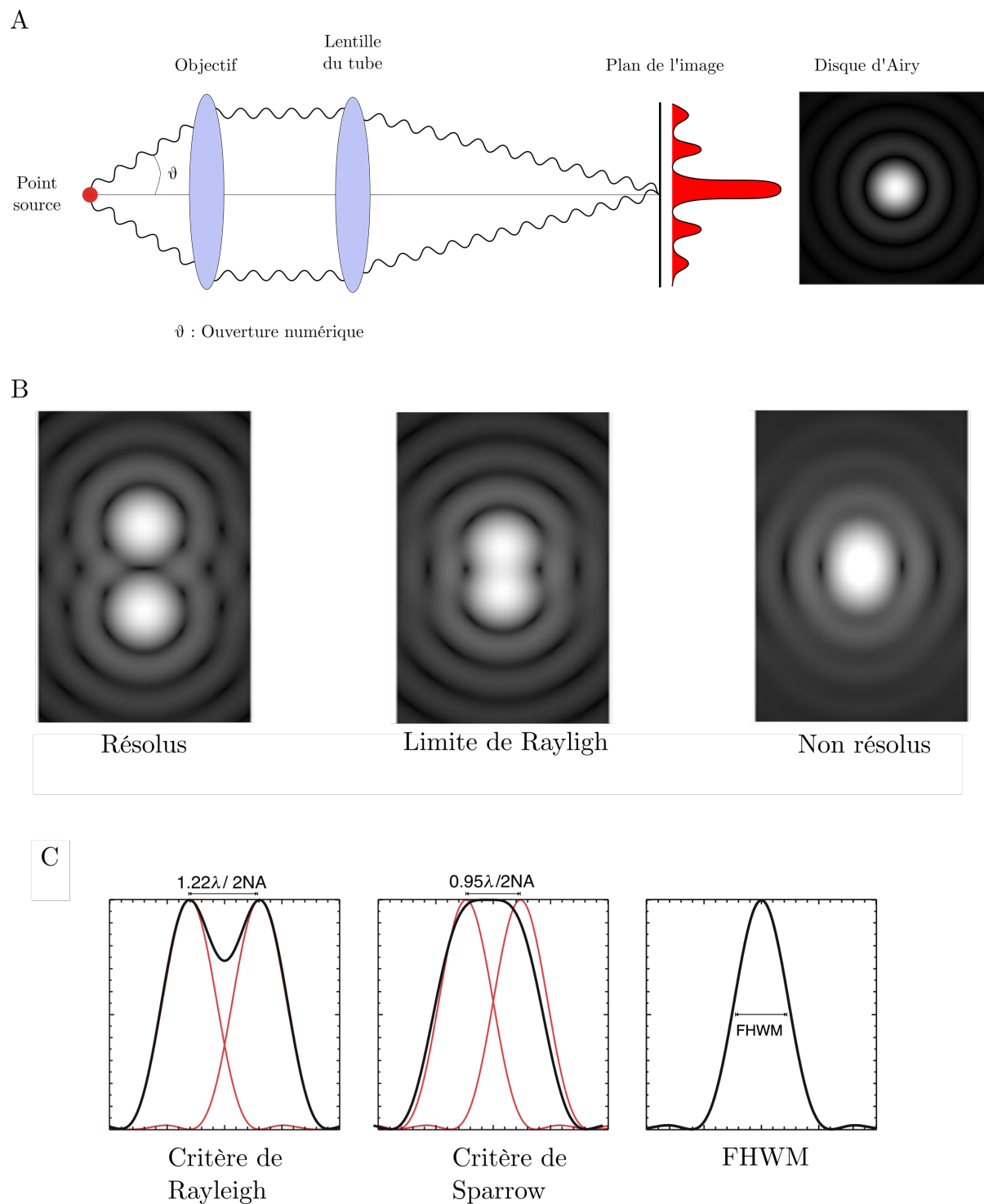


Figure 15 Image d'un point en microscopie. A. L'image d'un point par un système optique est un motif de diffraction. B Problématique de la résolution et C. critères actuels de cette dernière.

que la résolution d'un microscope est le rayon latéral r du disque d'Airy, qu'il définit par :

$$r = \frac{\lambda}{2 NA}$$

et

$$NA = n \sin \theta$$

où n est l'indice de réfraction du milieu, et NA l'ouverture numérique de l'objectif. Il propose ainsi une « limite de diffraction de la lumière », infranchissable pour un système optique aux propriétés fixées (longueur d'onde et NA)¹⁴³.

Le développement précédent permet d'appréhender la problématique de la résolution en microscopie à fluorescence, qui peut être formulée comme suit : quelle est la distance minimale entre deux disques d'Airy permettant leur distinction ? Lord Rayleigh apportera une réponse empirique à cette question en 1896. Il définit le critère de Rayleigh R , qui stipule que deux points sont résolus si le centre du disque d'Airy du premier point (maximum du pic) chevauche le premier minimum du disque du second point (zone noire entourant le disque Figure 15 B et C), selon la formule :

$$R = \frac{1,22 \lambda}{2 NA}$$

Plus proches, les points sont alors considérés comme non résolus. Ce critère est très courant en microscopie, il est illustré par la Figure 15B. Il faut cependant souligner l'empirisme d'une telle définition, car d'autres théories admettent une résolution plus faible, telle que le critère de Sparrow S . Ce dernier définit la résolution comme la plus petite distance à laquelle il est possible de distinguer une diminution de l'intensité lumineuse entre deux points. (Figure 15C).

$$S = \frac{0,95 \lambda}{2 NA}$$

Un troisième critère définit la résolution comme la largeur maximale à mi-hauteur $FHWM$ du disque d'Airy, selon :

$$FHWM = \frac{1,04 \lambda}{2 NA}$$

La résolution est une problématique qui anime bien des passions, et dépend pour beaucoup de la qualité du système optique. Car s'il a été envisagé un système parfait jusqu'ici, ce ne peut être le cas en pratique. De plus, le système de détection (œil, caméra...) ou encore la complexité de l'échantillon exerceront une influence directe sur

cette dernière. Elle se doit donc d'être définie expérimentalement pour chaque système et expérience.

À des fins de conclusions, il apparaît judicieux de discuter des limites principales du raisonnement décrit ici. Il s'agit évidemment de la résolution axiale, qui n'a volontairement pas été traitée. Elle suit néanmoins les principes énoncés précédemment, mais induit un degré de complexité supplémentaire. De plus, la notion de fonction d'étalement du point (PSF), correspondant au disque d'Airy d'un point imagé soumis aux aberrations optiques induites par un système optique imparfait, ne sera pas discutée. Ces notions n'étant pas nécessaires pour apprécier l'origine de la limite de résolution d'un système, elles ont délibérément été écartées.

Limite de diffraction en imagerie biologique

Afin d'appréhender l'importance de cette limite pour le biologiste, il est intéressant de rappeler quelques ordres de grandeur : l'être humain (1 à 2 mètres) est composé d'organes (quelques centimètres) organisés en tissus millimétriques formés par une structure cohésive de cellules (10 à 100 μm). L'échelle micrométrique est riche d'informations, correspondant grossièrement à la taille d'une bactérie ou d'une mitochondrie. Mais l'existence de l'un comme l'autre dépend de processus physiologique nanométrique. Un brin d'ADN linéaire de 1000 paires de bases mesure 340 nm¹⁴⁴. Les protéines se situent dans une fenêtre de 1 à 10 nm. Pour illustrer, un anticorps mesure une dizaine de nanomètre¹⁴⁵, l'épaisseur de la bicouche lipidique est de 6 nm¹⁴⁶, une protéine fluorescente comme la GFP (28 kDa) est un cylindre de 4,2 nm sur 2,4 nm¹⁴⁷ et le récepteur trimérique P2X7 atteint 14 nm de « haut » pour un diamètre extracellulaire de 7 nm au plus large⁷³.

Cette itération quelque peu barbare permet de se rendre compte de l'importance des informations inaccessibles lors d'observations de processus physiologique avec un microscope « classique ». Avec une résolution de 200 nm au mieux, il est alors impossible de discriminer le comportement des composants cellulaires susnommés et il n'est laissé à l'expérimentateur que des conclusions micrométriques sur des objets nanométriques. Cette limite physique a poussé les scientifiques à imaginer de nouveaux systèmes d'imagerie afin de la contourner. Récompensés par le prix Nobel de chimie de 2014, E. Betzig, S. W. Hell et W. E. Moerner sont les pionniers de la microscopie à fluorescence super-résolutive (ou nanoscopie) permettant de résoudre des objets nanométriques.

La section suivante fait état de ces nouvelles méthodes. Cependant, beaucoup de techniques ont vu le jour et il n'apparaît pas pertinent d'en faire une liste exhaustive. Seuls les principes physiques sous-jacents à la « single molecule localization microscopy »

(SMLM) seront traités en détail, dans un souci de cohérence et de clarté. Néanmoins, quelques exemples choisis sont introduits afin de situer cette technique dans le paysage des méthodes de nanoscopie actuelles.

2. SIM, STED et ExM

SIM

La première technique dont il est question est considérée par certains spécialistes comme la grande absente du prix Nobel¹⁴⁸. M. G. L. Gustafsson en 2000 fut le premier à présenter des images super-résolues de structure cellulaire. Par « structured illumination microscopy » (SIM), il montre des filaments d’actine de cellule HeLa avec une résolution latérale d’une centaine de nanomètre¹⁴⁹.

Cette méthode repose sur une illumination structurée de l’échantillon. Des motifs composés de plusieurs raies ou de sinusoïdes sont communément utilisés. Plusieurs acquisitions (*e.g.*, 9) sont alors enregistrées selon différentes positions et orientations du motif d’excitation. La superposition des deux réseaux (le motif d’excitation et l’échantillon) formera un motif de Moiré. Ce dernier va permettre à un algorithme de reconstruire une image avec une résolution entre 50 et 100 nm (Figure 16).

En 2008, L. Schermelleh *et al.* ont utilisé son itération 3D (3D-SIM) pour imager des complexes de pore nucléaire. Ces travaux impressionnants ont permis de résoudre ces structures individuellement¹⁵⁰, en plus de montrer une invagination membranaire lors

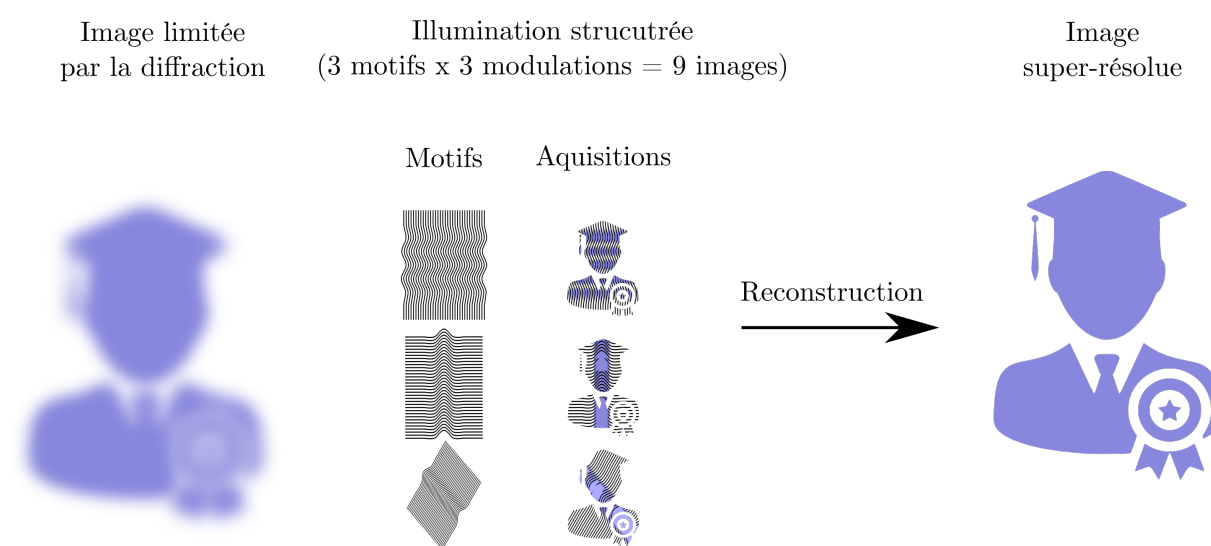


Figure 16 Principe général de la microscopie SIM. Les images obtenues après de multiples illuminations structurées sont reconstruites pour obtenir une image super-résolue.

de la mitose, invisible jusqu'alors en microscopie confocale, car se situant entre 100 et 200 nm.

L'imagerie SIM admet également la résolution de processus biologique dans le temps. Mais ces applications demeurent encore l'apanage des systèmes fait main, non-commerciaux¹⁵¹. La première démonstration de la capacité d'un tel système a été faite en 2009 par P. Kner *et al.*, dans le laboratoire de M. G. L. Gustafsson. La résolution temporelle était d'alors 11 Hz^{6a}. Après optimisation, certaines équipes rapportent aujourd'hui des acquisitions à 79 Hz¹⁵².

La microscopie SIM permet une imagerie relativement simple, pouvant être adaptée sur un microscope conventionnel. Elle ne demande aucune préparation spécifique de l'échantillon, en plus d'autoriser une acquisition multi-couleurs de cellule vivante. Elle est notamment appréciée par sa capacité de détection d'objets relativement peu lumineux, car elle ne rejette aucun photon émis par la cible. Cette propriété permet de réduire la puissance laser et de préserver le tissu biologique observé. Enfin, l'imagerie SIM ne demande pas de fluorophore particulier¹⁵¹.

Toutefois, comme mentionné plus haut, la résolution d'un tel système est souvent limitée (50 – 100 nm), au regard de ses concurrents. De plus, la limite de la diffraction est outrepassée par algorithme et non par méthode physique. Celui-ci induit inévitablement des artefacts lors de la reconstruction. En outre, il faut mentionner que cette méthode est sensible à la lumière hors plan focal, et donc les échantillons denses peuvent présenter certaines difficultés¹⁵³, incluant les incertitudes informatiques.

STED

Le concept de la microscopie par « stimulated emission depletion » (STED) a été développé par S. Hell et publié dans un papier théorique en 1994. Malgré des débuts timides, cette méthode trouve aujourd'hui une place de choix dans les plateformes de microscopies dédiées à l'étude du vivant. Les craintes formulées concernant la puissance laser nécessaire expliquent la résistance initiale des biologistes.

L'excitation des électrons d'une molécule fluorescente permet le passage de son état fondamental à un état excité (singulet). Ces derniers ont alors plusieurs voies de désexcitation possibles, dépendantes des conditions. L'émission d'un photon de moindre énergie est une des voies spontanées (fluorescence). Mais l'énergie nécessaire à la désexcitation peut être apportée par une source lumineuse d'une longueur d'onde adéquate, dans un processus appelé émission stimulée. C'est sur ce phénomène quantique que repose le STED : forcer le retour à un état fondamental des fluorophores d'une région définie

^{6a} images par seconde.

pour n'autoriser l'émission de photons que d'une région plus fine que la limite de diffraction¹⁵⁴. Deux lasers sont par conséquent nécessaires : un laser torique qui déplètera réversiblement la fluorescence des molécules (laser STED), et un laser gaussien d'excitation « classique », aligné au centre du premier laser. Les molécules fluorescentes de l'échantillon sont gardées à l'état fondamental par le premier laser, à l'exception de celles situées en son centre (Figure 17). Le diamètre interne du tore délimite la zone d'excitation des fluorophores et donc la résolution du système. Ce dernier est inversement proportionnel à la puissance du laser STED. C'est cette caractéristique qui contraint la méthode à des intensités d'illumination de l'échantillon peu commune.

En théorie, l'imagerie à balayage STED n'est limitée que par la taille de la molécule fluorescente. C'est l'échantillon et l'alignement imparfait des lasers qui seront les principaux facteurs limitants de la résolution en pratique¹⁵⁵.

Ses applications sont nombreuses. T. A. Klar *et al.* furent parmi les premiers à apporter

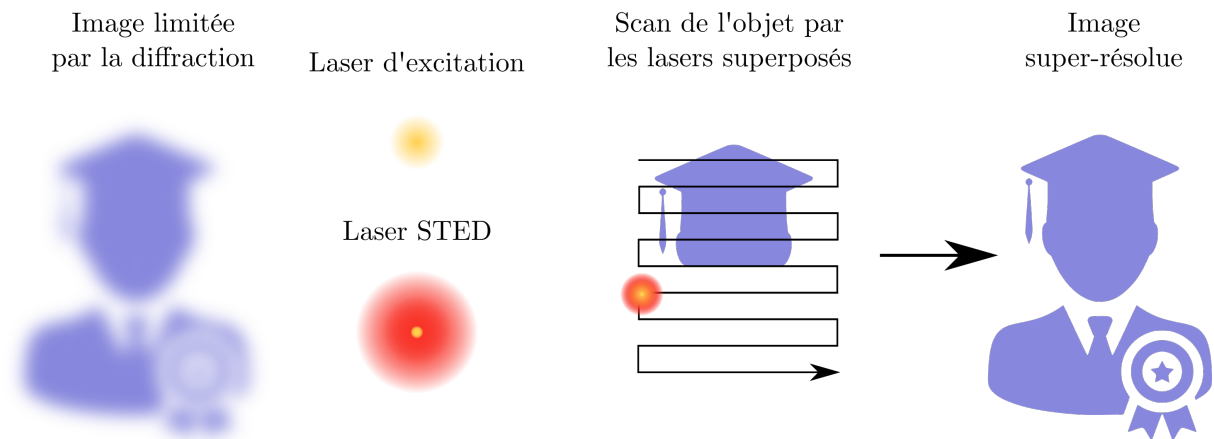


Figure 17 Principe général de la microscopie STED. Un scan de l'échantillon avec la superposition des lasers d'excitation et STED permet d'offrir une image super-résolue.

la preuve de concept en biologie. En 2000, ils rapportent des images en trois dimensions super-résolues de *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli*¹⁵⁶. Depuis les résultats remarquables obtenus par Willig *et al.* sur l'étude nanométrique vésicules synaptiques¹⁵⁷ et Kittel *et al.* sur l'organisation moléculaire de zone présynaptique¹⁵⁸, la microscopie STED est devenue un outil particulièrement apprécié des neuroscientifiques.

En effet, cette méthode permet d'appréhender des processus biologiques dynamiques avec une résolution spatiale d'environ 20 nm, et temporelle de typiquement 30 Hz¹⁵⁹, limitée par la vitesse de balayage des lasers et donc de la taille du champ scanné.

Certaines équipes atteignent des fréquences d'acquisition de 200 Hz¹⁶⁰, mais le champ d'observation extrêmement réduit limite les applications biologiques.

En plus des qualités indubitables, ces itérations permettent une acquisition tridimensionnelle de tissus relativement profonds. La résolution sera alors limitée par les aberrations optiques induites par l'échantillon¹⁵⁴. Enfin, la microscopie STED admet l'imagerie multi-couleurs¹⁶¹.

Cependant, la puissance des lasers utilisés impose certaines précautions et limitations. La phototoxicité est bien entendu en première ligne, en particulier dans l'imagerie de cellules vivantes. L'imagerie « Reversible saturable optical fluorescence transition » (RESOLFT), inspirée du STED apporte un élément de réponse à ce problème¹⁶², par l'utilisation de protéines fluorescentes photoswitchable^{7a} en lieu et place de fluorophores organiques. Ces dernières peuvent être activées et désactivées (déplétées) par des puissances laser considérablement inférieures.

Enfin, le choix du fluorophore n'est pas anodin. L'imagerie STED requiert des sondes de marquages photostables dus à ces puissances hors du commun. Les sondes choisies sont en général basées sur des structures dérivées de rhodamine.

ExM

La microscopie à expansion (ExM) n'est généralement que peu citée dans les techniques de microscopie super-résolutive. À juste titre, elle ne représente pas une technique d'imagerie à proprement parler, mais une méthode de préparation d'échantillon. Il a été jugé intéressant d'en faire mention ici afin d'offrir une introduction un peu plus hétéroclite.

L'ExM est un protocole très récent qui permet de résoudre des structures biologiques au-delà de la limite de la diffraction de la lumière sans autre matériel qu'un microscope conventionnel. Pour se faire, elle grossit l'échantillon à observer physiquement et non optiquement. Plus précisément, l'expérimentateur fait polymériser *in situ* une matrice (hydrogel) à l'intérieur de l'échantillon. Celle-ci va expandre isotropiquement les biomolécules le composant en conservant leur organisation initiale relative. Un système de microscopie conventionnel peu alors est utilisé pour observer des détails normalement nanométriques.

Les premières explorations d'une telle technique en 2015 par l'équipe d'E. S. Boyden montrent une résolution de 60 nm sur des tranches d'hippocampe murin avec un microscope confocal¹⁶³. S'il apparaît évident qu'aucune étude de cellule vivante ne peut être imaginée, cette méthode offre quelques caractéristiques singulières. Parmi elles,

^{7a} Anglicisme désignant la caractéristique réversible d'une molécule à changer de propriété sous l'action de la lumière

deux sont particulièrement intéressantes. La première concerne la réduction de la densité des biomolécules, qui permet par exemple l'accès à des épitopes masqués¹⁶⁴ ou l'amplification d'un signal¹⁶⁵. Ensuite, l'expansion rend l'échantillon transparent, le gel formé étant composé à 99% d'eau. Des illuminations en feuillet de lumière peuvent alors révéler certains détails impressionnants. F. Chen *et al.* en 2016 observe ainsi des détails nanométriques de l'ARN¹⁶⁶ sur tranches de cerveau de 200 μm d'épaisseur. Il est facile d'imaginer l'application de ce protocole conjointement avec les autres méthodes introduites.

3. SMLM et dSTORM

E. Betzig fait partie des figures de proue de la détection de molécule unique par microscopie optique. Le prix Nobel de 2014 récompense ses travaux pionniers de la SMLM. En 1995, il propose la méthode théorique suivante : (1) identifier et isoler individuellement chaque composante d'un échantillon et (2) localiser spatialement ces dernières par détermination du centre du signal détecté. Les coordonnées spatiales sont alors utilisées pour reconstruire l'image finale super-résolue¹⁶⁷.

La microscopie à fluorescence fait apparaître pour chaque point observé son motif de diffraction, le PSF (fonction d'étalement du point, voir section sur la diffraction de la lumière). Le centre de masse de tous les points peut donc être déterminé avec une très bonne approximation, à la condition d'être optiquement séparé l'un de l'autre.

On doit les premières observations de molécule unique en fluorescence à M. Orrit et J. Bernard, en 1990. En reprenant les travaux de W. E. Moerner et L. Kador de 1989¹⁶⁸, ils détectent le signal de fluorescence de molécules uniques de pentacène immobilisées dans un cristal cryogénique de *p*-Terphenyl¹⁶⁹. Le transfert du principe en biologie

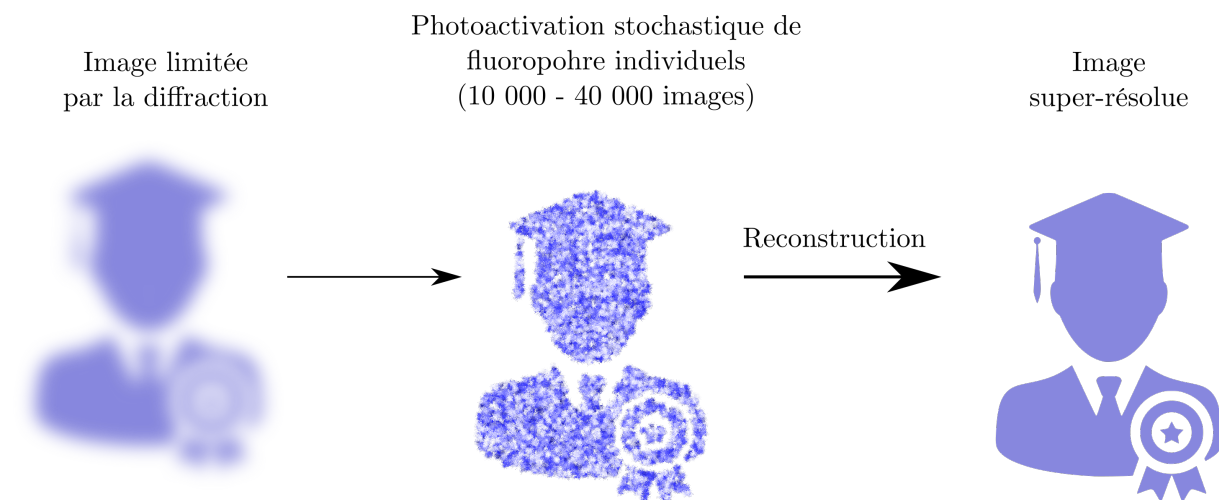


Figure 18 Principe général de la microscopie SMLM.

cellulaire aura alors nécessité deux événements : la découverte du « clignotement » de la GFP par l'équipe de W. E. Moerner¹⁷⁰ et l'apparition des protéines photoactivables comme outils de recherche¹⁷¹. Le contrôle par la lumière de ces deux fluorophores permet de remplir partiellement la première condition postulée par E. Betzig, isoler individuellement chaque composant. Le concept abouti apparaît en 2006, mentionné aujourd'hui comme l'*annus mirabilis* de la microscopie super-résolutive¹⁴⁸. Afin de parfaitement isoler chaque fluorophore, des séquences d'acquisition de milliers d'images sont effectuées, en ne permettant qu'à quelques-uns d'entre eux d'être commutés dans un état émissif (état ON, photoswitché ou photoactivé) à chaque image. Une image complexe est ainsi transformée en milliers d'images « simples » dans lesquels la densité de signal par image est drastiquement réduite. Un algorithme pourra alors localiser avec précision le centre de chaque signal, et reconstruire une image finale (Figure 18).

Trois techniques majeures ont été décrites lors cette célèbre année 2006. « La photoactivation localization microscopy » (PALM), développé par E. Betzig *et al.*¹⁷² et la « fluorescence photoactivation localization microscopy » (FPALM) introduites par S. W. Hess¹⁷³ tirent profil des protéines mentionnées plus haut. M. J. Rust, M. Bates et X. Zhuang décriront quant à eux le « stochastic optical reconstruction microscopy » (STORM)¹⁷⁴. Cette dernière utilise des fluorophores organiques photoswitchables en lieu et place des protéines fluorescentes.

dSTORM et fluorophore

Le STORM, tel que décrit en 2006, a rapidement évolué en « direct » STORM (dSTORM). Dans sa version initiale, cette méthode utilisait une paire de fluorophores (cyanine3 et cyanine5) et deux lasers. L'un permet de passer tous les fluorophores de l'échantillon dans un état noir (état non émissif) avec un pulse initial puissant. Ensuite le pulse d'un deuxième laser va photoswitcher (état émissif) une fraction des fluorophores, qui pourront alors émettre des photons sur un troisième pulse, du laser initial. Le taux de molécules photoswitchées dépend de la proximité de la paire de fluorophores. Des cycles répétés fourniront un set d'image optiquement qui pourront être résolus.

Mais cette approche complexe s'est fortement simplifiée grâce aux travaux de M. Heilemann *et al.* en 2008. Ils démontrent que l'Alexa Fluor 647, une sulfo-cyanine5 utilisée en STORM, peut être réversiblement amenée dans un état noir par une puissance laser suffisante. En maintenant celle-ci, une molécule va stochastiquement (*c.-à-d.* aléatoirement) se relaxer en émettant un photon (fluorescence) et pourra alors être ramenée dans le même état noir, dans ces cycles itératifs. Cette méthode directe n'a besoin que d'un seul fluorophore et d'un unique laser d'excitation.

Certains détails de ces cycles sont maintenant connus, ils sont résumés dans le diagramme de Jablonski simplifié proposé en Figure 19. Brièvement, un fluorophore à l'état fondamental S_0 va être excité à l'état singulet S_1 par irradiation ($h\nu$). Comme mentionnées précédemment, plusieurs voies de désexcitation sont possibles, l'une d'entre elles étant l'émission d'un photon par fluorescence. La molécule pourra alors effectuer plusieurs cycles jusqu'à photoblanchiment. Une puissance laser suffisante augmentera la probabilité de peupler un état triplet T_1 par conversion intersystème. Cet état de très faible durée de vie (microseconde) peut être annihilé par la présence d'oxygène dans le milieu. Mais une concentration raisonnablement basse de cette espèce, couplée à la présence de thiol réactif dans le milieu permettra de former un anion radicalaire ($D^{\bullet-}$) métastable en dépeuplant ainsi l'état T_1 . Cet intermédiaire de longue durée (millisecondes à minutes, voire heures) est dans un état noir (OFF, non émissif), et sera stochastiquement oxydé pour regagner l'état S_0 ¹⁷⁵ par émission de photon. Les propriétés rédox et la concentration en oxygène du milieu gouvernent la durée de vie de l'état noir.

Applications

Bien que très jeunes, les applications du dSTORM sont pléthoriques en sciences biologiques. Aussi, il est choisi de se concentrer sur quelques exemples concrets, empruntés

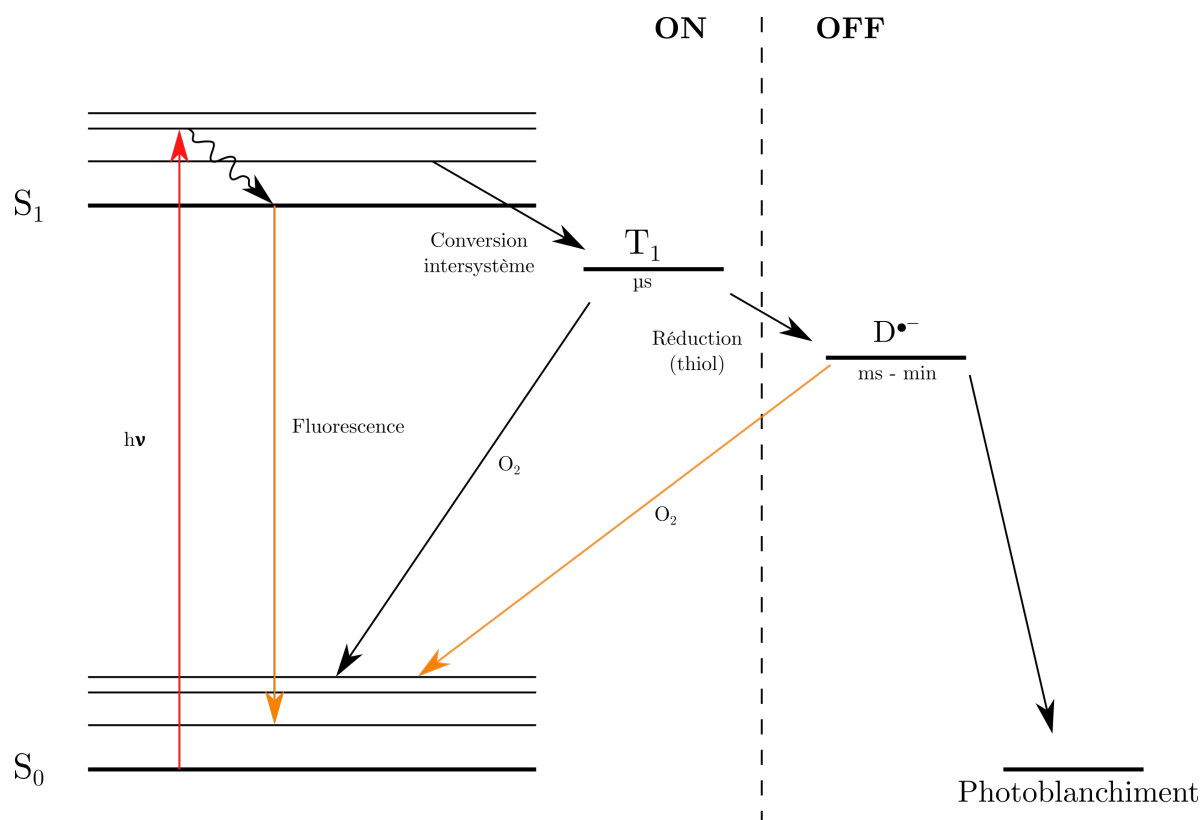


Figure 19 Diagramme Jablonski simplifié du principe du dSTORM.

pour la plupart aux neurosciences, ayant pour but d'illustrer la puissance et certaines caractéristiques de la méthode.

Le dSTORM admet l'imagerie à deux couleurs, propriété précieuse dans cette discipline. Elle permet d'analyser l'organisation et l'interaction nanométrique de protéines. La fente synaptique mesurant entre 20 et 30 nm, il est impossible d'étudier ces interactions par microscopie classiques. J. Goncalves *et al.* ont par exemple déterminé la nature de l'interaction de récepteurs aux glutamates mGluR, AMPA et NMDA au niveau synaptique grâce à cette méthode. Ils démontrent que ces deux derniers, contrairement aux données de microscopie classiques, ne sont pas colocalisés, mais espacés de 50 à 250nm¹⁷⁶.

T. Rahbek-Clemmensen *et al.* montrent également les incertitudes de la microscopie limitée par la diffraction de la lumière. En utilisant un équipement similaire de dSTORM deux couleurs, ils ont observé une séquestration du transporteur de dopamine au sein de la membrane de neurones dopaminergiques. La nano-organisation de ces derniers échappe totalement à la microscopie conventionnelle¹⁷⁷.

L'imagerie dynamique en dSTORM est délicate. Si elle est faisable, elle nécessite un design d'expérience particulier. Comme mentionné plus haut, le dSTORM requiert un milieu réducteur, qui s'avère hautement toxique pour les cellules¹⁷⁸. Quand il est réalisable, le PALM est préféré par certains groupes. Ce fut notamment le cas pour l'étude dynamique de P2X7, tel que décrit dans la section dédiée à ce dernier. L'utilisation de fluorophores adéquats peut alors apporter des réponses pertinentes. Ainsi, R. Wombacher montre que la sonde ATTO655 peut, après irradiation, être transférée dans un état noir de longue durée grâce à la contraction élevée de glutathion intracellulaire. Ils décrivent une résolution temporelle de 0,33 Hz¹⁷⁹.

D'autres fluorophores montrent des « clignotements spontanés », tels que les dérivés de silicone-rhodamine développés par laboratoire de K. Johnsson¹⁸⁰. La résolution temporelle décrite est approximativement la même. Néanmoins, les applications de ces nouveaux outils d'imagerie ne sont pas encore légion dans les laboratoires de sciences biologiques.

Enfin, cette méthode admet une observation tridimensionnelle. Le laboratoire de X. Zhuang en a apporté les premières fondations en 2008. En imageant les structures formées par les microtubules, ils montrent une résolution axiale entre 50 et 60 nm¹⁸¹. Le 3D-STORM est aujourd'hui bien implanté. La cartographie volumétrique préliminaire de réseaux neuronaux fait partie des applications notoires^{182,183}.

En conclusion, cette technique permet d'atteindre, en plusieurs couleurs et en 3D, des résolutions parmi les plus basses des méthodes d'imagerie optique. C'est une des raisons qui l'a rendue populaire dans l'étude de supercomplexes, référés ci-après comme cluster,

formés par certaines protéines, notamment les canaux ioniques^{184,185}. Elle permet de rendre compte de propriétés quantitatives jusque-là inaccessibles, telles que le nombre de protéines contenues dans un cluster, la densité et la taille de ces derniers.

Elle nécessite toutefois l'acquisition de milliers d'images, typiquement entre 10 000 et 50 000, en plus de devoir ajuster le milieu d'incubation du matériel biologique au fluorophore imagé. Elle est donc peu adaptée au suivi de processus cellulaire dynamique.

Remarques conclusives : émergence

La microscopie super-résolutive permet d'analyser un échantillon biologique à une échelle proche de son organisation fondamentale. S'il est possible d'imager une protéine, définie comme l'entité unitaire des fonctions du vivant, à un niveau unique, il est attrayant de (re)déterminer son impact sur le concept d'émergence. Cette notion stipule qu'un tout est plus que la simple addition de ses composants.

L'observation à des échelles spatiales et temporelles inexplorées permettra d'offrir des éléments d'études nouveaux. La microscopie super-résolutive a le potentiel d'offrir de précieux éléments de réponse à la question de l'émergence d'une fonction biologique à partir de ses composants moléculaires. C'est une question singulièrement débattue au sein de la communauté des biologistes^{186,187}. Il sera excitant de voir à quel point de nouvelles approches expérimentales influenceront notre compréhension du principe de causalité des systèmes biologiques.

But de la thèse

Les travaux de cette thèse ont pour objectif de révéler les détails nanoscopiques de P2X7 en utilisant une approche de marquage d'affinité guidé par un ligand. Il doit en résulter un outil de marquage chimique sélectif, qui pourra être diffusé au sein de la communauté scientifique spécialisée.

Pour se faire, 3 grands axes de travail ont été conduits. (1) Le design et la synthèse des réactifs chimiques, (2) la caractérisation pharmacologique de ces derniers et (3) l'imagerie nanoscopique du récepteur ainsi que sa significativité biologique.

Le marquage d'affinité guidé par un ligand est un exercice délicat, car peu documenté. Son succès requiert une conception rationalisée sur des données préliminaires conséquentes. Ici, plusieurs molécules, issues de deux stratégies différentes, ont dû être testées avant d'identifier un candidat remplissant le cahier des charges imposé par l'imagerie dSTORM.

Dans un premier chapitre, il sera question d'une stratégie d'affinité basée sur un marquage catalytique (couple pyridinium oxime - NASA). Malheureusement, cette dernière s'est trouvée infructueuse, aucun marquage spécifique de P2X7 n'ayant pu être détecté. Ceci en dépit de différentes molécules testées ainsi qu'un large screening de conditions expérimentales.

Le chapitre suivant traite d'une seconde stratégie, conçue sur la base de l'expertise acquise et du rationnel du premier échec. Le candidat chimique présenté est issu d'une modélisation moléculaire approfondie. Il s'est montré remarquablement efficace et sélectif. L'évaluation de ses propriétés pharmacologiques valide une sélectivité suffisante pour une application en microscopie super-résolutive (dSTORM).

Deux points d'intérêt scientifique ressortent de ces travaux. (1) L'outil de marquage en lui-même ainsi que la caractérisation de ses propriétés intrinsèques et (2) les découvertes que celui-ci a permis sur la nano-organisation de P2X7 dans différents types cellulaires.

*Chapitre 2 : Pyridinium-4-aldoxime :
Organocatalyse*

1. Introduction

Ce chapitre décrira les étapes de conception, de synthèse et d'applications biologiques d'une première génération de réactifs de marquages basée sur une approche catalytique. Cette première stratégie est apparue séduisante en vertu de :

- La réduction de la concentration de ligand nécessaire, bénéficiant théoriquement à la sélectivité.
- La simplicité de l'introduction d'une diversité chimique. Plusieurs sondes peuvent être conjuguées au donneur d'acyle, sans modifier la chimie du ligand catalytique.

Comme signifié en introduction, le ligand est le cœur d'un marquage d'affinité. En 2016, A. Karasawa et T. Kawate ont publié la structure du récepteur P2X7 de panda⁷², lié à différents inhibiteurs allostériques hautement sélectifs. Le site de liaison se situe au sommet de la protéine, dans sa partie extracellulaire, à l'interface entre deux sous-unités. Parmi les antagonistes décrits, la molécule AZ10606120 est particulièrement intéressante.

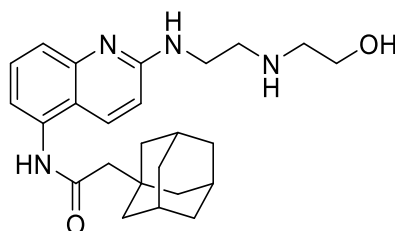


Schéma 2 AZ10606120.

En effet, cette molécule arbore une affinité exceptionnelle (K_D espèces-dépendant, contenu entre 1,4 et 19 nM). L'étude des protéines semblables à P2X7 révèle que les boucles extracellulaires de P2X4 et P2X6 montrent respectivement 51 % et 42 % de similarité. En dépit de cette analogie structurale, le composé AZ10606120 manifeste une sélectivité 1000 fois supérieure pour P2X7. Le site de liaison se retrouve également chez les autres récepteurs P2X, mais est trop étroit pour accommoder ce composé. À des fins d'illustrations, il présente une $IC_{50} \approx 10$ nM pour P2X7 mais n'expose aucune activité inhibitrice envers P2X1 à 10 μ M. Différents tests pharmacologiques ont montré son efficacité à inhiber la prolifération du glioblastome et du cancer du pancréas ainsi que réduire l'expression de P2X7 dans les cancers ovariens¹⁸⁸.

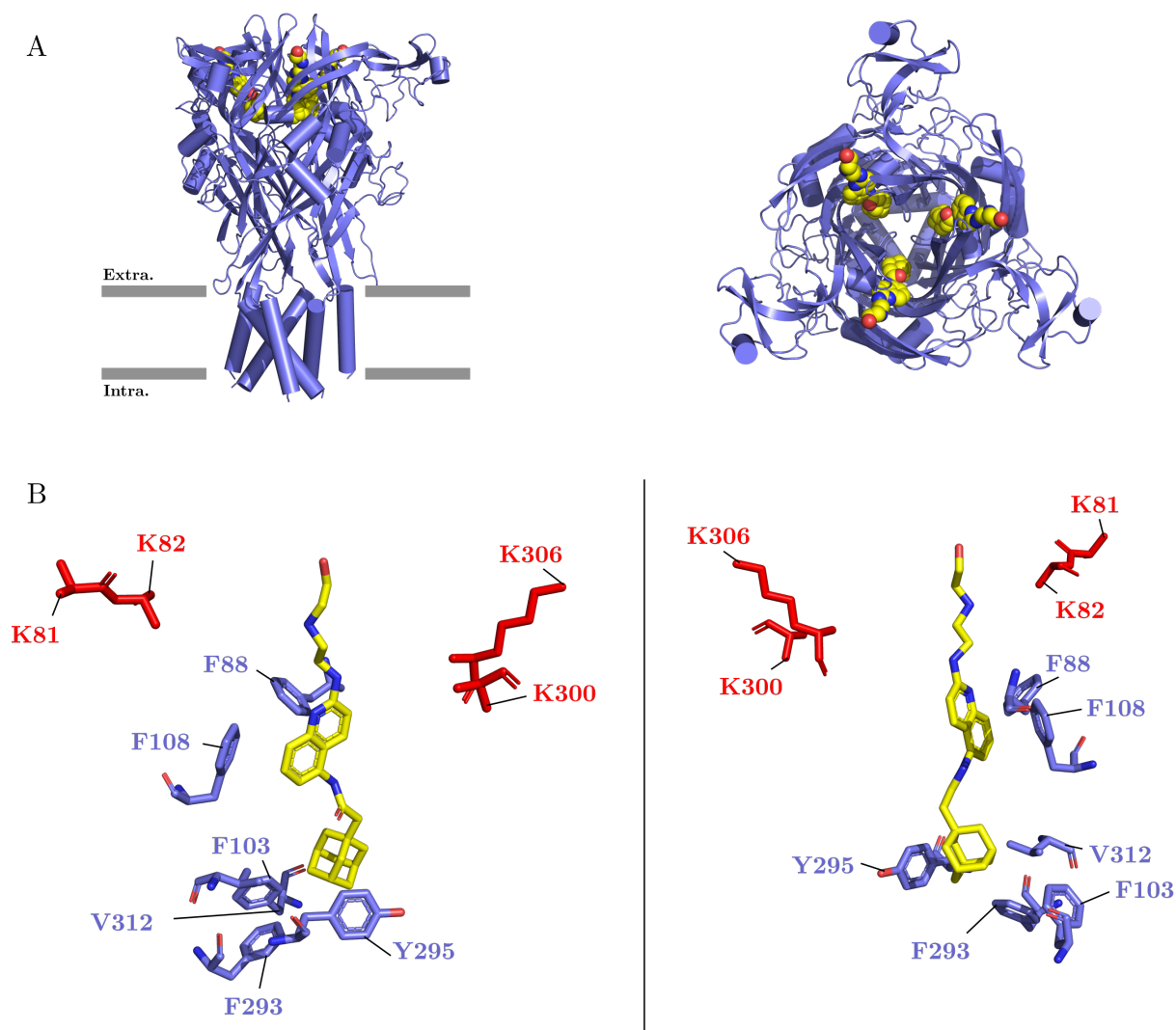


Figure 20 Caractéristiques moléculaires de la liaison de AZ10606120 et P2X7. A. Structure du complexe. B. Site de liaison. Violet : Résidus importants dans la stabilité du complexe. Rouge : Lysines proches du site de liaison.

Une représentation graphique des résidus importants pour la formation du complexe P2X7-AZ10606120 est fournie en Figure 20. Sur celle-ci, deux caractéristiques suscitent un intérêt particulier. La première concerne la nature des liaisons qui stabilisent le complexe. Ce sont les groupements hydrophobes du composé qui sont majoritairement impliqués (adamantane, chaîne carbonée...) ^{72,189}. En d'autres termes, l'hydroxyle accessible au solvant ne participe que peu. Une modification chimique sur ce site est susceptible de n'avoir qu'un impact modéré sur l'affinité. Deuxièmement, ce dernier se trouve à une dizaine d'angströms de 4 lysines (K81, K82, K300 et K306), qui deviennent alors des cibles de choix pour une bioconjugaison telle que décrite précédemment.

Ces données préliminaires valident donc les critères nécessaires (structure disponible de la protéine cible, ligand hautement affiné et acides aminés nucléophiles accessibles) pour concevoir une approche de marquage protéique basée sur l'affinité.

Le choix de la méthodologie adéquate est motivé par les antécédents de recherche du laboratoire (précédent ces travaux de thèse). Une stratégie de modification catalytique avait déjà été expérimentée, établie sur le couple DMAP-benzylthioester¹³⁰. Cependant, il n'en a été issu aucun résultat permettant de conclure à la bioconjugaison spécifique de P2X7. En cause un bruit de fond n'autorisant aucune analyse fine. En amont de la conception d'une nouvelle stratégie, des hypothèses probables se doivent d'être formulées afin de tirer profil de cet échec.

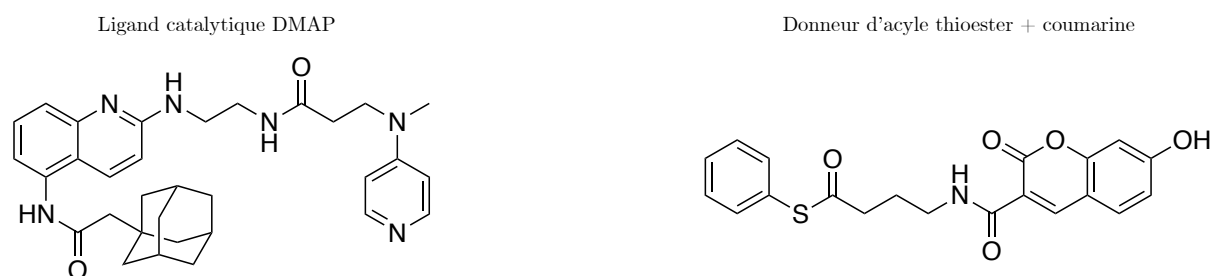


Schéma 3 Couple DMAP-benzylthioester lié à une coumarine (fluorophore).

La source majeure d'aspécificité fut vraisemblablement due à l'électrophilie du thioester. Ce dernier n'admet qu'une bioorthogonalité limitée. Par conséquent la réaction de bioconjugaison est usuellement conduite à 4 °C afin de restreindre les réactions non désirées. Par ailleurs, il est aisément dégradé par les estérases, obligeant à accroître sa concentration au détriment du rapport signal sur bruit. Enfin, la nucléophilie du DMAP est exacerbée en milieu basique. L'expérience requiert une valeur élevée du pH, dépassant généralement 8. En conséquence, la population de lysine déprotonée (donc réactive) s'accroît et favorise les réactions parasites non-catalytiques¹³¹.

La sélectivité et la biocompatibilité de cette méthodologie sont somme toute contestables, tout du moins lorsqu'appliquées à P2X7. En comparaison, la stratégie pyridinium oxime-NASA montre des paramètres de sélectivité et d'efficacité remarquablement supérieurs. Les auteurs décrivent l'application de cette méthode sur des tissus biologiques très complexe (tranche de cerveau). De ce fait, cette dernière sera explorée dans le cadre de cette thèse.

Le pK_a décrit des pyridiniums oxime se situe entre 7 et 8,5. L'anion oximate correspondant exhibe une nucléophilie supérieure aux nucléophiles oxygénés classiques à ce pH¹⁹⁰ (sérine, thréonine, tyrosine...), favorisant une réaction rapide et sélective. En complément, la structure du donneur d'acyle (composé NASA) a été optimisée pour que celui-ci arbore une électrophilie modérée, appropriée pour une réaction avec l'ion oximate, mais orthogonale à la plupart des groupements chimiques (à pH physiologique). Cette

propriété réduit drastiquement l'aspécificité du marquage d'affinité. Enfin, la structure du donneur d'acyle n'est pas rencontrée au sein du vivant, les dégradations enzymatiques devraient donc être négligeables¹³¹.

En répondant en tout point aux problèmes soulevés par l'échec de la stratégie initiale, le couple pyridinium oxime-NASA se positionne comme un choix approprié. Aussi, cette approche nécessite deux molécules chimiques : un ligand catalytique et un donneur d'acyle (NASA) conjugué à une sonde d'intérêt. Les détails de la réaction sont exposés en Figure 21. Après la reconnaissance spécifique du ligand, l'extrémité oxime facilitera le transfert d'acyle porté par le composé NASA sur un acide aminé. Une première réaction bioorthogonale entre les deux molécules exogènes formera un intermédiaire acyle-oxime hautement réactif. Un acide aminé endogène pourra séquentiellement réagir avec ce dernier pour former une liaison amide biologiquement stable. Il régénérera ainsi l'extrémité oxime qui s'engagera dans d'autres cycles catalytiques.

Par définition, la première réaction pourra être conduite hors site. Cependant, l'intermédiaire acyle-oxime est labile et, à ce titre, sa formation en dehors du site de liaison aboutirait à une hydrolyse rapide, limitant dès lors l'aspécificité du marquage.

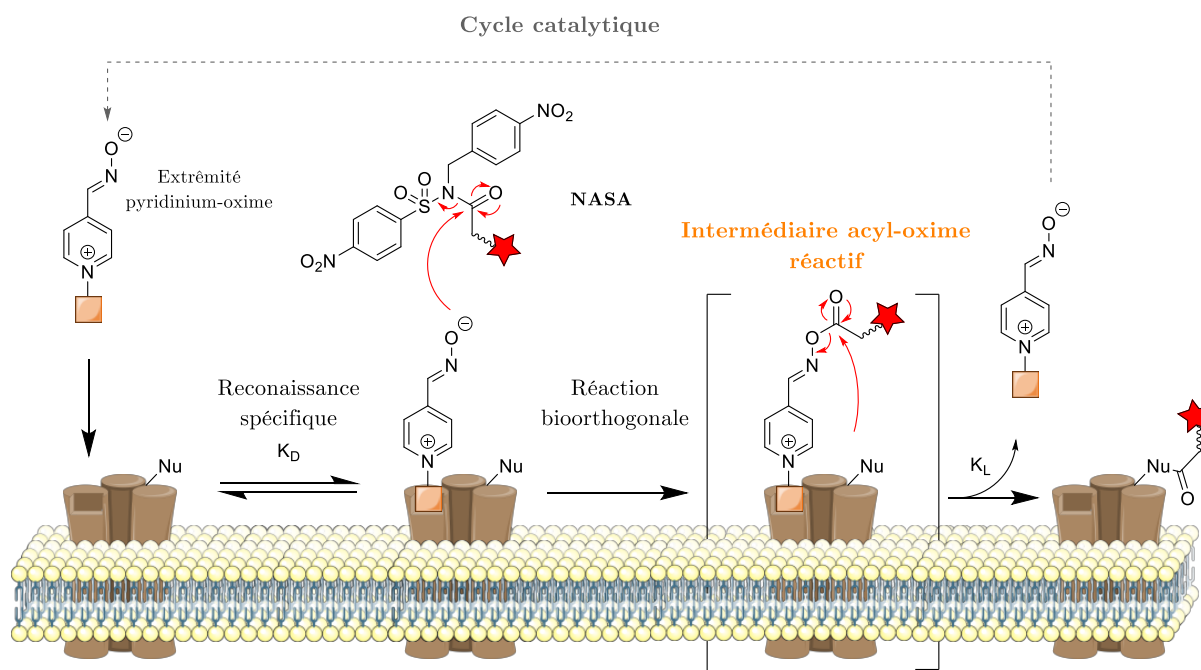


Figure 21 Illustration de la modification de protéine par la chimie catalytique pyridinium Oxime – NASA. Nu : nucléophile, carré orange : ligand spécifique, trimère marron : protéine d'intérêt, étoile rouge : sonde chimique.

Ce chapitre traitera de la conception et de la synthèse des composés chimiques initiaux, de la modification de P2X7 par ces derniers et de la rétroaction des résultats de biologie sur la synthèse organique.

2. Ligands pyridinium oxime (PyOx)

La stratégie initiale s'est appuyée sur une synthèse convergente du pharmacophore et de l'extrémité pyridine-4-aldoxime grâce à un lien oligoéthylène glycol de différentes tailles. À cette fin, une cycloaddition alcyne-azoture 1,3-dipolaire catalysé par le cuivre(I) (CuAAC) apparaissait comme une solution rapide et efficace. Le 1,2,3-triazole formé ne devrait avoir qu'un impact limité sur l'activité biologique de la molécule :

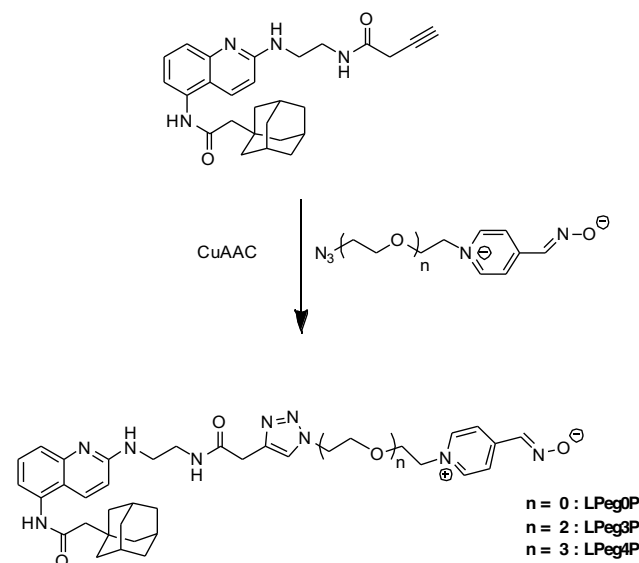


Schéma 4 Stratégie de synthèse du ligand PyOx catalytique.

Ces structures ont été validées à l'aide de modèles d'interactions. L'approche préférée ici a été l'amarrage moléculaire^{8a} par comparaison de motif. Puisque le mode de liaison de AZ10606120 à P2X7⁷² est connu, ces données expérimentales peuvent être mises à profit pour valider la conformation du pharmacophore de chaque ligand au sein de la poche de liaison. La Figure 22 fait état des structures générées et des distances entre l'extrémité oxime et la lysine la plus proche. Chaque complexe admet un positionnement propice (3,0 et 3,1 Å) à une réaction guidée par la proximité. De manière intéressante, la lysine la plus proche de l'oxime varie avec la longueur de la chaîne.

Il convient de rester (très) prudent quant à ces modèles. Ils ne sont que qualitatifs et ne prédisent que pauvrement la conformation de plus faible énergie du complexe. Pour conclure sur cette dernière, la modélisation de la dynamique moléculaire du complexe est indispensable. Cependant, le laboratoire ne dispose pas des ressources informatiques

^{8a} Très souvent dénommée par son anglicisme « docking », cette méthode *in silico* permet de prédire l'état de plus basse énergie d'un complexe ligand-protéine.

nécessaires à cette étape qui doit par ailleurs être conduite par un spécialiste expérimenté. Les résultats présentés ne sont donc que des « poses probables », qui valident imparfaitement la disponibilité des nucléophiles.

3. Synthèse du pharmacophore et du ligand

La synthèse du composé AZ10606120 est décrite par la littérature (brevet)¹⁹¹. Cette dernière, présentée dans le schéma suivant, a largement inspiré la stratégie initiale.

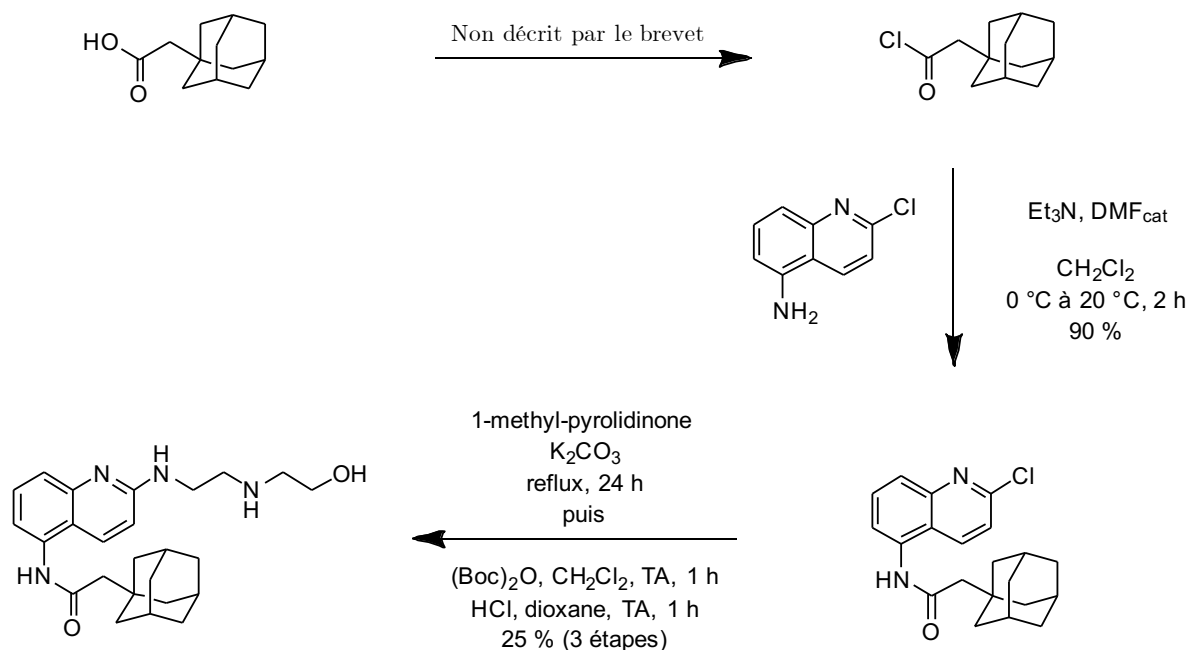


Schéma 5 Synthèse décrite de AZ10606120.

Cette voie a cependant dû être légèrement modifiée à la suite des imprévus détaillés ci-après.

Le chlorure d'acyle, issu de l'acide acétique correspondant, n'a posé aucun problème de synthèse. Néanmoins la 2-chloroquinolin-5-amine ne fut pas commercialement disponible aux débuts des travaux de thèse. Une équipe a toutefois décrit sa synthèse en deux étapes à partir du 5-nitroquinolin-2(1*H*)-one¹⁹². Une première étape de chloration grâce au trichlorure de phosphoryle suivit de la réduction de la fonction nitro avec du chlorure d'étain(II). Cette dernière étape a été problématique, car le produit final se dégrade sur colonne de silice. De plus, l'émulsion obtenue lors de l'extraction du brut réactionnel complexifie fortement sa manipulation. L'étape de réduction a alors été optimisée. La catalyse au palladium sur charbon est apparue comme solution idéale. Le dihydrogène gazeux s'est montré supérieur à l'ammonium formiate en tant que source d'hydrogène. Enfin, la réaction de chloration effectuée en aval du couplage au motif adamantane permet des rendements excellents et une purification aisée.

La synthèse de l'alcyne terminale a été réalisée selon la stratégie présentée par le Schéma 6.

En partant de la 5-nitroquinolin-2(1*H*)-one commercial, une réaction de réduction effectuée avec l'hydrogène gazeux et d'une quantité catalytique de palladium(0) sur charbon (10 %) a permis d'obtenir quantitativement l'aniline 5-aminoquinolin-2(1*H*)-one **1**. Cette dernière a été mise en présence du chlorure d'acyle **2** obtenu après 3 h à reflux de l'acide acétique d'adamantane dans le chlorure de thionyle, et d'un léger excès de triéthylamine. La réaction forme l'amide **3** correspondante avec un rendement de 81 %. Ce composé est converti en la chloroquinoline **4** par une réaction avec POCl₃ fraîchement distillé dans le 1,2-dichloroéthane anhydre à reflux sous atmosphère inerte (argon). Le chlore peut alors être substitué par l'éthylène diamine dans une réaction de substitution nucléophile aromatique. Ainsi, après 48 h à reflux dans l'éthanol anhydre en présence de 50 équivalents d'éthylène diamine, le composé **5** est obtenu avec un rendement de 51 %.

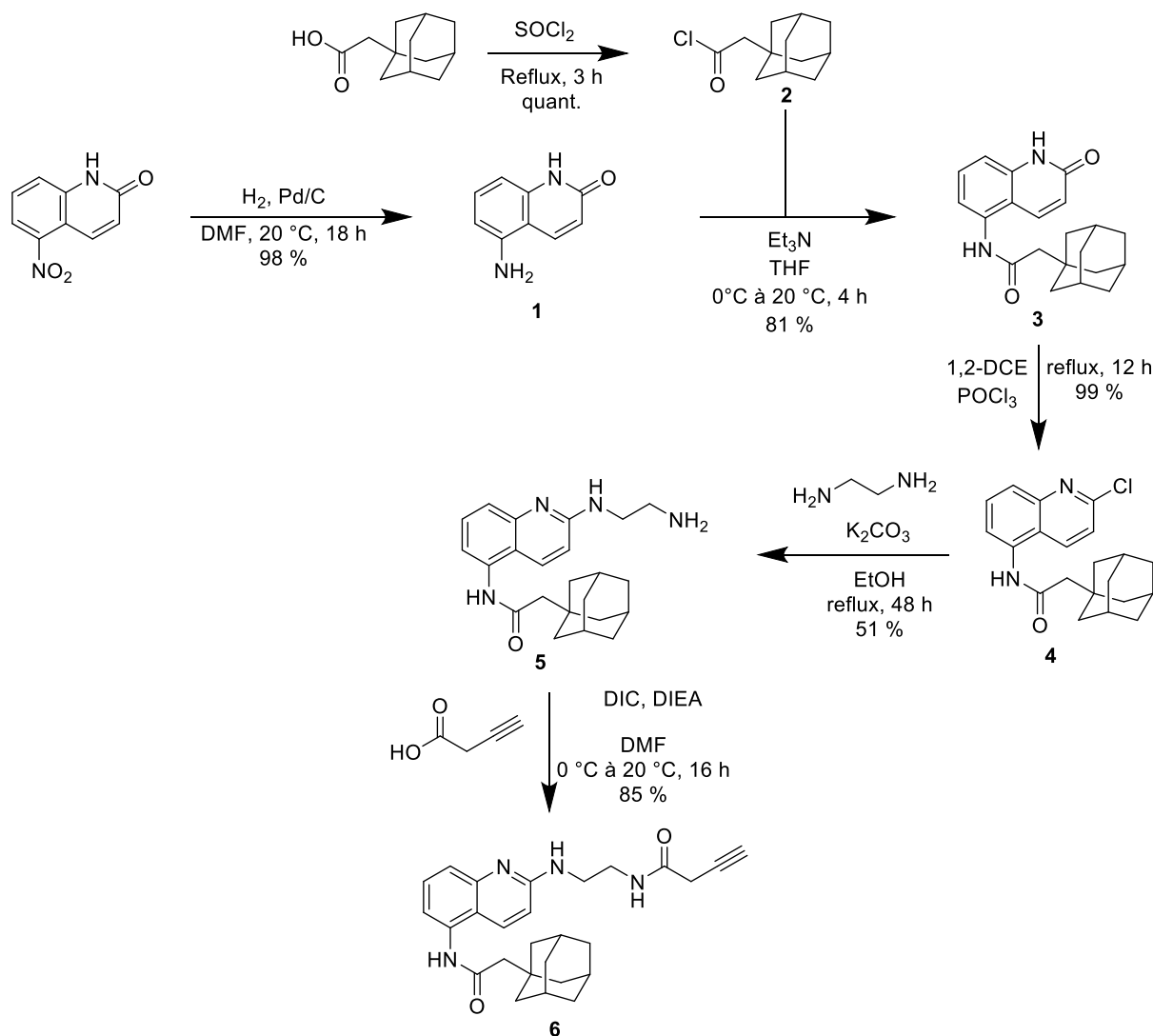


Schéma 6 Synthèse de l'alcyne terminal 6.

Enfin, l'analogue alcyne **6** est obtenu par acylation de l'amine primaire par l'acide but-3-ynoïque en présence de N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC). Le composé **6** a par conséquent été obtenu avec un rendement de 85 % après purification.

La synthèse de l'extrémité azoture-oxime (Schéma 7) a été grandement simplifiée par la disponibilité commerciale de la pyridine-4-aldoxime. Afin d'augmenter les chances d'effectuer un marquage spécifique de P2X7 à l'aide la stratégie pyridinium oxime-NASA, différents analogues du composé AZ10606120 fonctionnalisés par un groupement pyridinium oxime ont été synthétisés. Ceci a conduit à la synthèse de divers groupements pyridinium oxime alkylés par des chaînes oligoéthylène glycol présentant une fonction azoture terminale. Pour ce faire, les différentes unités d'éthylène glycol ($n = 0, 1, 2$, et 3) ont été bis-tosylées en présence de chlorure de *paratoluènesulfonyl* (désigné tosylé par la suite) et d'une quantité catalytique de DMAP pour obtenir les produits **7** correspondants. La substitution d'un tosylates par un azoture permet d'obtenir les produits bifonctionnalisés asymétriques **8**. Enfin, le tosylé a été substitué quantitativement par la pyridine-4-aldoxime afin d'obtenir les produits désirés **9**, **10**, **11** et **12**.

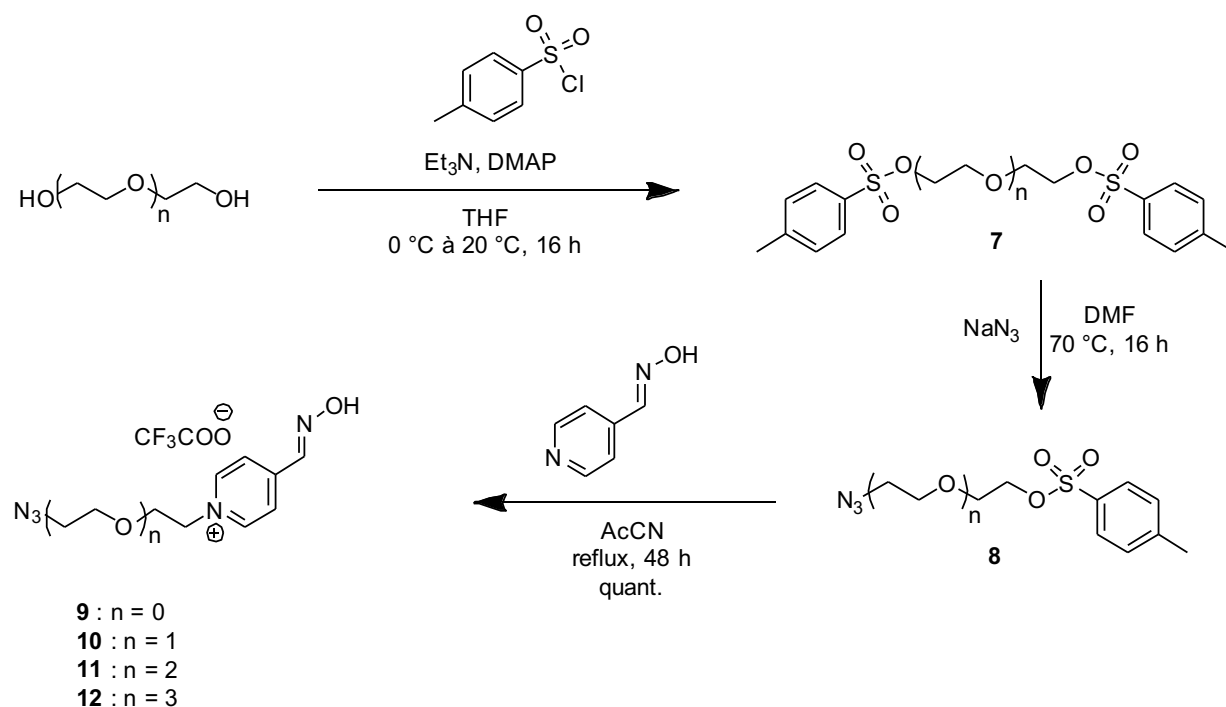


Schéma 7 Synthèse des extrémités pyridinium-oxime.

La conjugaison des deux synthons obtenus (alcyne terminal et azotures) par cycloaddition n'a pas été aussi triviale qu'escomptée. En effet, les conditions classiques de

CuAAC, qui utilisent le sulfate de cuivre(II), l'acide ascorbique (réduisant ce dernier) et la L-proline (ligand du cuivre qui améliore sa réactivité) dans un solvant H₂O : DMF : *tert*-butanol (1 : 1 : 2), n'ont pas permis d'isoler les produits finaux désirés.

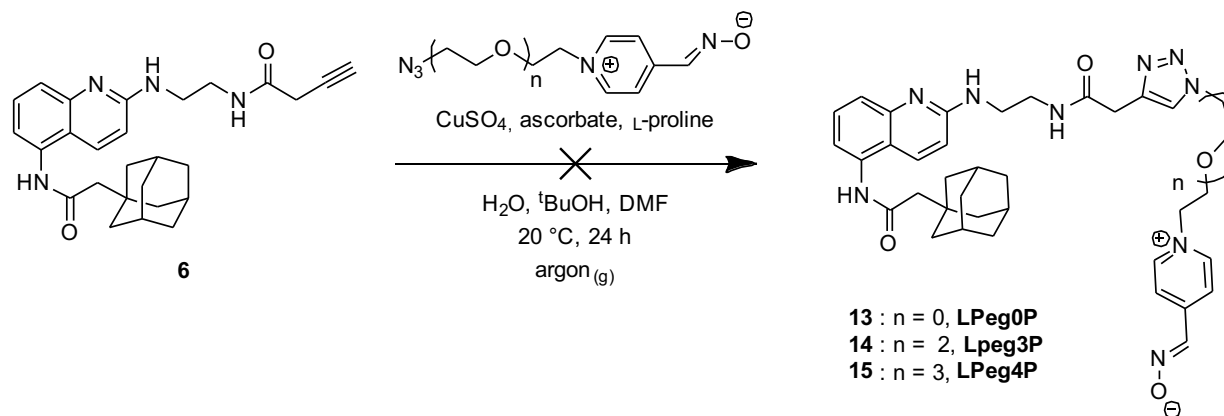


Schéma 8 Stratégie de synthèse des ligands catalytique par CuAAC.

En conséquence, les modalités réactionnelles ont été adaptées. T. Tamura *et al.* font état d'un protocole expérimental particulier pour la chimie CuAAC avec des substrats similaire¹³¹ :

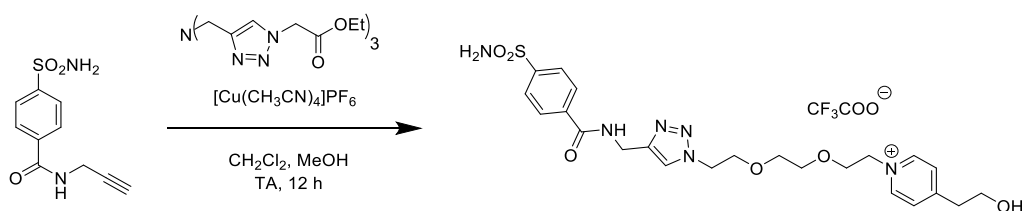


Schéma 9 Exemple de synthèse avec des substrats similaires.

L'hexafluorophosphate de cuivre(I) tetrakis (acétonitrile) est une source directe de cuivre(I), nécessaire à la réaction. Il ne requiert pas de réduction par l'acide ascorbique pour être réactif. La présence d'un ligand polytriazole permet d'accélérer la réaction grâce à (1) sa basicité qui favorise la formation de l'acétylure de cuivre(I) en aidant à

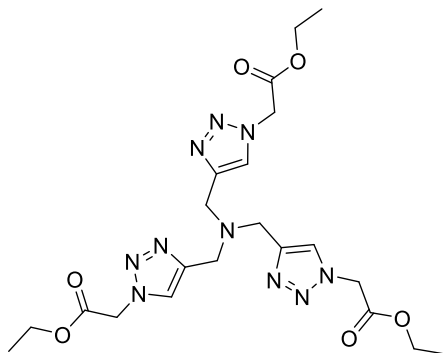


Schéma 10 Structure du ligand TTMA.

la déprotonation de l'alcyne, (2) sa chélation du cuivre (I) qui le protège de l'oxydation et empêche la formation d'agrégat polynucléaire de cuivre(I), et (3) sa faible stabilité de coordination offre des échanges de ligands rapides et bénéficie aux propriétés catalytiques¹⁹³. Parmi ces ligands tris-triazole, le TTMA se montre particulièrement efficace¹⁹⁴ et a été utilisé dans la série de réactions suivantes (Schéma 10).

Différentes proportions stoechiométriques cuivre-ligand ont ainsi été expérimentées. L'optimisation de ces dernières a fourni la molécule LPeg0P avec un rendement modeste de 4 %.

Les réactions de CuAAC avec les substrats azotures **11** et **12** arborant une chaîne polyéthylène glycol plus longue n'a permis de n'isoler aucun produit attendu **14** et **15** (LPeg3P et LPeg4P). Le cuivre est probablement complexé par les fonctions chimiques de l'alcyne vrai qui masque alors sa réactivité. Toutefois, les quelques milligrammes obtenus sont suffisants pour une série d'expérimentations biologiques qui établira la capacité de la molécule à modifier sélectivement P2X7.

4. Donneur d'acyle NASA

Ces étapes ont tiré profil de la description détaillée de la synthèse par Tamura *et al.*¹³¹. Brièvement, la N-acylation du 4-nitrobenzenesulfonamide par le Boc-PEG4-COOH a été effectuée au moyen du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) en présence d'une quantité catalytique de DMAP (50 %). Cette réaction a permis d'obtenir le composé **16** avec 60 % de rendements. Ensuite, le bromure de 4-nitrobenzyl a permis la N-alkylation de la fonction sulfonamide et d'obtenir le composé **17** avec un rendement de 65 %. Enfin, le groupement *tert*-butoxycarbonyl (appelé Boc par la suite) a été éliminé à l'aide d'un mélange 1 : 1 TFA : CH₂Cl₂, permettant d'accéder au composé **18** présentant une amine primaire terminale (Schéma 11).

Cette dernière a permis l'incorporation de la carboxyfluoresceine. Ce fluorophore a été introduit à l'aide de la 5-carboxyfluoresceine en présence de chlorure de 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium (DMTMM). L'utilisation de ce réactif de couplage est justifiée par l'échec d'autres agents de couplage, comme l'EDC ou l'hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium (HATU). Le schéma suivant illustre cette étape. Les rendements obtenus sont alors de 88 % pour **19** (NASA-F1, Schéma 12).

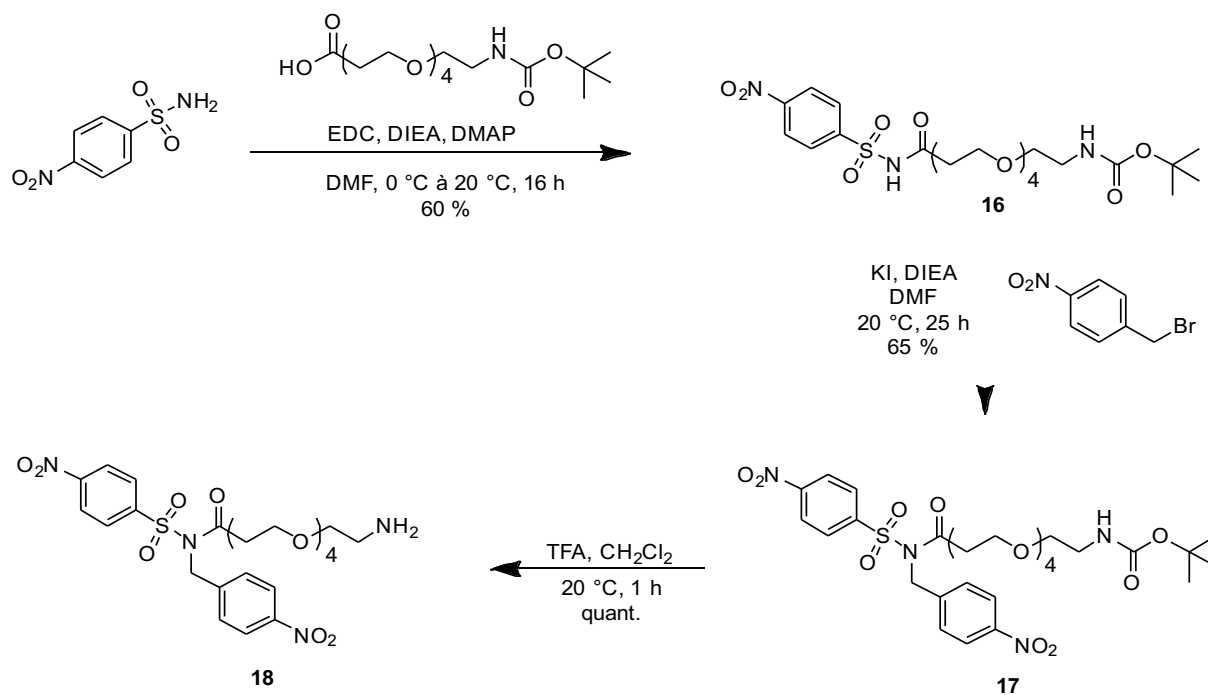


Schéma 11 Synthèse de l'amine primaire 18.

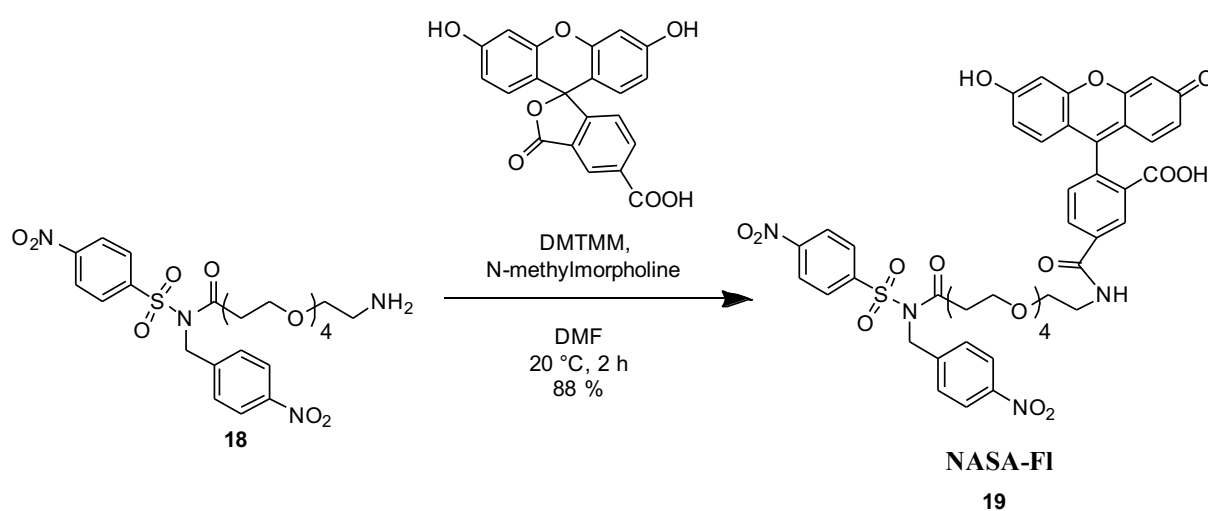


Schéma 12 Synthèse de NASA-Fl.

5. Pharmacologie de LPeg0

Une fois les différents composés synthétisés, le pouvoir inhibiteur du ligand catalyseur LPeg0 a été investigué par électrophysiologie patch-clamp. Le but de cette expérience est d'approcher l'affinité de la molécule par sa puissance d'inhibition des courants du récepteur P2X7. Néanmoins, il s'agit ici d'une inhibition non compétitive. À ce titre, les outils mathématiques classiques pour quantifier la valeur de l'affinité (*p. ex.* équation de Cheng-Prusoff) ne peuvent être employés.

Des cellules HEK293T ont été transfectées avec le récepteur P2X7 de rat 24 heures avant l'expérience. Un courant entrant est ensuite provoqué par l'application d'ATP extracellulaire (1 mM) pendant 2 secondes. Sans délai, LPeg0P a ensuite été appliqué pendant 10 secondes, dans le but de saturer les sites allostériques de P2X7. S'en suit alors une coapplication du ligand et de l'ATP pendant 2 secondes afin de provoquer un courant entrant. Enfin, 1 mM d'ATP seule est appliqué pendant 2 secondes après 30 secondes de perfusion d'une solution de lavage, pour estimer la réversibilité de la liaison du ligand à sa cible.

Ainsi, l'inhibition du ligand a été évaluée (1 μ M) en comparaison du composé de référence (AZ10606120, 1 μ M). La Figure 23 présente les pourcentages d'inhibition de ce dernier. Ceux-ci sont calculés par la soustraction de la valeur du courant lors de la coapplication ligand-ATP à la valeur du courant entrant provoqué par la première application d'ATP seule. LPeg0P montre des valeurs satisfaisantes (60,4 % $\pm$ 6,6 %, $n = 3$) à 1 μ M, pour rappel, IC_{50} AZ10606120 $\approx$ 10 nM).

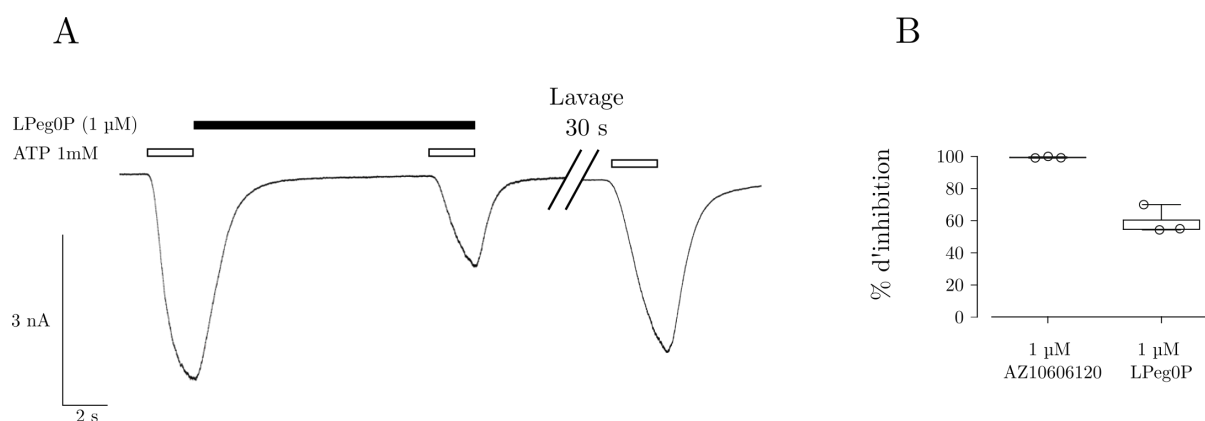


Figure 23 Pouvoir inhibiteur de LPeg0P à 1 μ M. A. Courant représentatif, cellule entière, provoqué par la stimulation de cellules transfectées P2X7 avec l'ATP (1 mM) pendant 2 s suivi de 10 s d'application de LPeg0P (1 μ M) et enfin 2 s de coapplication des deux composés aux concentrations indiquées précédemment. Après 30 s de lavage, l'ATP (1 mM) est appliquée pendant 2 s. B. Quantification du pouvoir inhibiteur contre 1 μ M AZ10606120 selon le même protocole.

L'insertion d'une charge positive et d'un trop grand nombre de degrés de liberté semble donc détrimentaire à l'affinité. Une conclusion robuste nécessitera cependant un travail de relation structure-activité dépassant de loin les objectifs de cette thèse.

Ces valeurs acquises, elles permettent subséquemment de guider les réactions de marquages à suivre. En effet, il est raisonnable de supposer que les concentrations inférieures à 1 μM LPeg0P n'ont que de faibles chances de succès lors de la réaction de bioconjugaison. La limite haute devra être définie *a posteriori*.

6. Marquage d'affinité

La stratégie de marquage est ensuite déployée sur cellule HEK293T transfectées avec P2X7. Afin de fluidifier la lecture des résultats et discriminer les cellules transfectées, les expériences suivantes tirent profil d'un récepteur P2X7 couplé à une protéine de fusion fluorescente mScarlet¹⁹⁵, dérivée de la protéine mCherry (protéine fluorescente rouge). Décrite en 2017, elle possède des caractéristiques photophysiques exceptionnelles, en plus d'un encombrement réduit (protéine monomérique). Dans un souci de cohérence, elle sera représentée dans les futures images en vert (Schéma 13). Si ce choix peut surprendre pour une protéine fluorescente rouge, il sera justifié par la suite. Il est demandé au lecteur d'en admettre la pertinence.

La section suivante propose une description progressive des différents paramètres optimisés pour cette stratégie. Chacune des conditions a été analysée par microscopie

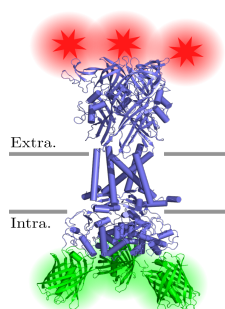


Schéma 13 Schéma du construit P2X7-mScarlet (vert), incluant la sonde de marquage (rouge). Ce code couleur sera repris tout au long des figures de microscopie à suivre.

à épifluorescence à champ large. Cette méthode permet de collecter plus de signaux que la microscopie confocale (elle ne rejette aucun photon), au dépit d'une quantification moins robuste. Elle a donc été préférée pour ces expériences préliminaires, où seule une observation qualitative d'un signal spécifique est recherchée. Les expériences initiales ont été menées avec LPeg0P (5 μM) et NASA-Fl (10 μM), incubés pendant 2 h sur cellules HEK293T transfectées avec P2X7-mScarlet.

Pour contrôle, la même expérience fut conduite en incubant les cellules avec NASA-Fl (10 μ M) uniquement. Certaines cellules paraissent alors émettre une fluorescence dépendante de la transfection (Figure 24, planche supérieure). Néanmoins, un signal similaire est observé lors de l'incubation avec NASA-Fl seul (Figure 24, planche inférieure). LPeg0P n'induit dans ces conditions aucun marquage sélectif. Il semble se lier aux cellules mortes ou mourantes. Les répliqua de l'expérience en modulant les concentrations des réactifs ont conduit aux mêmes conclusions.

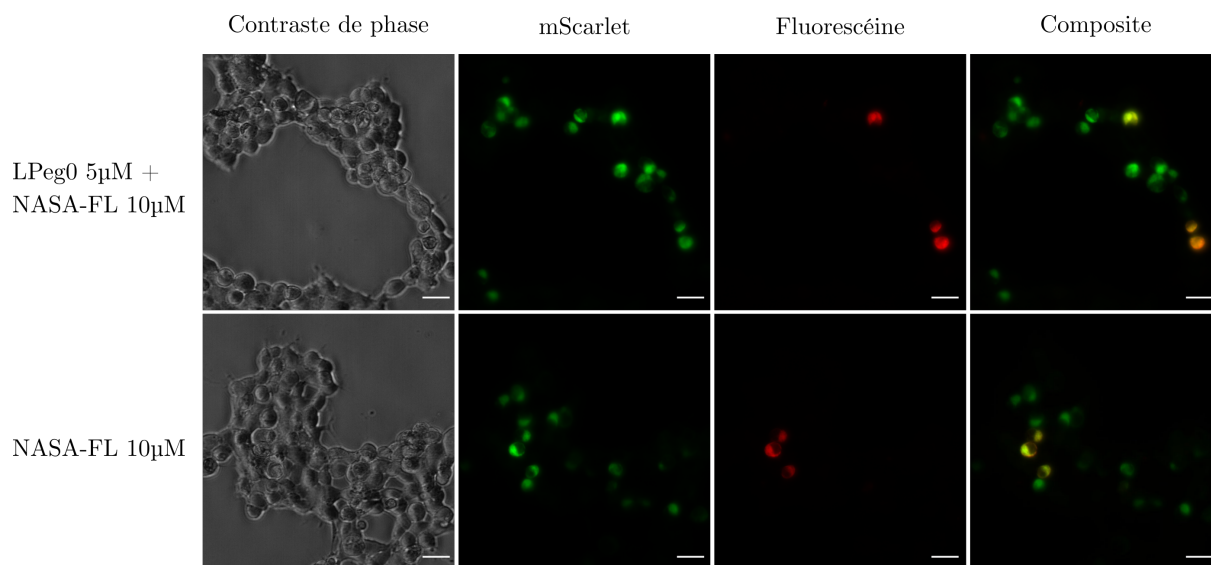


Figure 24 Marquage des récepteurs P2X7 par le système catalytique PyOx-NASA. Les cellules sont incubées (2 h, 37 °C, DMEM) avec le mix LPeg0P (5 μ M) et NASA (10 μ M) et imagées par microscopie à épifluorescence après 3 rinçages au tampon PBS. Barre d'échelle : 30 μ m.

Le rationnel d'échec initialement formulé pour expliquer cet échec se dirigeait contre la fluorescéine. La détection de son signal est gênée par l'autofluorescence des cellules. Déplacer l'illumination dans des longueurs d'onde proche infrarouge permettrait de s'affranchir de ces signaux parasites et d'augmenter le rapport signal sur bruit. En conséquence, le donneur d'acyle NASA fut fonctionnalisé par une tetrasulfo-cyanine5 (Alexa Fluor 647) en lieu et place de la fluorescéine. La présence de charges négatives sur ce composé devrait restreindre l'interaction avec les membranes plasmiques et limiter les liaisons aspécifiques telles qu'observées précédemment.

7. Synthèse d'un nouveau composé NASA

La synthèse en une étape de ce composé nécessite l'amine primaire **18** et l'acide carboxylique commercial d'Alexa Fluor 647 sous forme de sel de tris(triéthylammonium). Le couplage de ces deux molécules a été effectué avec le DMTMM comme précédemment décrit et permet d'obtenir le donneur d'acyl **20** (NASA-Al647) par la formation d'une liaison amide (Schéma 14) avec un rendement de 76 %.

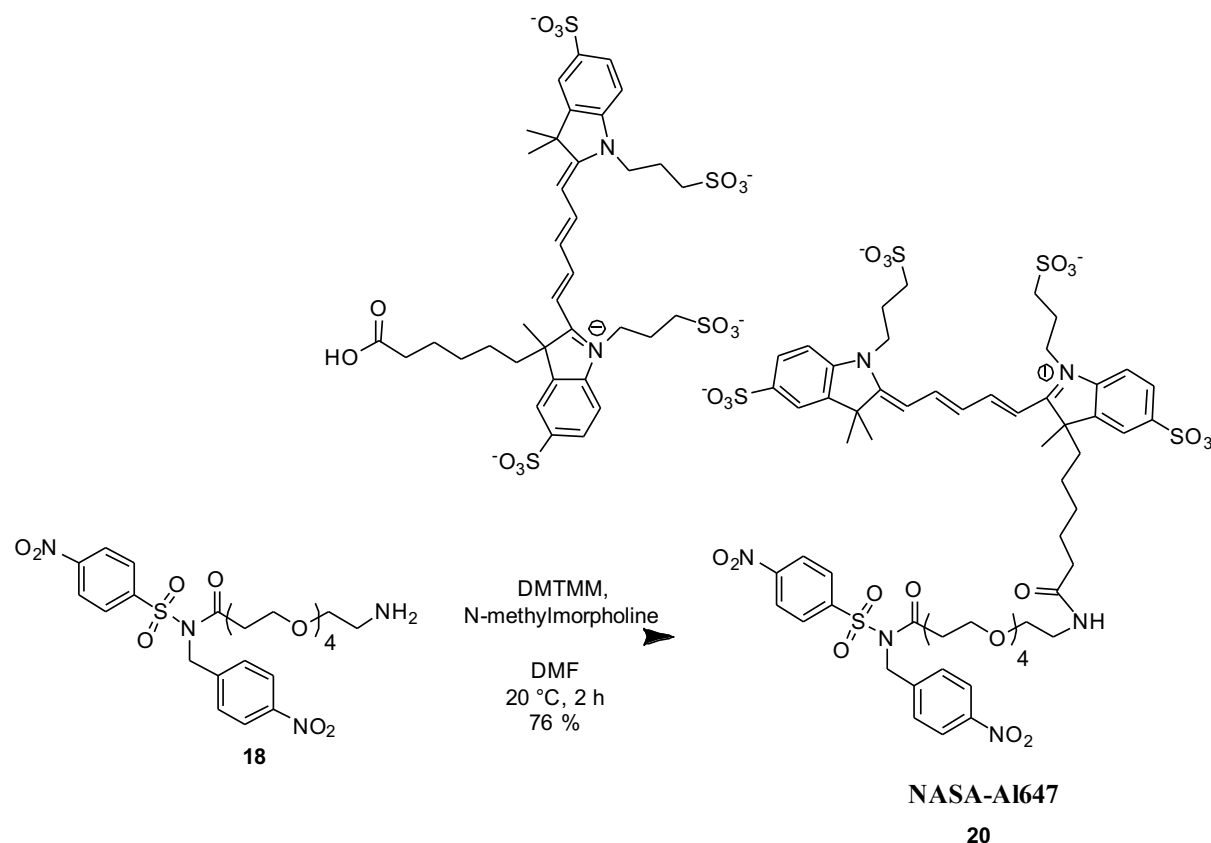


Schéma 14 Synthèse de NASA-Al647

Marquage d'affinité

La Figure 25 exemplifie une expérience de marquage avec le composé NASA-Al647. Les cellules ont été préparées selon le même protocole qu'en Figure 24. Si l'aspécificité du marquage cellulaire paraît réduite, aucun marquage spécifique de P2X7 n'a pu être discerné. Ici encore, différentes concentrations ont été testées, sans succès.

La longueur de la chaîne éthylène glycol semble ici être une cause vraisemblable de l'échec de cette stratégie. Plausiblement, ce dernier est trop court et adopte une conformation qui n'accepte pas l'exposition de l'extrémité pyridinium oxime au solvant. Tout du moins, pas assez pour conduire à une réaction efficace avec le donneur d'acyle. Cette hypothèse a été examinée par la suite en synthétisant un nouveau ligand catalytique.

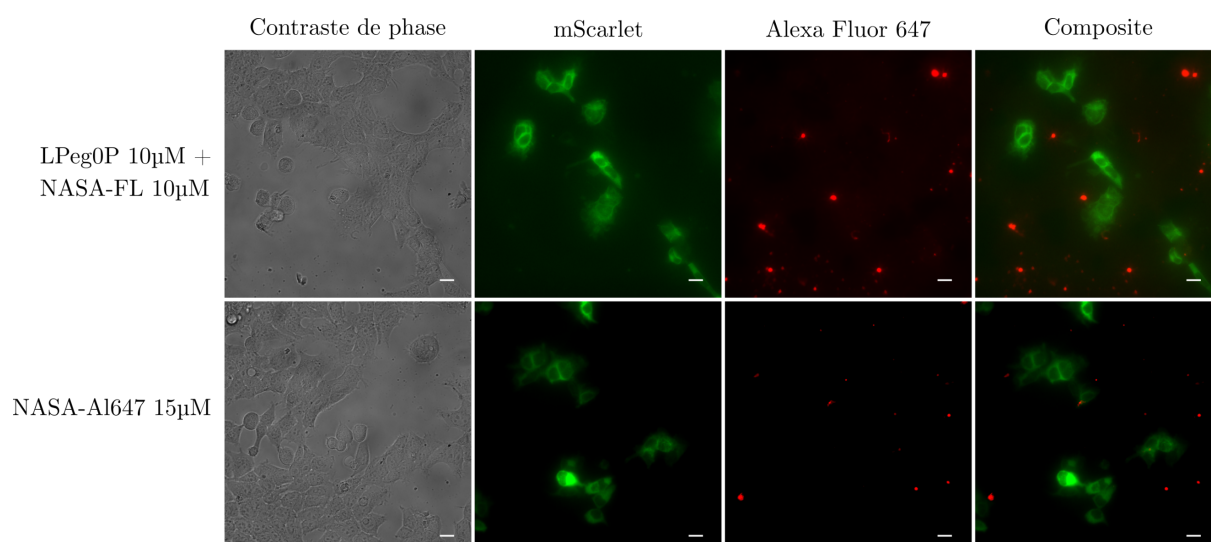


Figure 25 Marquage des récepteurs P2X7 avec LPeg0P et NASA-AI647. Les cellules sont incubées (2 h, 37 °C, DMEM) avec le mix LPeg0P (10 μ M) et NASA-AI647 (10 μ M) et imagées par microscopie à épifluorescence après 3 lavages au PBS. Barre d'échelle : 30 μ m.

8. LPeg7P

Synthèse

Une autre stratégie de synthèse a été utilisée pour produire ce nouveau ligand, plus long. En lieu et place de la chimie « click », exploiter l'amine primaire **5** du pharmacophore pour conjuguer l'extrémité aldoxime par liaison amide a paru pertinent. À cette fin, l'hexaéthylène glycol a été fonctionnalisé avec un acide carboxylique protégé grâce au *tert*-butyle de bromoacetate. La deuxième extrémité de cette chaîne fut modifiée avec un tosyle suivant le mode opératoire des réactions de tosylation précédentes. Une fois l'acide carboxylique déprotégé, une conjugaison a pu être effectuée avec le pharmacophore grâce au DMTMM, utilisé ici pour sa vitesse de réaction et sa tolérance à des milieux de réaction non anhydre. L'obtention d'un milieu de réaction strictement anhydre est difficile à contrôler lors de la manipulation de molécule contenant une chaîne polyéthylène glycol. La substitution du tosyle de la molécule **24** par la pyridine-4-aldoxime pour obtenir quantitativement la molécule finale attendue **25** a alors été commode.

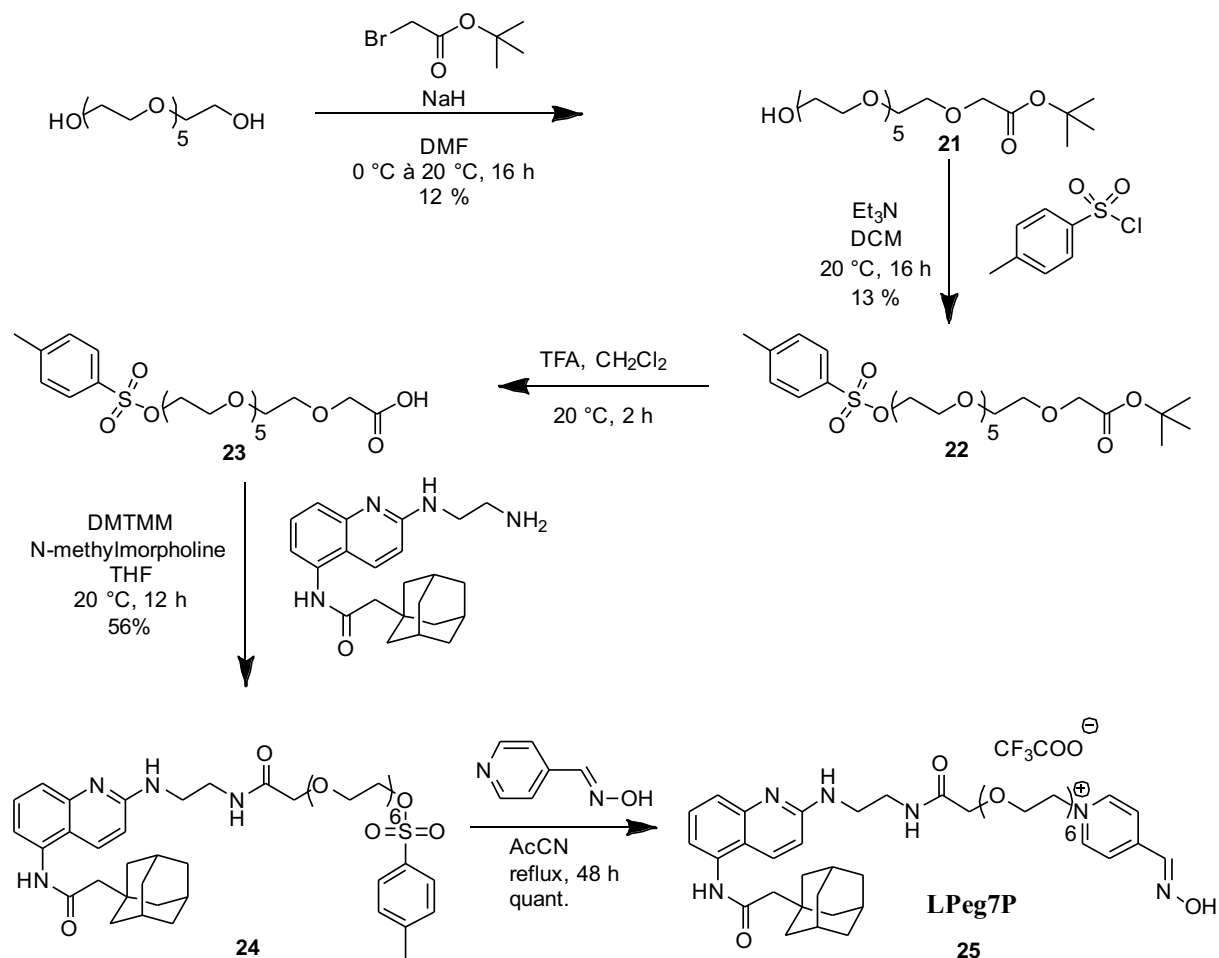


Schéma 15 Synthèse du ligand LPeg7P

Pharmacologie de LPeg7P

À l'image du premier ligand synthétisé, le pouvoir inhibiteur de LPeg7P a été évalué par électrophysiologie patch-clamp (Figure 26A). 5 μM de ce ligand inhibe 42,7 % ($\pm$ 5,1 %, $n = 3$) des courants entrants de P2X7 provoqués par 1 mM d'ATP.

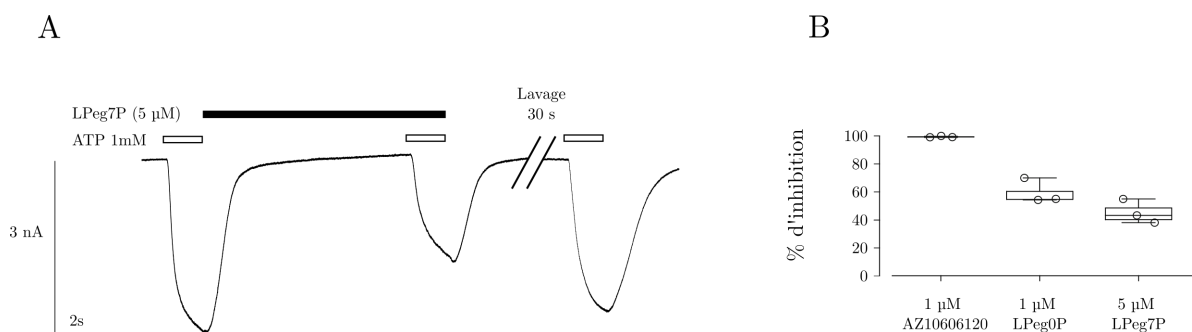


Figure 26 Pouvoir inhibiteur de LPeg7P (5 μM) en comparaison de LPeg0P (1 μM) et AZ10606120 (1 μM). Figure 23 pour le détail du protocole.

Lorsque comparée à 1 μM de LPeg0P, une telle diminution du pouvoir inhibiteur ne fut pas attendue (Figure 26B). La chaîne polyéthylène glycol induit probablement une conformation défavorable de la molécule à son amarrage à la poche allostérique cible. Cependant, ce ligand est capable de former un complexe avec le récepteur P2X7 et sera ainsi utilisé par la suite.

Marquage d'affinité et screening

Les conditions précédemment décrites ont été reprises, en ne changeant que la nature du ligand. Ce dernier, significativement plus long, ne s'est alors pas montré plus efficace que son homologue. Les figures obtenues sont identiques en tout point à celles présentées antérieurement et à ce titre, le lecteur y est référé.

Une réflexion plus approfondie fut engagée. Différents paramètres sont apparus comme potentiellement limitants :

- La température. À 37 °C, les protéines transmembranaires peuvent subir un turn-over plus ou moins rapide. Prolonger le temps de résidence de P2X7 à la membrane en bloquant l'internalisation peut donc bénéficier à la réaction. À cet effet, une réaction conduite à 16 °C permet de limiter l'endocytose.
- La surface. Le laboratoire utilise en routine la poly-L-lysine en tant que substrat d'adhésion cellulaire. Ce polymère de lysine qui recouvre l'entièreté de la surface de culture transparaît comme un candidat probable de réaction avec le donneur d'acyle. La société Ibidi® commercialise une solution d'adhérence (μ -Dish, ibiTreat) cellulaire permettant de s'affranchir de la poly-L-lysine et d'interroger cette théorie.
- Le milieu d'incubation. Les milieux classiquement utilisés en culture cellulaire sont chimiquement très complexes et peuvent induire des réactions non désirées. Le recours à un milieu d'incubation moins généreux en diversité moléculaire semble pertinent.
- L'homologie protéique. La protéine P2X7 issue de différents organismes montre une légère modification de la population de lysine exposée au solvant, notamment aux abords de la poche allostérique de liaison du ligand.
- Les paramètres cinétiques (temps et concentrations).

Chacun de ces paramètres a alors été considéré dans une campagne de screening. 35 conditions jugées prometteuses ont été évaluées, selon le Tableau 3 suivant :

Espèces	Humain, souris et rat
Température	16 °C et 37 °C
Milieu	DMEM et HEPES (50 mM)
Temps d'incubation	1 h, 2 h, 3 h et 5 h.
Support de culture	Poly-L-lysine Plastique Ibidi®
Ligands	LPeg0P 5 à 50 µM LPeg7P 10 à 100 µM
NASA-A1647	10 à 100 µM

Tableau 3 Conditions d'optimisation du marquage d'affinité

Il fut alors décevant de n'observer aucun signal spécifique récompensant ce travail. Chacune des expériences a abouti aux résultats précédemment illustrés par la Figure 25 : pas de fluorescence membranaire visible, dans un champ parsemé de zones exiguës d'intense fluorescence, correspondant sûrement à une liaison non spécifique du fluorophore aux grains de transfections.

9. Discussion

Dans le but de rationaliser l'échec de cette stratégie catalytique, les cinétiques de réactions ont été évaluées. La réaction de marquage est favorisée par la proximité de l'intermédiaire et la lysine endogène ciblée. Tout se passe alors comme si la concentration locale des deux réactifs était très élevée. Par conséquent, la réaction a été mimée grâce à l'incubation des deux réactifs dans un tampon concentré en amine primaire (l'éthylène diamine). La vitesse estimée de réaction a été analysée par chromatographie liquide haute performance (HPLC), en suivant la dégradation du composé NASA-Fl en fonction du temps.

Ainsi, dans un solvant HEPES (50 mM) contenant 1 mM d'éthylène diamine a été dissous 10 µM de NASA-Fl. En absence de ligand pyridinium oxime, aucune dégradation significative du composé n'a pu être observée. La présence équimolaire de ce dernier (LPeg7P) induit en revanche une dégradation de 20 % après 16 h de réaction (Figure 27).

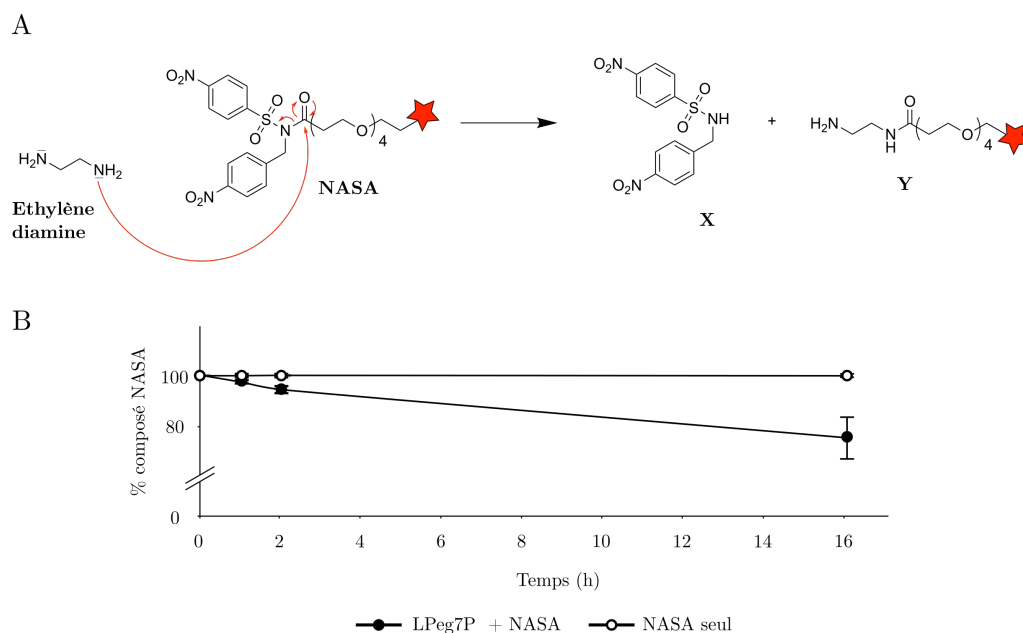


Figure 27 Réaction du composé NASA en présence d'éthylène diamine. A. Schéma réactionnel. B. Suivi HPLC de la conversion au cours du temps du composé NASA initial en composé X (+ Y).

Cette expérience met en avant des cinétiques insuffisantes. Ce modèle ne correspond néanmoins que pauvrement à la réaction guidée par la proximité spatiale et il convient d'être prudent lors de son interprétation. La réponse adéquate à cette interrogation nécessite la protéine P2X7 purifiée, et un suivi de la réaction par spectrométrie de masse. Cette investigation s'est avérée bien trop complexe au regard des bénéfices fournis au projet. Par ailleurs, étant donné sa nature transmembranaire, purifier P2X7 relève d'un défi tout autre que le projet présenté ici. Enfin, et au vu des échecs du marquage en dépit des nombreuses conditions expérimentées, il paraît peu probable d'obtenir des résultats permettant d'optimiser celui-ci grâce à cette méthode.

Ipso facto, un choix cornélien s'est imposé. Continuer le travail sur cette stratégie ou l'abandonner. Le premier cas de figure demande alors la synthèse d'une « chimiothèque » conséquente de ligands catalytiques, en modulant la structure du lien chimique (longueur et rigidité). Il ne garantira aucunement un succès, et nécessitera un labeur chronophage. Le deuxième implique la perte de plus d'un an de travail et la reformulation d'un projet de recherche.

La suite choisie s'est avérée être une chimère de ces deux issues. Quelques mois avant le début de cette thèse, le groupe d'I. Hamachi publia un article sur l'optimisation du composé NASA afin d'adapter cet électrophile à une méthode guidée par un ligand non catalytique. Une N-alkylation du NASA par un groupement acétonitrile en lieu et place du *para*-nitrobenzyle permet d'exacerber suffisamment son électrophilie pour une approche directe. Ainsi, un rationnel *in silico* fut rapidement mis en place. Le deuxième chapitre traitera en détail de cette stratégie qui bénéficie alors de la chimie établie du pharmacophore et de sa fonctionnalisation.

*Chapitre 3 : N-Alkyl-N-Acylsulfonamide :
Approche directe*

1. Introduction

I. Hamachi est indubitablement le père du marquage de protéine guidé par un ligand. Ses travaux pionniers posent les fondements d’une approche riche d’opportunités, aux caractéristiques uniques. Son laboratoire est l’auteur de la plupart des électrophiles, donneurs d’acyles et catalyseurs décrits plus haut. En 2018 son équipe et lui-même décrivent la dérivation du donneur d’acyle NASA en groupement clivable pour l’acylation de protéine. Comme décrit précédemment^{196,131}, l’électrophilie du N-acyle peut être optimisée en modifiant la nature du groupement électroattracteur N-alkyle. C’est ainsi qu’ils publieront le groupement N-cyanométhyl-N-acylphenylsulfonamide (appelé NASA par la suite, voir Schéma 16). Lors de test de marquage *in vitro* sur la protéine FKBP12 purifiée par une approche directe, guidée par un ligand, cet électrophile clivable montre des cinétiques exceptionnelles. 98 % des protéines du milieu ont été modifiées en 15 minutes. En comparaison, le N-nitrobenzyl-N-acylphenylsulfonamide (composé NASA, voir chapitre I) construit sur l’exact même ligand d’affinité ne parvient qu’à 22 % de marquage après 2 heures d’incubation, à concentrations égales¹¹³.

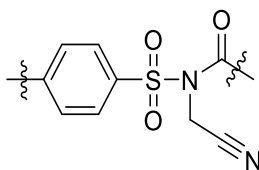


Schéma 16 Electrophile NASA

Cette chimie se montre par conséquent particulièrement efficace et sélective lors de modification de protéines natives sur cellules vivantes. Le marquage d’une protéine transmembranaire (récepteur au folate) guidée par le ligand méthotrexate ($K_D \approx 200$ nM) sur cellules KB vivantes fût complet en 30 minutes. Dix minutes suffisent pour atteindre 80 % de la réaction. Ces résultats remarquables ont inspiré une nouvelle stratégie de modification de P2X7. La réactivité optimisée du NASA légitime sa conjugaison au ligand AZ10606120 pour l’acylation sélective de lysines à proximité du site de liaison allostérique de P2X7 selon la Figure 28.

Le chapitre suivant détaille par conséquent les diverses étapes de conceptions, de synthèses et d’optimisations des outils de marquage de seconde génération. Il traitera également des explorations de la physiologie du récepteur P2X7 permises par cette approche.

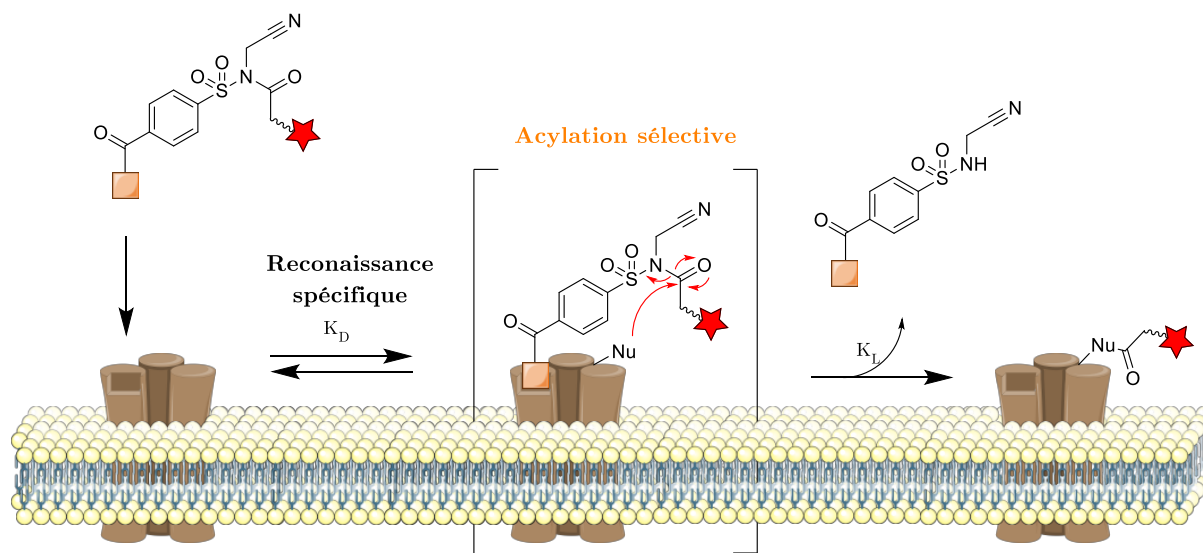


Figure 28 Illustration schématique du marquage par approche directe. La proximité de l'électrophile induite par la reconnaissance du ligand pour sa cible permet la modification covalente d'un acide aminé endogène aux abords du site de liaison. Orange: ligand spécifique, trimère marron : protéine d'intérêt, rouge : sonde chimique.

2. Modélisation moléculaire

Le ligand et l'électrophile sont donc définis. En accord avec les structures publiées par T. Tamura *et al.*, la sonde chimique sera séparée de l'électrophile par une chaîne tétraéthylène glycol. La solubilité du composé final en bénéficiera et la reconnaissance de tag^{9a} telle que la biotine par la streptavidine ne sera pas stériquement compromise (voir ci-après).

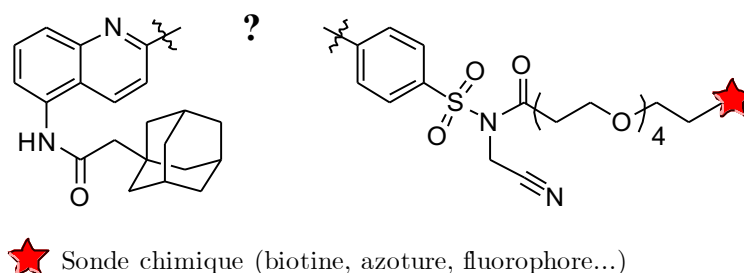


Schéma 17

La structure du lien chimique a alors été créée. La chimie médicinale décrite sur les antagonistes de PX7 a été le point initial de ces travaux. La littérature fait état de la relation structure activité de substituant de la quinoléine (voir références ¹⁹⁷ et ¹⁹²).

^{9a} Anglicisme désignant une étiquette moléculaire discriminable dans un milieu complexe.

Ces données ont permis de suggérer des candidats prometteurs par une approche inspirée du criblage par fragments^{10a}. La dérivation de l'inhibiteur originel en réactif de marquage, rationalisée par ces fragments, a généré les structures proposées en Figure 29. Chacune de ces 6 molécules a ensuite été virtuellement amarrée à P2X7. Pour cette expérience, la chaîne tétraéthylène glycol et la sonde ont été retirée de la structure. 10 poses par composé ont été générées (AutoDock Vina). Pour chaque complexe, la conformation la plus analogue à celle expérimentalement décrite pour le complexe P2X7-AZ10606120 a été retenue. Ceci permet de mesurer la distance du N-acyle et de la lysine K110 (la plus proche), ainsi que l'énergie de liaison prédite (Figure 29).

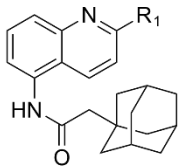
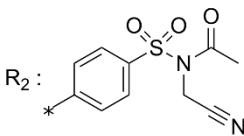
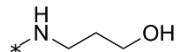
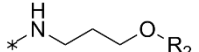
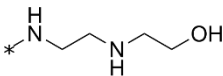
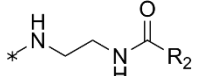
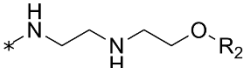
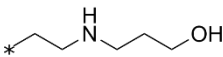
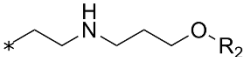
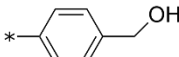
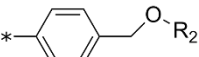
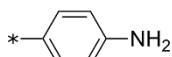
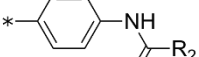
				
Substituants (R ₁)	IC ₅₀ décrit	Modification proposées	Distance K110*	Energie de liaison (kcal.mol ⁻¹)
	8 nM		10,9	-9,5
	10 nM		10,9	-10,4
			11,4	-9,3
	16 nM		14,6	-9
	8 nM		Poses aberrantes	-
	10 nM		Poses aberrantes	-

Figure 29 Prédiction *in silico* d'un réactif de marquage adéquat. Différentes modifications publiées (substituants R₁) conjointement avec leurs IC₅₀ respectifs ont inspirées les modifications proposées. Ces dernières ont été amarrées avec Autodock Vina (structure 5U1W, centre de grille de docking sur AZ10606120).

^{10a} Aussi plus connue par son anglicisme « fragment-based drug design ». Ce concept décrit l'analyse de l'activité biologique de petits fragments moléculaires au sein d'une poche de liaison protéique afin de construire une molécule complexe à partir de ces derniers.

Le candidat le plus prometteur sur les deux facteurs évalués (distance et énergie, Schéma 18) a alors été synthétisé.

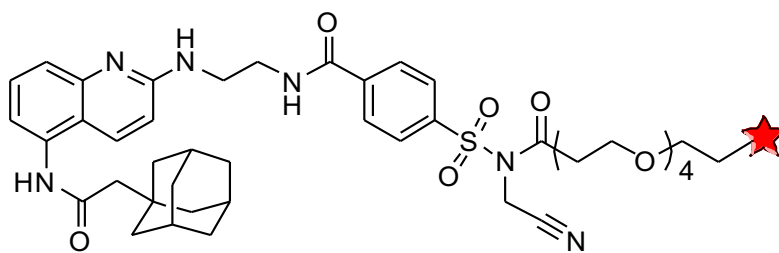


Schéma 18 Structure du réactif de marquage.

3. Synthèses

Les sondes choisies dans ce projet devaient initialement permettre de couvrir un spectre très large. Ainsi, 4 groupements chimiques ont été jugés appropriés. (1) La fluorescéine pour la révélation directe en microscopie à fluorescence, (2) la biotine, afin d'utiliser la gamme étendue de streptavidines fonctionnalisées disponibles, (3) Le TCO l'accès à une chimie bioorthogonale *in situ*, et (4) l'azoture, offrant un partenaire d'une autre chimie biocompatible.

La synthèse du réactif admet une voie de synthèse sans difficulté chimique apparente. La synthèse du pharmacophore et sa fonctionnalisation ont été optimisées dans le premier volet de ce projet. Les séquences réactionnelles suivantes s'avèrent être pour beaucoup des formations de liaisons amides, théoriquement triviales. Seule la N-alkylation paraît complexe, notamment due à la rapide hydrolyse du composé final en milieu basique et des équivalents (usuellement 50) d'iodoacétonitriles nécessaires. Ces derniers peuvent alors conduire à une polyalkylation du composé. Cependant, cette étape bénéficie d'une littérature relativement fournie.

Synthèse de l'acide carboxylique COOH-PEG4-Boc

La première phase de synthèse a été d'obtenir l'acide 2,2-diméthyl-4-oxo-3,8,11,14,17-pentaoxa-5-azanonadecan-19-oïque (COOH-PEG4-Boc, Schéma 19), nécessaire à la fonctionnalisation de la sonde chimique par l'électrophile NASA. Sa formation sera décrite ici, séparée de la molécule finale afin d'offrir une lecture des synthèses plus cohérente. Il a été synthétisé à partir du tétraéthylène glycol. Le *tert*-butylacrylate (1 eq.) a été introduit sur une fonction hydroxyle terminale dans une réaction d'oxa-Michael avec un rendement de 14 %. Une réaction avec le chlorure de *paratoluènesulfonyle* permet la tosylation de l'hydroxyle terminal libre. La substitution nucléophile

(S_N2) du tosylate par un azoture permet d'obtenir le *tert*-butyle 1-azido-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-oate (**28**, COOH-PEG4-N3 protégé). Ce composé fût alors utilisé pour la synthèse du réactif de marquage contenant un azoture. Ce même composé a également été réduit par une réduction de Staudinger à l'aide de triphénylphosphine en présence d'eau pour fournir l'amine primaire **29**. Une étape de protection de la fonction amine a ensuite été réalisée afin de pouvoir envisager un couplage sélectif de **31** à la sulfonamide **33** (voir ci-après). Dans ce but, un groupement Boc a été introduit

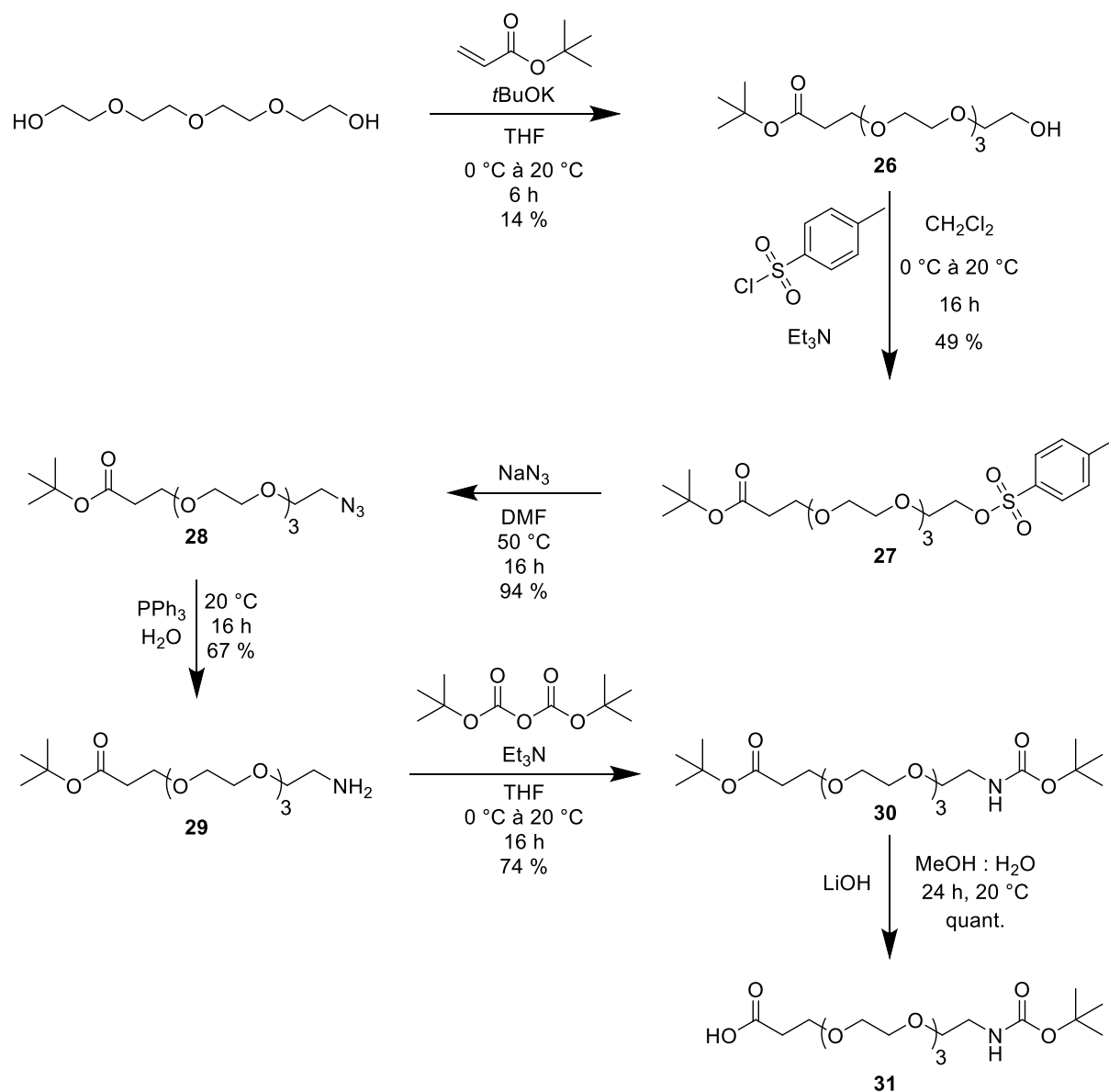


Schéma 19 Synthèse du COOH-PEG4-Boc.

sur **29** par la réaction de cette dernière avec le dicarbonate de di-*tert*-butyle en présence de bicarbonate de sodium. La déprotection sélective de l'acide carboxylique a été menée en conditions basiques à l'aide de LiOH dans un mélange 1 : 1 H₂O : MeOH afin d'obtenir l'acide COOH-PEG4-Boc **31**.

Synthèse du réactif dérivé de la fluorescéine (LNASAFI)

La stratégie qui permet d'obtenir ce composé fait intervenir l'amine primaire **5** précédemment décrite comme synthon initial (Schéma 20). Afin d'introduire la fonction sulfonamide essentielle à la molécule finale, la 4-méthylbenzenesulfonamide a été oxydée par KMnO_4 aqueux en milieu basique. L'acide 4-sulfamoylbenzoïque correspondant a alors été couplé via une liaison amide à l'amine primaire **5** grâce au carbodiimide EDC. La sulfonamide ainsi obtenue a été N-acylée par le COOH-PEG4-Boc dans une réaction inspirée de l'estérification de Steglich¹⁹⁸. Celle-ci étant peu réactive, une présence de DMAP catalytique (0,5 Eq) est requise afin de former un intermédiaire N-acylé urée permettant la N-acylation de cette dernière. La fonction Boc du composé formé a alors été déprotégée grâce à l'acide trifluoroacétique pour former l'amine primaire **35**.

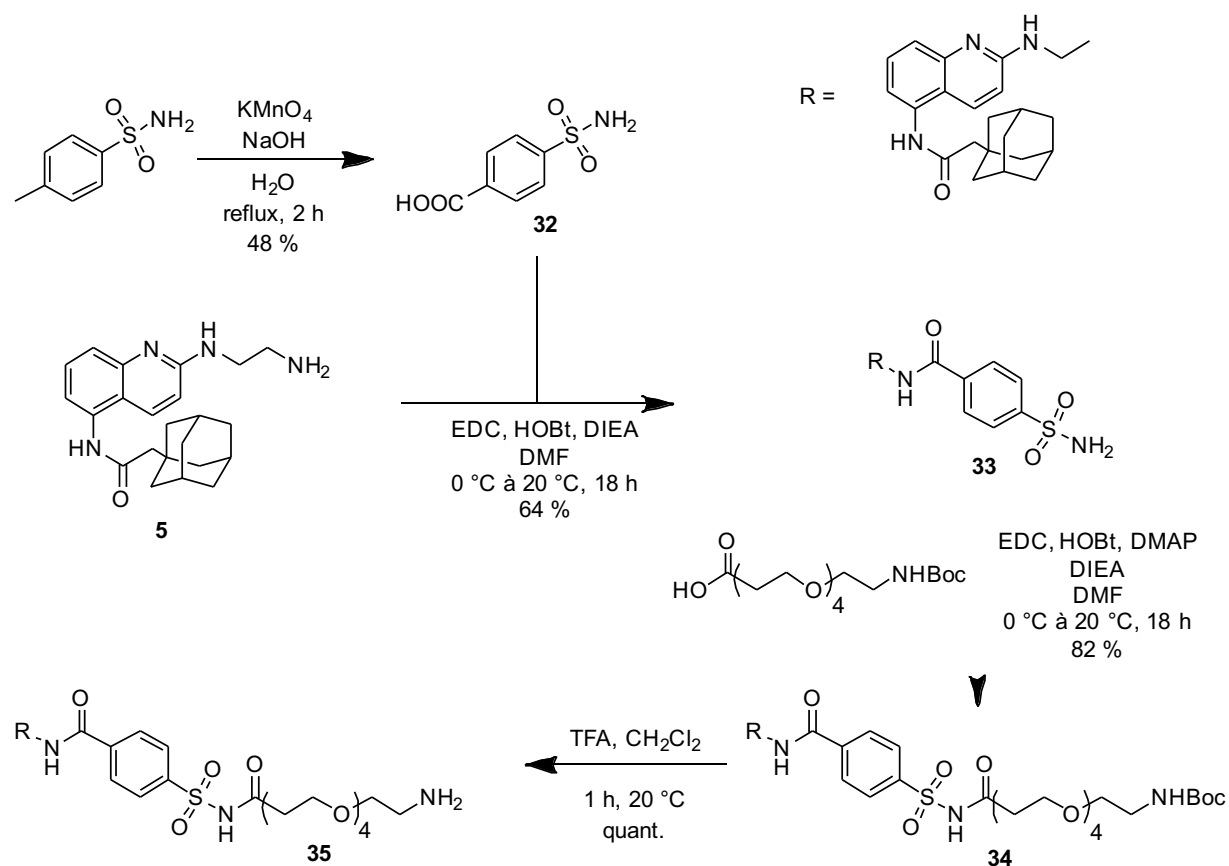


Schéma 20 Synthèse de l'amine 35.

Celle-ci a été mise en présence de 5-carboxyfluorescéine pour former une liaison amide grâce au réactif de couplage DMTMM. L'alkylation du composé obtenu requiert la présence d'iodoacétonitrile, obtenu par la réaction de Finkelstein¹⁹⁹ à partir du chlo-

roacétonitrile dans l'acétone. La N-alkylation de la N-acylsulfonamide par l'iodoacéto-nitrile dans la DMF anhydre sous argon à l'abri de la lumière n'a pas permis d'isoler le réactif de marquage final **37** (LNASAFI). La masse de ce dernier fut cependant détectée par spectrométrie de masse, parmi une grande quantité d'autres composés. Différentes tentatives d'optimisation ont été conduites (stoechiométrie, ordre des réactions), mais leurs échecs respectifs ont contraint cette voie à être abandonnée.

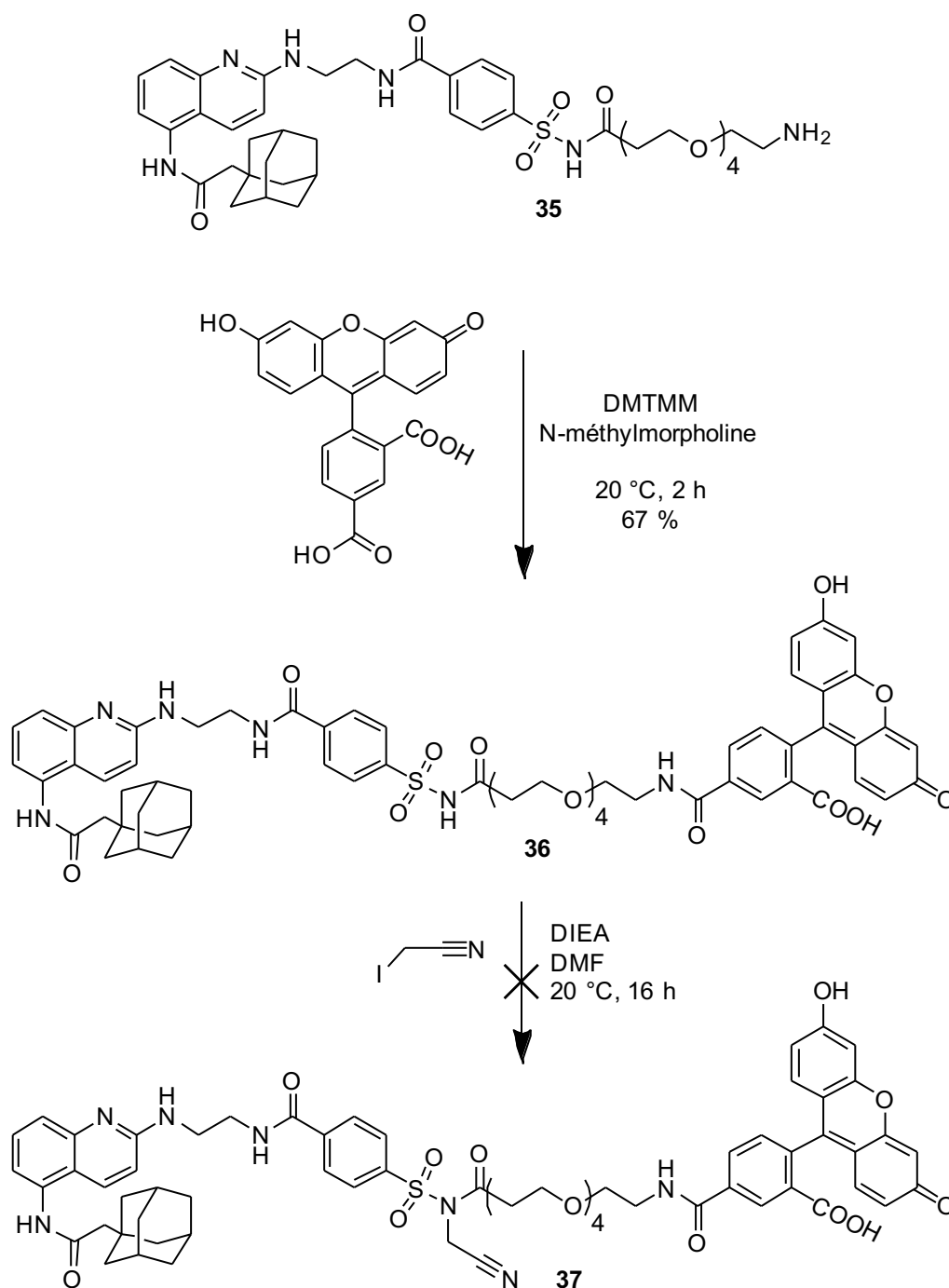


Schéma 21 Synthèse de LNASAFI.

Synthèse du réactif dérivé de la biotine (LNASAB)

Sur l'amine primaire obtenue après déprotection au TFA de la molécule **34** a été couplée la biotine grâce au DMTMM. La N-alkylation de la sulfonamide par l'iodoacétonitrile (voir LNASAFI) a alors permis d'obtenir le composé **39** (LNASAB) avec un rendement de 80 %.

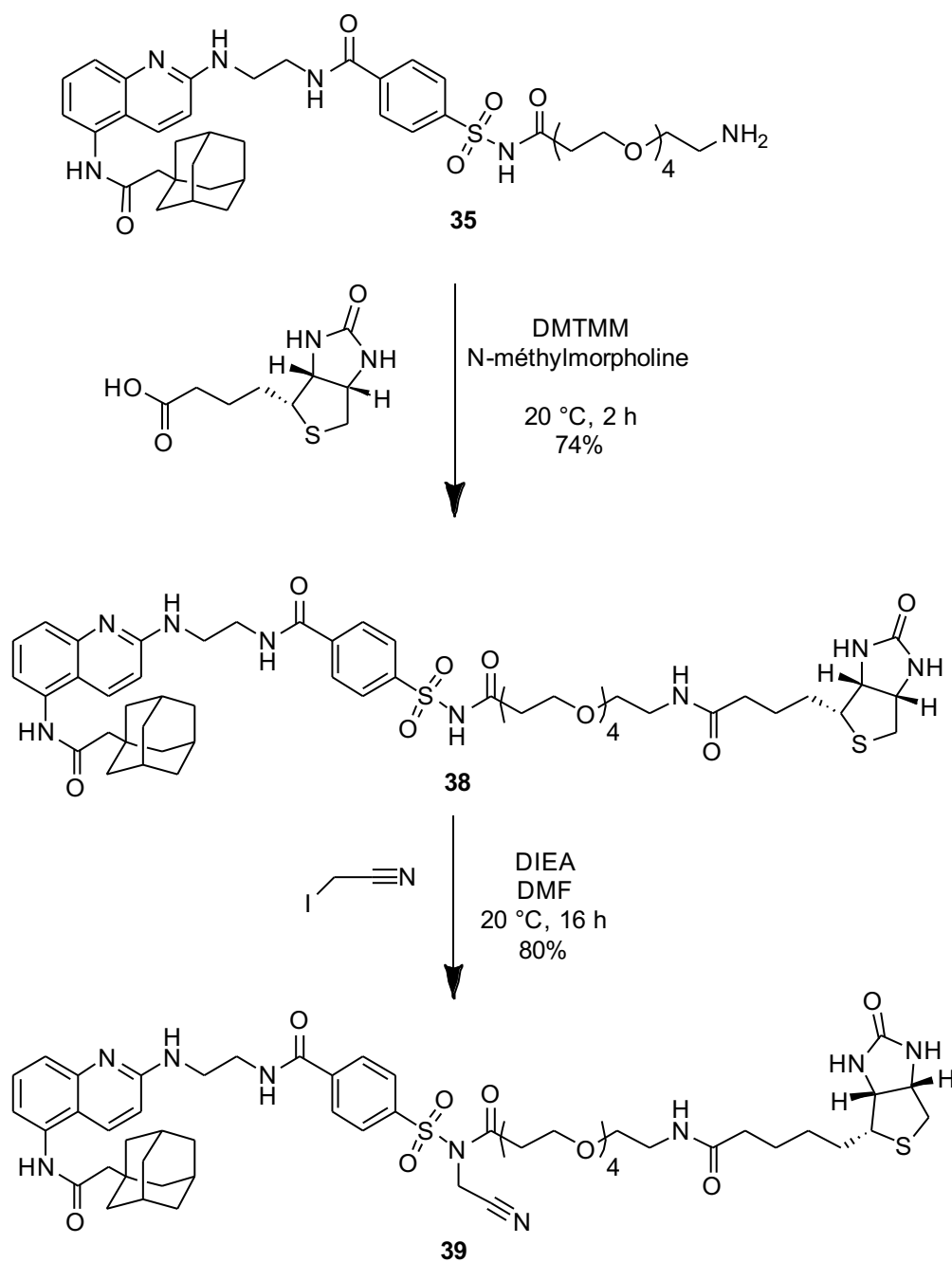


Schéma 22 Synthèse de LNASAB.

Synthèse du réactif dérivé du TCO (LNASATCO)

Suivant le schéma précédemment décrit, l'ester de *paramitrobenzyl-trans-cyclooctène* permet de fonctionnaliser l'amine primaire **35** avec un TCO par une liaison carbamate (Schéma 23). Néanmoins, la réaction de N-alkylation de la N-acylsulfonamide (voir LNAsAF1 et LNAsAB) produit deux composés. En accord avec la spectrométrie de masse, l'un est mono-alkylé et l'autre bis-alkylé. Les temps de rétention quasi égaux de ces produits ne permettent alors pas leur séparation. De plus, aucune réaction n'est observée lorsque ce mélange est mis en présence de tétrazine. Ceci suggère une réaction parasite du iodoacétonitrile sur le *trans*-cyclooctène, par un mécanisme dont le temps a manqué afin de l'explorer. Le produit bis-alkylé serait alors le produit de cette réaction et de la N-alkylation attendue.

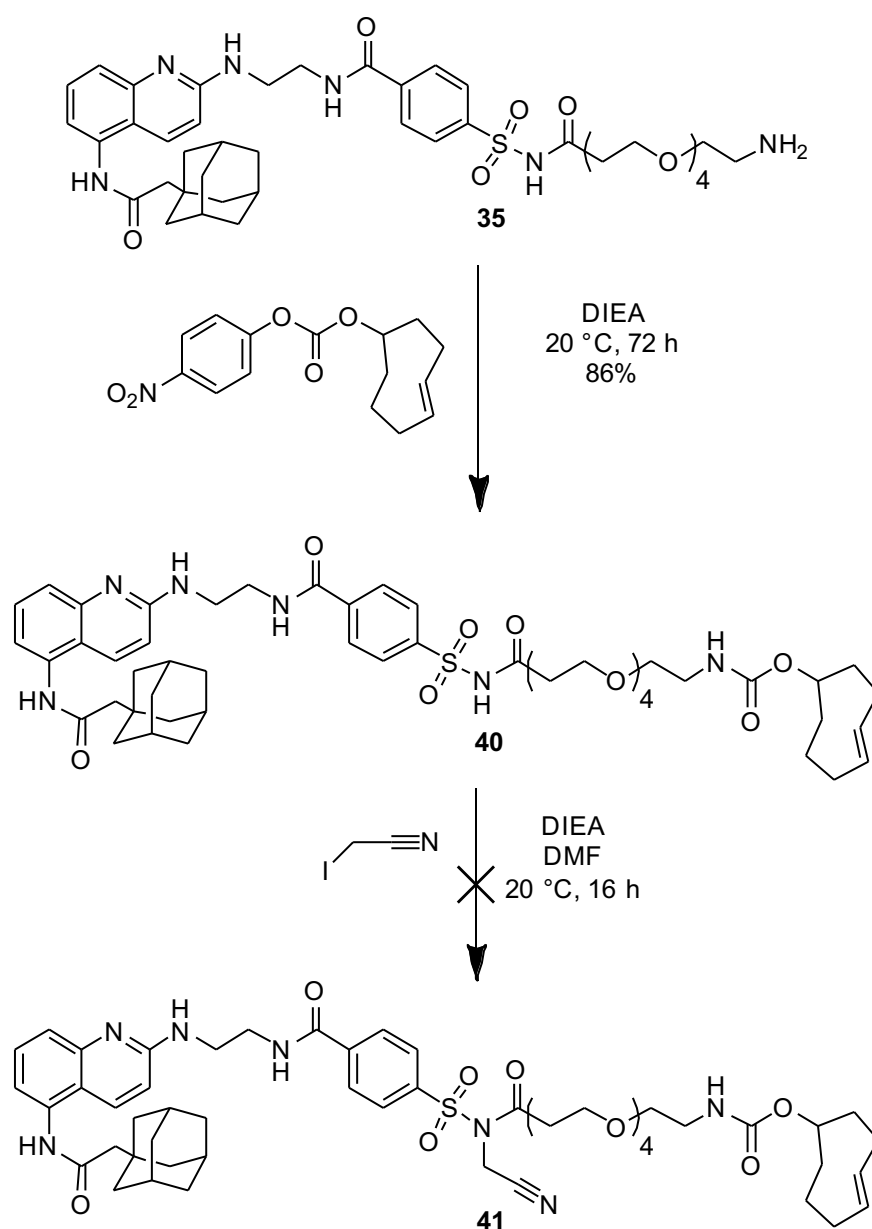


Schéma 23 Synthèse de LNAsATCO

Synthèse du réactif dérivé de l'azoture (LNASAN3)

Afin de pallier cet échec et permettre la bioconjugaison de la protéine ciblée par cette stratégie avec un partenaire de chimie bioorthogonale, un azoture a été introduit. Celui-ci est issu de l'acide COOH-PEG4-N₃, qui fut par conséquent couplé à la sulfonamide **35**, similairement à la réaction décrite par le Schéma 20. La N-alkylation n'a alors pas posée de problèmes particuliers, produisant le composé final attendu **43** (LNASAN3) avec un rendement de 43 %.

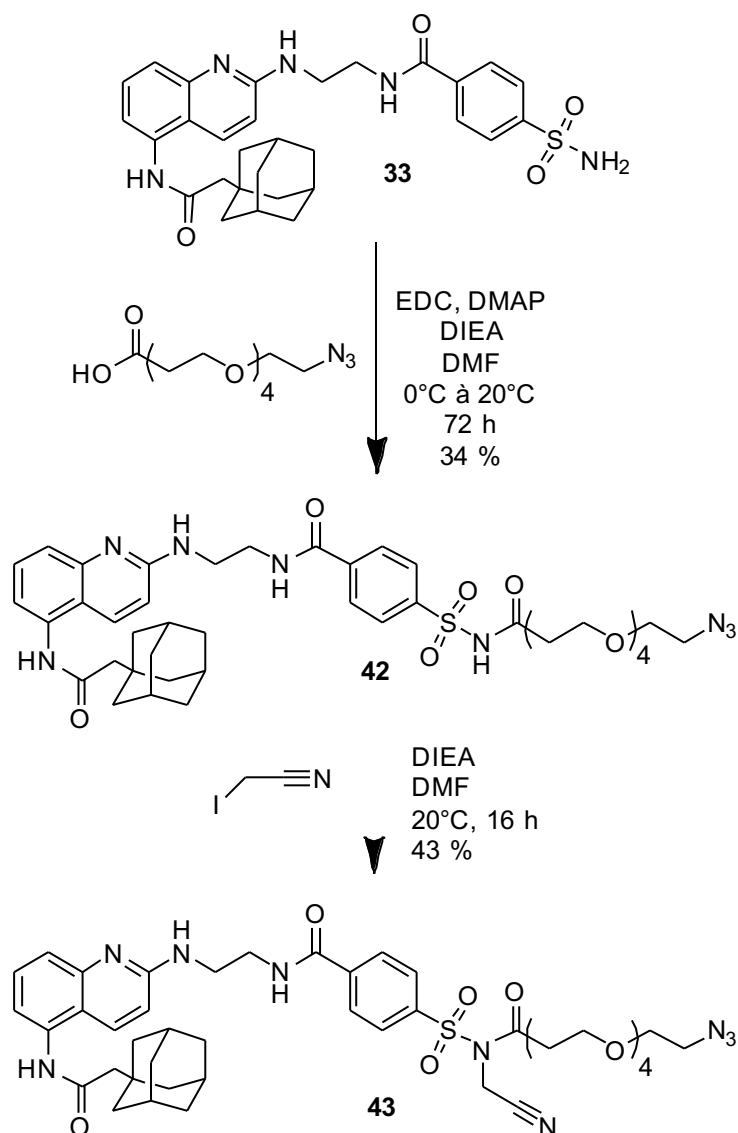


Schéma 24 Synthèse de LNASAN3

4. Pharmacologie

Les résultats présentés dans cette section sont issus du travail du chercheur postdoctoral Dr. Fransisco Peralta au sein du laboratoire. Afin d'étudier le pouvoir d'inhibition du composé de référence (AZ10606120), un protocole décrit de facilitation des courants P2X7 a été employé²⁰⁰. Ce dernier permet une étude non biaisée de l'activité biologique de l'inhibiteur sur P2X7.

La facilitation des courants entrants sur cellules HEK293T transfectées avec P2X7 est mesurée par l'application successive de BzATP (10 μ M) pendant 2 secondes toutes les 30 secondes. La Figure 30A montre une facilitation typique des courants entrants. L'inhibiteur a ensuite été préappliqué et coappliqué avec BzATP à la cinquième application, comme décrit par la Figure 30B et C. Le pouvoir inhibiteur a été mesuré par le rapport des amplitudes des courants entre la quatrième et cinquième application. L'application de l'inhibiteur de référence (AZ10606120, 1 μ M) atteste d'une inhibition attendue de 99,7 % ($\pm$ 0,2 %). Suivant le même protocole, LNASAB exhibe une inhibition de 79,3 % ($\pm$ 11,2 %) et 89,4 % ($\pm$ 5,7 %) à 1 μ M et 0,5 μ M, respectivement (Figure 30D).

La dérivation de AZ10606120 en réactif de marquage conduit à une réduction du pouvoir d'inhibition. Si ce résultat fût attendu, une réduction si modeste de l'inhibition a été surprenante. Lorsque comparée aux diminutions observées pour LPeg0P et LPeg7P, LNASAB montre une capacité d'antagonisme remarquable.

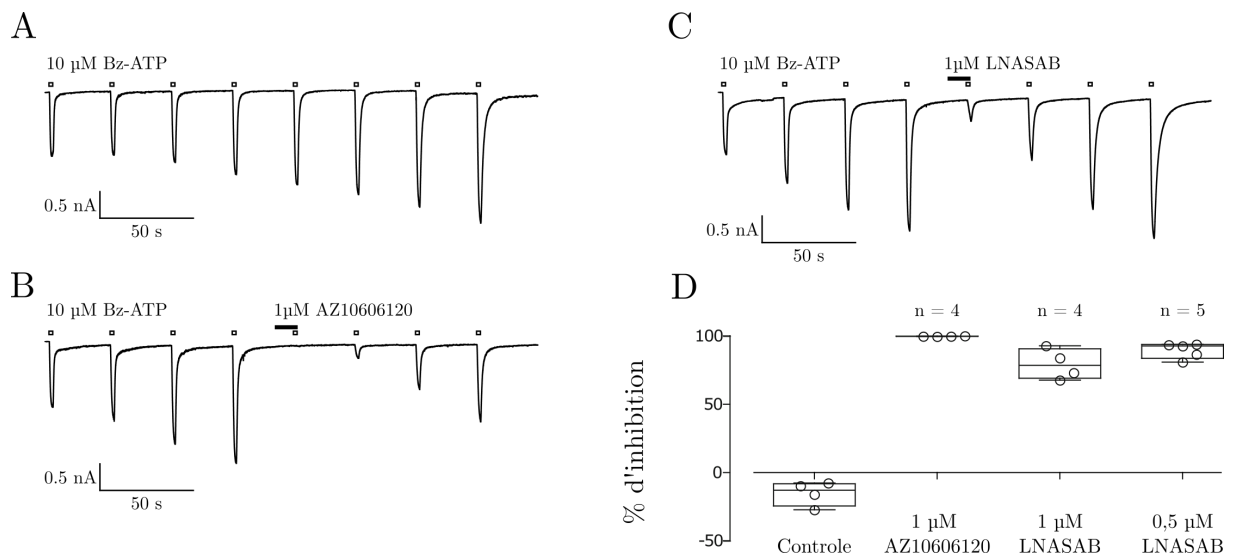


Figure 30 Pouvoir inhibiteur de LNASAB. Courant représentatif, cellule entière, provoqué par la stimulation de cellules transfectées P2X7 avec BzATP (10 μ M) pendant 2 s toutes les 30 s (A). Après la 4^{ème} application, 1 μ M de AZ10606120 (B) ou de LNASAB (C) est appliqué pendant 10 secondes précédant une coapplication de 2 s. D. Diagramme en boîte du pourcentage d'inhibition de chaque composé. Boîte à moustache : médiane, quartiles, maximum et minimum.

Ces résultats suggèrent une forte affinité de LNASAB pour P2X7 en plus d'une interaction réversible pour un temps d'incubation court (10 s), attestée par la Figure 30C. En conséquence, les caractéristiques de liaisons de LNASAB font de ce composé un excellent candidat pour une réaction de marquage guidée par un ligand.

Comparer ce pouvoir inhibiteur à ceux des ligands précédemment testés, nommément LPeg0P et LPeg7P, est intéressant. Les valeurs écrasantes de LNASAB suggèrent qu'une charge formelle positive présente sur le ligand est fortement délétère sur la capacité d'inhibition des courants P2X7.

5. Marquage de P2X7 guidé par le ligand

La capacité de marquage du réactif LNASAB a initialement été évaluée par des techniques biochimiques. La biotinylation^{11a} de la protéine d'intérêt permet de concevoir des expériences de Pull Down couplé à un Western blot robuste. Le Pull Down est une méthode *in vitro* qui admet la purification par affinité de protéines marquées d'une sonde de capture (*p. ex.* biotine, tags peptidiques...). Un partenaire spécifique pour cette sonde (streptavidine, anticorps...) est immobilisé sur un support et le milieu biologique est élué à travers ce dernier. La protéine marquée sera ainsi séparée du milieu par affinité.

Les expériences de Pull Down présentées dans ce chapitre tirent toutes profit de la NeutrAvidine immobilisée de manière covalente sur des microbilles d'agarose. Cette protéine se lie spécifiquement à la biotine ($K_D = 10^{-15}$ M) et réduit les liaisons aspécifiques parfois observées pour la streptavidine ou l'avidine native. La résine d'agarose permet la purification des protéines capturées par gravité.

Enfin, l'analyse par Western blot permet la révélation spécifique de caractéristiques chimiques (épitopes, biotine, tag...) présentes sur des protéines. Elle est précédée de la séparation de ces protéines issues de lysats cellulaires en fonction de leurs tailles par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Puisqu'aucun anticorps sélectif du récepteur P2X7 n'est commercialement disponible, un tag polypeptidique Myc a été fusionné en C-terminale afin d'introduire artificiellement un épitope spécifiquement discriminable.

Ainsi, des cellules HEK293T transfectées ou non avec P2X7-Myc ont été incubées 30 min à 20 °C avec LNASAB (5 μ M). Les cellules sont ensuite lysées et analysées par SDS-PAGE et Western blot avec un anticorps dirigé contre le tag Myc. Une partie de chaque lysat a été, en parallèle, purifié par affinité (Pull Down). Une bande à 75 kDa (Figure 31) est visible uniquement au sein des lignes 1 et 3, correspondantes aux cellules

^{11a} Conjugaison d'une biotine à une biomolécule.

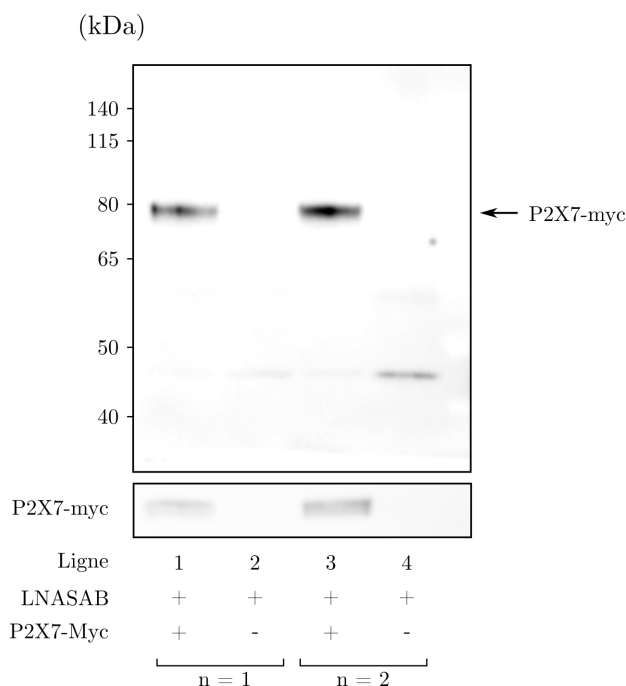


Figure 31 Modification chimique de P2X7 par LNASAB (5 μ M, 30 min) sur cellules transfectées, ou non, avec P2X7. A. Purification par Pull Down, SDS-PAGE et analyse par Western-blot. B. SDS-PAGE et analyse Western-blot des lysats de cellules. La flèche désigne le poids moléculaire attendu de P2X7-myc. Anticorps dirigé contre le tag Myc (1/5000), Invitrogen 9E10. n = 3.

transfectées. Cette dernière concorde avec le poids moléculaire attendu pour P2X7-myc. La même bande, moins intense, se retrouve lors de l'analyse des lysats cellulaires non purifiés et valide le succès de la transfection. Cette expérience établit ainsi la capacité de LNASAB à modifier de façon covalente le récepteur P2X7 au sein d'un milieu biologique complexe. De plus, elle démontre la possibilité de purifier (et de concentrer) cette protéine grâce au tag biotine et d'en détecter la présence par Western blot.

6. Cinétique de marquage

La quantification de ce signal permet alors de déterminer les paramètres cinétiques de la réaction. En effet, l'intensité du signal détecté par Pull Down couplé à un Western blot est proportionnelle au nombre de protéines chimiquement modifiées par LNASAB. Par conséquent, des cellules HEK293T transfectées avec P2X7-Myc ont été incubées avec LNASAB (2,5 μ M) pendant 10 à 60 minutes. Les cellules sont ensuite solubilisées et les lysats obtenus sont purifiés par Pull Down et analysées selon le même protocole que décrit précédemment. Les bandes observées par Western blot (Figure 32A) sont quantifiées et une vitesse de réaction est déterminée (Figure 32B). La réaction est achevée en 20 minutes. Une bande intense, correspondant à 80 % du maximum, est visible en seulement 10 minutes. Le signal perd en intensité avec le temps, imputé à l'internalisation et à la protéolyse du récepteur P2X7 au cours du temps (sans contrôle

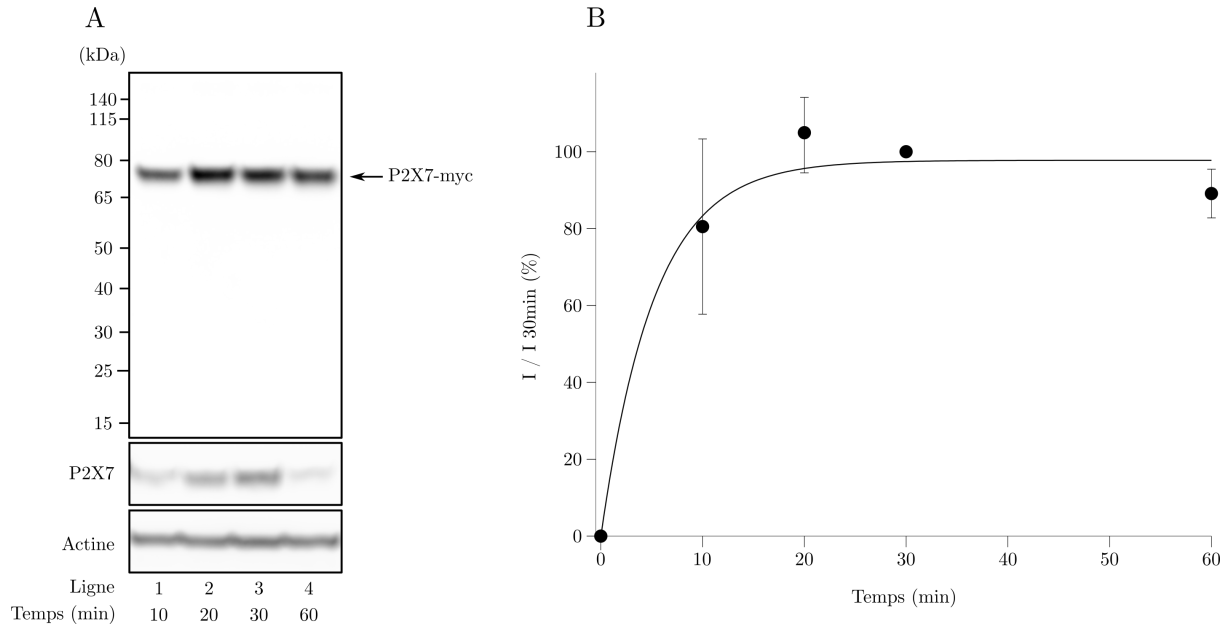


Figure 32 Vitesse de marquage de P2X7 par LNASAB 2,5 µM. A. Purification par Pull Down et analyse par Western-blot du récepteur P2X7 après 10, 20, 30 et 60 minutes de marquage avec LNASAB (2,5 µM, 20 °C, DMEM). La flèche noire désigne le poids moléculaire attendu de P2X7-myc. B. Profil temporel de la réaction de marquage. I et I_{30min} représentent la moyenne l'intensité des bandes au temps indiqué et a 30 minutes, respectivement. Données ajustées sur l'Équation 9. Barres d'erreurs : écart-type, n = 3. Anticorps dirigé contre le tag Myc (1/500), Invitrogen 9E10.

robuste pour le démontrer). La constante de la vitesse apparente de marquage, k_{app} , a été déterminée par régression exponentielle des courbes obtenues pour chaque expérience et est égale à $k_{app} = 0,15 \text{ min}^{-1} (\pm 0,04 \text{ min}^{-1} \text{ E.T.})$.

Bien que très appréciée, une telle vitesse de réaction ne fut pas attendue. Ainsi, des expériences complémentaires ont été conduites afin d'explorer cette cinétique à des concentrations plus faibles. En effet, au regard des données expérimentales d'électrophysiologie patch-clamp, 1 µM de LNASAB devrait être suffisant pour une réaction de marquage satisfaisante. En conséquence, des cellules HEK transfectées avec P2X7-Myc ont été marquée avec LNASAB (1 µM) à 20 °C entre 5 et 60 minutes. Les cellules sont ensuite lysées, purifiées et analysées selon les modalités détaillées plus haut. Conformément aux attentes, la vitesse de réaction est alors réduite. Toutefois, 5 minutes sont suffisantes pour parvenir à un marquage détectable (Figure 33A et B), démontrant une cinétique réactionnelle remarquable. La constante de vitesse apparente correspond à 60 % de la valeur décrite précédemment : $k_{app} = 0,09 \text{ min}^{-1} (\pm 0,05 \text{ min}^{-1} \text{ E.T.})$. La moitié de la réaction est atteinte en 10 minutes (48 % $\pm$ 13 %). Cependant, cette dernière est abolie par la présence d'antagoniste allostérique (AZ10606120 et A740003) dans le milieu, même après 60 minutes de réaction (Figure 33A, ligne 1 et 7). Ces deux inhibiteurs, de structure chimique distincte, se lient au même site que LNASAB avec une affinité supérieure. Ils démontrent ainsi que la réaction est dépendante de la formation d'un complexe P2X7-LNASAB, en accord avec la modélisation moléculaire. Ces

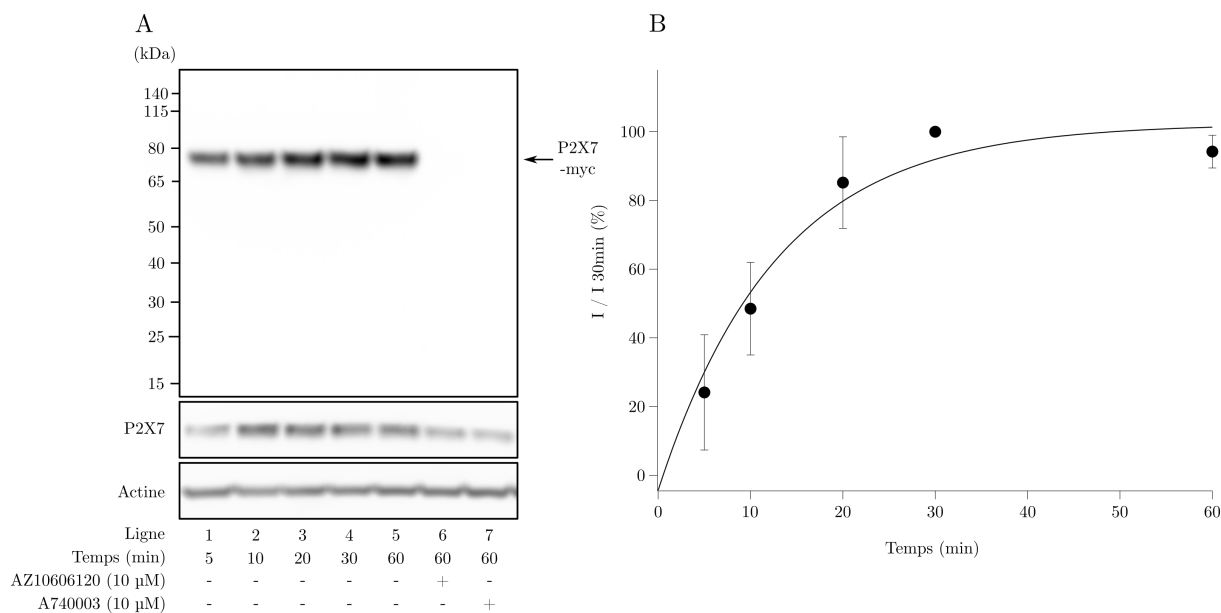


Figure 33 Vitesse de marquage de P2X7 par LNASAB 1 µM. A. Purification par Pull Down et analyse par Western-blot du récepteur P2X7 après 5, 10, 20, 30 et 60 minutes de marquage avec LNASAB (1 µM, 20 °C, DMEM), en présence ou absence d'inhibiteurs compétitifs. La flèche noire désigne le poids moléculaire attendu de P2X7. B. Profil temporel de la réaction de marquage. I et I30min représente la moyenne de l'intensité des bandes au temps indiqué et à 30 minutes, respectivement. Données ajustées sur l'Équation 9. Barres d'erreurs : écart-type, n = 3. Anticorps dirigé contre le tag Myc (1/500), Invitrogen 9E10.

résultats suggèrent fortement qu'une proximité entre l'électrophile et un acide aminé nucléophile est induite grâce à l'affinité de LNASAB, qui accélère alors la réaction d'acylation. Les vitesses de réaction observées sont similaires à celle décrite par le groupe d'I. Hamachi¹¹³.

6.1 Estimation de la constante de second ordre

Les valeurs expérimentales de k_{app} déterminées permettent alors de tracer une courbe de saturation de type Michaelis-Menten (Figure 34) . En ajustant cette dernière à l'Équation 7, le k_L de réaction est défini à $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et $K_D = 2 \text{ µM}$. La constante de second ordre de la réaction ($\frac{k_L}{K_D}$) est alors de $2250 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et se situe dans la fenêtre attendue pour un marquage d'affinité avec l'électrophile NASA¹¹³.

Bien entendu, ces valeurs ne sont qu'indicatives. Ces expériences nécessitent des répliqua suffisants pour conclure à une constante de second ordre fiable. Elles sont toutefois données ici afin d'apprécier le potentiel de la réaction marquage du composé LNASAB.

Néanmoins, bien qu'établissant la réactivité du composé, ces expériences ne caractérisent en rien la sélectivité du marquage. Puisque chaque expérience de Western blot est révélée avec un anticorps dirigé contre le tag myc, le marquage hors cible est invisible ici. Ce paramètre essentiel doit par conséquent être caractérisé.

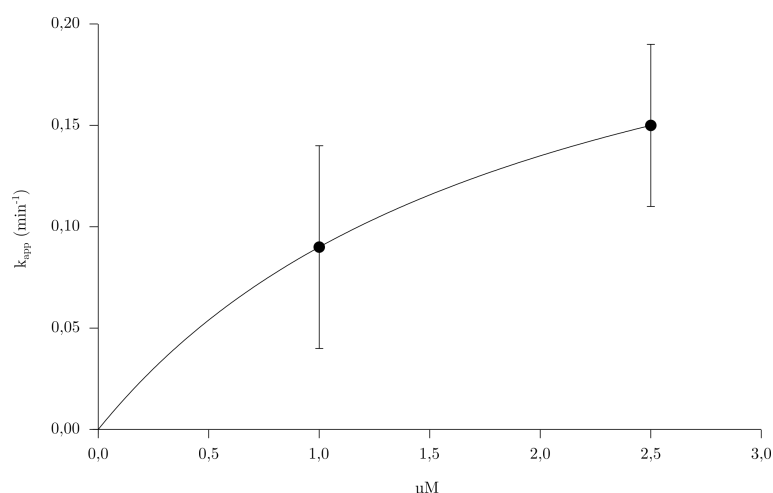


Figure 34 Dépendance du K_{app} à la concentration de LNASAB. Données ajustées sur l'Équation 7. Barres d'erreurs : écart type. $n = 2$.

7. Sélectivité du marquage

Le marquage d'affinité guidé par un ligand repose sur l'induction de proximité afin d'accélérer une réaction, normalement trop lente pour être détectable. La conséquence de cette définition est un aspécifisme potentiel qu'il convient de caractériser. La faible expression endogène des récepteurs P2X7 impose un excellent rapport signal sur bruit. La transférabilité de cette approche à des modèles physiologiquement pertinents dépend donc d'un marquage extrêmement sélectif.

7.1 Analyse de la sélectivité par Western blot

Ainsi, des méthodes biochimiques dirigées contre la biotine ont été mises en place. Une des plus prometteuses fût la révélation de lysats cellulaires, préalablement marqués avec LNASAB, par la streptavidine dans une analyse par Western blot. La sélectivité de LNASAB envers P2X7 peut alors être appréciée à différentes concentrations, volontairement élevées afin d'exacerber ce paramètre. Des cellules HEK293T transfectées ou non avec P2X7 ont été incubées avec LNASAB ($5 \mu\text{M}$) pendant 30 minutes. Le lysat est ensuite analysé par Western blot. Comme le montre la Figure 35, les gels typiquement obtenus par ces expériences sont pollués par des bandes qui ne peuvent être attribuées à une réaction parasite de LNASAB. Il est établi que la biotine est un co-facteur de carboxylases²⁰¹, qui correspond probablement aux signaux intenses détectés

à 120 kDa et 70 kDa. Cette dernière perturbe fortement la lecture quantitative du signal attendu au poids moléculaire de P2X7 (Figure 35B) et ne permet aucune conclusion robuste. Ces expériences peu convaincantes ont donc rapidement été discontinuées. Si d'autres méthodes similaires ont été investiguées, aucune n'a fourni de résultat

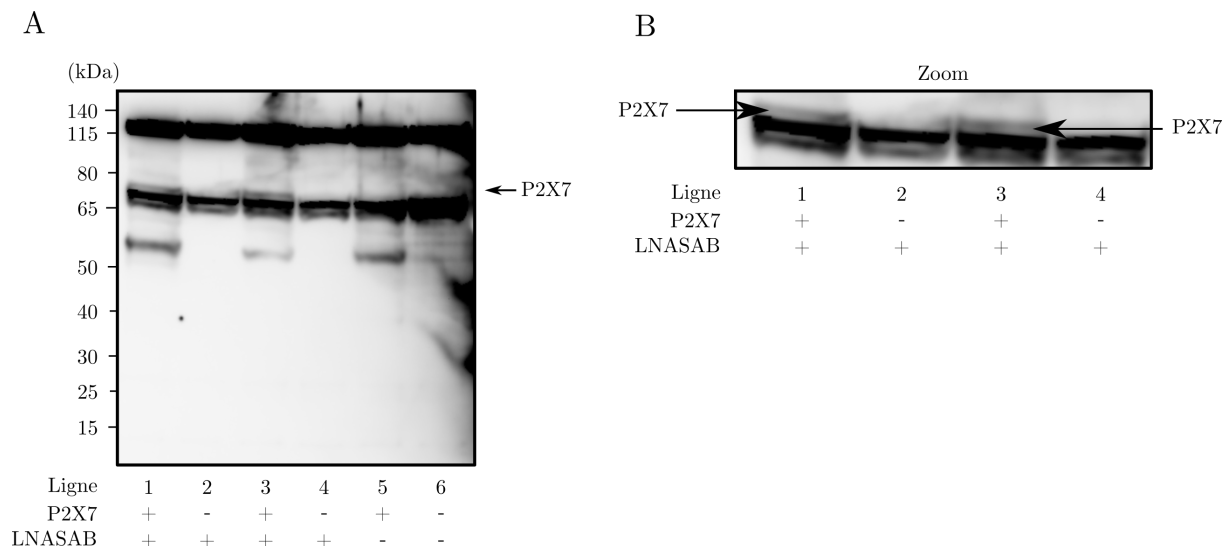


Figure 35 Présence de biotine endogène dans les cellules HEK293T analysées par Western blot (A) en présence ou absence de P2X7 transfecté et/ou LNASAB (5 μ M, 20 °C, DMEM), et révélée par streptavidine-HRP, Invitrogene. La flèche noire désigne le poids moléculaire attendu de P2X7. B. Image agrandie du même gel montrant une bande correspondante au poids moléculaire attendu pour P2X7.

exploitable. Pour cette raison, elles seront omises de ce manuscrit.

7.2 Analyse de la sélectivité par microscopie

La microscopie à fluorescence offre un moyen élégant de répondre à cette question. La modification extracellulaire de protéine par LNASAB peut être révélée par un partenaire d'interaction adéquat (biotine-streptavidine, azoture-alcyne...). La quantification de la fluorescence issue de différentes conditions pertinentes permet alors de dresser le profil de sélectivité du réactif de marquage. Fonctionnalisé avec une sonde de chimie bioorthogonale (azoture), le ligand LNASAN3 semble le meilleur candidat pour ces expériences. L'azoture peut réagir avec une cyclooctyne dans une cycloaddition azoture-alcyne promue par tension de cycle (SPAAC) et dès lors être sélectivement discriminé au sein d'un milieu moléculairement très complexe. Ainsi, l'incubation des cellules avec une cyclooctyne marquée d'un fluorophore permet, en théorie, de révéler rapidement les protéines modifiées par le réactif (P2X7 et autres).

Dans cet objectif, des cellules HEK293T transfectées avec P2X7-mScarlet ont été incubées avec LNASAN3 et la dibenzoazacyclooctyne (DBCO) couplés à l'Alexa Fluor 647

est ensuite appliquée. Les cellules sont subséquemment imagées par microscopie à fluorescence (illumination plein champ). Les champs imagés sont parasités par une fluorescence basale issue de toute la population cellulaire, exprimant P2X7-mScarlet ou non (Figure 36A). Afin d'isoler les différents facteurs potentiellement responsables de cet aspécifisme, les cellules ont été mises en présence de DBCO Alexa Fluor 647, sans préincubation avec LNASAN3. La fluorescence résiduelle constatée fût alors attribuée au manque de sélectivité de la cyclooctyne (Figure 36A, planche inférieure). Ces artefacts d'observation n'ont pas réussi à être limités à un seuil acceptable, en dépit de nombreuses tentatives d'optimisation qui ne seront pas détaillées ici. L'interaction biotine-streptavidine a par conséquent été ré-évaluée. La biotine endogène est séquestrée à l'intérieur des cellules, ou peut être très facilement retirée du milieu. En conséquence, révéler les protéines transmembranaires biotynilées par LNASAB par une streptavidine non perméante aux membranes plasmiques apparaît comme une solution pertinente. L'incubation de cellules transfectées (P2X7-mScarlet) avec la streptavidine conjuguée avec l'Alexa Fluor 647 suivant une réaction de marquage avec LNASAB abouti alors à une fluorescence membranaire spécifique des cellules transfectées (Figure 36B). Ôter LNASAB ou l'expression de P2X7 abolit ce signal. Un contrôle négatif élégant est désigné dans la Figure 36B (planche supérieure) par les flèches blanches. Ces dernières désignent, dans un champ correspondant à une transfection avec P2X7-mScarlet, des cellules n'ayant pas incorporé le vecteur plasmidique.

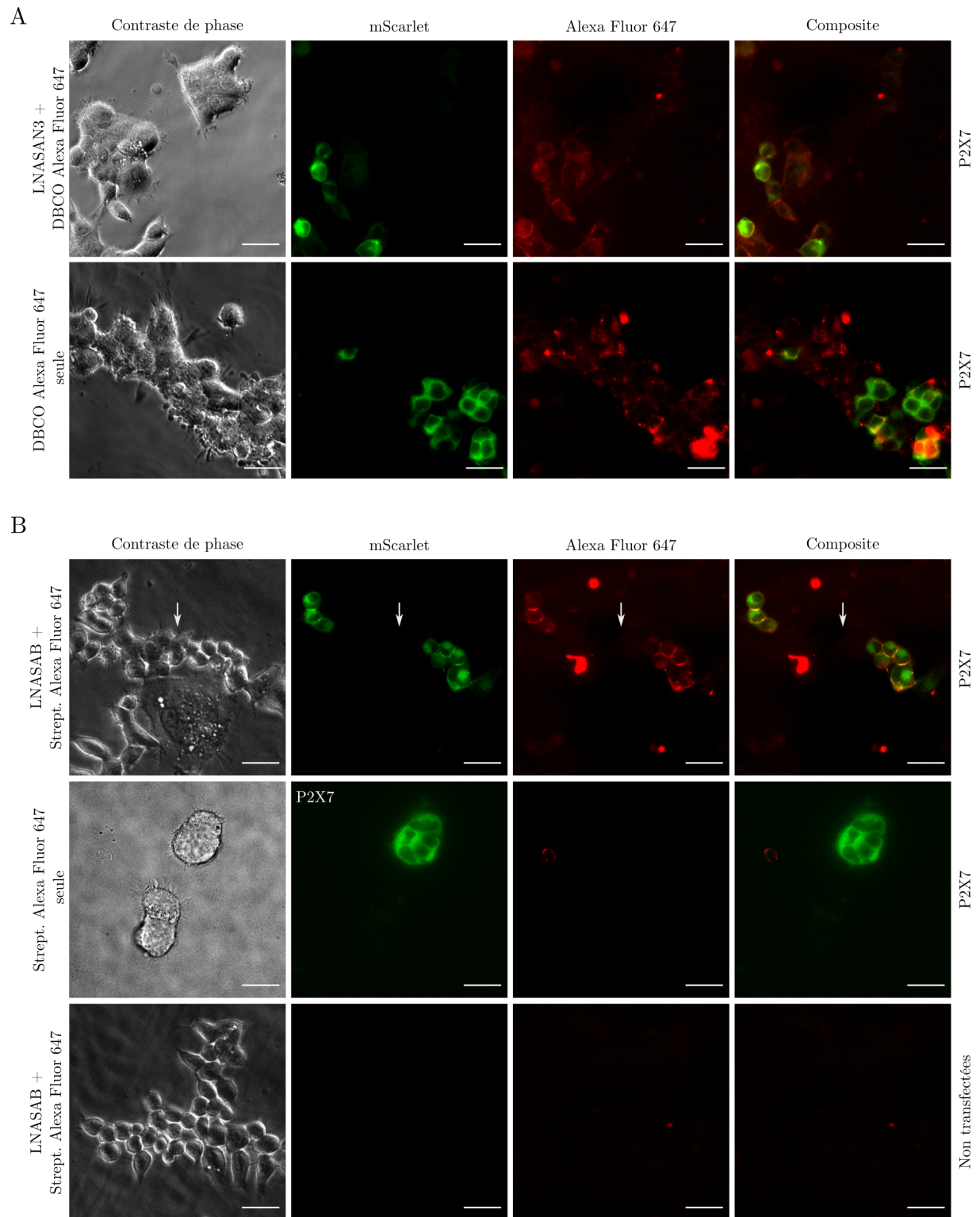


Figure 36 Marquage du récepteur P2X7 par LNASAN3 et LNASAB sur cellules HEK293T transfectées. A. Le marquage induit par LNASAN3 (5 μ M, 30 min, 37 °C, DMEM) est révélé avec la DBCO-Alexa Fluor 647 (1 μ g.ml⁻¹, 15 min, 37 °C, tampon PBS (pH = 7,4)). B. La biotinylation par LNASAB (5 μ M, 30 min, 37 °C, DMEM) de P2X7 est révélée avec la streptavidine conjuguée à l'Alexa Fluor 647 (5 μ g.ml⁻¹, 1 h, 37 °C, dans un tampon PBS). Chaque incubation est précédée de 3 rinçages au tampon PBS des cellules.

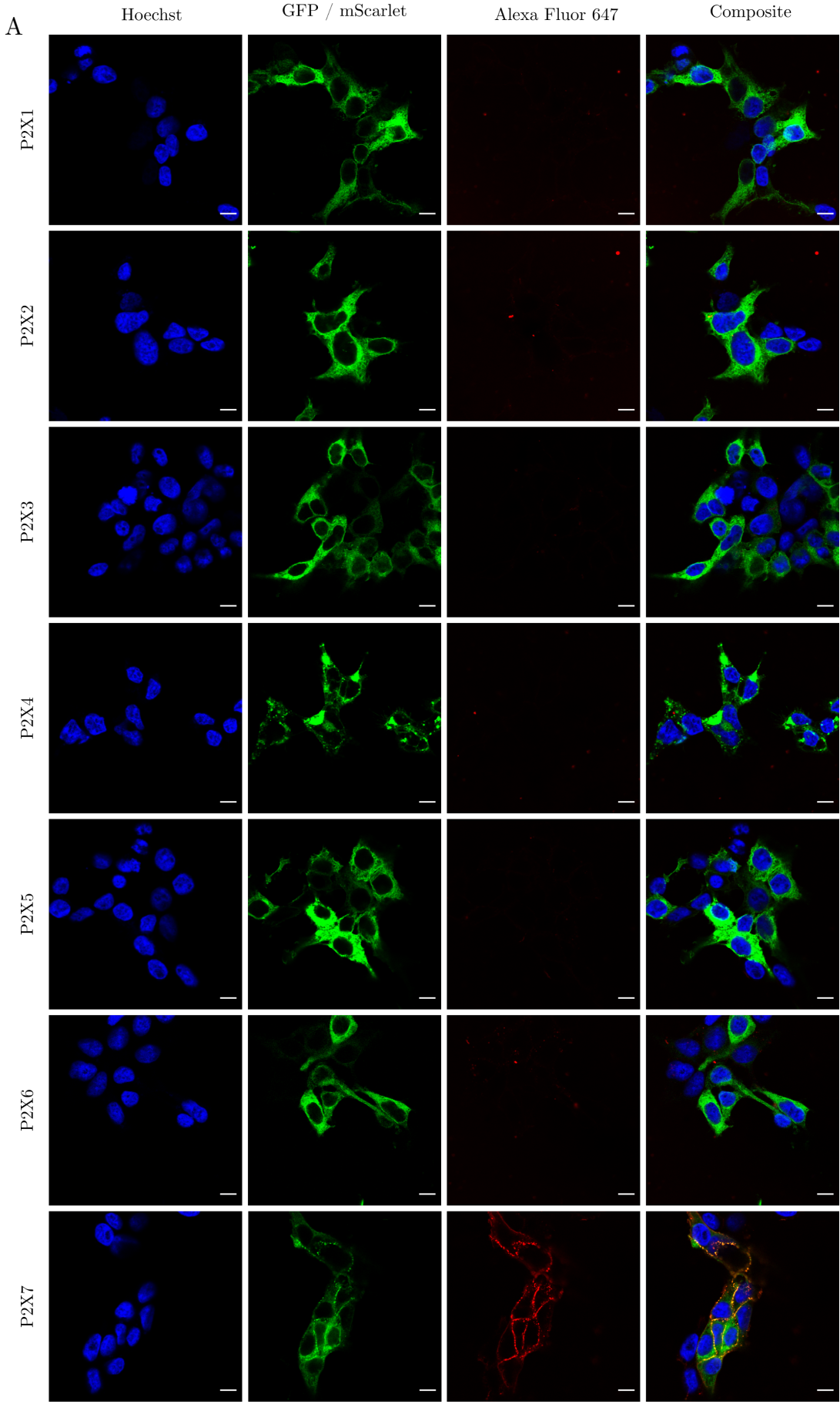
Elles n'exhibent alors pas de fluorescence membranaire dans le canal correspondant au marquage avec LNASAB (Alexa Fluor 647). Ce contrôle suggère que la réaction de marquage est dépendante de la présence du récepteur P2X7 à la membrane des cellules.

Ces images furent les premières visualisations d'un marquage fluorescent du récepteur P2X7 durant ce projet. Elles démontrent également l'importance de la sonde et de son éventuel partenaire lors d'un marquage d'affinité.

Ces résultats très prometteurs ont initié les travaux de microscopie qui ont suivi. L'illumination plein champ conduit à l'acquisition d'images bruitées au contraste limité. Le traitement quantitatif du signal de fluorescence est perturbé par les signaux issus des plans adjacents au plan focal de l'objectif sur toute la profondeur de l'échantillon. La mesure précise de la sélectivité nécessite une méthode robuste. La microscopie confocale à balayage laser fut toute désignée. Le détail de cette célèbre méthode ne sera pas discuté dans ce chapitre, mais une rapide introduction permettra aux lecteurs d'apprécier le potentiel quantitatif de cette technique.

Le balayage laser par une tête de scan motorisée permet l'illumination sélective d'une succession de point de l'échantillon. La fluorescence émise en dehors du plan focal est physiquement rejetée par un sténopé^{12a} placé devant le détecteur. L'élimination des photons hors focus permet d'augmenter la résolution latérale en plus de sectionner optiquement l'échantillon afin d'offrir une résolution axiale d'environ 500 nm²⁰². Cependant, l'amélioration de la résolution vient au dépit d'une quantité très faible de lumière acquise par le détecteur. Cette caractéristique nécessite donc l'implémentation d'un photomultiplicateur au sein de ce dernier. Il est composé d'une photocathode, émettant un flux de photoélectron lorsqu'exposé à des photons. Une chaîne multiplicatrice d'électrons (les dynodes) amplifiera le signal et permettra *in fine* la formation d'une image. La valeur de chaque pixel sera directement dépendante du nombre de photons émis par le point de l'échantillon scanné correspondant. Ce type de microscopie offre ainsi un excellent rapport signal sur bruit qui dépend, entre autres, du gain imposé sur le photomultiplicateur et donc de l'abondance du signal. Appliquée à la problématique de la sélectivité de la réaction de marquage, cette méthode en permet une lecture extrêmement robuste de l'intensité de fluorescence désirée et non désirée.

^{12a} Couramment appelé « pinhole », ou trou d'épingle.



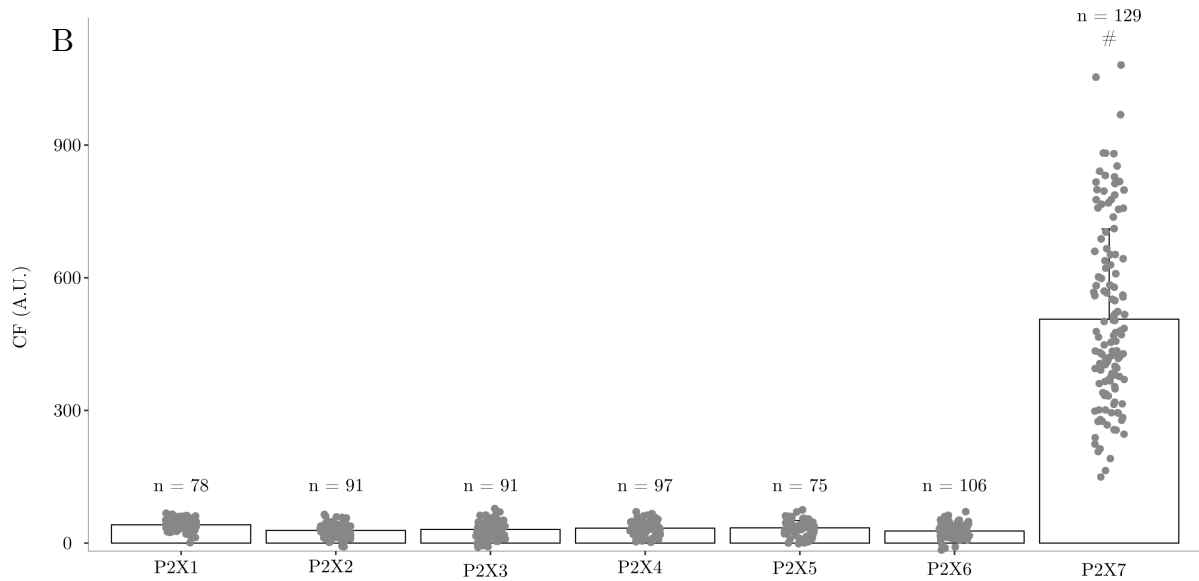


Figure 37 Marquage sélectif de LNASAB sur le récepteur P2X7. Chaque transfection a été incubée avec LNASAB (2,5 μ M, 30 min, 37 °C, DMEM) suivi de streptavidine-Alexa Fluor 647 (1 μ g.ml⁻¹, 10 min, 37 °C, dans un tampon PBS 1 % BSA) précédant la fixation. Toutes les incubations ont été précédées de 3 rinçages au tampon PBS. A. Images représentatives obtenues par microscopie confocale. Barre d'échelle : 10 μ m. B. Quantification de la fluorescence membranaire. Chaque condition a été évaluée selon 3 transfections indépendantes. Barres d'erreurs : écart-type.

Le marquage guidé par le ligand est, en théorie, entièrement fonction de la structure du récepteur P2X7. La présomption que le marquage hors cible sera dirigé particulièrement contre les protéines structurellement similaires à ce récepteur est donc raisonnable. En conséquence la sélectivité du marquage se doit d'être évaluée envers les analogues protéiques de la cible, singulièrement les récepteurs P2X. Après diverses optimisations volontairement omises ici, plusieurs séries d'expériences tirant profil de chaque récepteur P2X fusionné en C-terminal avec une protéine fluorescente (P2X1-6 : eGFP, P2X7 : mScarlet) ont été mises en place. La réaction de marquage est conduite selon les paramètres décrits ultérieurement et est révélée par 1 μ g.ml⁻¹ de streptavidine conjuguée à l'Alexa Fluor 647 pendant 10 minutes à 37 °C dans un milieu contenant 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA).

Premièrement, la sélectivité du réactif a été évaluée dans une condition permettant à la réaction de marquage d'être complète (dénommée condition saturante par la suite). Des cellules HEK293T transfectées avec la protéine chimérique adéquate ont été incubées avec LNASAB (2,5 μ M). Après la révélation par la streptavidine conjuguée, les cellules sont fixées, montées sur lame et imagées par microscopie confocale laser à balayage (Figure 37A). La fluorescence membranaire corrigée (CF) de chaque cellule a été déterminée par la soustraction de la valeur moyenne de l'arrière-fond au signal de fluorescence membranaire mesuré. Une représentation de ces données est proposée Fi-

gure 37B qui témoigne alors d'une sélectivité opportune de LNASAB pour le récepteur P2X7. Sa valeur arbitraire (A.U.) de fluorescence de 506,3 A.U. ($\pm 203,9$) se montre écrasante. La variabilité inter-récepteurs P2X (hormis P2X7) est remarquablement contenue, située entre 27,3 A.U. ($\pm 15,0$ P2X6) à 41.33 A.U. ($\pm 13,6$, P2X1). Cette caractéristique suggère que les réactions hors cible sont indépendantes de la présence d'homologues structuraux. De plus, cette constance permet de prédire le signal aspécifique attendu en amont de l'expérience, afin d'anticiper ses implications. Des craintes particulières avaient été initialement formulées à l'égard du récepteur P2X4, abondamment exprimé à la surface des microglies (dans des proportions à peine supérieures à P2X7²⁰³). Cependant, le récepteur P2X7 montre une CF 15 fois supérieure, et enterre conséquemment ces doutes.

La même expérience a alors été conduite pour valider la capacité des inhibiteurs allostériques précédemment cités (AZ10606120 et A740003) à abolir cette réaction de marquage. Ils fournissent dès lors un contrôle négatif élégant, indispensable à la transférabilité de la stratégie sur des modèles biologiques où l'accès à des KO génétique est compliqué ou impossible, en respect du modèle physiologique.

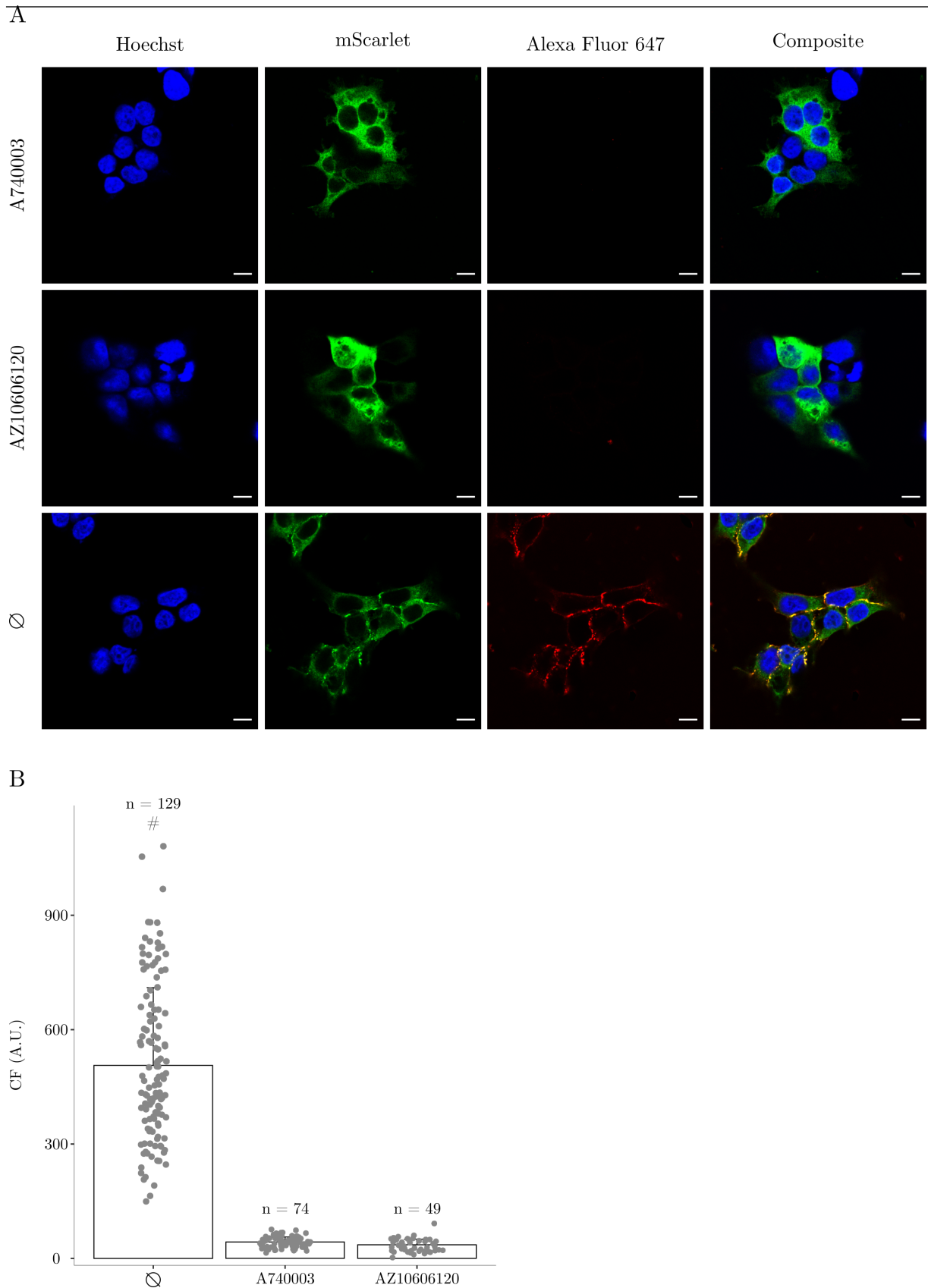


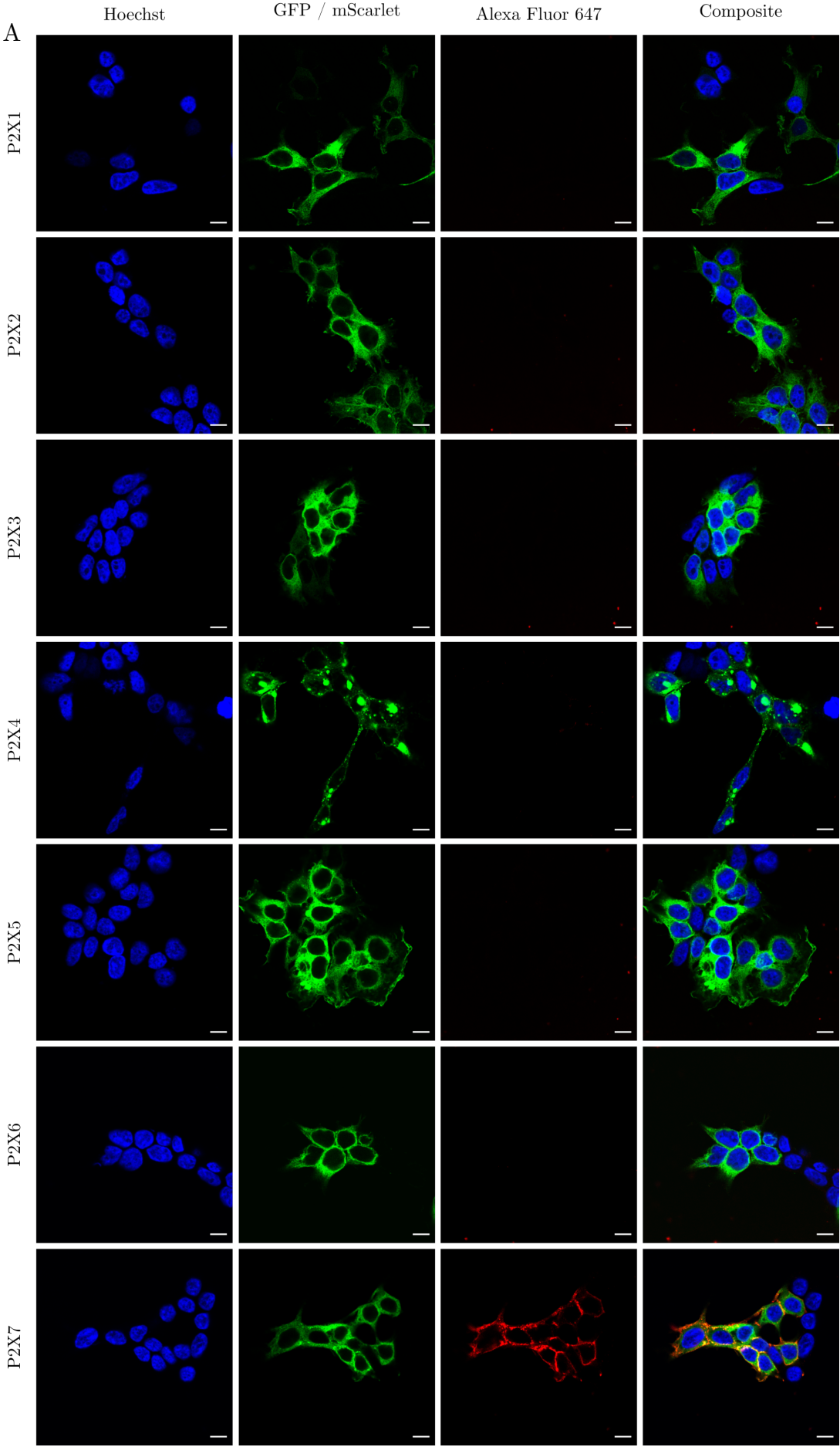
Figure 38 Protection pharmacologique du marquage par des inhibiteurs compétitifs. Le marquage par LNASAB (2,5 μ M, 30 min, 37 °C) a été conduit en présence ou absence de AZ10606120 ou A740003 (10 μ M), suivi de streptavidine-Alexa Fluor 647 (1 μ g.ml⁻¹, 10 min, 37 °C, dans un tampon PBS 1 % BSA) précédant la fixation La fluorescence membranaire observée par microscopie confocale (A) a été quantifiée (B) selon la méthode précédemment décrite. Barre d'échelle : 10 μ m. Chaque condition a été évaluée selon 3 transfections indépendantes. Barres d'erreurs : écart-type.

En adéquation avec les données de Western blot, la présence d'inhibiteurs allostériques dans le milieu restreint considérablement le marquage membranaire détectable (Figure 38A). Si les CF mesurées sont semblables à la valeur précédemment mesurée pour le marquage non spécifique, une différence statistiquement significative apparaît entre les deux inhibiteurs. AZ10606120 se montre plus efficace ($35,2 \pm 18,7$ A.U.) que A740003 ($44,9 \pm 16,1$ A.U.) dans cette compétition pharmacologique (test t de Student, p -valeur $< 0,05$), en adéquation avec les IC_{50} de ces derniers ($10 \mu\text{M}$ et $18 \mu\text{M}$, respectivement). L'efficacité de la compétition pharmacologique est donc tributaire du pouvoir inhibiteur du composé utilisé. Malheureusement, le K_D de A740003, témoin quantitatif de son affinité pour P2X7, n'est pas décrit. Sans totalement le démontrer, cette expérience suggère alors que la réaction de marquage est (1) accélérée par la proximité et (2) guidée par l'affinité.

Ces expériences ont été effectuées en conditions saturantes. Elles ont été conçues pour exacerber le marquage hors cible, mais ne correspondent pas à une « condition idéale ». Appliquer cette stratégie à des méthodes d'analyses qui n'admettent qu'un très faible rapport signal sur bruit, tel que le dSTORM, ou à des modèles cellulaires exprimant naturellement P2X7, comme les microglies, requiert des paramètres optimisés.

Des expériences additionnelles ont alors été menées. En accord avec les cinétiques définies précédemment, environ 50 % de la réaction de marquage est atteinte en 10 minutes par $1 \mu\text{M}$ de LNASAB. Ces conditions ont inspiré les mesures de microscopie confocale suivantes. Des cellules HEK293T transfectées avec le récepteur P2X chimérique adéquat ont été incubées avec LNASAB ($1 \mu\text{M}$) et révélées avec la streptavidine Alexa Fluor 647 (voir plus haut). Elles sont ensuite fixées et montées sur lame pour imagerie. Les paramètres sont mesurés et calculés selon les mêmes modalités décrites pour l'expérience précédente. Comme attendu, une tendance identique est observée (Figure 39A).

En 10 minutes, un signal intense de fluorescence ($391,9 \text{ A.U.} \pm 211,0$) P2X7-dépendante est détectable (Figure 39B). Le signal correspondant au marquage hors cible est alors compris entre $5,8 \text{ A.U.} (\pm 3,0 \text{ P2X6})$ et $11,9 \text{ A.U.} (\pm 5,1, \text{P2X1})$. Curieusement, le récepteur P2X1 subit la modification la plus conséquente, indépendamment de l'expérience, à l'exact opposé de P2X6. Cette sensibilité est suffisamment intéressante pour être notée, cependant elle n'a pas été investiguée plus avant. La conclusion d'un examen approfondi a été jugée peu attrayante pour le projet.



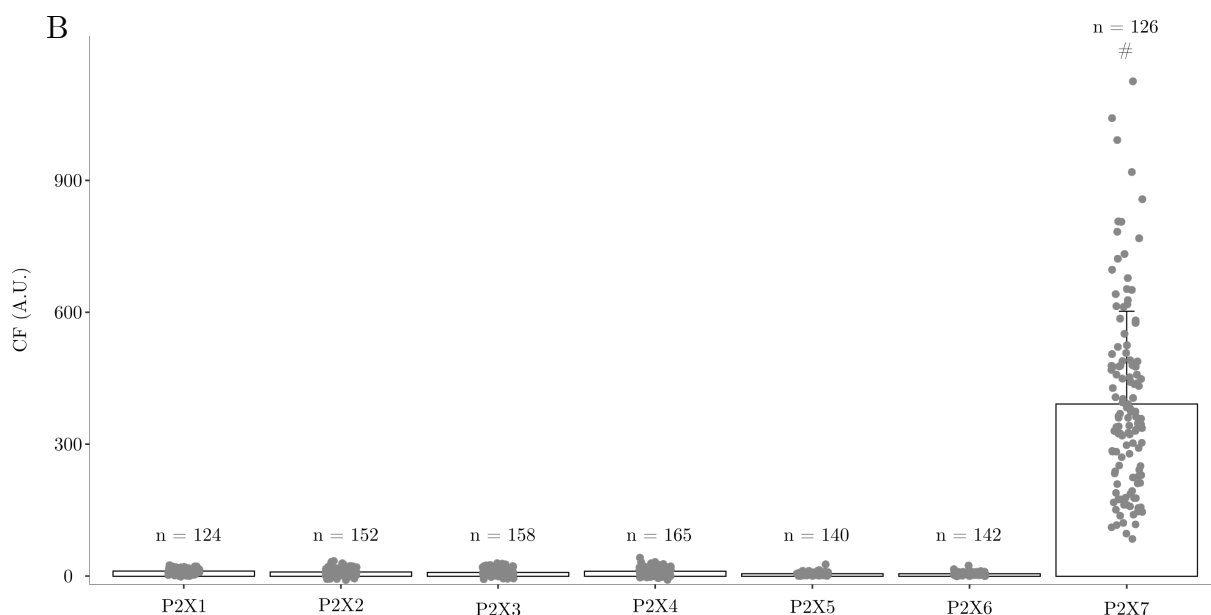


Figure 39 Marquage sélectif de LNASAB sur le récepteur P2X7. Chaque transfection a été incubée avec LNASAB (1 μ M, 10 min, 37 °C) suivi de streptavidine-Alexa Fluor 647 (1 μ g.ml⁻¹, 10 min, 37 °C dans le PBS 1 % BSA) précédant la fixation. Toutes les incubations ont été précédées de 3 lavages. A. Images représentatives obtenues par microscopie confocale. Barre d'échelle : 10 μ m. B. Quantification de la fluorescence membranaire. Chaque condition a été évaluée selon 3 transfections indépendantes. Barres d'erreurs : écart-type.

La réduction du signal fut inférieure à la prédiction d'environ 50 % basée sur la cinétique de marquage. En effet, cette condition optimisée conserve 77 % du signal de marquage obtenu lors d'une réaction saturante. Cette très bonne nouvelle s'accompagne d'une réduction importante du marquage hors cible. Ce dernier devient si faible qu'il en complique son analyse intrinsèque. La démonstration du succès de la compétition pharmacologique dans ces conditions (LNASAB 1 μ M, 1 min, 37 °C) est représentée par la Figure 40. Comme escompté, AZ10606120 et A740003 présentent une excellente inhibition de la réaction de marquage, la fluorescence corrigée est alors respectivement de 11,6 A.U. ($\pm$ 5,5) et 12,6 A.U. ($\pm$ 5,5).

Ainsi, LNASAB se montre capable de biotinyler le récepteur P2X7 avec une incroyable efficacité. Le signal non spécifique qu'il induit sur les cellules HEK293T est extrêmement contenu. À titre de comparaison, il surpasse largement la sélectivité des anticorps utilisés en routine au laboratoire pour les expériences d'immunohistochimie. Ces résultats le positionnent alors comme un outil d'étude remarquablement puissant et polyvalent.

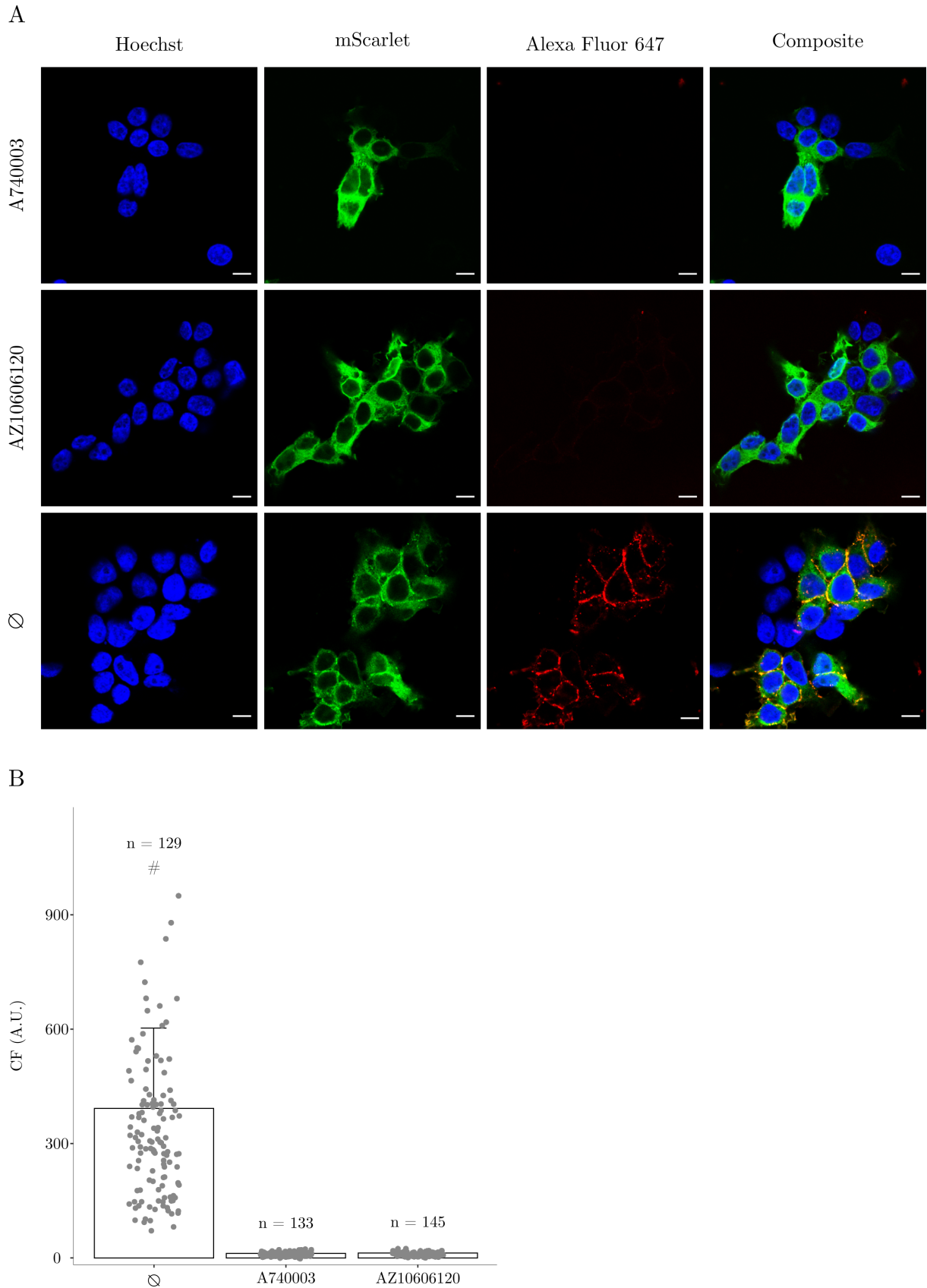


Figure 40 Protection pharmacologique du marquage par des inhibiteurs compétitifs. Le marquage par LNASAB (2,5 μ M, 30 min, 37 °C, DMEM) a été conduit en présence ou absence de AZ10606120 ou A740003 (10 μ M) suivi de streptavidine-Alexa Fluor 647 (1 μ g.ml⁻¹, 10 min, 37 °C dans un tampon PBS 1 % BSA) précédant la fixation. La fluorescence membranaire observée par microscopie confocale (A) est quantifiée (B) selon la méthode précédemment décrite. Barre d'échelle : 10 μ m. Barres d'erreurs : écart-type.

8. Microscopie super-résolutive : cellules HEK293T

La section précédente valide une sélectivité de l'outil adapté à la microscopie super-résolutive. Par conséquent, le marquage du récepteur P2X7 peut être imagé par dSTORM. Cette étape excitante permet d'étudier l'arrangement spatial de cette protéine, son éventuelle hiérarchisation compartimentale (cluster ou autre) au sein de la membrane et plus généralement son organisation nanométrique. La réaction de marquage a été conduite sur cellules HEK293T transfectées avec P2X7-mScarlet et révélée par la streptavidine conjuguée à l'Alexa Fluor 647. Après fixation, ces dernières sont montées sur lame dans un milieu adapté à l'imagerie dSTORM (Vectashield® anti-fade). 10 000 images sont acquises (33,3 Hz) par microscopie de fluorescence par réflexion interne (TIRF).

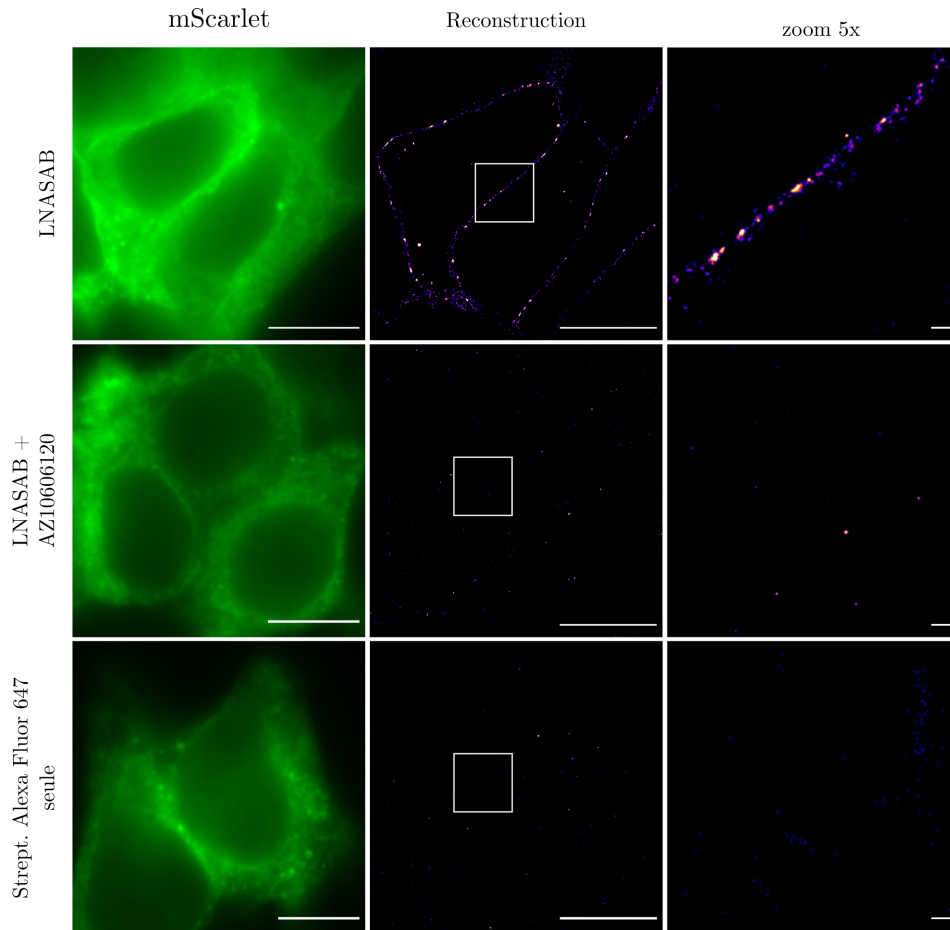


Figure 41 Organisation nanoscopique du récepteur P2X7 au sein de la membrane plasmique de cellules HEK293T transfectées révélée par dSTORM. Les cellules transfectées ont été traitées avec LNASAB (2,5 μM , 10 min, 37 °C, DMEM) en présence ou absence de l'inhibiteur AZ10606120 (10 μM) et streptavidine-Alexa Fluor 647 (1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, 10 min, 37 °C, dans un tampon PBS 1 % BSA) suivant 3 rinçages au PBS. Les cellules fixées sont montées sur lame dans un milieu compatible avec l'imagerie dSTORM (Vectashield, voir partie expérimentale). Barre d'échelle : 10 μm . Barre d'échelle zoom : 0,5 μm . Couleur des images super-résolues : palette « Fire » d'ImageJ.

La reconstruction est alors réalisée grâce au plug-in FIJI ThunderSTORM. Les images ainsi produites montrent alors une distribution hétérogène du récepteur P2X7, localisé au sein de densités membranaires (Figure 41). Ces dernières sont invisibles sur les contrôles négatifs (présence de l'inhibiteur AZ10606120 et application de streptavidine conjuguée seule). Ces « clusters » de protéines échappent totalement à la microscopie conventionnelle et démontrent la puissance de la microscopie dSTORM.

Toutefois, les systèmes hétérologues surexprimant la protéine d'intérêt offrent une lecture inexacte de ses caractéristiques. Les conclusions physiologiques de ces expériences s'en retrouvent limités et il convient d'être prudent sur l'extrapolation des résultats. Les preuves techniques quant à elles sont excellentes et supportent en tout point l'utilisation de LNASAB dans un système d'expression endogène du récepteur P2X7.

9. Microglie BV-2

La stratégie de marquage présentée jusqu'alors valide toutes les conditions nécessaires à son application sur un modèle cellulaire qui exprime de manière endogène le récepteur P2X7. En effet, la surexpression de celui-ci dans les cellules HEK293T promeut artificiellement un rapport signal sur bruit favorisé. La dernière étape avant d'explorer la biologie de ce récepteur grâce à LNASAB est de démontrer un marquage satisfaisant sur un système endogène. C'est dans cet objectif qu'a été initiée la culture de microglie BV-2 au laboratoire.

Les cellules BV-2 sont dérivées de microglies néonatales de souris immortalisées par un rétrovirus (J2) portant l'oncogène *-raf/v-myc*. Cette lignée, générée par E. Blasi *et al.* en 1990²⁰⁴, est le modèle de substitution à la culture primaire microgiale le plus fréquent aujourd'hui²⁰⁵. Sans reproduire fidèlement le comportement de ces dernières, elles permettent une approximation plus ou moins exacte, techniquement (très) facile d'accès et peu onéreuse, des processus microgiaux. À l'état quiescent, ces cellules présentent une morphologie en grande majorité ronde, avec occasionnellement quelques pseudopodes visibles^{204,206,207,208,209}. Elles peuvent alors être activées par différents agents pharmacologiques tels que les lipopolysaccharide (LPS) issus d'*Escherichia Coli*, l'ATP ou encore l'éthanol²¹⁰ et adapter leur morphologie.

Elles présentent des limites dans l'étude précise du rôle pathophysiologique des microglies au sein du SNC. Y. He *et al.* décrivent, lors d'une analyse comparée des transcriptomes des cellules BV-2 et des microglies primaires, une surexpression d'un facteur 4 ou plus de 1656 gènes et une sous-expression (d'un facteur 4 ou plus, également) de 1488 gènes. Cependant, ils rapportent parallèlement une conservation de la plupart des processus immunitaire spécifique aux microglies, à l'exception des voies de signalisation

de $\text{TGF}\beta^{13a}$ et la chimiotaxie. Enfin, ce groupe mentionne une sous-expression du récepteur P2X7 d'un facteur compris entre -0,34 et -0,61 au sein des microglies BV-2, en comparaison avec les cultures primaires de microglie néonatale²⁰³.

Ces cellules sont alors particulièrement adaptées à l'évaluation de l'efficacité de marquage du récepteur P2X7 en conditions natives par LNASAB. Cependant, l'affinité du pharmacophore utilisé dans cette stratégie est réduite pour l'isotype de souris. De plus, la distribution des lysines autour de la poche de liaison varie légèrement. Il convient tout d'abord de démontrer la capacité de l'outil à biotyniler la protéine cible. C'est ainsi que les expériences de Pull Down couplées à l'analyse par Western blot décrites ont été mises en place. Des microglies BV-2 ont été incubées avec LNASAB (1 μM) pendant 30 minutes à 20 °C, solubilisées et les lysats ainsi obtenus ont été purifiés par affinité sur microbille d'agarose conjuguée à la NeutrAvidine. L'analyse Western blot grâce à un anticorps dirigé contre P2X7 (#APR-008) révèle une bande très intense, invisible lors de la compétition pharmacologique avec AZ10606120 ou A740003 (Figure 42) au poids moléculaire correspondant à ce récepteur.

L'efficacité de LNASAB vérifiée, le taux de marquage dans les conditions précédemment optimisées (1 μM , 10 min) a été investigué. Pour se rendre compte de la quantité

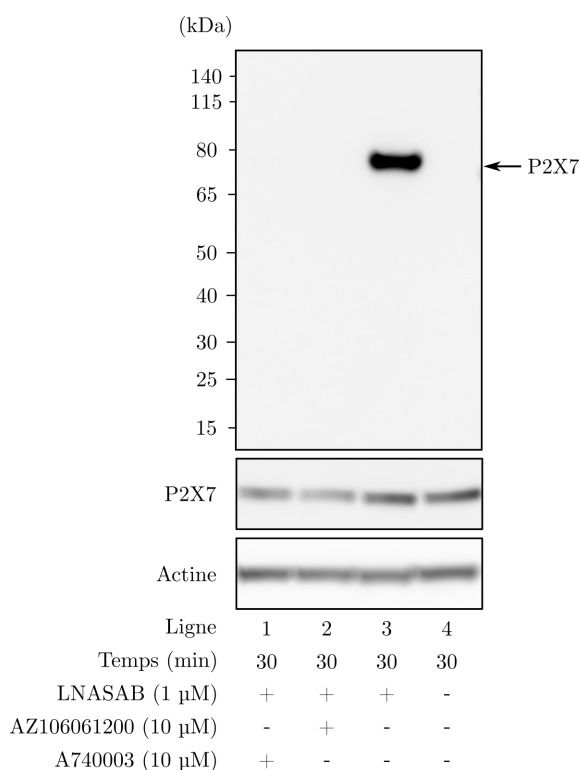


Figure 42 Marquage du P2X7 par LNASAB sur microglie. Purification par Pull Down et analyse par Western-blot du récepteur P2X7 après la réaction de marquage avec LNASAB (1 μM , 30 min, 20 °C) sur cellules microgliales BV-2, en présence ou absence d'inhibiteurs compétitifs (10 μM). La flèche noire désigne le poids moléculaire attendu de P2X7. Anticorps dirigé contre P2X7 (1/500), Alomone APR-008.

^{13a} Protéine impliquée dans la réponse adaptative des microglies.

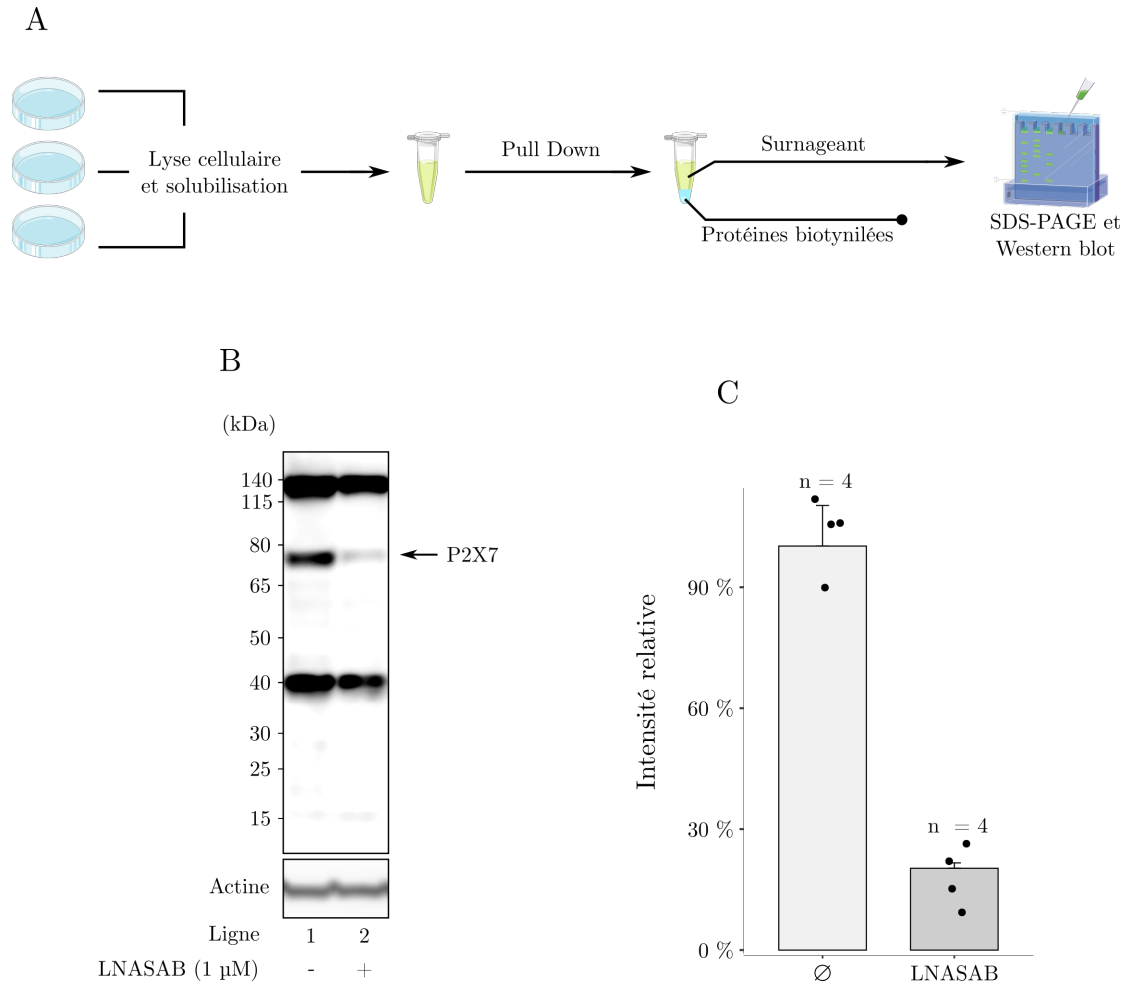


Figure 43 Pourcentage de récepteur marqué par LNASAB 1 μ M en 10 min. A. Le surnageant de la purification par affinité (c.-à-d. les protéines non biotinylées) est analysé par SDS-PAGE et Western blot suivant la réaction de marquage. La flèche noire désigne le poids moléculaire attendu de P2X7. Anticorps dirigé contre P2X7 (1/500), Alomone APR-008 B. Moyenne du pourcentage de l'intensité de la bande P2X7 suivant la réaction de marquage relativement à la quantité endogène de la protéine. Barre d'erreur : écart-type, n = 4.

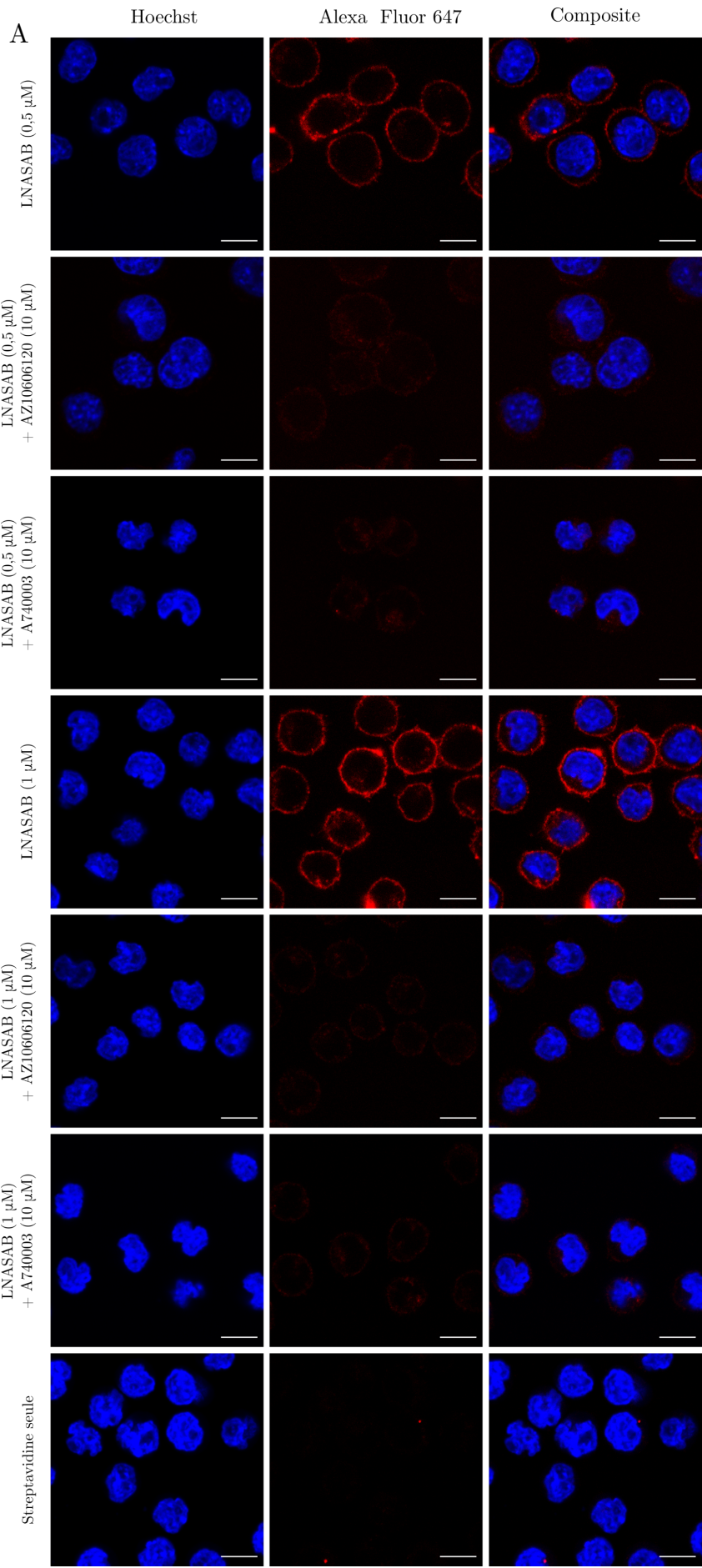
exacte de récepteur P2X7 modifié, le protocole de Pull Down a été adapté : Le surnageant de la purification d'affinité (donc, les protéines non biotinylées) a été chargé sur gel après avoir été mise en présence de LNASAB (**Figure 43A**). L'intensité de la bande correspondante à P2X7 est ensuite comparée à la quantité endogène de cette protéine, quantifiée en lysant des microglies BV-2 sans incubation préalable (Figure 43B, ligne 1). 79,9 % ($\pm$ 5,3 %) des récepteurs P2X7 ont été modifiés dans ces conditions (Figure 43C). En considérant la réaction terminée en 30 minutes, cette cinétique fait apparaître un $k_{app} = 0,16 \text{ min}^{-1}$ ($\pm$ 0,06, E.T.). Étonnement, cette valeur est très proche du k_{app} de la réaction de marquage sur cellules HEK293T, mais avec une concentration 2,5x supérieure. La stœchiométrie de la réaction (ratio P2X7 : LNASAB) peut potentiellement expliquer cette différence mais d'autres expériences dédiées doivent être mises en place pour conduire à des conclusions robustes. Ces dernières n'ont pas été jugées prioritaires dans ces travaux.

Il est intéressant de constater que l'anticorps utilisé, comme décrit dans l'introduction, n'est que pauvrement sélectif. S'il révèle la protéine d'intérêt, le gel est pollué par de nombreuses bandes parasites (Figure 43B), parfois plus intense que la cible. La comparaison avec la Figure 42 est alors explicite. Le même anticorps a été employé, néanmoins la purification par affinité grâce à LNASAB fait état d'une figure épurée, dans laquelle seule la bande d'intérêt est visible.

Par conséquent, LNASAB (1 μ M) est capable de marquer sélectivement environ 80 % des récepteurs P2X7 en 10 minutes. Ceci au sein d'un système l'exprimant nativement et qui permet donc son étude physiologique. De plus, cette technologie s'accompagne d'un contrôle négatif performant, qui ne nécessite aucune modification génétique.

L'analyse morphologique des microglies BV-2 suivant l'incubation avec LNASAB ne révèle pas de dérivation de l'état quiescent de ces dernières (données non illustrées ici).

Ces résultats ont ainsi encouragé la suite logique : la microscopie confocale du récepteur P2X7 suivant sa modification chimique dans ces conditions. Des microglies BV-2 ont été incubées avec LNASAB (1 μ M, 10 min, 37 °C) avec ou sans inhibiteurs compétitifs (A740003 et AZ10606120, 10 μ M). Le marquage est révélé grâce à la streptavidine conjuguée à l'Alexa Fluor 647. La fluorescence membranaire est calculée similairement à la Figure 44.



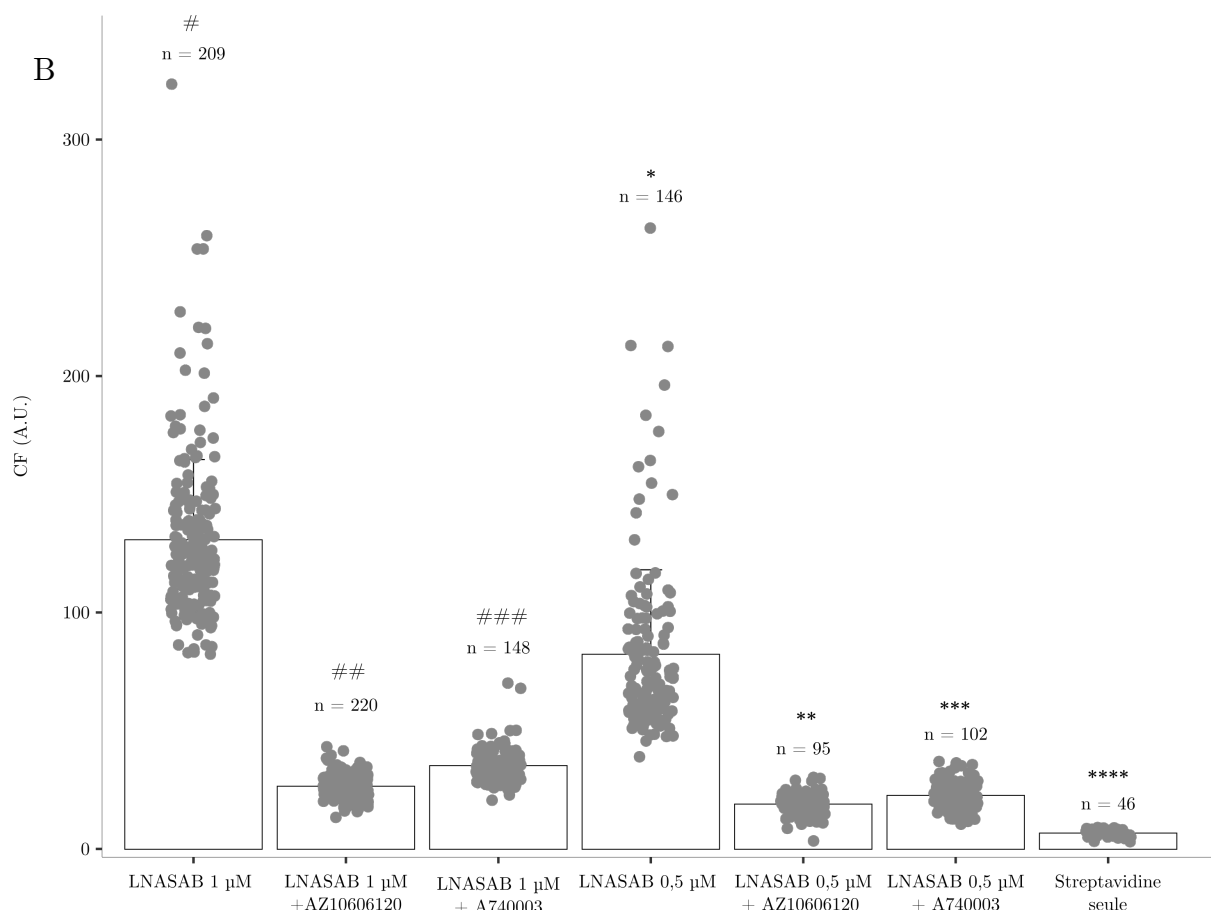


Figure 44 Marquage sélectif du récepteur P2X7 sur microglie BV-2. Après marquage (LNASAB, 10 min, 37 °C) révélé par la streptavidine-Alexa Fluor 647 (1 µg.ml⁻¹, 10 min, 37 °C dans un tampon PBS 1% BSA), les cellules sont fixées et imagées en microscopie confocale (A). La fluorescence membranaire est évaluée comme précédemment décrit (B).

Cette réaction de marquage fait alors apparaître un anneau de fluorescence (Figure 44A) membranaire aisément discernable. Son l'intensité est dépendante de la concentration de LNASAB, d'une valeur de $130,8 \pm 34,0$ A.U. et $82,4 \pm 37,7$ A.U. pour 1 µM et 0,5 µM, respectivement. Ce marquage est fortement limité par la présence d'inhibiteur dans le milieu. L'efficacité de cette protection pharmacologique dépend du pouvoir inhibiteur du composé utilisé et suggère, ici encore, la dépendance de la réaction de bioconjugaison à l'affinité du ligand.

Les résultats obtenus sur les microglies BV-2 sont extrêmement satisfaisants. LNASAB se positionne comme un outil exceptionnel d'étude du récepteur P2X7 natif. Ce réactif de marquage atteint une sélectivité amplement supérieure aux anticorps commercialement disponibles. De plus, il permet un marquage rapide sur cellule vivante, et admet donc un spectre extrêmement large d'expérimentation. Particulièrement intéressant dans ces travaux de thèses, ce marquage offre l'accès à la révélation de l'organisation nanoscopique du récepteur P2X7 en conditions native. LNASAB permet d'en révéler

les détails les plus fins et est, au moment de l'écriture de ce manuscrit, l'outil le plus adapté pour cette tâche.

10. Organisation nanométrique de P2X7

Les résultats présentés ici témoignent du potentiel de LNASAB. Cet outil a par conséquent été exploité pour interroger la distribution du récepteur P2X7 au sein de la membrane plasmique. Les cellules microgliales BV-2 montrent une expression de P2X7 virtuellement similaire aux microglies primaires. De plus, comme mentionné plus haut, les voies principales de signalisation P2X7-dépendantes sont conservées entre ces deux types cellulaires. L'utilisation de LNASAB sur microglie BV-2 permet donc de fournir des résultats très proches de la réalité physiologique de cette protéine au sein d'un organisme.

Les cellules microgliales sont extrêmement dynamiques. À ce titre, les expériences présentées ci-après ont pour but d'étudier le comportement du récepteur P2X7 exprimé à la surface de microglies quiescentes ou activées. Afin d'observer des comportements pro-inflammatoires, ces cellules ont été mises en présence de lipopolysaccharides (LPS) ou d'éthanol pendant 24 h. Le premier est une biomolécule dont les effets sont relativement bien décrits. Il induit l'expression de différentes molécules de surfaces (CD11b, CD40...) par son action sur le récepteur Toll-like receptor 4 (TLR4)²¹¹. Les cascades de signalisations suivant sa détection impliquent le facteur de transcription NF- κ B²¹², engagé dans la régulation de l'inflammasome NLRP3, mais aussi la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de monoxyde d'azote (NO)²¹³. Son effet sur le récepteur P2X7 est donc particulièrement intéressant puisqu'il n'agit pas directement sur cette protéine mais initie un large spectre d'effets pro-inflammatoires dont les conséquences indirectes sur P2X7 sont inconnues.

La stimulation de processus physiologique par l'éthanol est également intéressante. Cet agent pharmacologique induit une réponse neuro-immunitaire fortement dépendante des microglies²¹⁴. Mais plus particulièrement, il semble agir sur les fonctions des récepteurs P2X4 et P2X7, les deux sous-types de récepteur P2X majoritairement exprimés par les microglies. Une forte concentration d'éthanol (100 mM) exerce un pouvoir inhibiteur seulement sur P2X4 mais potentialise une sécrétion d'IL-1 β médié par P2X7²¹⁵. Sa conséquence sur l'organisation de P2X7 est inconnue. Ces deux conditions permettront alors de se rendre compte d'une éventuelle réorganisation du récepteur P2X7 dépendante de stimuli pro-inflammatoires.

Ainsi, ces cellules prétraitées ou non pendant 24 h avec de l'éthanol (EtOH) ou du LPS ont été mises en présence de LNASAB et la biotine est révélée par la streptavidine conjuguée à l'Alexa Fluor 647 et imagée par dSTORM (illumination TIRF) dans un milieu de montage adapté. La reconstruction des images révèle alors l'organisation en

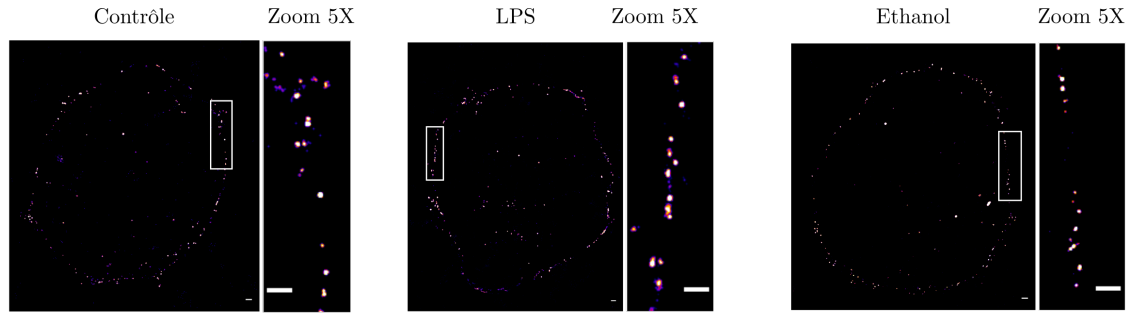
nanocluster du récepteur P2X7 (Figure 46A). Ce dernier s'organise en zone définie, clairement discernable sur la projection 3D des intensités (Figure 46B). Cette organisation peut être devinée sur des images de microscopie conventionnelle par illumination TIRF (Figure 45). Néanmoins, seule la microscopie super-résolutive permet d'étudier le motif de distribution spatiale du récepteur P2X7.

10.1 Analyse des clusters : introduction

Cette série d'expériences montre la tendance qu'a le récepteur P2X7 à former des clusters à la surface des microglies BV-2. L'analyse de ces derniers n'est pas triviale et il est nécessaire d'introduire et de clarifier certains concepts avant de présenter les résultats biologiques obtenus.

Les images super-résolues ont, jusqu'ici, été improprement illustrées par des images matricielles. Chaque pixel de ces matrices décrit une valeur d'intensité. C'est la manière intuitive de représentation et d'analyse de données en microscopie conventionnelle. Cependant, la microscopie dSTORM (et autres méthodes de détection de molécule unique) génère un tableau de coordonnées vectorielles correspondant à chaque point (dans sa définition mathématique) détecté. Cette approche, dite « pointilliste » fournit un nuage de point. Si l'œil humain peut rencontrer des difficultés à différencier les deux concepts une fois représentés par une image, la tâche informatique du traitement des données est différente. L'analyse de cluster peut être résumée de la manière suivante : décomposer un nuage de point en sous-ensembles non chevauchants tels que leurs ensembles forment le total des détections. Un cluster sera alors un groupe dense de points plus proches d'eux-mêmes que du sous-ensemble adjacent. La détermination d'un cluster correspondant à une structure biologique pertinente sera effectuée par des opérateurs mathématiques qui segmenteront l'ensemble et classifieront la distribution de chaque point²¹⁶.

A



B

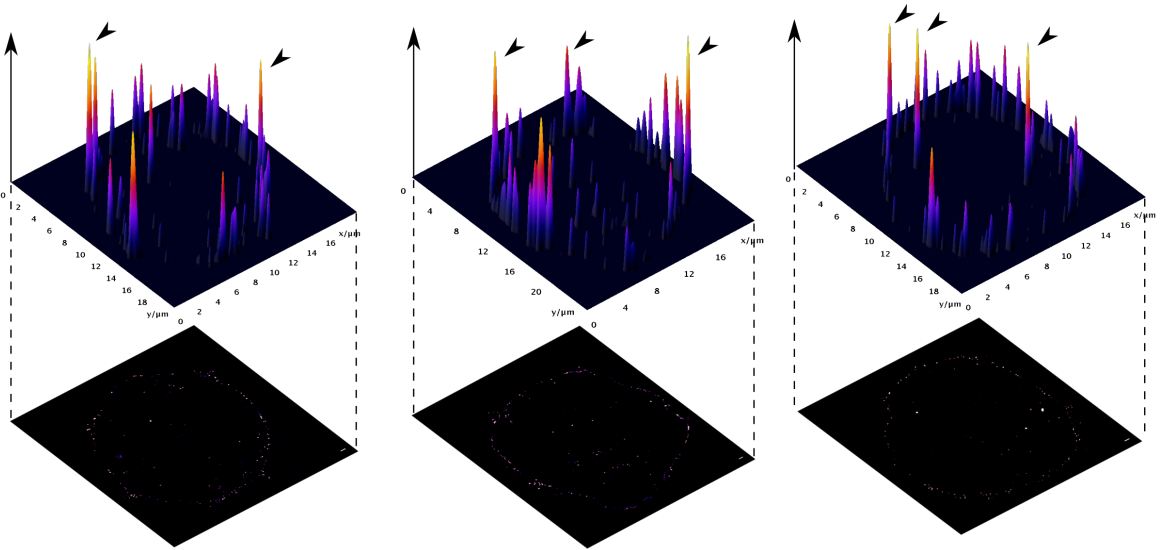


Figure 46 Nano-organisation du récepteur P2X7 microglial. Les cellules ont été prétraitées pendant 24h avec 100 mM d'éthanol, 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de LPS ou sans agents pharmacologiques (contrôle). LNASAB est ensuite appliqué (1 μM , 10 min, 37 °C, DMEM), suivi de la streptavidine conjuguée à l'Alexa Fluor 647 (1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, 10 min, 37 °C dans un tampon PBS 1% BSA). Après fixation, les cellules sont montées sur lame dans un milieu adéquat (Vectashield, voir partie expérimentale). Chaque incubation est précédée de 3 rinçages au tampon PBS. A. Images dSTORM reconstruites accompagnées d'un zoom 5X. Barre d'échelle : 0,5 μm . B. Projection 3D des intensités de fluorescences. Couleur : palette « Fire » d'ImageJ. Les flèches noires désignent des clusters potentiels.

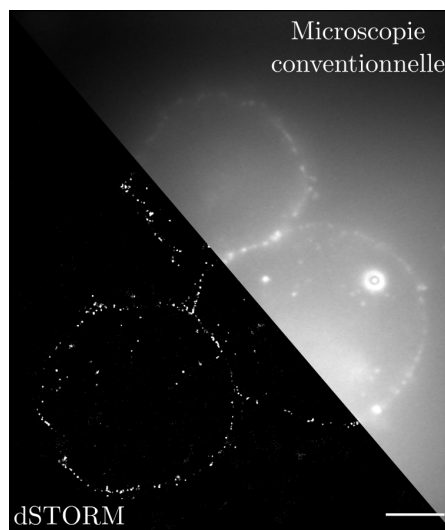


Figure 45 Comparaison des images obtenues par différents type de microscopie. Figure extraite du groupe contrôle (Figure 46). Barre d'échelle : 5 μm .

Différentes méthodes informatiques sont disponibles aujourd'hui pour quantifier ces structures multiprotéiques complexes. Les plus célèbres sont basées sur (1) l'approche statistique (*e.g.* Fonction de Ripley (K, H et L²¹⁷)), (2) la densité (Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise (DBSCAN²¹⁸), et son itération Fast Optimized Aluster Algorithm for Localizations (FOCAL²¹⁹)) et (3) la tessellation par diagramme de Voronoï. Cette dernière, publiée par F. Levet *et al.* en 2015 permet une analyse relativement aisée et robuste de l'organisation d'objet biologique détectée par dSTORM²²⁰. Brièvement, cette méthode partitionne l'espace en cellules contenant chacune une détection unique issue du tableau de coordonnées obtenu par dSTORM. Chaque point^{14a} du plan est associé à la détection dont il est le plus proche, définissant alors une région propre à cette dernière (une cellule de Voronoï). L'ensemble des polygones centrés sur une détection forme alors un diagramme de Voronoï. Les propriétés géométriques de chaque cellule peuvent alors être utilisées pour définir un cluster. Une illustration sur un jeu de données issu des expériences de LNASAB sur microglie BV-2 est fournie par la Figure 47.

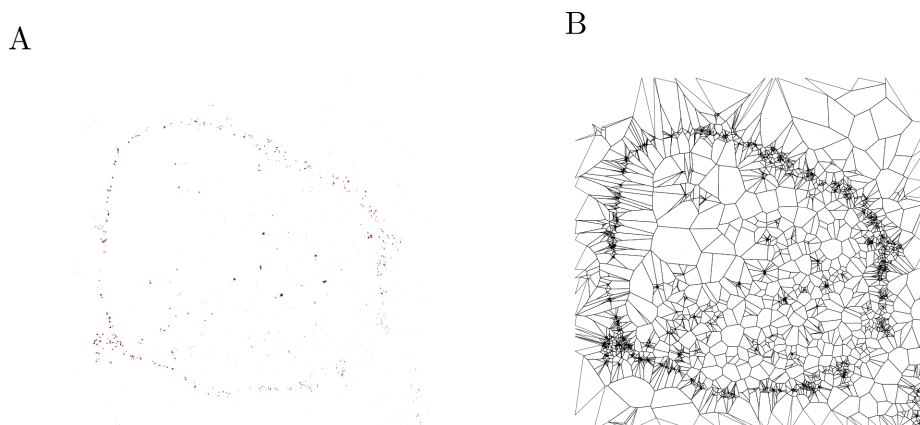


Figure 47 Illustration de la segmentation par tessellation d'un ensemble de détection issue du marquage par LNASAB de P2X7 (jeu de donnée issu de l'expérience présentée par la Figure 46). La cartographie des points (A) est segmentée en diagramme de Voronoï (B) par tessellation.

^{14a} Ne pas confondre ici point et détection. « Chaque point du plan » ne fait pas référence aux détections de molécule unique dans ce cas mais à l'infinité de points qui compose un plan tel que défini par la géométrie euclidienne.

10.2 Analyse des clusters

Les données précédentes ont ainsi été analysées par la méthode de tessellation. Les structures identifiées (Figure 46) ont été classées selon leur taille. Dans les modalités de l'expérience, le récepteur P2X7 montre alors une distribution en cluster d'un diamètre médian de 58 nm (intervalle de confiance à 95% (IC_{95}) : [55, 59]) (Figure 48) lorsqu'une quasi-circularité des clusters est admise.

Une fois cette information définie, il est intéressant de la comparer avec les diamètres des clusters observés pour des microglies préincubées avec du LPS (groupe LPS) et avec de l'éthanol (groupe éthanol). La distribution de leurs fréquences (Figure 48A, B et C) selon leurs diamètres montre, pour tous les groupes, une distribution asymétrique avec un coefficient d'asymétrie positif (étalé vers la droite). Les queues des distributions du groupe contrôlé et éthanol sont relativement contenues, à l'inverse du groupe LPS qui montre alors un étalement plus important. Le diamètre médian de ces clusters est plus important lorsque les cellules sont exposées au LPS de (67 nm, IC_{95} : [63, 75]) plutôt qu'à l'éthanol (52 nm, IC_{95} : [51, 57]). Aucune différence statistique n'a pu être mise en évidence entre cette population et les cellules contrôlées. Un test statistique de Mann-Whitney fait apparaître une différence significative du groupe LPS lorsque comparé au groupe contrôle et éthanol ($p < 0,001$).

La tendance inverse est observée lorsque les densités des clusters sont analysées. En effet, le groupe LPS montre une différence significative avec les deux autres groupes (test de Mann-Whitney, $p < 0,001$), démontrant une densité plus faible.

Ces données supportent alors une modulation de l'architecture du récepteur P2X7 en réponse à l'exposition des microglies à des agents pharmacologiques pro-inflammatoires.

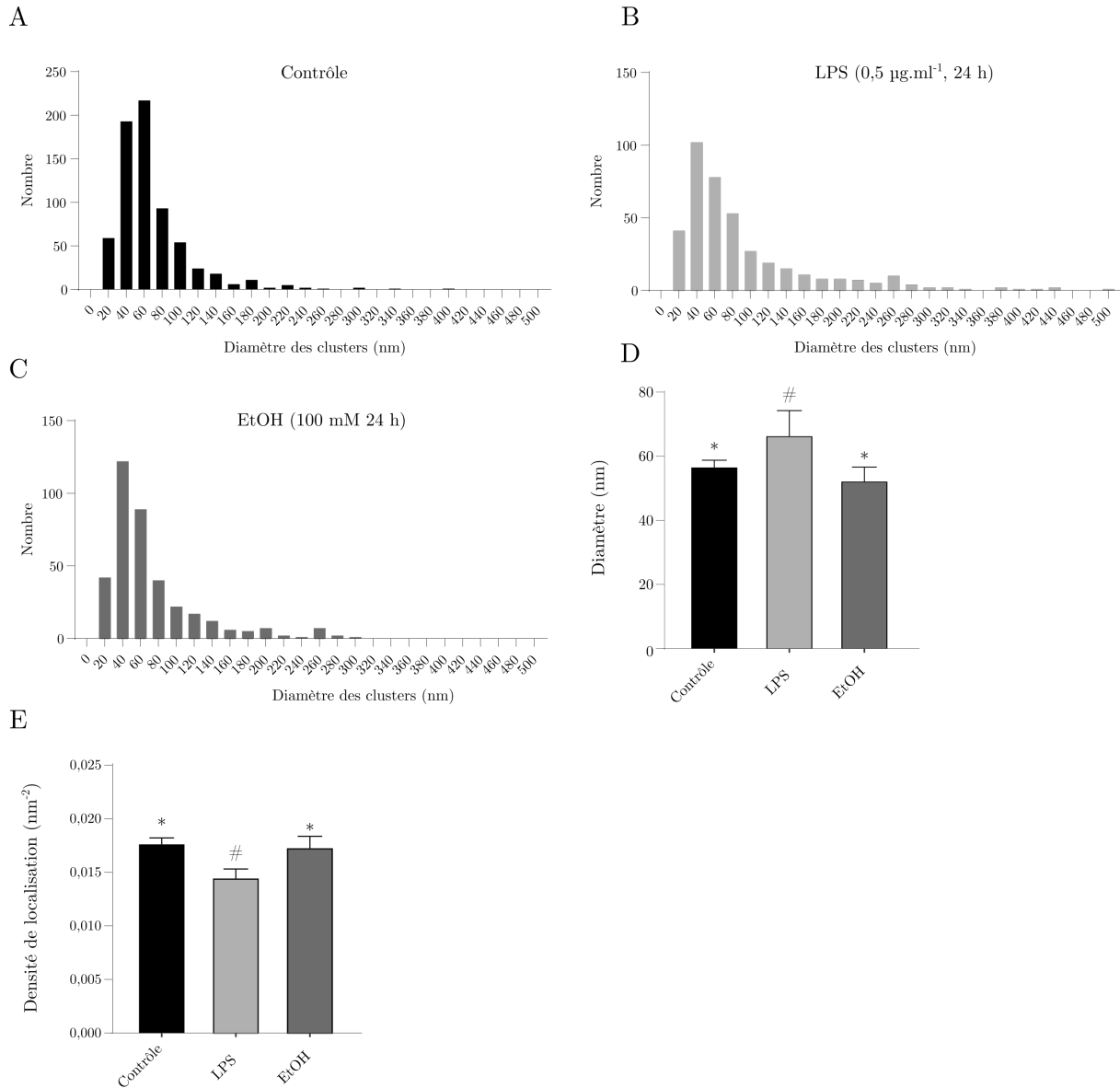


Figure 48 Analyse des clusters formés par P2X7 dans les microglies BV-2. Le jeu de données est issu de l'expérience présentée par la Figure 46. A, B, C. Distribution de la taille des clusters à la surface des microglies BV-2. D. Taille médiane des clusters en fonctions des conditions d'incubations. Barres d'erreurs : IC_{95} . E. Densité moyenne des clusters détectés. Barres d'erreurs : Erreur standard de la moyenne. $n \geq 9$ cellules pour chaque condition.

Cette expérience riche d'information clôture ce chapitre. Les conséquences physiologiques seront discutées dans le chapitre suivant.

Le lecteur attentif pourra toutefois être surpris par l'absence de préapplication d'agoniste dans cette expérience. En effet, l'étude des conséquences nanoscopiques de l'activation pharmacologique de ce récepteur est indispensable. De telles expériences ont été menées (application de $100 \mu\text{M}$ de BzATP 1 h précédant la réaction de marquage). Le nombre de cellules de ces expériences fût néanmoins trop faible pour conduire à des résultats robustes et a donc été omis de ce manuscrit.

Chapitre 4 : Discussion - Conclusion

1. Résumé des résultats présentés

Depuis son premier clonage en 1996, le récepteur P2X7 challenge les scientifiques. Ses importances pathologiques n'ont d'égales que ses inconnues physiologiques. Les outils d'études décrits échouent à démontrer une sélectivité suffisante pour les questions modernes que cette protéine soulève. En particulier ses implications pathophysiologiques. Les résultats présentés ici font état de la conception, de la synthèse et de l'application d'une méthode d'étude hautement sélective qui permet la modification covalente du récepteur P2X7 en conditions natives sur un acide aminé non impliqué dans la fonction de récepteur canal de P2X7. Une fois optimisé, le protocole d'utilisation de celle-ci est techniquement simple de mise en œuvre et rapide. Il ne requiert aucune modification génétique de la cible et peut donc être facilement transféré à des problématiques expérimentales *ex* et *in vivo*. Le contrôle négatif que fournit la compétition pharmacologique ne souffre également d'aucune contrainte technique.

Ce dernier a révélé, au moyen de microscopie dSTORM, la formation de clusters d'environ 55 – 60 nm de diamètre médian à la surface des cellules microgliales BV-2. Cette taille varie lors d'exposition à des agents pharmacologiques pro-inflammatoire.

Au vu de la portée multidisciplinaire de l'aboutissement de ces travaux, les résultats seront discutés dans deux sections distinctes. La première traitera du succès du marquage et de sa significativité dans l'expendabilité du marquage d'affinité. La deuxième discutera des découvertes physiologiques qu'un tel outil a permises.

2. Marquage d'affinité

2.1 Conclusions générales

Une grande partie de ces travaux de thèse se sont concentrés sur le développement rationnel d'une méthode de marquage covalente de la protéine ciblée. Les nombreuses étapes d'échecs et d'apprentissage décrites ici montrent que la conception cartésienne d'une telle approche n'est pas triviale. Cet exercice requiert un labeur expérimental particulier, dû avant tout à une littérature scientifique encore très jeune et peu diversifiée. Cependant, une fois la stratégie aboutie et optimisée, elle permet l'accès à un panel de méthodes d'analyse sans précédent.

En plus de présenter un outil de marquage, ce manuscrit a la prétention de décrire une méthodologie de conception. L'échec de l'approche pyridinium oxime – NASA a probablement souffert d'un manque de maturité scientifique (sur le design *in silico*), en plus de cinétique trop lente. Les leçons tirées ont cependant permis de définir une méthodologie robuste. La conception de la deuxième génération d'outil moléculaire s'est alors appuyée sur un état bibliographique complet de la relation structure-activité concernant le récepteur P2X7. Des fragments moléculaires potentiellement intéressants ont été couplés au pharmacophore initial et le tout a été évalué par docking moléculaire dont est issu *in fine* un candidat chimique. La synthèse et l'application de ce dernier montrent le succès de cette approche et valident partiellement les étapes de cette méthodologie.

L'électrophile NASA semble être le groupement réactif décrit pour un marquage d'affinité non catalytique le plus attrayant. Les auteurs de sa première application observent un aspécifisme conséquent lors d'incubations longues à de fortes concentrations (1 h, 20 μM)¹¹³. Néanmoins comme démontré ici, les vitesses exceptionnelles de réaction de ce groupement chimique dans un marquage d'affinité ne requièrent qu'une dizaine de minutes pour être presque complètes. Couplé à un ligand de haute affinité ($K_D \approx 10 \text{ nM}$), l'outil final ne nécessite qu'une concentration très modérée et n'arbore par conséquent qu'un aspécifisme difficilement détectable.

En substance, à la date d'écriture de ce manuscrit, le réactif LNASAB est le premier outil de marquage basé sur un ligand qui a été étendu avec succès à la caractérisation de nanostructure par microscopie super-résolutive (dSTORM). Cette preuve de principe démontre la puissance de l'approche et est alors susceptible d'inspirer d'autre stratégie similaire appliquée à différentes protéines. Il est intéressant de noter qu'au gré des diverses techniques utilisées au fil de ces travaux, LNASAB ne s'est jamais montré le facteur limitant. En effet, les difficultés rencontrées ont majoritairement été d'ordre

technique ou liées à la présence de biotine endogène. Ce fut notamment le cas pour des expériences sur tranche de cerveau, macrophages ou cellules microgliales primaires menée par des collaborateurs de ce projet.

Ce point amène à la conclusion suivante : la limite de cette stratégie n'a pu être empiriquement définie, malgré un effort certain déployé dans ce but.

2.2 Perspectives

Au regard de la diversité chimique qu'il est envisageable d'insérer sur le réactif de marquage, ce projet s'ouvre sur de nombreuses opportunités d'étude et de manipulation de la protéine cible. La fonctionnalisation est la clé de voute de la polyvalence de la stratégie. La boîte à outils moléculaire à la disponibilité des chimistes et biologistes permet d'imaginer des expériences très variées.

Une brève introduction de plus évidente est proposée ci-après. Cette dernière sera volontairement contenue afin de centrer cette discussion sur une perspective théorique particulière, jugée subjectivement plus excitante que les autres.

Diazirine et photo-crosslinking^{15a}.

Les diazirines sont des fonctions chimiques particulières qui, lors d'une irradiation par lumière ultra-violette (365 nm), forment un carbone divalent extrêmement réactif de type carbène. Ce dernier peut s'insérer dans des liaisons O-H, N-H ou même C-H de protéines avoisinantes. Le greffage covalent d'une diazirine sur une chaîne PEG soluble de longueur définie à l'extrémité d'un réactif de marquage LNASA permettrait de

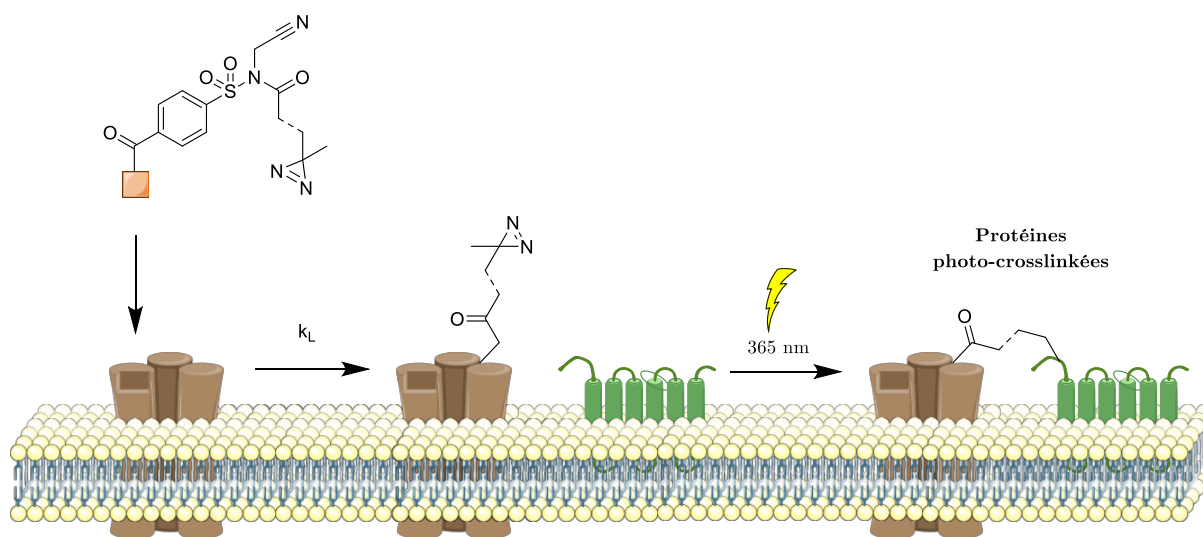


Schéma 25 Photo-crosslinking de protéines voisines par fonctionnalisation du réactif de marquage avec une diazirine.

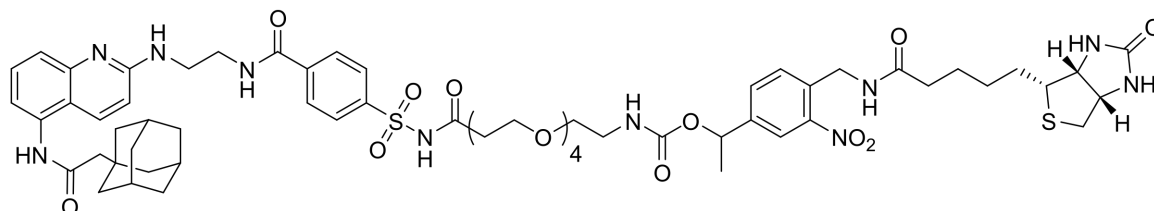
^{15a} Anglicisme pouvant se traduire par « liaisons transversales ». Il fait référence ici à la liaison covalente de deux protéines entre elles.

photo-crosslinker les protéines à proximité de P2X7, en respect de l'éloignement choisi et ainsi étudier les interactions protéine-protéine, par exemple par Western blot ou spectrométrie de masse (Schéma 25).

Groupeement photolabile et protéomique

Cette technologie est toute désignée pour l'analyse de complexe protéique par spectrométrie de masse. L'insertion d'un groupeement photolabile précédent la biotine dans la structure de LNASAB permet une purification de P2X7 et de ses partenaires d'interactions en deux étapes : Un Pull Down, qui comme démontré dans ce manuscrit, purifiera une première fois la protéine. Cependant, cette technique souffre d'un aspécifisme modéré (particulièrement imputable à des liaisons non spécifiques de protéines sur les microbilles d'agarose), suffisant pour interférer avec une méthode analytique aussi sensible que la spectrométrie de masse. C'est ainsi qu'un groupeement photolabile peut permettre, suivant la première purification par Pull Down, de libérer les protéines effectivement marquées par le réactif dans le milieu. Un tel projet de « catch'n release », dénommé LNASA-BOB (Biotine-*ortho*-nitrobenzyle) a été initié dans ces travaux, mais n'a pas vu le jour par manque de temps (Figure 49).

A



B

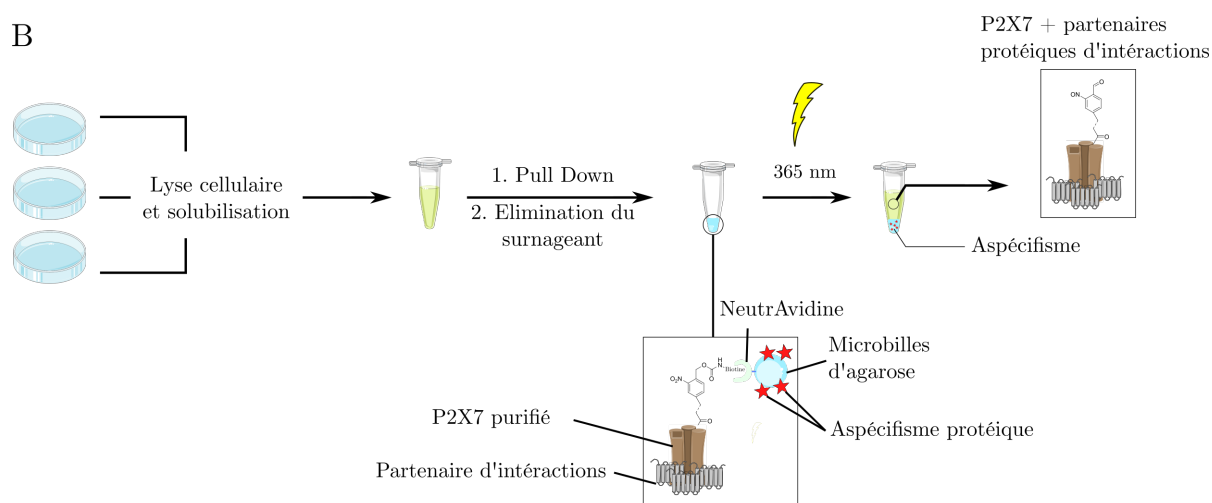


Figure 49 Stratégie LNASA-BOB. A. Structure du réactif. B. Schéma de principe de la stratégie.

Inhibiteur covalent

En s'inspirant des travaux de I. Hamachi, il semble chimiquement accessible de transformer le réactif de marquage en inhibiteur covalent du récepteur P2X7, par la simple inversion de la fonction de l'électrophile portée par la sonde NASA (Schéma 26) dans la structure. Ses applications peuvent dès lors être nombreuses, en se substituant par exemple à un KO génétique. Cet outil peut conditionnellement induire une perte d'activité du récepteur. Il présenterait de sérieux avantages dans des expériences sur cellules primaires, voir organisme entier, où l'accès à ce KO est compliqué (voir introduction sur P2X7). Cette méthode fournit un moyen élégant de retenir les éventuelles fonctions métabotropiques du récepteur P2X7, tout en inhibant son activité de canal ionique.

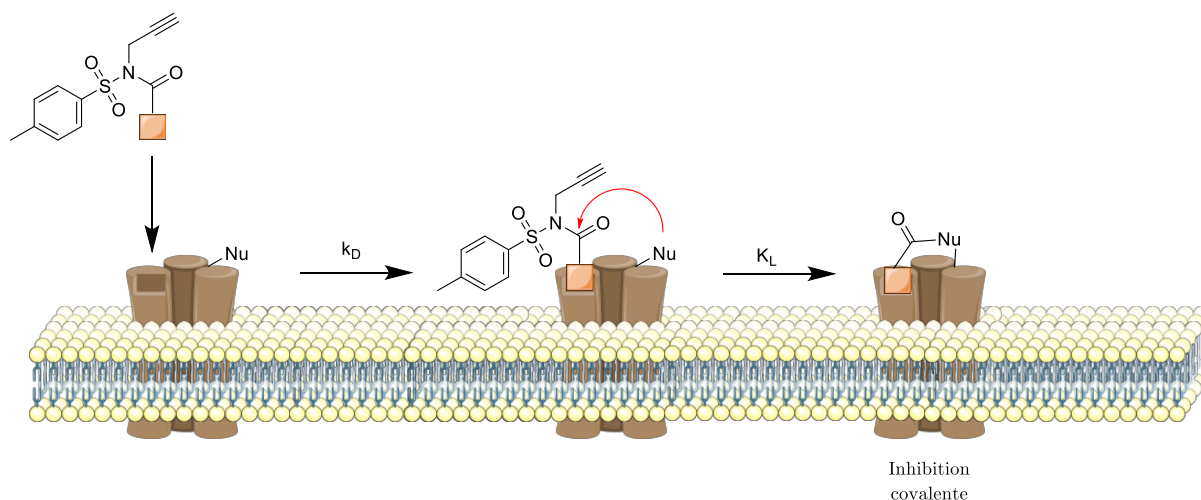


Schéma 26 Inhibition covalente du récepteur P2X7.

Autres

Bien évidemment, cette liste n'est pas exhaustive et le potentiel de ces outils est principalement limité par la créativité de l'expérimentateur. Des analyses drastiquement différentes de celles présentées ici peuvent également voir le jour, à l'instar de la microscopie électronique (insertion d'atome d'or)²²¹ ou la RMN (*p. ex.* grâce à l'isotope de fluor ^{19}F)²²². Le premier permet alors une excellente résolution sur cellule ou tissu fixé. Le deuxième permet d'envisager de l'imagerie *in vivo* par résonance magnétique nucléaire (IRM).

Suivi dynamique

Probablement les observations les plus pertinentes à la suite des résultats présentés, l'analyse dynamique de P2X7 devient accessible grâce à l'optimisation de cette technologie. L'insertion d'un fluorophore organique en lieu et place d'une biotine admet un avantage expérimental particulier : le suivi dans le temps de la protéine s'affranchit de l'encombrement stérique de la streptavidine, et donc des artefacts qu'elle peut induire.

Cela nécessite alors la conjugaison du réactif de marquage avec un partenaire de chimie bioorthogonale à l'extrémité de celui-ci. Le manque de sélectivité observé des cyclooctynes nous a conduits à favoriser l'utilisation de la chimie bioorthogonale de type iEDDA préférentiellement à la chimie SPAAC. Les difficultés de synthèse du réactif LNA-SATCO limitent cependant plus encore l'investigation préalable de ce type de chimie biocompatible. Différentes stratégies de synthèse peuvent néanmoins être envisagées. Parmi ces dernières, l'exploitation de l'azoture du réactif LNASAN3 comme partenaire de chimie CuAAC pour l'introduction d'un TCO fonctionnalisé par un alcyne vrai semble pertinente. Si cette stratégie doit se solder par un échec dû à la réactivité du TCO, celui-ci pourra être substitué par un cyclopropène^{16a}.

Une fois abouti, un tel outil pourra alors permettre une étude multi-échelle de la dynamique du récepteur P2X7. L'introduction d'un fluorophore photostable (tel que les rhodamines, utilisées notamment pour la microscopie STED) permet des observations « longues » par microscopie confocale afin d'étudier les phénomènes d'internalisations ou de recyclages protéiques.

Les récents développements de fluorophores organiques spontanément clignotants permettent d'imaginer des expériences d'imagerie super résolutive dans le temps, sans recourir à des additifs cytotoxiques tels que le milieu Vectashield® (ou autre milieu compatible avec le dSTORM). Parmi les candidats les plus séduisants, l'hydroxyméthyl Si-rhodamine (HMSiR) arbore des propriétés exceptionnelles. Cette sonde subit une transformation intramoléculaire (spirocyclisation) dépendante du pH la faisant alterner d'un état fluorescent ON à OFF. Son point d'équilibre se situe à $\text{pH} \approx 6$. En conséquence, 98 % des molécules sont à l'état OFF à pH physiologique (7,4)^{180,223}. Cette propriété convient à la résolution de chaque détection individuellement, selon le principe de dSTORM précédemment décrit.

La bionconjugaison de ce fluorophore (ou ses dérivés) sur le récepteur P2X7 admet alors un suivi spatiotemporel nanométrique de la localisation de cette protéine, en conditions natives sur cellules vivantes.

Ce dernier point est particulièrement intéressant. Les méthodes de marquages les plus courantes en microscopie cellulaire sont les protéines de fusion (protéines fluorescentes et enzyme-suicide) ainsi que les anticorps. L'introduction de ce manuscrit fait état des problématiques qu'induit les construits génétiques, notamment sur l'encombrement stérique et l'inhibition d'interaction protéine-protéine. Des artefacts similaires sont rencontrés au cours d'immunomarquages. Lors de l'investigation du comportement d'une protéine à une échelle nanométrique, ces incertitudes ne peuvent plus être ignorées. Le

^{16a} Partenaire de la réaction iEDDA, il est moins réactif que le TCO dans cette dernière.

marquage d'affinité comme décrit ici présente alors une opportunité exceptionnelle. Ce dernier admet des expériences de dSTORM sur cellules vivantes couplées à un suivi de particule afin de déterminer les dynamiques d'une protéine et ses réponses à différents stimuli, exemptes d'artefacts manifestes.

Appliquées au récepteur P2X7, de telles expériences ont le potentiel de révéler ses dynamiques de diffusion membranaire dans différentes conditions pro-inflammatoires et préciser ses rôles dans des modèles pathologiques.

Une élégante preuve de principe de dSTORM sur cellule vivante couplée à un suivi de particule a été apportée par l'équipe de K. Johnsson en 2019 sur le récepteur β -2-adrénergique²²⁴ par l'emploi d'enzymes-suicide et un fluorophore dérivé des Si-rhodamine.

3. Récepteur P2X7 et nanodomains

Le chapitre 3 s'achève sur l'observation de clusters formés par le récepteur P2X7, d'un diamètre d'environ 60 nm. À ce jour, la littérature ne compte qu'un seul exemple d'image super-résolue du récepteur P2X7 quantifiant les propriétés des structures nanoscopiques que celui-ci forme. Il est issu de microscopie PALM sur neurones transfectés avec une protéine de fusion P2X7-Dendra2 (voir introduction)⁹⁶. Ce travail explore la dynamique de cette protéine, la formation de cluster stable ainsi que l'observation de récepteur unique diffusant rapidement au sein de la membrane plasmique. Si ces résultats sont remarquables, la méthode présente d'importants biais. Il s'agit bien évidemment du couple protéine de fusion – expression hétérologue. Par définition, ce modèle s'éloigne de la réalité physiologique du comportement de la protéine étudiée.

Par conséquent, les résultats présentés ici s'opposent à ceux décrits. A. Shrivastava *et al.* ont observé un arrangement de P2X7 en clusters d'un diamètre de 100 nm, quand le marquage de cette protéine en conditions natives témoigne d'un diamètre inférieur de 40 nm.

Cette différence illustre les propos avancés dans la deuxième partie du chapitre introductif de cette thèse. Les résultats de la mesure sont dépendants de la méthode, et par conséquent ne peuvent être interprétés que dans les limites intrinsèques de cette dernière.

3.1 Cluster : significativité

Mise en contexte bibliographique

La présence de P2X7 dans des domaines membranaires spécialisés est connue depuis une quinzaine d'années. Les premières preuves ont été apportées par P. Bannas *et al.* en 2005²²⁵, M. Garcia-Marcos *et al.* en 2006²²⁶ et par K. Barth *et al.* un an plus tard²²⁷. Les deux derniers groupes ont montré la présence de cette protéine au sein de structures membranaires particulières, présentant une forte concentration en cholestérol et caveolin-1. Cependant M. Garcia-Marcos *et al.* observent également une fraction de la population de P2X7 en dehors de ces arrangements. La protéine caveolin-1 est considérée comme un marqueur des « radeaux lipidiques »²²⁸. Ces microdomaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides sont établis comme des compartiments fonctionnels aux rôles très variés. Ces densités hétérogènes ont été définies en 2006 par un consensus du Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function, réunissant biologistes et physiciens. Cette définition rend compte de domaines membrane mesurant de 10 à 200 nm ayant un dynamisme (diffusion latérale et association – dissociation)

remarquable. Ils peuvent être stabilisés par des interactions protéine – protéine et protéine – lipide pour former des plateformes plus large²²⁹. Leurs abondances, leurs tailles et leurs compositions dépendent de différents facteurs incluant le type cellulaire et les facteurs de stress²³⁰. Ils ont un rôle particulier dans la réponse immunitaire et inflammatoire où ils modulent, par exemple, la réponse du récepteur TLR4 au LPS²³¹.

La littérature semble unanime sur la présence, au moins en partie, de P2X7 dans ces microdomaines. Les modifications post-traductionnelles de ce récepteur soutiennent également ce point. En effet, la palmitoylation contrôle l'affinité d'une protéine pour ces structures lipidiques particulière²³² et P2X7 n'échappe pas à cette règle : P. Gonord *et al.* ont montré que la modification de cystéines spécifiques régule sa présence au sein des radeaux lipidiques²³³.

Les travaux préliminaires concernant l'interaction fonctionnelle entre P2X7 et ces microdomaines ont mis en lumière différents aspects intéressants dont CD39 fait partie. Pour rappel, cette ectonucléotidase dégrade l'ATP (et l'ADP) en AMP et régule ainsi l'activité des récepteurs P2^{17a}.

La composition chimique de la membrane module l'activité de CD39²³⁴. La déplétion de cholestérol par la méthyl- β -cyclodextrin (M β CD) inhibe l'activité de cette protéine, suggérant l'importance des propriétés mécaniques de la membrane pour son activité enzymatique²³⁵. Des résultats complémentaires ont récemment été publiés par Savio *et al.*²³⁶ en 2020. Cette équipe montre que l'augmentation d'activité de CD39 normalement observé suivant une exposition à l'ATP extracellulaire chez des macrophages prétraités au LPS est inhibée en présence M β CD. De plus, dans les mêmes conditions, ils constatent une diminution de la colocalisation de CD39 avec un marqueur de radeau lipidique, la flotillin-2. Ils notent également que l'expression de la caveolin-1 est essentielle pour l'interaction de P2X7 avec un facteur de transcription de CD39 (STAT3). Enfin, la même équipe avait observé 3 ans plus tôt la modulation positive de l'expression de CD39 suivant l'activation de P2X7²³⁷. Un lien fonctionnel existe donc entre P2X7 et CD39, apparemment dépendant dès leurs présences au sein de radeaux lipidiques.

De fait, une théorie raisonnable émerge sur l'activité directe de P2X7 sur le métabolisme lipidique, la formation ou la stabilisation de microdomaines responsable d'activités catalytiques²³⁶.

^{17a} Le lecteur est référé à l'introduction concernant la signalisation purinergique.

Certaines expériences manquent pour affirmer que les clusters observés par microscopie super-résolutive dans cette thèse sont bien situés au sein de radeaux lipidiques. La déplétion de cholestérol par le M β CD précédant le marquage avec LNASAB pourrait être ici très informative. Des expériences de co(immuno)précipitation par Pull Down de P2X7 avec des protéines régulant les radeaux lipidiques comme la caveolin-1 ou l'actine²³⁸ fournirait également des conclusions robustes.

Cependant en accord avec la littérature scientifique sur le sujet, il est raisonnable d'assumer cette localisation.

3.2 Hypothèse concluante

Implications microgliales

Les travaux cités dans la section précédente traitent du récepteur P2X7 au sein des macrophages. Cependant, ce travail de thèse s'est concentré sur les cellules microgliales et l'implication de cette protéine dans leurs fonctions. À ce titre, la conclusion de ces travaux ne se concentrera que sur l'implication des résultats présentés sur ce type cellulaire, bien qu'ils puissent raisonnablement être extrapolés.

Le LPS agit sur son récepteur présent à la surface des microglies, la protéine TLR4. L'injection de LPS dans des modèles murins induits de sévère allodynie tactile, non observée chez les animaux KO pour le gène *Tlr4*²³⁹. Son activation nécessite sa dimérisation au sein de radeaux lipidiques^{259,231}. Les expériences de dSTORM réalisées ici montrent une dilatation des clusters observés, à l'inverse de leur densité en récepteur P2X7 lors de l'exposition au LPS. L'effet observé sur le P2X7 de cet agoniste du récepteur TLR4 suggère un lien fonctionnel entre les deux protéines. Une théorie plausible serait l'insertion de protéines, dont TLR4, au sein de radeaux lipidiques contenant P2X7 en dilatant ces derniers. Le rôle de protéines potentiellement impliquées reste à définir. Les acteurs de la signalisation purinergique, en particulier CD39, sont des cibles d'intérêt particulier pour de futures explorations. L'étude du trio P2X7 — CD39 — caveolin-1 et leurs conséquences structurelles et fonctionnelles apparaissent, à la lumière de ces travaux, comme une perspective excitante.

De telles structures sont en accord avec la théorie de « l'inflammaraft » développée dans une excellente revue²⁴¹ de Y. Miller *et al.*. Dans celle-ci, ils formalisent l'assemblage de protéines pro-inflammatoires au cœur de microdomaines pour former des densités protéiques spécialisées dans la cascade signalétique inflammatoire, principalement localisées à la surface de cellules gliales. Ils suggèrent l'implication de ces structures dans des pathologies neuroinflammatoires telles que les douleurs neuropathiques. La stabilisation

des inflammarafts dans le temps pourrait en partie expliquer les effets à long terme de lésions nerveuses induisant des douleurs neuropathiques.

Les résultats présentés ici soutiennent en partie la théorie de l'inflammaraft. En guise de conclusion, une théorie spéculative peut être formulée en s'appuyant sur la littérature et les résultats récemment publiés par le laboratoire.

Le cholestérol entrave une partie de l'activité de canal ionique du récepteur P2X7 en inhibant de façon allostérique l'activité observée suivant l'application d'agonistes^{242,94} et participe à la facilitation des courants. À l'inverse, la présence de M β CD potentialise cette facilitation.

En conditions normales, cette protéine est localisée dans des zones membranaires riches en cholestérol, et interagit directement avec CD39 qui hydrolyse l'ATP. Ainsi, il est raisonnable de postuler que cet agencement agit comme un filtre passe-bas de l'activité du canal ionique formé par le récepteur P2X7.

À l'inverse, l'exposition de la cellule au LPS induit la dimérisation du récepteur TLR4 qui migre dans les radeaux lipidiques et amorcer un état pro-inflammatoire. La cellule pourrait alors sortir de son état quiescent par des mécanismes encore obscurs, incluant probablement l'inflammasome NLRP3. Une des caractéristiques de cet amorçage serait la migration de P2X7 dans des localisations membranaires dépourvues (au moins en partie) de cholestérol et de CD39. La réponse inflammatoire pourrait ainsi bénéficier de la facilitation des courants exhibés par P2X7 pour s'amplifier d'elle-même. (Figure 50).

Cette organisation protéines – lipides – cholestérol dans un contexte neuroinflammatoire offre de nouvelles perspectives thérapeutiques. La modulation des acteurs stabilisant les inflammarafts sur la durée permettrait de concevoir des traitements n'ayant qu'un impact minime sur la fonction normale des protéines impliquées, en ne perturbant que leurs « agencements pathologiques ». Les études précliniques pourront probablement répondre à cette question dans un futur proche.

LNASAB a alors le potentiel d'explorer ces structures à leurs échelles propres. La combinaison de la microscopie super résolutive et la créativité de l'expérimentateur autorisent une réflexion presque onirique sur les perspectives de cet outil.

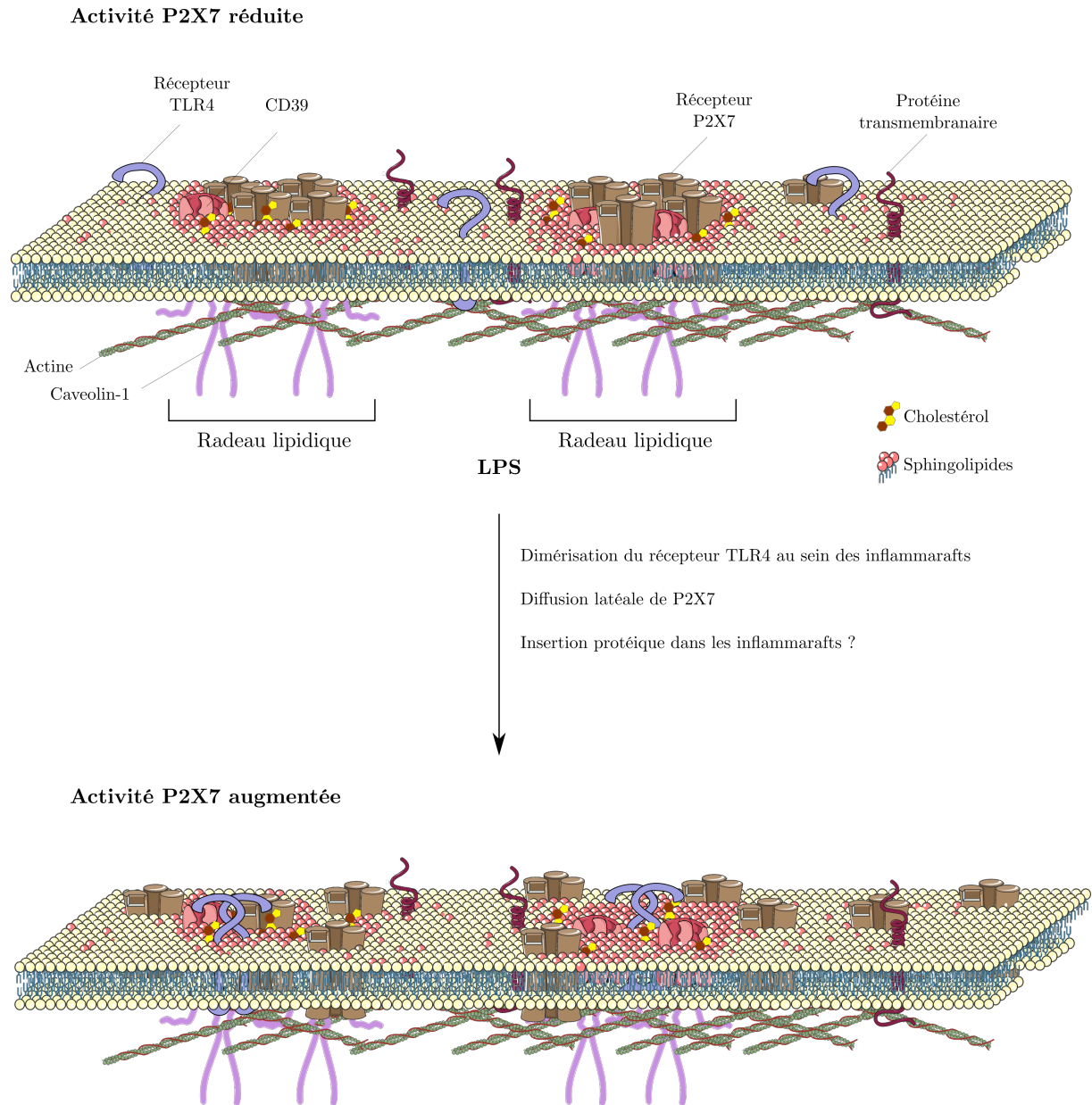


Figure 50 Illustration spéculative de l'effet du LPS sur l'organisation de P2X7 et sa présence potentielle au sein des inflammaraft. La diffusion des récepteurs P2X7 permet de diminuer la concentration locale de cholestérol et l'et permet ainsi la facilitation des courants de ce dernier. De plus, l'éloignement de P2X7 et de CD39 permet une activation accrue du récepteur. Ceci afin d'exacerber le signal inflammatoire.

Chapitre 5 : Partie expérimentale

1. Biologie

Culture cellulaire et transfection

Les cellules HEK293T (ATCC) et BV-2 (don de l'équipe de Rémy Schlichter) ont été cultivées dans le milieu Eagle modifié de Dulbecco supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml (Gibco Life Technologies).

Les cellules trypsinées ont été étalées sur des lamelles de 9 ou 18 mm No. 1.5H (Marienfeld) dans des plaques 12 puits pour les expériences de fluorescences, ou dans des boîtes de Petri de 100 mm pour les expériences biochimiques, dans les deux cas pré-traités avec de la poly-L-lysine (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Les cellules ont été incubées à 37 °C en présence de 5 % de CO₂.

Les lamelles utilisées pour les expériences de microscopies confocales et dSTORM ont été nettoyées avec une solution piranha (H₂SO₄ : H₂O₂ 30 %, 3 : 1) à 60 °C pendant 2 h et stérilisées avec une lampe UV 20W pendant 1 h.

Les transfections ont été conduites suivant la méthode de précipitation au phosphate de calcium²⁴³. L'ADNc codant le gène de la protéine indiquée est contenu dans le plasmide pcDNA3.1(+) (Invitrogen). Pour les expériences biochimiques, chaque boîte de Petri a été transfectée avec 10 µg d'ADNc codant pour P2X7-myc. Pour les expériences de fluorescences, les cellules ont été transfectées avec 1 µg de la protéine indiquée contenue dans le construit. Les cellules ont été lavées après un jour de transfection avec du PBS et le milieu est remplacé.

Electrophysiologie Patch-Clamp

Les enregistrements en cellules entières ont été effectués 24 h suivant la transfection. Les pipettes de patch ont été tirées à partir de capillaire de borosilicate (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) et microforgées pour atteindre des résistances entre 3 – 5 MΩ. Le pH a été vérifié pour toutes les solutions et ajusté si nécessaire avec une solution de 1 M de NaOH à 7,3. De plus, elles ont été maintenues à environ 300 mOsm.

Lors des expériences, les cellules ont été maintenues à un potentiel de -60 mV à l'aide d'un amplificateur EPC10 (HEK, Reutlingen, Allemagne) et les données ont été enregistrées avec le logiciel PATCHMASTER. Les données ont été acquises à 10 kHz avec un filtre passe-bas à 2,9 Hz. L'application des inhibiteurs a été effectuée par perfusion à l'aide de trois capillaires placés directement au-dessus de la cellule. Ces dernières ont été déplacées grâce au système SF-77B Perfusion Fast Step (Warner), garantissant l'échange de solution en 5 – 10 ms. La solution extracellulaire (utilisée aussi pour le lavage) contient 140 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0,1 mM MgCl₂, 10 mM

HEPES, 10 mM Glucose. La solution intra-pipette est composée de 140 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA et 10 mM HEPES.

Le BzATP (sel de triéthylammonium ; Alomone Lab), AZ10606120 (dihydrochlorure ; Tocris) et LNASAB ont été solubilisés dans la solution extracellulaire. Les solutions initialement contenues dans le DMSO ont été diluées pour atteindre une concentration de travail < 0,1 % de DMSO. Due à la facilitation de P2X₇, une seule cellule a été patchée par lamelles.

Pull Down, SDS-PAGE et Western blot

Les cellules sont lysées par incubation après 3 lavages au PBS+ (PBS supplémenté avec 1 mM MgCl₂ et 0,4 mM CaCl₂, pH ajusté à 7,4) avec une douce incubation de 80 min à 4 °C avec un tampon de lyse contenant 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 % Triton-X, 5 mM EDTA, tablette d'inhibiteur de protéase (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA). Après 10 min de centrifugation à 14 000 rpm, le supernatant est collecté. Les échantillons de lysats cellulaires sont collectés à cette étape. Les lysats sont resuspendus dans un tampon de charge NuPage LDS (Thermo Fischer) et 70 mM de DTT et bouilli pendant 10 min. Le supernatant est chargé sur un gel NuPage Novex Bis-Tris 4 % - 12 % (Thermo Fischer) et migré dans un tampon MOPS. Le transfert sur membrane de nitrocellulose a été effectué avec un système TransBlot Turbo (BioRad) and la membrane a été bloquée 30 min dans le TPBS (PBS supplémenté de lait en poudre 1 %, 0,5 % de BSA et 0,05 % de Tween-20). La membrane a été incubée une nuit à 4 °C dans le TPBS contenant un anticorps anti-c-myc avec une dilution 1 : 500 (Invitrogen, Thermo Fischer, référence 13-2500) un anticorps anti-P2X₇ avec une dilution 1 : 500 (Alomone, référence APR-008), un anticorps anti-β-actine avec une dilution 1 : 5000 (Sigma Aldrich, référence A5441) ou la streptavidine-HRP 1 : 5000 (Invitrogen, Thermo Fischer, référence SA-10001). Trois lavages avec le TPBS ont été effectués avant une seconde incubation avec un anticorps de mouton conjugué à l'HRP (excepté pour la streptavidine) dirigé contre la souris (anticorps anti-c-myc et anti-β-actine, GE Life Sciences, référence NA9310) ou un anticorps de chèvre dirigé contre le lapin (anticorps anti-P2X₇, Invitrogen référence 31460), les deux dilués à 1 : 10000 pendant 2 h à 20 °C. Trois lavages au TPBS précèdent la révélation avec le réactif Amersham ECL Select Western Blotting Detection (GE Life Sciences). La chemoluminescence a été mesurée avec un Imager 600, Amersham.

Pour les expériences de Pull Down, une résine de NeutrAvidine-agarose (Thermo Fischer, référence 29,200) a été ajoutée aux lysats cellulaires qui sont alors incubés une nuit

à 4 °C sous agitation douce. Les échantillons ont alors été préparés selon le protocole décrit plus haut.

Cytochimie

Les cellules transfectées ou non ont été fixées 24 h après transfection avec 4 % PFA (PBS, 4 % paraformaldéhyde, pH 8,0). Pendant 15 minutes à 20 °C. Les lamelles ont alors été lavées 3 fois avec du PBS, suivi de 3 lavages de 10 minutes au PBS. Les aldéhydes réactifs sont neutralisés avec une incubation de 15 min de PBS 100mM glycine, contenant 4 µg/ml de Hoescht 33342 afin de marquer les noyaux. Après 3 lavages PBS, les lamelles sont montées sur lame avec un réactif de montage (Prolong Gold antifade, P36930, Invitrogen) et laissées sécher une nuit avant imagerie.

Pour l'imagerie dSTORM, les lamelles sont montées sur un milieu Vectashield® (Antifade, Vector Laboratories, référence H-1000) : 50mM TRIS-glycérol (obtenu par la dilution de 5 % v/v TRIS pH8 dans le glycérol suivi d'une filtration sur filtre de 0,22 µm) 1 : 3 conservé à 4 °C sous argon. Le montage est scellé par une colle dentaire double composante (voir ²⁴⁴).

Microscopie à fluorescence

La fluorescence à champ large a été mesurée avec un Leica FW400 (objectif 40x, N.A. 0,75, HCX PL APO à air) 24 h post-transfection. Les lamelles ont été lavées 3 x au PBS et les cellules ont été incubées dans une solution extracellulaire contenant 140 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, pH ajusté 7.32–7.33.

L'imagerie confocale a été effectuée avec un Leica SPE (objectif 63x, N.A. 1,4 HCX PL APO CS à immersion d'huile). Les longueurs d'onde d'excitation (λ_{exc}) et d'émission (λ_{em}) ont été : Hoechst (λ_{exc} = 364 nm; λ_{em} = 430–481 nm), GFP (λ_{exc} = 495 nm; λ_{em} = 500–600 nm) mScarlet (λ_{exc} = 561 nm; λ_{em} = 648–708 nm), et Alexa Fluor 647 (λ_{exc} 647 ; λ_{em} = 657 – 750 nm).

L'imagerie super-résolutive dSTORM a été effectué sur un système construit basé sur un statif Nikon Eclipse Ti équipé d'un objectif 100x (N.A. 1,49 à immersion d'huile). Une ligne laser à 642 nm a été utilisée pour exciter l'Alexa Fluor 647, réglée à une puissance de 134 mW (résultant en une intensité de 5,2 kW/cm²). L'échantillon a été imagé avec une caméra EM-CCD refroidie à -60 °C. (Détails ²⁴⁵).

Analyse des données et statistiques

Les données de microscopie ont été mesurées avec Fiji (version 1.0).

Les piles d'images (10000-20000 image) obtenues par microscopie dSTORM ont été analysées avec le plug-in ThunderSTORM sur Fiji. Les paramètres suivants ont été utilisés : image filtering – Difference-of-Gaussians filter (sigma 1=1.0 and sigma 2 = 1.6); approximate localization of molecules – Local maximum (peak intensity threshold: std(Wave.F1), connectivity: 8-neighbourhood); sub-pixel localization of molecules – Integrated Gaussian (fitting radius: 4 px, fitting method: Least squares, initial sigma: 1.3 px. Les résultats obtenus ont été filtrés par les valeurs de sigma et d'intensité ($110 \text{ nm} < \text{sigma} < 220 \text{ nm}$, intensité < 2000).

Les données ont été analysées avec des scripts R (RStudio, version 1.4.1717) écrits individuellement pour chaque expérience. Une partie des courbes de tendance ont été produites avec Igor Pro (version 6,37). Les valeurs exactes sont montrées par des points dans chaque représentation graphique des données.

Pour les analyses statistiques, la normalité des distributions a été testée avant la sélection du test de Student. Dans le cas contraire, le test de Mann-Withney a été sélectionné. Une p-valeur $< 0,05$ a été considéré comme une différence significative.

Modélisation moléculaire

La structure du récepteur P2X7 a été récupérée sur la PDB (code 5U1W). L'ensemble des docking ont été effectués avec AutoDock Vina 1.5.6. Les rounds ont été effectué avec une boîte de $30 \text{ \AA}$ centrée sur la quinoline du composé AZ10606120, définie avant de supprimer ce dernier du modèle. La fonction de « scoring » d'Autodock Vina a été utilisée pour sélectionner les meilleurs candidats.

2. Synthèse organique

Toutes les manipulations de composés sensibles à la lumière (réactions et purifications) ont été conduites dans une chambre noire éclairée avec un projecteur RGB LED MEIKEE (25 W) réglée sur une lumière rouge (650 nm).

Les réactifs et les solvants anhydres utilisés pour la synthèse ont été achetés chez Sigma-Aldrich, TCI EUROPE, ACROS Organics ou Alfa Aesar. Tous les réactifs commerciaux ont été utilisés dans purification supplémentaire, à l'exception du dichlorométhane (distillé sur CaH_2 sous atmosphère d'argon) et du THF (distillé sur sodium/benzophénone sous atmosphère d'argon) avant usage.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à 400, 500 ou 700 MHz sur les spectromètres RMN 400 MHz Bruker Avance III, 500 MHz Bruker Avance III et 700 MHz Bruker équipés d'une cryosonde TCI Z-gradient sur une console Avance III-HD, respectivement. Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en ppm en respect du signal résiduel du solvant (CDCl_3 : 7,26 ppm, MeOD: 3,33 ppm, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$: 2,50 pour la RMN ^1H et CDCl_3 : 77,16 ppm, MeOD: 49 ppm, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$: 39,52 ppm pour la RMN ^{13}C . Les attributions sont données de la manière suivante : Déplacement chimique suivant par, entre parenthèses : (s, b, d, t, q, m, dd correspondants respectivement à singulet, signal large, doublet, triplet, quadruplet, multiplet et doublet de doublets), constante de couplage en Hz et nombre de protons. Les rendements sont exprimés par η .

Les spectres de LCMS ont été enregistrés sur un spectromètre Agilent 1200 SI/QTOF 6520 couplé à Hypersil Golf C18 1,9 μm (taille de particules) de dimension 1 x 3 mm. Les spectres ESI ont été enregistrés sur un spectromètre Agilent 1200 SL MicroTOF (Bruker) équipé d'une source d'électrospray.

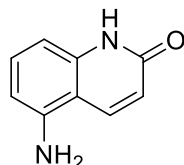
Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur une plaque d'aluminium couvert d'un gel de silice Merck 60 F254. Les chromatographies ont été réalisées avec un gel de silice Merck (230-400 mesh ; 0,040-0,063 mm).

Les analyses HPLC ont été réalisées sur un système de chromatographie à haute performance Waters[®] (pompe Waters 15252 avec un détecteur Waters 2996) équipé d'une colonne analytique Betbasics 5-microns (4,6, 250 nm). Les analyses ont été effectuées avec un gradient commençant à 100 % H_2O (0,1 % TFA) et atteignant 100 % d'acétonitrile en 30 minutes. Les purifications HPLC ont été réalisées sur une série de systèmes de chromatographie à haute performance Waters (double corps Waters 600 avec un détecteur Waters 2996) équipée d'une colonne Thermo Betabasics 5-microns (10, 250 nm). Les purifications HPLC ont été faites selon le gradient ou l'isocratique indiqué.

1. Synthèse des ligands catalytiques

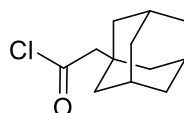
Synthèse du ligand alcyne 6

5-aminoquinolin-2(1*H*)-one (1) :

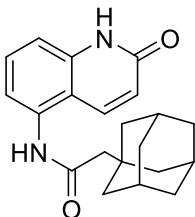


Dans un ballon anhydre de 100 ml sous argon, 1 g de 5-nitroquinolin-2(1*H*)-one (5,26 mmol, 1 eq.) est dissous dans 40 ml de N,N-diméthylformamide (DMF) anhydre. La solution est gelée à -196 °C et 448 mg de palladium(0) sur charbon actif (10 %) sec est ajouté (4,21 mmol, 0,8 eq.). La solution est laissée remonter à température ambiante et du dihydrogène gazeux est bullé pendant 5 minutes dans la solution. La réaction est placée sous agitation magnétique pendant 16 h. Le brut est alors filtré sur un pad de célite. Ce dernier est rincé avec 100 ml de DMF. Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite pour obtenir 825 mg d'un solide blanc/gris. $\eta = 98 \%$. RMN ^1H (400 MHz, MeOD) : δ 8.19 (dd, $J = 9.7, 0.8$ Hz, 1H), 7.28 – 7.24 (m, 1H), 6.63 (dt, $J = 8.1, 0.9$ Hz, 1H), 6.55 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H), 6.47 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H).

Chlorure 2-(1-adamantyl)acétyle (2) :



Dans un ballon anhydre de 50 ml sous argon est placé 1,1 g d'acide 2-(1-adamantyl)acétique (5,67 mmol, 1eq.). 10 ml de chlorure de thionyle est ajouté et la solution est mise à reflux sous argon et agitation magnétique pendant 3 h. Le ballon est évaporé à sec pour obtenir 1,2 g d'une huile jaune translucide. $\eta = 100 \%$. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 2.69 (s, 2H), 1.99 (m, $J = 3.3$ Hz, 3H), 1.68 (m, 12H).

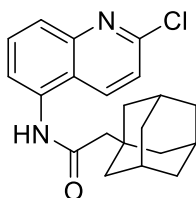
2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-*N*-(2-oxo-1,2-dihydroquinolin-5-yl)acétamide (3) :

Dans un ballon anhydre de 50 ml, 825 mg de 5-aminoquinolin-2(1H)-one (5,15 mmol, 1 eq.) sont dissous par 15 ml de tétrahydrofurane (THF) fraîchement distillé. 1,11 ml de triéthylamine (8,24 mmol, 1,6 eq.) anhydre est ajouté. La solution est refroidie à 0 °C et 1,2 g de chlorure 2-(1-adamantyl)acétyle (5,67 mmol, 1,1 eq.) dissous dans 5 ml de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte sur 15 minutes pour former une solution laiteuse grisâtre. La réaction est placée sous agitation magnétique sous argon à 0 °C pendant 1 h puis à 20 °C pour 2 h. Le brut est évaporé sous vide et rincé avec 3 x 50 ml de dichlorométhane. Après séchage, le produit est obtenu sous forme d'un solide gris (1,4 g). $\eta = 81\%$.

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) : δ 8.06 (dd, $J = 9.8, 0.8$ Hz, 1H), 7.58 – 7.54 (m, 1H), 7.33 (dd, $J = 7.8, 1.1$ Hz, 1H), 7.26 (m, 1H), 6.65 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 2.26 (s, 2H), 2.03 (m, 3H), 1.86 – 1.70 (m, 12H).

RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO) : δ 170.16, 162.06, 140.18, 136.16, 135.34, 130.69, 121.50, 118.12, 113.65, 112.41, 67.49, 50.63, 42.61, 36.91, 33.21, 28.54.

MS (ESI) : m/z $[\text{M}^+]$ calculé pour $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2^+$: 337,1911, trouvé : 337,1921.

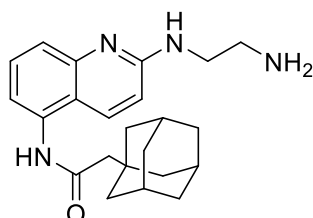
2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-*N*-(2-chloroquinolin-5-yl)acétamide (4) :

Dans un ballon anhydre sous argon de 50 ml est dissous 725 mg de 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-*N*-(2-oxo-1,2-dihydroquinolin-5-yl)acétamide 3 (2,15 mmol, 1eq.) dans 10 ml de 1,2-dichloroéthane distillé. 618 μL de POCl_3 (6,45 mmol, 3 eq.) rendus anhydre par distillation fractionnée sur colonne de Vigreux est ajouté et la solution est portée à reflux sous agitation magnétique et sous argon. Une couleur orange apparaît

et la solution est placée 16 h dans ces conditions. Le solvant est ensuite évaporé et le brut réactionnel est repris dans 20 ml de dichlorométhane. La solution ainsi obtenue est filtrée avec 3 x 50 ml de dichlorométhane et le filtrat est évaporé à sec pour obtenir un solide jaune-orange ($m = 760$ mg). $\eta = 99$ %.

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) : δ 8.43 (dd, $J = 8.8, 0.8$ Hz, 1H), 7.87 – 7.79 (m, 2H), 7.72 (dd, $J = 7.2, 1.5$ Hz, 1H), 7.59 – 7.55 (m, 1H), 2.30 (s, 2H), 2.03 (m, 3H), 1.86 – 1.72 (m, 12H).

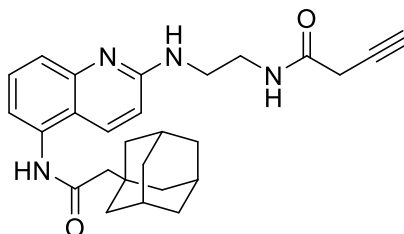
2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-N-(2-((2-aminoethyl)amino)quinolin-5-yl)acétamide (5) :



Dans un ballon anhydre sous argon de 50 ml, 488 mg de 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-N-(2-chloroquinolin-5-yl)acétamide 4 (1,36 mmol, 1 eq.) et 376 mg de K_2CO_3 (2,72 mmol, 2 eq.) sec sont dissous dans 10 ml d'éthanol séché par distillation fractionnée (colonne de Vigreux) sur CaH. 4,54 ml d'éthylène diamine (68 mmol, 50 eq.), rendu anhydre par agitation 16 h sur tamis moléculaire 4 Å activé au micro-ondes suivi d'une distillation fractionnée sur colonne de Vigreux, est ensuite ajouté à la solution. Le mélange réactionnel est porté à reflux. Après 48 h le solvant est évaporé et repris dans 50 ml d'eau. Le brut est extrait avec 3 x 50 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec 25 ml de saumure, séchées pas MgSO_4 anhydre, filtrée et évaporée. Le brut est ensuite dissous dans un minimum de dichlorométhane et de l'éther diéthylique est ajouté goutte à goutte jusqu'à l'apparition d'une opalescence. Un ajout lent d'heptane fait alors précipiter le produit pur sous forme de solide jaunâtre ($m = 262$ mg). $\eta = 51$ %.

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) : δ 7.96 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.56 – 7.46 (m, 2H), 7.23 (dd, $J = 7.2, 1.4$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.57 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.91 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.25 (s, 2H), 2.03 (m, 3H), 1.87 – 1.68 (m, 12H).

2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-*N*-(2-((2-(but-3-yn-1-ylamino)ethyl)amino)quinolin-5-yl)acétamide (6) :



Dans un ballon anhydre sous argon de 50 ml, 60 mg de 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-*N*-(2-((2-aminoethyl)amino)quinolin-5-yl)acétamide 5 (158,5 μmol , 1 eq.) est dissous dans 2 ml de DMF anhydre. 19,96 mg d'acide but-3-ynoïque (237,7 μmol , 1,5 eq.) ainsi que 70 μl de *N,N*-Diisopropyléthylamine (DIEA, 412,1 μmol , 2,6 eq.) sont ajoutés et la solution est refroidie à 0 °C. 37 μl de *N,N'*-Diisopropylcarbodiimide (237,7 μmol , 1,5 eq.) est ajouté et la solution est mise 2 h à 0 °C sous agitation magnétique et sous argon avant de la placer remonter à 20 °C pour 16 h. La réaction est neutralisée par 50 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 10 % et extraite avec 3 x 30 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées avec MgSO_4 anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane : méthanol, 9,9 : 0,1 puis 9,5 : 0,5) pour obtenir un solide jaune ($m = 59 \text{ mg}$). $\eta = 85 \%$.

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.98 (d, $J = 9.3 \text{ Hz}$, 1H), 7.59 – 7.47 (m, 2H), 7.28 – 7.23 (m, 1H), 6.80 (d, $J = 9.3 \text{ Hz}$, 1H), 5.67 (t, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 1H), 5.19 (d, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 2H), 3.66 (d, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 2H), 3.52 (t, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 2H), 2.25 (s, 2H), 2.03 (m, 3H), 1.89 – 1.70 (m, 12H).

MS (ESI) : m/z [M^+] calculé pour $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_2^+$: 445,2598, trouvé : 445,2609.

Synthèse des extrémités oximes

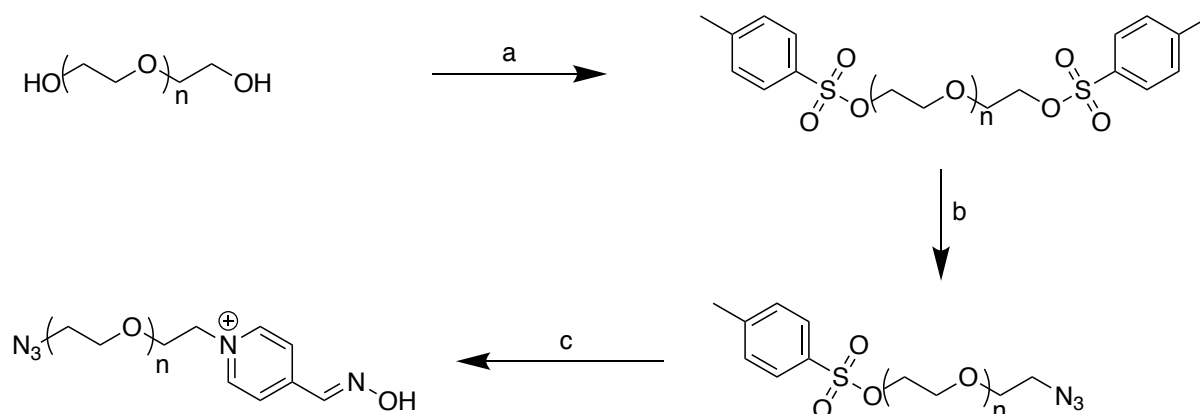


Schéma 27 **Schéma 28** Synthèse des chaînes (poly)éthylène glycol bifonctionnalisées. *Réactifs et conditions* : (a) chlorure de 4-toluènesulfonyle, DMAP, triéthylamine, THF, 0 °C-20 °C, 16 h ; (b) Azoture de sodium, DMF, 70 °C, 16 h ; (c) pyridine-4-aldoxime, acétonitrile, reflux, 48 h.

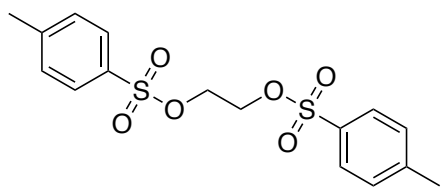
Procédure générale pour (a): L'éthylène glycol ($n = 0, 2, 3$) sec (1 eq.) ainsi qu'une quantité catalytique de DMAP (0,1 eq.) sont dissous dans le THF anhydre. 5 eq. de triéthylamine fraîchement distillé est ajoutée et la solution est refroidie à 0 °C. Le chlorure de 4-toluènesulfonyle (2,2 eq.) dissous dans le THF est ajouté goutte à goutte et la solution est laissée remonter à 20 °C sous agitation magnétique et sous argon pendant 16 h. Le solvant est évaporé et 100 ml d'un mélange dichlorométhane : H₂O 1 : 1 est ajouté au résidu. Les phases sont extraites avec 2 x 50 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse d'HCl (5 %) suivi d'une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique est ensuite séchée avec MgSO₄ anhydre, filtrée et évaporée à sec.

Procédure générale pour (b)

Le produit bis-tosylé (5 eq.) est dissous dans la DMF. L'azoture de sodium (1 eq.) est ajouté par petite portion et la solution est chauffée à 75 °C sous agitation magnétique et sous argon pendant 16 h. La solution est filtrée, et de l'eau est ajoutée au filtrat. Ce dernier est extrait trois fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées avec MgSO₄ anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice.

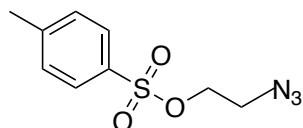
Procédure générale pour (c)

Le dérivé tosylé sec (1 eq.) est dissous dans l'acétonitrile distillé. 2eq. de pyridine-4-aldoxime est ajouté et la solution est portée à reflux pendant 48 h. Le brut réactionnel est ensuite évaporé et de l'acétate d'éthyle est ajouté au résidu. Le mélange est soniqué 3 x en éliminant le surnageant à chaque étape.

Ethane-1,2-diyl bis(4-methylbenzenesulfonate)

Ce composé a été synthétisé par la réaction entre l'éthylène glycol (200 mg, 1,88 mmol) et le chlorure de 4-toluènesulfonyl (788 mg, 4,14 mmol) selon la procédure générale pour (a).

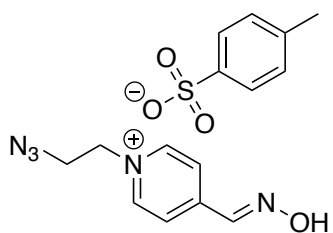
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.73 – 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.28 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 4.16 (s, 4H), 2.35 (s, 6H).

2-azidoethyl 4-methylbenzenesulfonate

Ce composé a été synthétisé par la réaction entre l'éthane-1,2-diyl bis(4-methylbenzenesulfonate) et l'azoture de sodium selon la procédure générale pour (b). Le produit brut a été purifié par

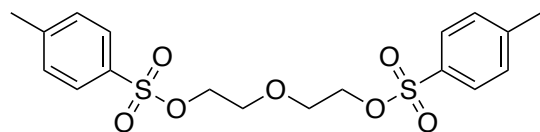
chromatographie sur gel de silice (heptane : acétate d'éthyle, 9 : 1).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.78 – 7.70 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.65 – 3.61 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.29 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H).

1-(2-azidoethyl)-4-(nitrosomethyl)pyridin-1-ium (9)

Ce composé a été synthétisé par la réaction entre 2-azidoethyl 4-methylbenzenesulfonate (500 mg, 2,072 mmol) et la pyridine-4-aldoxime (506 mg, 4,14 mmol) selon la procédure générale décrite pour (c).

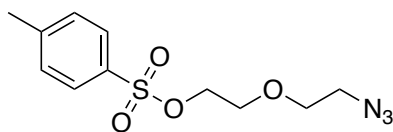
RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ 8.93 – 8.87 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.27 – 8.22 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.12 (s, 1H), 7.74 – 7.70 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.28 – 7.22 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.77 – 4.69 (m, 2H), 4.06 – 3.99 (m, 2H), 2.39 (s, 3H).

Oxybis(ethane-2,1-diyl) bis(4-methylbenzenesulfonate)

Ce composé a été synthétisé par la réaction entre le diéthylène glycol (1 g, 9,42 mmol) et le chlorure de 4-toluènesulfonyl (3,95 gr,

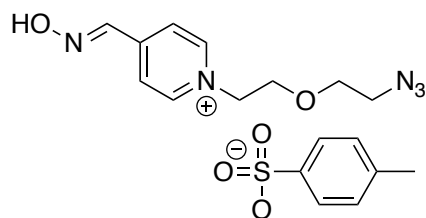
20,73 mmol) selon la procédure générale pour (a). Produit obtenu sous forme de solide blanchâtre (*m* = 3,55 gr). *η* = 91 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.71 – 7.66 (d, *J* = 8.1 Hz, 4H), 7.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 4H), 4.02 – 3.96 (m, 4H), 3.54 – 3.48 (m, 4H), 2.35 (s, 6H).

2-(2-(2-azidoethoxy)éthyle 4-methylbenzenesulfonate

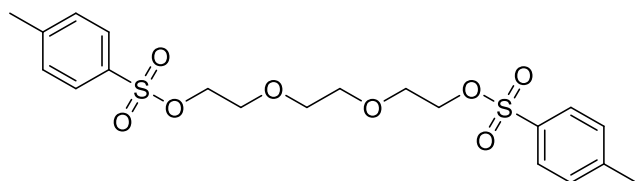
Ce composé a été synthétisé par la réaction entre l'oxybis(ethane-2,1-diyl) bis(4-methylbenzenesulfonate) (2,07 gr, 5 mmol) et l'azoture de sodium (65 mg, 1 mmol) selon la procédure générale pour (b). Le produit a été purifié par chromatographie sur gel de silice (heptane : acétate d'éthyle, 8 : 2). Un solide blanc est obtenu ($m = 236$ mg). $\eta = 83$ %.

NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.73 – 7.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.10 – 4.04 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 3.62 – 3.58 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 3.50 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.22 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H).

(*E*)-1-(2-(2-azidoethoxy)ethyl)-4-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium**(10)**

Ce composé a été synthétisé par la réaction du 2-(2-azidoethoxy)éthyle 4-methylbenzenesulfonate (167 mg, 0,58 mmol) et de la pyridine-4-aldoxime (142 mg, 1,17 mmol) selon la procédure générale pour (c). Le produit pur est obtenu sous forme d'huile jaune-orange ($m = 236$ mg). $\eta = 100$ %.

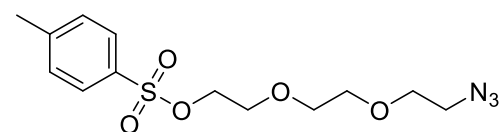
RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ 8.90 – 8.84 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 8.31 (s, 1H), 8.23 – 8.16 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 7.73 – 7.68 (m, 2H), 7.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.82 – 4.76 (m, 2H), 4.04 – 3.94 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.66 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.35 (m, 2H), 2.38 (s, 3H).

(ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl) bis(4-methylbenzenesulfonate)

Ce composé a été synthétisé par la réaction du triéthylène glycol (5 g, 33,29 mmol) et le chlorure de 4-toluènesulfonyl (13,96 g, 73,26 mmol) selon la procédure générale pour (a).

Produit obtenu sous forme de solide blanc ($m = 14,03$ g). $\eta = 92$ %.

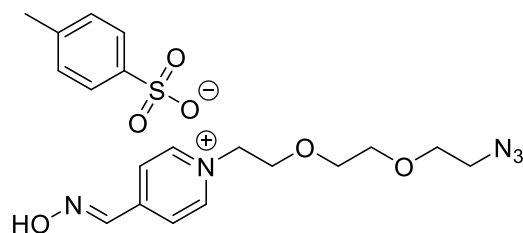
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.72 – 7.67 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H), 7.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H), 4.10 – 3.98 (m, 4H), 3.52 – 3.41 (m, 8H), 2.34 (s, 6H).

2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)éthyle 4-methylbenzenesulfonate

Ce composé a été synthétisé par la réaction de l'ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl) bis(4-methylbenzenesulfonate) (3,07 g, 10,08 mmol) et de l'azoture de sodium (131,06, 2,02 mmol), selon la procédure générale pour (b). Produit obtenu sous forme d'huile jaune ($m = 572$ mg). $\eta = 86$ %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.73 – 7.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.29 – 7.22 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.06 (m, 2H), 3.62 – 3.47 (m, 8H), 3.26 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H).

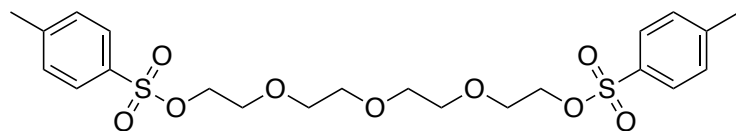
(E)-1-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)-4-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium (11)



Ce composé a été synthétisé par la réaction du 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)éthyle 4-méthylbenzenesulfonate (500 mg, 1,518 mmol) et de la pyridine-4-aldoxime (371 mg, 3,03 mmol) selon la procédure générale pour (c). Le produit pur est obtenu sous forme d'huile jaune-orange ($m = 678$ mg). $\eta = 99$ %.

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) : δ 8.91 – 8.86 (m, 2H), 8.33 (s, 1H), 8.24 – 8.18 (m, 2H), 7.74 – 7.69 (m, 2H), 7.28 – 7.21 (m, 2H), 4.80 – 4.73 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.00 – 3.96 (m, 2H), 3.68 – 3.57 (m, 6H), 3.35 (m, 2H), 2.39 (s, 3H).

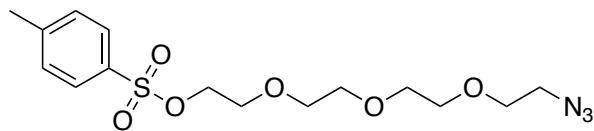
(ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl) bis(4-méthylbenzenesulfonate)



Ce composé a été synthétisé par la réaction du tétraéthylène glycol (4 g, 20,59 mmol) et du chlorure de 4-toluènesulfonyl (8,64 g, 45,30 mmol) selon la procédure générale pour (a). $\eta = 90$ %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.74 – 7.64 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H), 7.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H), 4.10 – 4.01 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H), 3.60 – 3.54 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H), 3.53 – 3.41 (m, 8H), 2.34 (s, 6H).

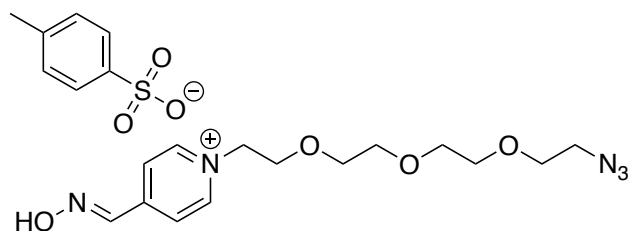
2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)éthyle 4-méthylbenzenesulfonate



Ce composé a été synthétisé par la réaction du ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl) bis(4-méthylbenzenesulfonate) (5,32 g, 10,57 mmol) avec de l'azoture de sodium (137 mg, 2,11 mmol) selon la procédure générale pour (b). Le produit a été purifié par chromatographie sur gel de silice (heptane : acétate d'éthyle, 4 : 1 puis 1 : 1). Un solide blanc est obtenu ($m = 733$ mg). $\eta = 93$ %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.75 – 7.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.11 – 4.07 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.64 – 3.50 (m, 14H), 2.39 (s, 3H).

(*E*)-1-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium (12)



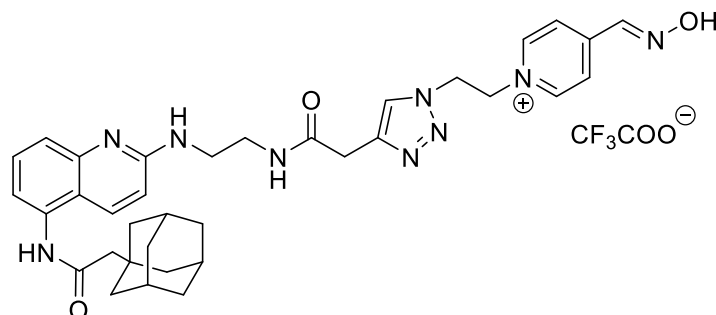
Ce composé a été synthétisé par la réaction du 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)éthyle 4-méthylbenzenesulfonate (733 mg, 1,96 mmol) et de la pyridine-4-aldoxime

(0,48 g, 3,92 mmol) selon la procédure générale pour (c). Le produit pur est obtenu sous forme d'huile jaune-orange ($m = 961$ mg). $\eta = 99$ %.

NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.90 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 8.11 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 7.74 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 4.77 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H), 3.83 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H), 3.62 – 3.45 (m, 10H), 3.31 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 2.32 (s, 3H).

Synthèse du ligand LPeg0P et LPeg7P :

1-(2-(4-(2-((2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)-4-((*E*)-(hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium (13, LPeg0P) :



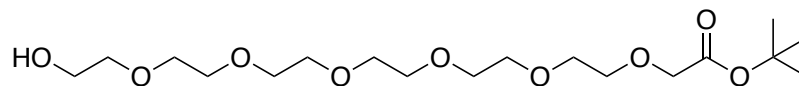
Dans un ballon anhydre sous argon a été placé 17 mg de 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-*N*-(2-((2-(but-3-yn-1-ylamino)ethyl)amino)quinolin-5-yl)acétamide 6 (0,04 mmol, 1 eq.) dissous dans 1 ml de DMF anhydre. 16,7 mg de (*E*)-1-(2-azidoethyl)-4-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium 9 (0,46 mmol, 1,2 eq.) est ajouté, suivi de 24,5 mg de ligand triazole TTMA (0,06 mmol, 1,48 eq.) et de 33,7 mg d'acide ascorbique (19,12 mmol, 5 eq.). L'oxygène est enlevé du milieu par 7 cycles de gel-pompe-dégel. 21,3 mg d'hexafluorophosphate de tetrakis(acetonitrile)cuivre(I) est ensuite ajouté sur la solution gelée et le ballon est mis sous un vide poussé avant d'être mis sous argon et laissée remonter à température ambiante. La réaction est alors chauffée à 50 °C pendant

72 h sous agitation magnétique et sous argon. Après évaporation du solvant, 20 ml d'H₂O : acétate d'éthyle, 1 : 1 est ajouté et la phase organique est extraite avec 2 x 10 ml d'acétate d'éthyle. Les fractions organiques sont rassemblées et évaporées à sec. Le produit est purifié par HPLC (gradient acétonitrile : H₂O TFA (0,1 %) : 0 : 1 à 1 : 0 pendant 30 min) et lyophilisé pour être obtenu sous forme d'un solide orangé. (m = 1 mg), η = 4 %.

MS (ESI) : m/z [M+H]²⁺ calculé pour C₃₅H₄₃N₉O₃₂²⁺ : 318,6739, trouvé 318,6746

Synthèse de LPeg7P

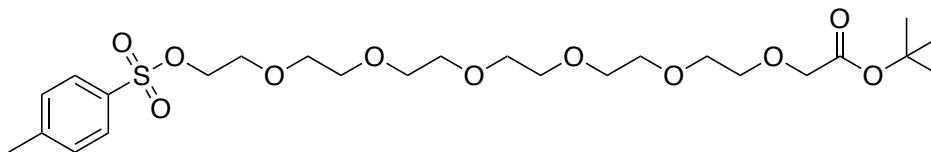
Tert-butyle 20-hydroxy-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosanoate (21) :



Dans un ballon de 50 ml est placé 1 g d'hexaéthylène glycol (3,54 mmol, 1 eq.). Le ballon est mis sous vide et chauffé 1 h à 100 °C sous agitation magnétique. Le ballon est ensuite refroidi à 0 °C et 15 ml de DMF est ajouté suivi de 93,5 mg d'hydruide de sodium (3,90 mmol, 1,1 eq.). La solution est portée à 75 °C pendant 2 h, jusqu'à ce que le dégagement gazeux cesse. Le milieu réactionnel est alors refroidi à 0 °C et 523 μ l de *tert*-butyle bromoacetate est ajouté goutte à goutte pendant 10 minutes. La réaction est alors placée à 20 °C sous agitation magnétique et sous argon pendant 18 h. La réaction est neutralisée avec 50 ml d'H₂O et extraite avec 3 x 50 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sous MgSO₄ anhydre et évaporées à sec. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient de dichlorométhane : méthanol, 1 : 0 à 0,94 : 0,06) pour obtenir une huile jaune (m = 181 mg). η = 13 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 3.97 (s, 2H), 3.68 – 3.59 (m, 24H), 1.42 (s, 9H).

Tert-butyle 20-(tosyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosanoate (22) :

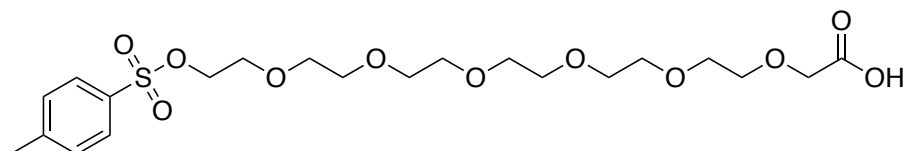


Dans un ballon de 50 ml, 135 mg de *tert*-butyle 20-hydroxy-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosanoate 21 (0,34 mmol, 1 eq.) est coévaporé 3 x avec 10 ml de toluène anhydre. Le

produit est ensuite dissous dans 4 ml de dichlorométhane anhydre, 141 μ l de triéthylamine fraîchement distillée (1,02 mmol, 3 eq.) est ajouté et la solution est refroidie à 0 °C. 97 mg de chlorure de tosyloxy (0,51 mmol, 1,5 eq.) est dissous dans 2 ml de dichlorométhane et est ajouté goutte à goutte à la réaction pendant 10 minutes. La réaction est laissée remonter à température ambiante pendant 16 h sous agitation magnétique et sous argon. La réaction est arrêtée par évaporation du solvant, et 50 ml de dichlorométhane est ajouté au résidu. 50 ml d'H₂O est ajouté et la phase organique est extraite avec 2 x 50 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées, lavées avec 50 ml de saumure, séchées sous MgSO₄ anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient dichlorométhane : méthanol, 1 : 0 à 0,9 : 0,1) pour obtenir une huile jaune (m = 52 mg). η = 28 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81 – 7.76 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.35 – 7.30 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.17 – 4.12 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.73 – 3.58 (m, 22H), 2.43 (s, 3H), 1.46 (s, 9H).

Acide 20-(tosyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosanoïque (23) :

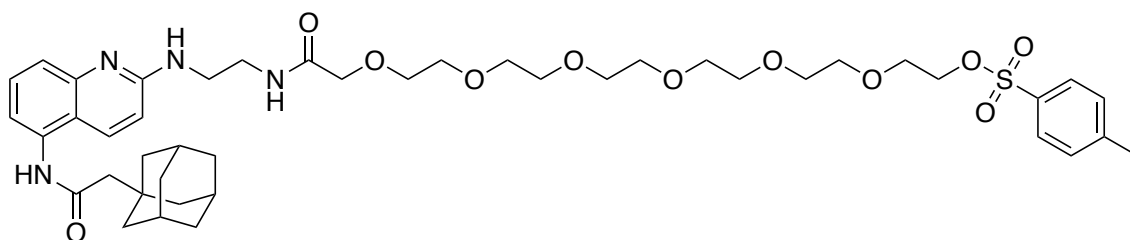


Dans un ballon de 25 ml anhydre sous argon, 25 mg de tert-butyle 20-(tosyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosanoate 22 (45 μ mol, 1 eq.) est dissous dans 300 μ l de dichlorométhane anhydre. 51 μ l de TFA (6,67 mmol, 15 eq.) est ajouté et la réaction est placée sous agitation magnétique et sous argon à 20 °C pendant 2h. Après évaporation du solvant, le produit pur est obtenu sous forme d'huile orange (m = 22 mg). η = 100 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.82 – 7.75 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.15 (m, 4H), 3.78 – 3.55 (m, 24H), 2.35 (s, 3H).

NMR ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 171.95, 144.81, 133.03, 129.84, 127.98, 71.30, 70.68, 70.59, 70.47, 70.43, 70.40, 70.32, 70.26, 69.26, 69.04, 68.66, 21.63.

1-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)-4-oxo-6,9,12,15,18,21-hexaoxa-3-azatricosan-23-yl 4-methylbenzenesulfonate (24) :



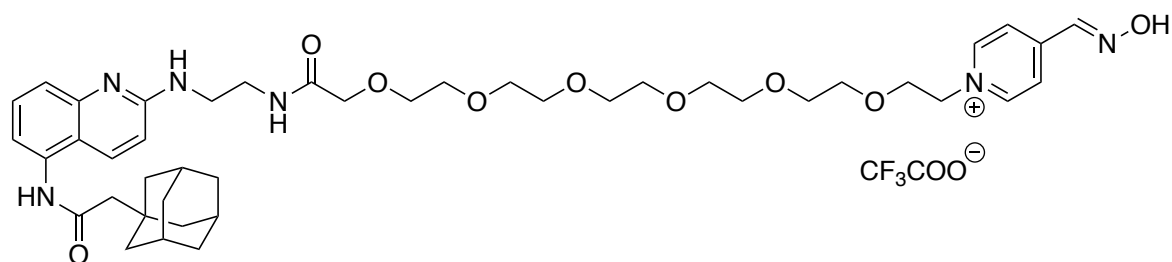
Dans un ballon de 10 ml anhydre sous argon contenant 1 ml de THF anhydre est placé 17 mg d'acide 20-(tosyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosanoïque 23 (34 μmol , 1 eq.), 14 mg de 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-*N*-(2-((2-aminoethyl)amino)quinolin-5-yl)acétamide (37 μmol , 1,1 eq.) ainsi que 7 μl de *N*-méthylmorpholine (69 μmol , 2 eq.). Ensuite, 14 mg de DMTMM (51 μmol , 1,5 eq.) est ajouté et la réaction est mise sous agitation magnétique et sous argon pendant 16 h. Une fois la réaction terminée, 20 ml d' H_2O est ajouté et le produit est extrait avec 3 x 20 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le produit est purifié sur chromatographie flash à phase inverse (gradient acétonitrile : H_2O (0,1 % TFA), 0 : 1 à 1 : 0 pendant 40 min) sous forme d'huile jaune ($m = 16 \text{ mg}$). $\eta = 55 \%$.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.26 (d, $J = 9.7 \text{ Hz}$, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.75 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H), 7.56 (s, 2H), 7.32 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H), 7.04 (d, $J = 9.7 \text{ Hz}$, 1H), 4.11 (t, $J = 4.8 \text{ Hz}$, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.74 – 3.48 (m, 26H), 2.43 (s, 3H), 2.23 (s, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.78 – 1.58 (m, 12H).

RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 145.08, 133.42, 129.88, 127.92, 121.01, 71.03, 70.66, 70.51, 70.45, 70.41, 69.33, 68.63, 42.63, 36.73, 33.41, 29.69, 28.65, 21.62, 14.30.

MS (ESI) : m/z [M^+] calculé pour $\text{C}_{44}\text{H}_{63}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{S}^+$: 856,4209, trouvé 856,4246.

1-(1-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)-4-oxo-6,9,12,15,18,21-hexaoxa-3-azatricosan-23-yl)-4-((*E*)-(hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium (27, LPeg7P) :



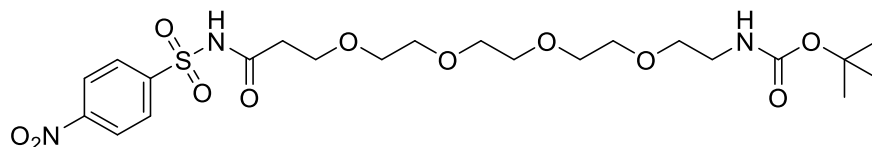
Dans un ballon de 10 ml anhydre, 16 mg de 1-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)-4-oxo-6,9,12,15,18,21-hexaoxa-3-azatricosan-23-yl 4-methylbenzenesulfonate **24** (19 μ mol, 1 eq.) est dissous dans 1 ml d'acétonitrile fraîchement distillé. 5 mg de pyridinium 4-aldoxime (37 μ mol, 2 eq.) est ajouté et la réaction est mise à reflux sous agitation magnétique et sous argon pendant 48 h. Le solvant est évaporé et le brut réactionnel est purifié par HPLC (gradient acétonitrile : H₂O (0,1 % TFA) 3 : 7 à 1 : 1 pendant 15 min) et lyophilisé.

RMN ¹H (500 MHz, MeOD) δ 8.90 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 8.34 (s, 1H), 8.30 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 7.80 (s, 2H), 7.57 – 7.50 (m, 1H), 7.09 (s, 1H), 4.75 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.07 (s, 2H), 4.01 – 3.94 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.75 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.69 – 3.51 (m, 22H), 2.29 (s, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.85 – 1.69 (m, 12H).

MS (ESI) : m/z [M^+]²⁺ calculé pour C₄₄H₆₂N₆O₉²⁺ : 403,2283, trouvé 403,2291.

Synthèse des donneurs d'acyles

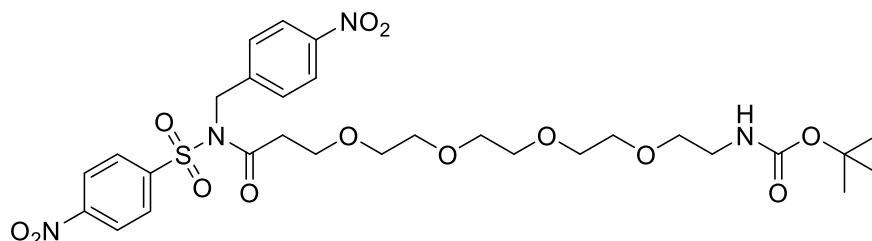
***tert*-butyl (15-((4-nitrophenyl)sulfonamido)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)carbamate (**16**) :**



Dans un ballon anhydre sous argon de 50 ml, 110 mg de 4-nitrobenzenesulfonamide (0,55 mmol, 1 eq.) est dissous dans 5 ml de DMF anhydre. 200 mg de COOH-PEG-Boc (0,55 mmol, 1 eq.) est ajouté suivi de 262 μ l de DIEA (2,73 mmol, 5 eq.) et 20 mg de DMAP (0,16 mmol, 0,3 eq.). La solution est refroidie à 0 °C et 127 mg de 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide (EDC, 0,820 mmol, 1,5 eq.) est ajouté. La réaction est maintenue 2 h à 0 °C et est laissée remonter à température ambiante pendant 16 h sous agitation magnétique et sous argon. Le milieu réactionnel est alors versé dans 100 ml de dichlorométhane et 30 ml d'une solution aqueuse de NaHCO₃ saturé est ajouté. La phase organique extraite est alors lavée avec 30 ml d'une solution aqueuse d'acide citrique (5 %) suivi de 30 ml de saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et évaporée à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane : acétate d'éthyle, 1 : 1) pour obtenir une huile jaune clair (m = 181). η = 60 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.39 – 8.33 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.30 – 8.26 (m, 2H), 3.76 – 3.54 (m, 16H), 3.33 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.56 (m, 2H), 1.44 (s, 9H).

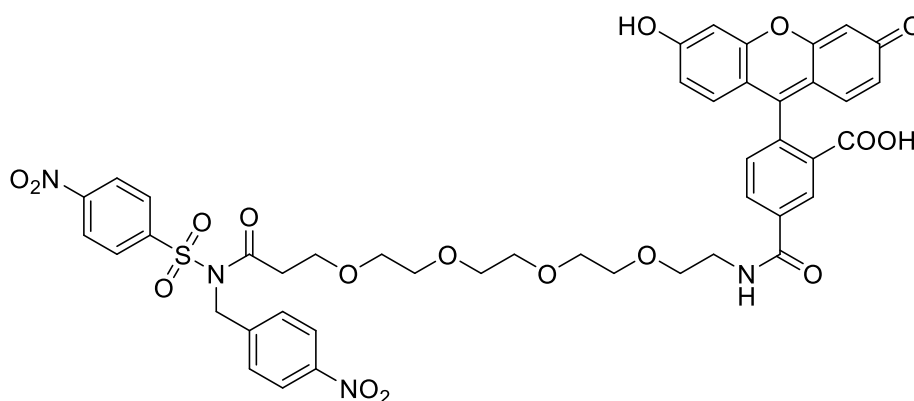
tert-butyl (1-(4-nitrophenyl)-2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-3-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-2-azaheptadecan-17-yl)carbamate (17) :



Dans un ballon anhydre sous argon de 50 ml, 165 mg de tert-butyle (15-((4-nitrophenyl)sulfonamido)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)carbamate 16 (0,30 mmol, 1 eq.) est dissous dans 1 ml de DMF anhydre. 78 mg de bromure de 4-nitrobenzyle (0,36 mmol, 1,2 eq.) est ajouté, suivi de 15 mg d'iodure de potassium (0,09 mmol, 0,3 eq.) et 104 μ l de DIEA (0,6 mmol, 2 eq.). La réaction est placée sous agitation magnétique et sous argon. Après 25 h, le solvant est évaporé, 25 ml de dichlorométhane est ajouté au résidu ainsi que 25 ml de saumure. La phase organique est extraite, séchée sur MgSO_4 anhydre, filtrée et évaporée à sec. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane : heptane, 1 : 1, puis 1 : 0, puis gradient dichlorométhane : acétate d'éthyle de 9 : 1 à 1 : 4) pour obtenir une huile jaune foncé ($m = 134$ mg). $\eta = 65$ %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.42 – 8.37 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.26 – 8.22 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.15 – 8.10 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.59 – 7.53 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.70 – 3.48 (m, 16H), 3.28 (m, 2H), 2.82 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

(9-(2-carboxy-4-((1-(4-nitrophenyl)-2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-3-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-2-azaheptadecan-17-yl)carbamoyl)phényl)-3-oxo-3H-xanthen-6-yl)oxonium (19, NASA-FI) :

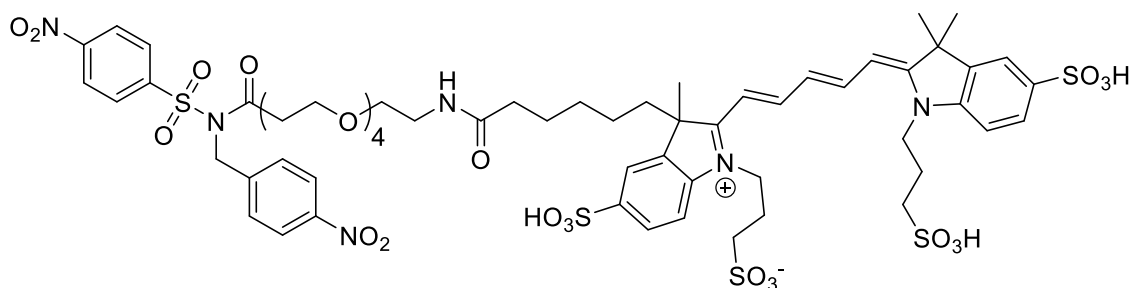


Dans un ballon de 10 ml anhydre sous argon, 7 mg de tert-butyle (1-(4-nitrophenyl)-2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-3-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-2-azaheptadecan-17-yl)carbamate 17 (10 μmol , 1 eq.) est dissous dans 500 μl de dichlorométhane anhydre. 500 μl de TFA est ajouté et la réaction est mise 1 h sous agitation magnétique et sous argon. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est coévaporé 3 x avec 5 ml de toluène. 0,5 ml de DMF anhydre est ajouté au produit pour le dissoudre, suivi de 4 μl de N-méthylmorpholine (35 μmol , 3,5eq.), 4,9 mg de 5-carboxyfluoresceine (13 μmol , 1,3 eq.) et 3,9 mg de DMTMM (14 μmol , 1,4 eq.). La solution est placée 2 h sous agitation magnétique et sous argon. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est purifié par HPLC (gradient acétonitrile : H_2O (0,1 % TFA), 2,5 : 7,5 à 8 : 2 pendant 30 min) et lyophilisé pour obtenir une poudre jaune. ($m = 8 \text{ mg}$). $\eta = 88 \%$.

RMN ^1H (500 MHz, MeOD) : δ 8.46 – 8.41 (m, 3H), 8.26 – 8.20 (m, 5H), 7.62 – 7.58 (m, 2H), 7.31 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H), 6.73 (d, $J = 2.8 \text{ Hz}$, 2H), 6.68 – 6.52 (m, 4H), 5.28 (s, 2H), 3.70 (t, $J = 5.3 \text{ Hz}$, 2H), 3.67 (s, 4H), 3.65 – 3.61 (m, 6H), 3.58 – 3.55 (m, 2H), 3.51 – 3.48 (m, 2H), 3.46 – 3.42 (m, 2H), 2.83 (t, $J = 5.9 \text{ Hz}$, 2H).

MS (ESI) : m/z [M^+] calc. $\text{C}_{45}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{S}^+$: 943,2338, trouvé : 943,2297.

3-(2-((1E,3E)-5-((Z)-3,3-diméthyl-5-sulfo-1-(3-sulfopropyl)indolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3-méthyl-3-(1-(4-nitrophenyl)-2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-3,19-dioxo-6,9,12,15-tetraoxa-2,18-diazatetracosan-24-yl)-5-sulfo-3H-indol-1-ium-1-yl)propane-1-sulfonate (20, NASA-A1647) :



Dans un ballon de 10 ml anhydre sous argon, 3,5 mg de tert-butyle (1-(4-nitrophenyl)-2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-3-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-2-azaheptadecan-17-yl)carbamate (5 μmol , 1,2 eq.) est dissous dans 500 μl de dichlorométhane anhydre. 500 μl de TFA est ajouté et la réaction est placée 1 h sous agitation magnétique et sous argon. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est coévaporé 3 x avec 5 ml de toluène. 0,5 ml de DMF anhydre est ajouté au produit pour le dissoudre, suivi de 1 μl de N-méthylmorpholine (10 μmol , 2,3 eq.), 5 mg d'acide carboxylique d'Alexa Fluor 647 sous forme de sel de tris(triéthylammonium) (4 μmol , 1 eq.) et 2,4 mg de DMTMM (10 μmol , 2

eq.). La solution est laissée 2 h sous agitation magnétique et sous argon. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est purifié par HPLC (gradient acétonitrile : H₂O (0,1 % TFA), 2,5 : 7,5 à 8 : 2 pendant 30 min) et lyophilisé pour obtenir une poudre bleue. (m = 4,7 mg). η = 76 %.

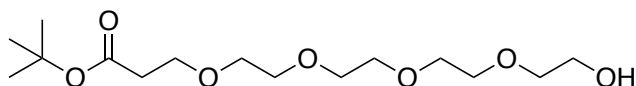
RMN ¹H (500 MHz, DMSO) : δ 11.15 (s, 1H), 8.44 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.40 – 8.24 (m, 6H), 7.77 (d, J = 23.2 Hz, 3H), 7.63 (m, 4H), 7.39 (dd, J = 8.3, 5.0 Hz, 2H), 6.56 (t, J = 12.3 Hz, 1H), 6.45 (t, J = 13.3 Hz, 2H), 5.31 (s, 2H), 4.26 (t, J = 7.8 Hz, 4H), 3.53 – 3.49 (m, 2H), 3.47 – 3.29 (m, 14H), 3.09 (q, i = 5.4 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.70 – 2.59 (m, 4H), 2.37 (s, 1H), 2.14 (s, 1H), 2.01 (q, J = 7.8, 7.4 Hz, 4H), 1.87 (dt, J = 9.7, 4.5 Hz, 2H), 1.67 (d, J = 7.0 Hz, 8H), 1.31 (p, J = 7.5 Hz, 2H), 1.16 – 1.03 (m, 2H), 0.78 (s, 1H), 0.45 (s, 1H).

MS (ESI) : m/z [M⁺] calculé pour C₆₀H₇₇N₆O₂₄S₅⁺ : 1425,3587, trouvé 1425,3526.

Ligand N-acyl-N-cyanomethylsulfonamide

COOH-PEG4-Boc

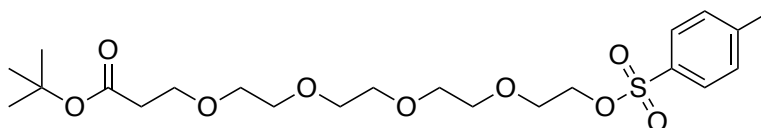
tert-butyl 1-hydroxy-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oate (26) :



Dans un ballon de 250 ml, 17,7 g de tétraéthylène glycol (80,7 mmol, 1 eq.) est coévaporé 3 x avec 20 ml de toluène anhydre. 20 ml de THF anhydre est ajouté suivi de 11,6 ml de *tert*-butyl acrylate (80,7 mmol, 1 eq.). La solution est refroidie à 0 °C et 904 mg de *tert*-butoxide de potassium est ajouté par petite portion. La solution est placée sous agitation magnétique et sous argon à 20 °C pendant 6 h. Le solvant est évaporé et 100 ml de dichlorométhane est ajouté ainsi que 100 ml d'une solution de NaH₂PO₄ 1M aqueux. La phase organique est extraite avec 2 x 50 ml de dichlorométhane, séchée et sur MgSO₄ anhydre, filtrée et concentré *in vacuo*. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle : heptane, 3 : 2 puis 1 : 0) pour obtenir une huile jaune clair (m = 3,7 g). η = 14 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 3.68 – 3.49 (m, 18H), 2.42 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.36 (s, 9H).

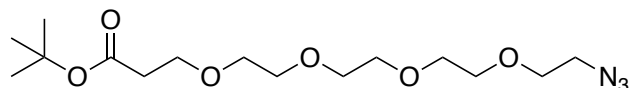
2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (27) :



Dans un ballon de 100 ml, 3,7 g de *tert*-butyl 1-hydroxy-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oate 26 (11,6 mmol, 1 eq.) est coévaporé 3 x avec 20 ml de toluène anhydre. Le produit est dissous dans 15 ml de dichlorométhane et 1,9 ml de triéthylamine anhydre (13,9 mmol, 1,2 eq.) est ajouté. La solution est refroidie à 0°C et 2,4 g de chlorure de tosylate (12,8 mmol, 1,1 eq.) dissout dans 5 ml de dichlorométhane est ajouté par une goutte à goutte sur 15 minutes. La solution est ensuite laissée remonter à 20 °C pendant 16 h sous agitation magnétique et sous argon. Le solvant est ensuite évaporé, 100 ml de dichlorométhane est ajouté au résidu ainsi que 100 ml d'eau. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et évaporées à sec. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle : heptane, 1 : 1) pour obtenir une huile jaune (m = 2,7 g). η = 49 %.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.77 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.14 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.69 – 3.49 (m, 16H), 2.45 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.36 (s, 9H).

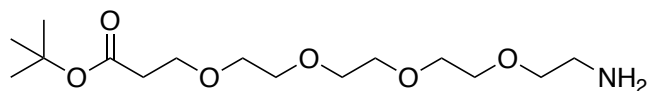
***tert*-butyl 1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oate (28) :**



Dans un ballon de 50 ml, 2,7 g de 2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate 27 (5,7 mmol, 1 eq.) est dissout dans 8 ml de DMF. 560 mg d'azoture de sodium (8,6 mmol, 1,5 eq.) est ajouté et la réaction est placée sous agitation magnétique et sous argon pendant 16 h à 50 °C. La réaction est neutralisée par ajout de 30 ml d' H_2O et le produit est extrait avec 3 x 50 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées à sec pour obtenir une huile jaune ($m = 1,9$ g), $\eta = 94$ %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 3.68 – 3.52 (m, 16H), 3.38 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 2.45 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.40 (s, 9H).

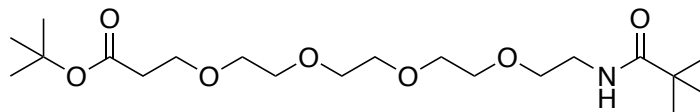
***tert*-butyl 1-amino-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oate (29) :**



Dans un ballon de 50 ml, 1,28 g de *tert*-butyl 1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oate 28 (3,70 mmol, 1 eq.) est dissout dans 15 ml de THF. 1,1 g de triphénylphosphine (4,0 mmol, 1,2 eq.) est ajouté suivi de 450 μl d' H_2O . La solution est mise sous agitation magnétique pendant 16 h à 20 °C. Le solvant est évaporé et 50 ml de dichlorométhane est ajouté au résidu ainsi que 50 ml d' H_2O . Le produit est extrait avec 2 x 30 ml de dichlorométhane et les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (méthanol : dichlorométhane (1 % v/v triéthylamine), 0,5 : 9,5) pour obtenir une huile jaune clair ($m = 805$ mg), $\eta = 67$ %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 3.71 – 3.54 (m, 14H), 3.47 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 2.82 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 2.46 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H).

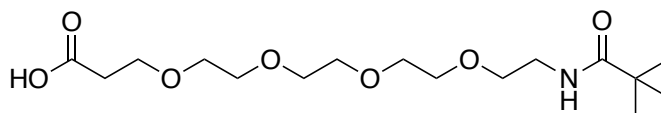
***tert*-butyl 2,2-dimethyl-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecan-19-oate (30) :**



Dans un ballon anhydre de 50 ml sous argon, 805 mg de *tert*-butyl 1-amino-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oate 29 (2,5 mmol, 1 eq.) est dissout dans 15 ml de THF anhydre. 700 µl de triéthylamine anhydre est ajouté au milieu (5,0 mmol, 2 eq.). La solution est refroidie à 0 °C et 543 mg de dicarbonate de di-*tert*-butyle (2,5 mmol, 1 eq.). La solution est laissée remonter à température ambiante pendant 16 h sous agitation magnétique et sous argon. La réaction est ensuite neutralisée avec une solution aqueuse d'acide citrique (0,1 M). Le produit est extrait avec 3 x 30 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle) pour obtenir le produit pur sous forme d'une huile jaune (m = 750 mg), η = 74 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 3.65 – 3.49 (m, 14H), 3.45 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.24 – 3.18 (m, 2H), 2.41 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.39 – 1.32 (m, 18H).

Acide 2,2-dimethyl-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecan-19-oïque (31, COOH-PEG4-Boc) :



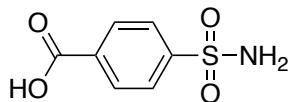
Dans un ballon de 50 ml, 750 mg de *tert*-butyl 2,2-dimethyl-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecan-19-oate 30 (1,8 mmol, 1 eq.) est dissout dans 20 ml d'un mélange méthanol : H₂O, 1 : 1. 213 mg de LiOH (8,9 mmol, 5 eq.) est ajouté à la solution et la réaction est mise sous agitation magnétique pendant 24 h. 50 ml d'H₂O est ensuite ajouté suivi de 30 ml de dichlorométhane. La phase organique est extraite avec 2 x 30 ml de dichlorométhane. La phase aqueuse est ensuite acidifiée avec une solution aqueuse d'acide citrique (0,1 M) et le produit est extrait avec 3 x 30 ml de dichlorométhane. Ces phases organiques sont ensuite rassemblées, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et évaporées à sec pour obtenir le produit final sous forme d'huile jaune foncé (m = 504 mg), η = 80 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 3.74 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.68 – 3.57 (m, 12H), 3.53 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.28 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 2.59 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H).

RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃) : δ 175.11, 70.60, 70.44, 70.34, 70.23, 66.51, 46.01, 40.32, 34.95, 28.41.

Synthèse des réactifs de marquage LNASA

Acide 4-sulfamoylbenzoïque (32) :

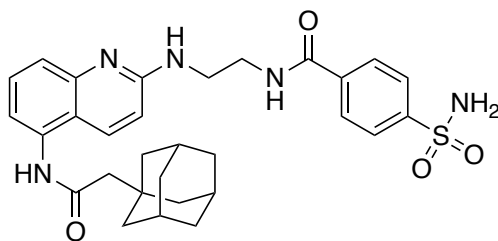


Dans un ballon de 250 ml est mis 100 ml d'H₂O et 5,8 g de NaOH (14,75 mmol, 0,5 eq.). 5 g de 4-méthylbenzenesulfonamide (29,20 mmol, 1 eq.) sont dissous dans la solution et 5,8 g de KMnO₄ (36,70 mmol, 1,25 eq.) est ajouté. La réaction est portée à reflux pendant 2 h. Une fois refroidie, la solution est filtrée et le filtrat est lentement acidifié avec une solution aqueuse saturée en HCl (37 %) jusqu'à la formation d'un précipité. Les impuretés sont solubilisées dans l'acétate d'éthyle et la solution est filtrée à chaud. Le filtrat est récupéré et lavé à l'eau pour obtenir une poudre blanche (m = 2,40 g). η = 48 %.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO) : δ 13.39 (b, 1H), 8.14 – 8.08 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.97 – 7.90 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.54 (s, 2H).

RMN ¹³C (400 MHz, DMSO) : δ 166.78, 148.15, 134.09, 130.41, 126.38.

N-(2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)-4-sulfamoylbenzamide (33) :



Dans un ballon de 25 ml anhydre sous argon, 105 mg de 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)-*N*-(2-((2-aminoethyl)amino)quinolin-5-yl)acétamide 5 (0,28 mmol, 1 eq.) est dissous dans 2,5 ml de DMF anhydre. 67 mg d'acide 4-sulfamoylbenzoïque 32 (0,33 mmol, 1,2 eq.), 45 mg de 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) (0,33 mmol, 1,2 eq.) ainsi que 129 μ l de DIEA (0,75 mmol, 2,7 eq.) sont ajoutés à la solution. Cette dernière est refroidie à 0 °C et 64 mg d'EDC (0,33 mmol, 1,2 eq.) est ajouté et le milieu réactionnel est placé à température ambiante pendant 18 h sous agitation magnétique et sous argon à 20 °C. La réaction est arrêtée par évaporation du solvant et le brut réactionnel est purifié par chromatographie flash à phase inverse (gradient acétonitrile : H₂O (0,1 % TFA), 0 : 1

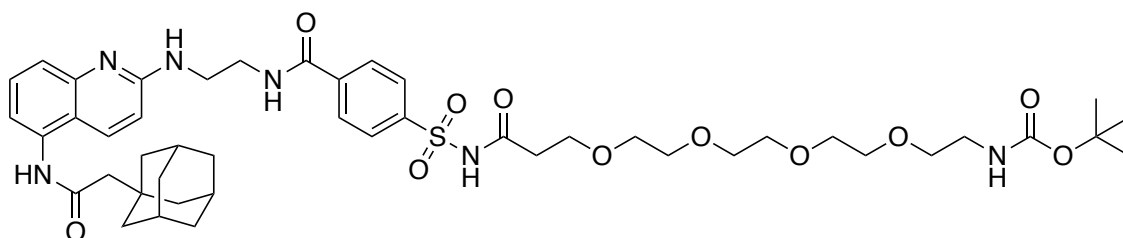
à 1 : 0 pendant 40 min). Le produit pur est obtenu après évaporation sous forme d'un solide orange ($m = 100$ mg), $\eta = 64$ %.

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ 8.19 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 8.02 – 7.91 (m, 4H), 7.70 (m, 2H), 7.45 (dd, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.83 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.73 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.28 (s, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.88 – 1.68 (m, 12H).

^{13}C NMR (400 MHz, MeOD) δ 172.12, 168.14, 159.01, 154.57, 146.56, 136.81, 136.21, 134.43, 131.23, 127.72, 125.96, 121.02, 117.82, 117.38, 63.87, 55.04, 53.36, 42.86, 42.71, 42.48, 40.74, 39.10, 36.50, 36.29, 35.57, 33.02, 30.27, 28.81, 28.69.

MS (ESI) : m/z $[\text{M}^+]$ calculé pour $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}^+$: 562,2483, trouvé 526,2516.

***tert*-butyle (15-((4-((2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)carbamoyl)phenyl)sulfonamido)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)carbamate (34) :**



Dans un ballon de 10 ml anhydre sous argon, 43 mg de *N*-(2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)-4-sulfamoylbenzamide 33 (76 μmol , 1 eq.) est dissous dans 1 ml de DMF anhydre. 33,6 mg de COOH-PEG4-Boc (92 μmol , 1,2 eq.) sont ajoutés ainsi que 33 μl de DIEA (191 μmol , 2,5 eq.) et 2 mg de DMAP (15 μmol , 0,2 eq.). La solution est refroidie à 0 °C et 17,6 mg d'EDC (92 μmol , 1,2 eq.) est ajouté. La solution est laissée remonter à température ambiante (20 °C) pendant 16 h. Toute les 24 pendant 72 h est rajouté 1 eq. d'acide carboxylique, d'EDC et 2 eq. de DIEA à 0 °C.

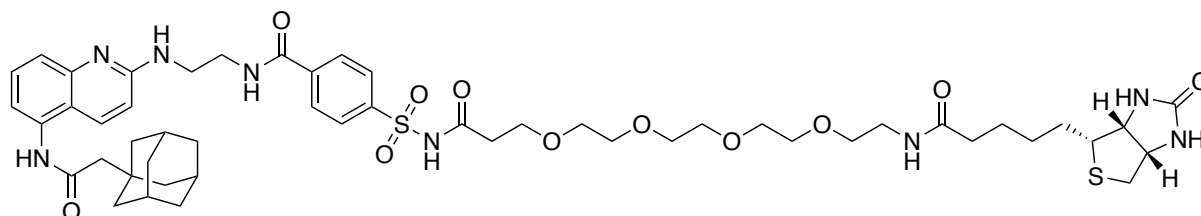
La réaction est arrêtée par évaporation du solvant et 50 ml d'une solution dichlorométhane : H_2O (1 : 1) est ajoutée au résidu. La phase organique est extraite avec 2 x 20 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées à sec. Le produit est purifié par HPLC (gradient acétonitrile : H_2O (0,1 % TFA), 0 : 1 à 1 : 0 pendant 30 min). Le produit pur est obtenu après extraction des fractions récoltées par 3 x 20 ml de dichlorométhane et évaporation sous forme d'une huile orange foncé ($m = 56,7$ mg), $\eta = 82$ %.

NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.20 (m, 1H), 8.01 (m, 4H), 7.42 (m, 3H), 6.85 (s, 1H), 3.79 (m, 2H), 3.60 (m, 18H), 3.26 (s, 2H), 2.48 (s, 2H), 2.22 (s, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.77 – 1.59 (m, 12H), 1.41 (s, 9H).

RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) : δ 173.37, 170.40, 166.33, 156.37, 153.55, 147.56, 142.02, 139.80, 137.58, 134.56, 133.23, 128.28, 127.86, 121.39, 115.22, 113.45, 107.97, 79.44, 77.35, 77.03, 76.71, 70.45, 70.38, 70.22, 70.13, 66.12, 53.42, 51.57, 42.68, 40.28, 38.72, 37.21, 36.69, 33.47, 29.69, 28.62, 28.41.

MS (ESI) : m/z $[\text{M}^+]$ calculé pour $\text{C}_{46}\text{H}_{65}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{S}^+$: 909,4427, trouvé 909,4099.

***N*-(2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)-4-(*N*-(17-oxo-21-((3*aR*,4*R*,6*aS*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-4,7,10,13-tetraoxa-16-azahenicosanoyl)sulfonyl)benzamide (38) :**



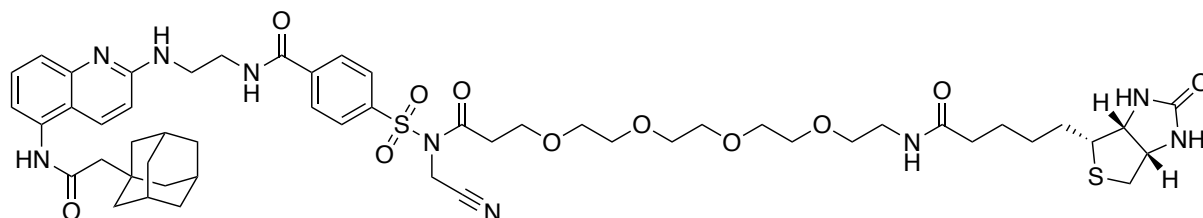
Dans un ballon de 10 ml anhydre sous argon est dissous 7,6 mg de *tert*-butyle (15-((4-((2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)carbamoyl)phenyl)sulfonamido)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)carbamate 34 (8 μmol , 1 eq.) dans 700 μl de dichlorométhane anhydre. 100 μl de TFA est ajouté et la réaction est placée sous agitation magnétique et sous argon pendant 1h. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est coévaporé 3 x avec 5 ml de toluène. 1 ml de DMF anhydre est ensuite ajouté, suivi de 2 μl de *N*-méthylmorpholine (17 μmol , 2 eq.), 3 mg de biotine (13 μmol , 1,5 eq.) et 3,4 mg de DMTMM (13 μmol , 1,5 eq.). La solution est mise 2 h sous agitation magnétique et sous argon à 20 °C. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est purifié par HPLC (gradient acétonitrile : H_2O (0,1 % TFA), 0 : 1 à 1 : 0 pendant 40 min) et lyophilisé pour obtenir un solide orange (m = 7 mg), η = 80 %.

RMN ^1H (500 MHz, MeOD) δ 8.01 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.96 – 7.86 (m, 4H), 7.55 – 7.43 (m, 2H), 7.28 (m, 1H), 6.86 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.47 (dd, J = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 4.29 – 4.21 (m, 2H), 3.82 – 3.74 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.72 – 3.47 (m, 16H), 3.41 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 3.08 – 3.01 (m, 1H), 2.94 – 2.87 (m, 1H), 2.69 (d, J = 12.6 Hz, 1H), 2.48 – 2.41 (m, 2H), 2.26 (d, J = 1.8 Hz, 2H), 2.22 (m, 2H), 2.16 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.04 – 2.00 (m, 3H), 1.83 – 1.69 (m, 12H), 1.63 – 1.50 (m, 2H), 1.44 – 1.34 (m, 2H).

RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD) δ 174.74, 172.10, 170.58, 168.22, 164.50, 157.63, 153.13, 142.40, 137.88, 136.87, 135.05, 132.42, 128.07, 127.71, 122.07, 116.80, 115.22, 113.54, 70.15, 70.12, 70.11, 70.01, 69.86, 69.17, 65.80, 61.98, 60.26, 55.58, 53.75, 50.55, 42.46, 40.91, 39.67, 38.97, 38.05, 36.48, 36.44, 35.33, 33.05, 28.79, 28.33, 28.09, 25.44.

MS (ESI) : m/z $[M^+]$ calculé pour $\text{C}_{51}\text{H}_{72}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}_2^+$: 1035,4684, trouvé 1035,3520.

***N*-(2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)-4-(*N*-(cyanomethyl)-*N*-(17-oxo-21-((3*aR*,4*R*,6*aS*)-2-oxo-hexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-4,7,10,13-tetraoxa-16-azahenicosanoyl)sulfamoyl)benzamide (39, LNASAB) :**



Dans un ballon de 10 ml anhydre sous argon, 4 mg de *N*-(2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)-4-(*N*-(17-oxo-21-((3*aR*,4*R*,6*aS*)-2-oxo-hexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-4,7,10,13-tetraoxa-16-azahenicosanoyl)sulfamoyl)benzamide 38 (4 μmol , 1 eq.), séché par 5 coévaporations avec 5 ml de toluène anhydre, est dissous dans 0,5 ml de DMF anhydre. 32 μl de DIEA (190 μmol , 50 eq.) fraîchement distillé est ajouté ainsi que 13 μl d'iodoacétonitrile (190 μmol , 50 eq.) préalablement séché sur plug d'alumine basique anhydre. La réaction est placée 16 h sous agitation magnétique et sous argon dans le noir à 20 °C. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est purifié par HPLC (gradient acétonitrile : H_2O (0,1 % TFA), 0 : 1 à 1 : 0 pendant 30 min) et lyophilisé pour obtenir un solide marron orange (m = 3,3 mg), η = 80 %.

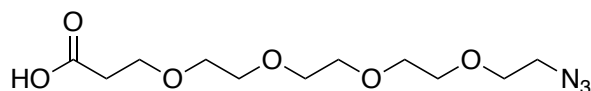
RMN ^1H (700 MHz, DMSO) : δ 10.02 (s, 1H), 9.08 (b, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.14 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 8.08 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.83 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.76 – 7.72 (b, 1H), 7.60 (b, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.31 (dd, J = 7.8, 5.0 Hz, 1H), 4.13 (dd, J = 7.7, 4.4 Hz, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.66 (s, 2H), 3.60 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 3.53 – 3.42 (m, 10H), 3.39 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.18 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.12 – 3.07 (m, 1H), 2.94 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.82 (dd, J = 12.6, 5.1 Hz, 1H), 2.58 (d, J = 12.6 Hz, 2H), 2.22 (m, 2H), 2.07 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.97 (s, 3H), 1.73 – 1.58 (m, 12H), 1.53 – 1.43 (m, 4H), 1.34 – 1.23 (m, 2H).

^{13}C NMR (176 MHz, DMSO) δ 172.60, 170.79, 170.40, 165.90, 163.19, 158.69, 158.49, 140.52, 140.35, 139.88, 135.76, 128.92, 128.45, 116.70, 116.13, 114.66, 70.22, 70.20,

70.17, 70.06, 70.02, 69.62, 65.70, 61.51, 59.67, 55.89, 50.62, 42.58, 38.90, 36.87, 36.38, 35.56, 34.44, 33.27, 28.66, 28.52, 28.50, 25.73., 28.50, 25.73.

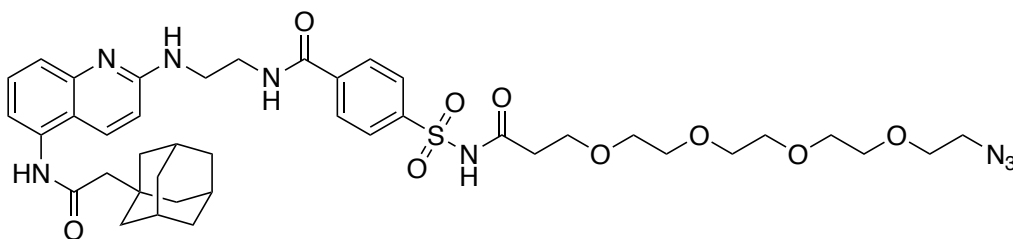
MS (ESI) : m/z $[M]^+$ calculé pour $C_{53}H_{71}N_9O_{11}S_2^+$: 1074,4787, trouvé 1074,4797.

Acide 1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oïque (28-2, COOH-PEG4-N3)



Dans un ballon de 50 ml, 700 mg de *tert*-butyl 1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oate (2,0 mmol, 1 eq.) est dissout dans un mélange dichlorométhane : acide tri-fluoroacétique, 2 : 8. La réaction est mise sous agitation magnétique et sous argon pendant 16 h à 20 °C. Le solvant a été évaporé afin d'obtenir l'acide carboxylique pur sous la forme d'une huile jaune (538 mg), η = 100 %.

***N*-(2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)-4-(*N*-(1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oyl)sulfamoyl)benzamide (42) :**



Dans un ballon de 10 ml anhydre sous argon, 208 mg de *N*-(2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)-4-sulfamoylbenzamide 33 (0,37 mmol, 1 eq.) est dissout dans 2 ml de DMF anhydre. 138 mg de COOH-PEG4-N3 (0,40 mmol, 1,1 eq.) sont ajoutés ainsi que 161 μ l de DIEA (0,92 mmol, 2,5 eq.) et 9 mg de DMAP (0,07 mmol, 0,2 eq.). La solution est refroidie à 0 °C et 77 mg d'EDC (0,40 mmol, 1,1 eq.) est ajouté. La solution est laissée remonter à température ambiante (20 °C) pendant 16 h. Toute les 24 pendant 72 h est rajouté 1 eq. d'acide carboxylique, d'EDC et 2 eq. de DIEA à 0 °C.

La réaction est arrêtée par évaporation du solvant et 50 ml d'une solution dichlorométhane : H₂O (1 : 1) est ajoutée au résidu. La phase organique est extraite avec 2 x 20 ml

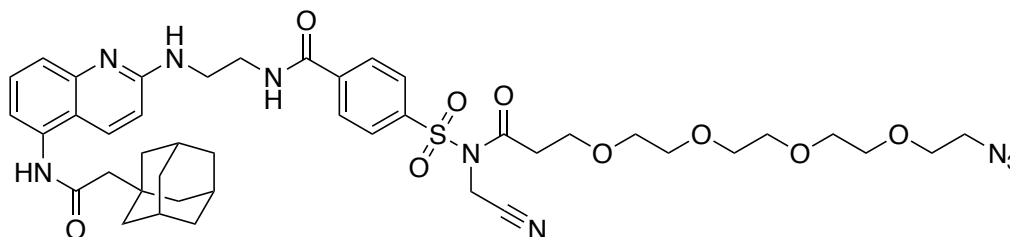
de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées à sec. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane : méthanol, 9,5 : 0,5). Le produit pur est obtenu sous forme d'une huile orange ($m = 104 \text{ mg}$), $\eta = 34 \%$.

NMR ^1H (500 MHz, CDCl_3) : δ 8.68 (s, 1H), 7.82 (s, 4H), 7.40 – 7.29 (m, 3H), 6.59 (s, 1H), 3.68 – 3.41 (m, 18H), 3.33 (t, $J = 5.0 \text{ Hz}$, 2H), 2.52 – 2.42 (m, 2H), 2.24 (s, 2H), 2.03 (s, 2H), 1.97 (s, 3H), 1.75 – 1.58 (m, 12H).

RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) δ 176.83, 171.45, 167.43, 154.36, 147.79, 146.78, 145.22, 136.72, 134.10, 131.09, 127.65, 127.18, 126.06, 120.25, 116.58, 112.37, 70.69, 70.66, 70.63, 70.60, 70.55, 70.52, 70.47, 70.40, 70.37, 70.32, 70.23, 70.15, 70.12, 70.00, 69.97, 69.94, 69.88, 69.78, 67.39, 53.46, 51.14, 50.67, 50.64, 50.56, 42.64, 36.78, 33.37, 28.67, 28.56.

MS (ESI) : m/z $[\text{M}^+]$ calculé pour $\text{C}_{43}\text{H}_{56}\text{N}_9\text{O}_9\text{S}^+$: 874,3916, trouvé 874,3958.

***N*-(2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)-4-(*N*-(1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oyl)-*N*-(cyanomethyl)sulfamoyl)benzamide (43, LNASAN3) :**



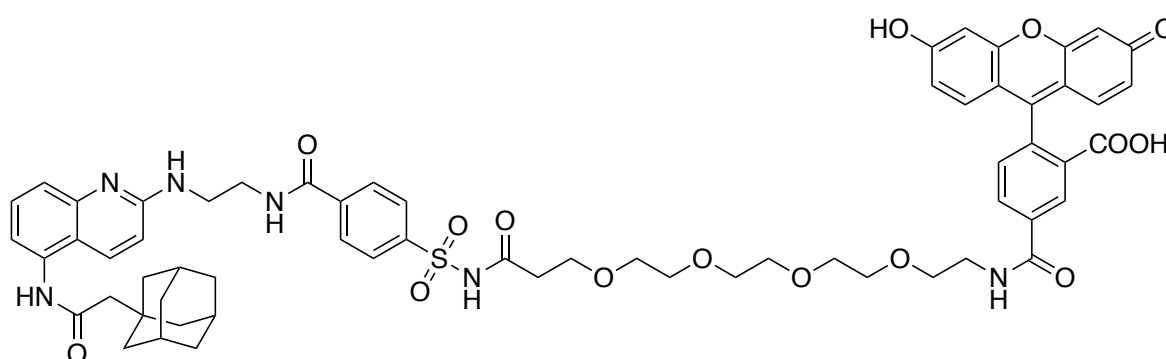
Dans un ballon de 10 ml anhydre sous argon, 25 mg de *N*-(2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)-4-(*N*-(1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oyl)sulfamoyl)benzamide 42 (30 μmol , 1 eq.), séché par 5 coévaporations avec 10 ml de toluène anhydre, est dissout dans 1 ml de DMF anhydre. 255 μl de DIEA (1497 μmol , 50 eq.) fraîchement distillée est ajouté ainsi que 108 μl d'iodoacétonitrile (1497 μmol , 50 eq.) préalablement séché sur plug d'alumine basique anhydre. La réaction est mise 16 h sous agitation magnétique et sous argon dans le noir à 20 °C. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est purifié par HPLC (gradient acétonitrile : H_2O (0,1 % TFA), 0 : 1 à 1 : 0 pendant 30 min) et lyophilisé pour obtenir un solide marron ($m = 11,3 \text{ mg}$), $\eta = 43 \%$.

^1H NMR (700 MHz, DMSO) δ 10.02 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.13 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 8.09 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 7.72 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H), 7.60 (d, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H), 7.10 (s, 1H), 5.01 (s, 2H), 3.85 – 3.34 (m, 22H), 2.94 (t, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 2H), 2.21 (s, 2H), 1.96 (s, 3H), 1.73 – 1.58 (m, 12H).

RMN ^{13}C (700 MHz, DMSO) δ 170.78, 170.41, 165.84, 153.22, 140.49, 139.93, 137.58, 135.73, 132.42, 128.92, 128.41, 120.86, 118.11, 116.70, 116.42, 115.90, 114.39, 70.40, 70.30, 70.26, 70.24, 70.19, 70.15, 70.06, 69.70, 68.75, 68.54, 67.42, 67.16, 65.70, 50.62, 50.45, 49.30, 46.97, 42.57, 41.71, 36.87, 36.38, 34.43, 33.57, 33.26, 28.53.

MS (ESI) : m/z $[M^+]$ calculé pour $\text{C}_{41}\text{H}_{55}\text{N}_8\text{O}_9\text{S}^+$: 874,3916, trouvé 835,3875.

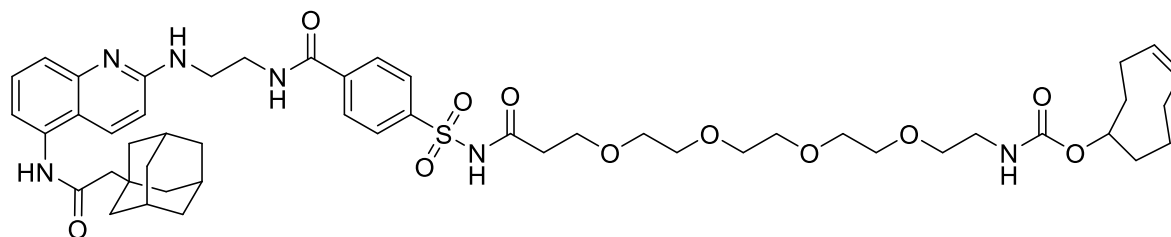
Acide 5-((15-((4-((2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)carbamoyl)phenyl)sulfonamido)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)carbamoyl)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)benzoïque (36) :



Dans un ballon de 10 ml anhydre sous argon est dissout 10 mg de tert-butyle (15-((4-((2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)carbamoyl)phenyl)sulfonamido)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)carbamate 34 (11 μmol , 1 eq.) dans 800 μl de dichlorométhane anhydre. 100 μl de TFA est ajouté et la réaction est mise sous agitation magnétique et sous argon pendant 1h. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est coévaporé 3 x avec 5 ml de toluène. 1 ml de DMF anhydre est ajouté dans le ballon, suivi de 2,4 μl de N-méthylmorpholine (22 μmol , 2 eq.), de 4,9 mg de 5-carboxyfluorescéine (13 μmol , 1,2 eq.) et 3,6 mg de DMTMM (12 μmol , 1,2 eq.). La réaction est placée à 20 °C pendant 2 h sous agitation magnétique et sous argon. Le solvant est ensuite évaporé et le brut réactionnel est purifié par HPLC (acétonitrile : H_2O (0,1 % TFA), 4,4 : 5,6, isocratique.)

RMN ^1H (500 MHz, MeOD) δ 8.33 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 8.08 (dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, 1H), 7.97 (t, $J = 10.4$ Hz, 4H), 7.76 (s, 1H), 7.66 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.54 – 6.40 (m, 5H), 5.24 (dd, $J = 5.6, 4.3$ Hz, 2H), 3.70 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.65 – 3.43 (m, 16H), 3.41 – 3.33 (m, 4H), 2.36 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.16 (s, 2H), 1.96 – 1.86 (m, 3H), 1.73 – 1.56 (m, 12H).

(R,Z)-cyclooct-4-en-1-yl (15-((4-((2-((5-(2-((3r,5r,7r)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)carbamoyl)phenyl)sulfonamido)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)carbamate (40) :



Dans un ballon de 10 ml anhydre sous argon est dissous 26 mg de tert-butyle (15-((4-((2-((5-(2-((3r,5r,7r)-adamantan-1-yl)acetamido)quinolin-2-yl)amino)ethyl)carbamoyl)phenyl)sulfonamido)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)carbamate 34 (28,6 μmol , 1 eq.) dans 700 μl de dichlorométhane anhydre. 100 μl de TFA est ajouté et la réaction est placée sous agitation magnétique et sous argon pendant 1h. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est coévaporé 3 x avec 5 ml de toluène. Le produit de déprotection est ensuite dissout dans 1 ml de DMF anhydre et 10 mg d'ester trans-cyclooctene-*para*-nitrobenzyle (34,3 μmol , 1,2 eq.) est ajouté ainsi que 12,5 μl de DIEA (71,5 μmol , 2,5 eq.). La solution est mise sous agitation magnétique et sous argon pendant 72 h dans le noir à 20 °C. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est purifié par HPLC (gradient acétonitrile : H₂O (0,1 % TFA), 0 : 1 à 1 : 0 pendant 30 min) et extrait avec 3 x 1 ml de dichlorométhane. Les phases organiques ont été rassemblées, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et évaporées pour obtenir une huile marron ($m = 11,3 \text{ mg}$), $\eta = 86 \%$.

¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) : δ 10.84 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H), 8.04 (s, 4H), 7.63 – 7.35 (m, 3H), 6.85 (d, $J = 9.7 \text{ Hz}$, 1H), 5.63 – 5.40 (m, 2H), 4.45 – 4.25 (m, 1H), 3.88 – 3.77 (m, 2H), 3.73 – 3.49 (m, 16H), 3.31 (p, $J = 3.6 \text{ Hz}$, 2H), 2.48 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H), 2.37 – 2.20 (m, 4H), 2.00 (d, $J = 4.5 \text{ Hz}$, 3H), 1.90 (tt, $J = 11.0, 5.8 \text{ Hz}$, 3H), 1.77 – 1.61 (m, 16H), 1.36 – 1.20 (m, 4H).

RMN ¹³C (700 MHz, CDCl₃) : δ 170.86, 170.27, 166.10, 156.51, 153.57, 141.81, 139.81, 137.69, 134.94, 134.54, 133.31, 132.95, 129.75, 129.63, 128.34, 120.90, 117.34, 115.69, 108.41, 80.60, 70.59, 70.50, 70.40, 70.19, 70.15, 66.16, 51.68, 51.31, 49.84, 42.70, 42.63, 41.17, 40.67, 38.63, 37.29, 36.69, 34.29, 33.47, 32.54, 31.94, 31.92, 30.98, 29.72, 28.61, 27.24, 25.56, 24.81, 22.71, 22.34, 21.10, 14.15.

Bibliographie

- (1) Drury, A. N.; Szent-Györgyi, A. The Physiological Activity of Adenine Compounds with Especial Reference to Their Action upon the Mammalian Heart1. *J. Physiol.* **1929**, *68* (3), 213–237. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1929.sp002608>.
- (2) Burnstock, G. Purinergic Nerves. *Pharmacol. Rev.* **1972**, *24* (3), 509–581.
- (3) Agostinho, P.; Madeira, D.; Dias, L.; Simões, A. P.; Cunha, R. A.; Canas, P. M. Purinergic Signaling Orchestrating Neuron-Glia Communication. *Pharmacol. Res.* **2020**, *162*, 105253. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105253>.
- (4) Burnstock, G. Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. *Physiol. Rev.* **2007**, *87* (2), 659–797. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006>.
- (5) Heo, J. S.; Han, H. J. ATP Stimulates Mouse Embryonic Stem Cell Proliferation via Protein Kinase C, Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt, and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways. *Stem Cells* **2006**, *24* (12), 2637–2648. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0588>.
- (6) Glaser, T.; de Oliveira, S. L. B.; Cheffer, A.; Beco, R.; Martins, P.; Fornazari, M.; Lameu, C.; Junior, H. M. C.; Coutinho-Silva, R.; Ulrich, H. Modulation of Mouse Embryonic Stem Cell Proliferation and Neural Differentiation by the P2X7 Receptor. *PLoS ONE* **2014**, *9* (5), e96281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096281>.
- (7) Tsao, H.-K.; Chiu, P.-H.; Sun, S. H. PKC-Dependent ERK Phosphorylation Is Essential for P2X7 Receptor-Mediated Neuronal Differentiation of Neural Progenitor Cells. *Cell Death Dis.* **2013**, *4* (8), e751–e751. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.274>.
- (8) Schwindt, T. T.; Trujillo, C. A.; Negraes, P. D.; Lameu, C.; Ulrich, H. Directed Differentiation of Neural Progenitors into Neurons Is Accompanied by Altered Expression of P2X Purinergic Receptors. *J. Mol. Neurosci.* **2011**, *44* (3), 141–146. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9417-y>.
- (9) Lin, J. H.-C.; Takano, T.; Arcuino, G.; Wang, X.; Hu, F.; Darzynkiewicz, Z.; Nunes, M.; Goldman, S. A.; Nedergaard, M. Purinergic Signaling Regulates Neural Progenitor Cell Expansion and Neurogenesis. *Dev. Biol.* **2007**, *302* (1), 356–366. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.017>.
- (10) Liu, X.; Hashimoto-Torii, K.; Torii, M.; Haydar, T. F.; Rakic, P. The Role of ATP Signaling in the Migration of Intermediate Neuronal Progenitors to the Neocortical Subventricular Zone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (33), 11802–11807. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805180105>.
- (11) Silva, C. G.; Metin, C.; Fazeli, W.; Machado, N. J.; Darmopil, S.; Launay, P.-S.; Ghestem, A.; Nesa, M.-P.; Bassot, E.; Szabo, E.; Baqi, Y.; Muller, C. E.; Tome, A. R.; Ivanov, A.; Isbrandt, D.; Zilberter, Y.; Cunha, R. A.; Esclapez, M.; Bernard, C.

Adenosine Receptor Antagonists Including Caffeine Alter Fetal Brain Development in Mice. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5* (197), 197ra104-197ra104. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006258>.

(12) Díaz-Hernandez, M.; del Puerto, A.; Díaz-Hernandez, J. I.; Diez-Zaera, M.; Lucas, J. J.; Garrido, J. J.; Miras-Portugal, M. T. Inhibition of the ATP-Gated P2X7 Receptor Promotes Axonal Growth and Branching in Cultured Hippocampal Neurons. *J. Cell Sci.* **2008**, *121* (Pt 22), 3717–3728. <https://doi.org/10.1242/jcs.034082>.

(13) Peterson, T. S.; Camden, J. M.; Wang, Y.; Seye, C. I.; Wood, W. G.; Sun, G. Y.; Erb, L.; Petris, M. J.; Weisman, G. A. P2Y2 Nucleotide Receptor-Mediated Responses in Brain Cells. *Mol. Neurobiol.* **2010**, *41* (2–3), 356–366. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8115-7>.

(14) Safiulina, V. F.; Kasyanov, A. M.; Sokolova, E.; Cherubini, E.; Giniatullin, R. ATP Contributes to the Generation of Network-Driven Giant Depolarizing Potentials in the Neonatal Rat Hippocampus: ATP on the Developing Hippocampus. *J. Physiol.* **2005**, *565* (3), 981–992. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.085621>.

(15) Fumagalli, M.; Lecca, D.; Abbracchio, M. P.; Ceruti, S. Pathophysiological Role of Purines and Pyrimidines in Neurodevelopment: Unveiling New Pharmacological Approaches to Congenital Brain Diseases. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 941. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00941>.

(16) Naviaux, R. K. Antipurinergic Therapy for Autism—An in-Depth Review. *Mitochondrion* **2018**, *43*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.12.007>.

(17) Koványi, B.; Csölle, C.; Calovi, S.; Hanuska, A.; Kató, E.; Köles, L.; Bhattacharya, A.; Haller, J.; Sperlágh, B. The Role of P2X7 Receptors in a Rodent PCP-Induced Schizophrenia Model. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 36680. <https://doi.org/10.1038/srep36680>.

(18) Mao, F.; Li, W.; Chen, H.; Qian, L.; Buzby, J. S. Periventricular Leukomalacia Long-Term Prognosis May Be Improved by Treatment with UDP-Glucose, GDNF, and Memantine in Neonatal Rats. *Brain Res.* **2012**, *1486*, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.09.033>.

(19) Edwards, F. A.; Gibb, A. J.; Colquhoun, D. ATP Receptor-Mediated Synaptic Currents in the Central Nervous System. *Nature* **1992**, *359* (6391), 144–147. <https://doi.org/10.1038/359144a0>.

(20) Khakh, B. S.; North, R. A. Neuromodulation by Extracellular ATP and P2X Receptors in the CNS. *Neuron* **2012**, *76* (1), 51–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.024>.

(21) O’Kane, E. M.; Stone, T. W. Characterisation of ATP-Induced Facilitation of Transmission in Rat Hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *409* (2), 159–166. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00785-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00785-8).

- (22) Yamazaki, Y.; Kaneko, K.; Fujii, S.; Kato, H.; Ito, K.-I. Long-Term Potentiation and Long-Term Depression Induced by Local Application of ATP to Hippocampal CA1 Neurons of the Guinea Pig. *Hippocampus* **2003**, *13* (1), 81–92. <https://doi.org/10.1002/hipo.7999>.
- (23) Pankratov, Y. V.; Lalo, U. V.; Krishtal, O. A. Role for P2X Receptors in Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* **2002**, *22* (19), 8363–8369. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-19-08363.2002>.
- (24) Sim, J. A. Altered Hippocampal Synaptic Potentiation in P2X4 Knock-Out Mice. *J. Neurosci.* **2006**, *26* (35), 9006–9009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2370-06.2006>.
- (25) Khakh, B. S.; Gittermann, D.; Cockayne, D. A.; Jones, A. ATP Modulation of Excitatory Synapses onto Interneurons. *J. Neurosci.* **2003**, *23* (19), 7426–7437. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-19-07426.2003>.
- (26) Wang, Y.; Mackes, J.; Chan, S.; Haughey, N. J.; Guo, Z.; Ouyang, X.; Furukawa, K.; Ingram, D. K.; Mattson, M. P. Impaired Long-Term Depression in P2X3 Deficient Mice Is Not Associated with a Spatial Learning Deficit. *J. Neurochem.* **2006**, *99* (5), 1425–1434. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04198.x>.
- (27) Jacobson, K. A.; Müller, C. E. Medicinal Chemistry of Adenosine, P2Y and P2X Receptors. *Neuropharmacology* **2016**, *104*, 31–49. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.12.001>.
- (28) Bertin, E.; Deluc, T.; Pilch, K. S.; Martinez, A.; Pougnet, J.-T.; Doudnikoff, E.; Allain, A.-E.; Bergmann, P.; Rousseau, M.; Toulmé, E.; Bezard, E.; Koch-Nolte, F.; Séguéla, P.; Lévi, S.; Bontempi, B.; Georges, F.; Bertrand, S. S.; Nicole, O.; Boué-Grabot, E. Increased Surface P2X4 Receptor Regulates Anxiety and Memory in P2X4 Internalization-Defective Knock-in Mice. *Mol. Psychiatry* **2021**, *26* (2), 629–644. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0641-8>.
- (29) Dunwiddie, T. V.; Diao, L.; Proctor, W. R. Adenine Nucleotides Undergo Rapid, Quantitative Conversion to Adenosine in the Extracellular Space in Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* **1997**, *17* (20), 7673–7682. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-20-07673.1997>.
- (30) E. Parkinson, F.; L. Damaraju, V.; Graham, K.; Y.M. Yao, S.; A. Baldwin, S.; E. Cass, C.; D. Young, J. Molecular Biology of Nucleoside Transporters and Their Distributions and Functions in the Brain. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11* (8), 948–972. <https://doi.org/10.2174/156802611795347582>.
- (31) Lopes, L. V.; Cunha, R. A.; Ribeiro, J. A. Cross Talk Between A₁ and A_{2A} Adenosine Receptors in the Hippocampus and Cortex of Young Adult and Old Rats. *J. Neurophysiol.* **1999**, *82* (6), 3196–3203. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.6.3196>.

- (32) d'Alcantara, P.; Ledent, C.; Swillens, S.; Schiffmann, S. N. Inactivation of Adenosine A2A Receptor Impairs Long Term Potentiation in the Accumbens Nucleus without Altering Basal Synaptic Transmission. *Neuroscience* **2001**, *107* (3), 455–464. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00372-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00372-4).
- (33) Sebastião, A. M.; Ribeiro, J. A. Neuromodulation and Metamodulation by Adenosine: Impact and Subtleties upon Synaptic Plasticity Regulation. *Brain Res.* **2015**, *1621*, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.008>.
- (34) Azevedo, F. A. C.; Carvalho, L. R. B.; Grinberg, L. T.; Farfel, J. M.; Ferretti, R. E. L.; Leite, R. E. P.; Filho, W. J.; Lent, R.; Herculano-Houzel, S. Equal Numbers of Neuronal and Nonneuronal Cells Make the Human Brain an Isometrically Scaled-up Primate Brain. *J. Comp. Neurol.* **2009**, *513* (5), 532–541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>.
- (35) Scemes, E.; Giaume, C. Astrocyte Calcium Waves: What They Are and What They Do. *Glia* **2006**, *54* (7), 716–725. <https://doi.org/10.1002/glia.20374>.
- (36) Guthrie, P. B.; Knappenberger, J.; Segal, M.; Bennett, M. V. L.; Charles, A. C.; Kater, S. B. ATP Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves. *J. Neurosci.* **1999**, *19* (2), 520–528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-02-00520.1999>.
- (37) Zhao, Y.-F.; Tang, Y.; Illes, P. Astrocytic and Oligodendrocytic P2X7 Receptors Determine Neuronal Functions in the CNS. *Front. Mol. Neurosci.* **2021**, *14*, 641570. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.641570>.
- (38) Xiong, Y.; Sun, S.; Teng, S.; Jin, M.; Zhou, Z. Ca²⁺-Dependent and Ca²⁺-Independent ATP Release in Astrocytes. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 224. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00224>.
- (39) James, G.; Butt, A. M. P2Y and P2X Purinoceptor Mediated Ca²⁺ Signalling in Glial Cell Pathology in the Central Nervous System. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *447* (2–3), 247–260. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01756-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01756-9).
- (40) Illes, P.; Burnstock, G.; Tang, Y. Astroglia-Derived ATP Modulates CNS Neuronal Circuits. *Trends Neurosci.* **2019**, *42* (12), 885–898. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.09.006>.
- (41) Frost, J. L.; Schafer, D. P. Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26* (8), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.006>.
- (42) Neumann, H.; Kotter, M. R.; Franklin, R. J. M. Debris Clearance by Microglia: An Essential Link between Degeneration and Regeneration. *Brain* **2008**, *132* (2), 288–295. <https://doi.org/10.1093/brain/awn109>.
- (43) Ransohoff, R. M. A Polarizing Question: Do M1 and M2 Microglia Exist? *Nat. Neurosci.* **2016**, *19* (8), 987–991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>.

- (44) Rodrigues, R. J.; Tomé, A. R.; Cunha, R. A. ATP as a Multi-Target Danger Signal in the Brain. *Front. Neurosci.* **2015**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00148>.
- (45) Suurväli, J.; Boudinot, P.; Kanellopoulos, J.; Rüütel Boudinot, S. P2X4: A Fast and Sensitive Purinergic Receptor. *Biomed. J.* **2017**, *40* (5), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.010>.
- (46) Matsumura, Y.; Yamashita, T.; Sasaki, A.; Nakata, E.; Kohno, K.; Masuda, T.; Tozaki-Saitoh, H.; Imai, T.; Kuraishi, Y.; Tsuda, M.; Inoue, K. A Novel P2X4 Receptor-Selective Antagonist Produces Anti-Allodynic Effect in a Mouse Model of Herpetic Pain. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 32461. <https://doi.org/10.1038/srep32461>.
- (47) Jurga, A. M.; Piotrowska, A.; Makuch, W.; Przewlocka, B.; Mika, J. Blockade of P2X4 Receptors Inhibits Neuropathic Pain-Related Behavior by Preventing MMP-9 Activation and, Consequently, Pronociceptive Interleukin Release in a Rat Model. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00048>.
- (48) Zabala, A.; Vazquez-Villoldo, N.; Rissiek, B.; Gejo, J.; Martin, A.; Palomino, A.; Perez-Samartín, A.; Pulagam, K. R.; Lukowiak, M.; Capetillo-Zarate, E.; Llop, J.; Magnus, T.; Koch-Nolte, F.; Rassendren, F.; Matute, C.; Domercq, M. P2X4 Receptor Controls Microglia Activation and Favors Remyelination in Autoimmune Encephalitis. *EMBO Mol. Med.* **2018**, *10* (8). <https://doi.org/10.15252/emmm.201708743>.
- (49) Tozaki-Saitoh, H.; Tsuda, M.; Miyata, H.; Ueda, K.; Kohsaka, S.; Inoue, K. P2Y₁₂ Receptors in Spinal Microglia Are Required for Neuropathic Pain after Peripheral Nerve Injury. *J. Neurosci.* **2008**, *28* (19), 4949–4956. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0323-08.2008>.
- (50) Kyrargyri, V.; Madry, C.; Rifat, A.; Arancibia-Carcamo, I. L.; Jones, S. P.; Chan, V. T. T.; Xu, Y.; Robaye, B.; Attwell, D. P2Y₁₃ Receptors Regulate Microglial Morphology, Surveillance, and Resting Levels of Interleukin 1 β Release. *Glia* **2020**, *68* (2), 328–344. <https://doi.org/10.1002/glia.23719>.
- (51) Haynes, S. E.; Hollopeter, G.; Yang, G.; Kurpius, D.; Dailey, M. E.; Gan, W.-B.; Julius, D. The P2Y₁₂ Receptor Regulates Microglial Activation by Extracellular Nucleotides. *Nat. Neurosci.* **2006**, *9* (12), 1512–1519. <https://doi.org/10.1038/nn1805>.
- (52) Monif, M.; Reid, C. A.; Powell, K. L.; Smart, M. L.; Williams, D. A. The P2X₇ Receptor Drives Microglial Activation and Proliferation: A Trophic Role for P2X₇R Pore. *J. Neurosci.* **2009**, *29* (12), 3781–3791. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5512-08.2009>.
- (53) Calovi, S.; Mut-Arbona, P.; Sperlágh, B. Microglia and the Purinergic Signaling System. *Neuroscience* **2019**, *405*, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.021>.

- (54) Matyash, M.; Zabiegalov, O.; Wendt, S.; Matyash, V.; Kettenmann, H. The Adenosine Generating Enzymes CD39/CD73 Control Microglial Processes Ramification in the Mouse Brain. *PLOS ONE* **2017**, *12* (4), e0175012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175012>.
- (55) Luongo, L.; Guida, F.; Imperatore, R.; Napolitano, F.; Gatta, L.; Cristino, L.; Giordano, C.; Siniscalco, D.; Di Marzo, V.; Bellini, G.; Petrelli, R.; Cappellacci, L.; Usiello, A.; de Novellis, V.; Rossi, F.; Maione, S. The A1 Adenosine Receptor as a New Player in Microglia Physiology: New Player in Microglia Physiology. *Glia* **2014**, *62* (1), 122–132. <https://doi.org/10.1002/glia.22592>.
- (56) Orr, A. G.; Orr, A. L.; Li, X.-J.; Gross, R. E.; Traynelis, S. F. Adenosine A2A Receptor Mediates Microglial Process Retraction. *Nat. Neurosci.* **2009**, *12* (7), 872–878. <https://doi.org/10.1038/nm.2341>.
- (57) Davalos, D.; Grutzendler, J.; Yang, G.; Kim, J. V.; Zuo, Y.; Jung, S.; Littman, D. R.; Dustin, M. L.; Gan, W.-B. ATP Mediates Rapid Microglial Response to Local Brain Injury in Vivo. *Nat. Neurosci.* **2005**, *8* (6), 752–758. <https://doi.org/10.1038/nm1472>.
- (58) Kurpius, D.; Nolley, E. P.; Dailey, M. E. Purines Induce Directed Migration and Rapid Homing of Microglia to Injured Pyramidal Neurons in Developing Hippocampus. *Glia* **2007**, *55* (8), 873–884. <https://doi.org/10.1002/glia.20509>.
- (59) Madry, C.; Arancibia-Cárcamo, I. L.; Kyrargyri, V.; Chan, V. T. T.; Hamilton, N. B.; Attwell, D. Effects of the Ecto-ATPase Apyrase on Microglial Ramification and Surveillance Reflect Cell Depolarization, Not ATP Depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (7), E1608–E1617. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715354115>.
- (60) Laprell, L.; Schulze, C.; Brehme, M.-L.; Oertner, T. G. The Role of Microglia Membrane Potential in Chemotaxis. *J. Neuroinflammation* **2021**, *18* (1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02048-0>.
- (61) Volterra, A.; Meldolesi, J. Astrocytes, from Brain Glue to Communication Elements: The Revolution Continues. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6* (8), 626–640. <https://doi.org/10.1038/nrn1722>.
- (62) Panatier, A.; Vallée, J.; Haber, M.; Murai, K. K.; Lacaille, J.-C.; Robitaille, R. Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses. *Cell* **2011**, *146* (5), 785–798. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022>.
- (63) Shen, W.; Nikolic, L.; Meunier, C.; Pfrieger, F.; Audinat, E. An Autocrine Purinergic Signaling Controls Astrocyte-Induced Neuronal Excitation. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 11280. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11793-x>.
- (64) Tan, Z.; Liu, Y.; Xi, W.; Lou, H.; Zhu, L.; Guo, Z.; Mei, L.; Duan, S. Glia-Derived ATP Inversely Regulates Excitability of Pyramidal and CCK-Positive Neurons. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 13772. <https://doi.org/10.1038/ncomms13772>.

- (65) Pascual, O.; Ben Achour, S.; Rostaing, P.; Triller, A.; Bessis, A. Microglia Activation Triggers Astrocyte-Mediated Modulation of Excitatory Neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (4), E197–E205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111098109>.
- (66) Shinozaki, Y.; Shibata, K.; Yoshida, K.; Shigetomi, E.; Gachet, C.; Ikenaka, K.; Tanaka, K. F.; Koizumi, S. Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y₁ Receptor Downregulation. *Cell Rep.* **2017**, *19* (6), 1151–1164. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.047>.
- (67) Bianco, F.; Pravettoni, E.; Colombo, A.; Schenk, U.; Möller, T.; Matteoli, M.; Verderio, C. Astrocyte-Derived ATP Induces Vesicle Shedding and IL-1 β Release from Microglia. *J. Immunol.* **2005**, *174* (11), 7268–7277. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7268>.
- (68) Li, Y.; Du, X.; Liu, C.; Wen, Z.; Du, J. Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Dev. Cell* **2012**, *23* (6), 1189–1202. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.027>.
- (69) Stowell, R. D.; Wong, E. L.; Batchelor, H. N.; Mendes, M. S.; Lamantia, C. E.; Whitelaw, B. S.; Majewska, A. K. Cerebellar Microglia Are Dynamically Unique and Survey Purkinje Neurons *in Vivo*: Cb Microglia Survey Purkinje Neurons *In Vivo*. *Dev. Neurobiol.* **2018**, *78* (6), 627–644. <https://doi.org/10.1002/dneu.22572>.
- (70) Cserép, C.; Pósfai, B.; Lénárt, N.; Fekete, R.; László, Z. I.; Lele, Z.; Orsolits, B.; Molnár, G.; Heindl, S.; Schwarcz, A. D.; Ujvári, K.; Környei, Z.; Tóth, K.; Szabadits, E.; Sperlág, B.; Baranyi, M.; Csiba, L.; Hortobágyi, T.; Maglóczy, Z.; Martinecz, B.; Szabó, G.; Erdélyi, F.; Szipőcs, R.; Tamkun, M. M.; Gesierich, B.; Duering, M.; Katona, I.; Liesz, A.; Tamás, G.; Dénes, Á. Microglia Monitor and Protect Neuronal Function through Specialized Somatic Purinergic Junctions. *Science* **2020**, *367* (6477), 528–537. <https://doi.org/10.1126/science.aax6752>.
- (71) Surprenant, A.; Rassendren, F.; Kawashima, E.; North, R. A.; Buell, G. The Cytolytic P2Z Receptor for Extracellular ATP Identified as a P2X Receptor (P2X₇). *Science* **1996**, *272* (5262), 735–738. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.735>.
- (72) Karasawa, A.; Kawate, T. Structural Basis for Subtype-Specific Inhibition of the P2X₇ Receptor. *eLife* **2016**, *5*, e22153. <https://doi.org/10.7554/eLife.22153>.
- (73) McCarthy, A. E.; Yoshioka, C.; Mansoor, S. E. Full-Length P2X₇ Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization. *Cell* **2019**, *179* (3), 659–670.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.017>.
- (74) Nicke, A.; Kuan, Y.-H.; Masin, M.; Rettinger, J.; Marquez-Klaka, B.; Bender, O.; Górecki, D. C.; Murrell-Lagnado, R. D.; Soto, F. A Functional P2X₇ Splice Variant with an Alternative Transmembrane Domain 1 Escapes Gene Inactivation in P2X₇

- Knock-out Mice. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (38), 25813–25822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.033134>.
- (75) Andrejew, R.; Oliveira-Giacomelli, Á.; Ribeiro, D. E.; Glaser, T.; Arnaud-Sampaio, V. F.; Lameu, C.; Ulrich, H. The P2X7 Receptor: Central Hub of Brain Diseases. *Front. Mol. Neurosci.* **2020**, *13*, 124. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00124>.
- (76) Franceschini, A.; Capece, M.; Chiozzi, P.; Falzoni, S.; Sanz, J. M.; Sarti, A. C.; Bonora, M.; Pinton, P.; Di Virgilio, F. The P2X7 Receptor Directly Interacts with the NLRP3 Inflammasome Scaffold Protein. *FASEB J.* **2015**, *29* (6), 2450–2461. <https://doi.org/10.1096/fj.14-268714>.
- (77) Liu, Y.; Xiao, Y.; Li, Z. P2X7 Receptor Positively Regulates MyD88-Dependent NF-KB Activation. *Cytokine* **2011**, *55* (2), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.05.003>.
- (78) Di Virgilio, F.; Dal Ben, D.; Sarti, A. C.; Giuliani, A. L.; Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **2017**, *47* (1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>.
- (79) Adinolfi, E.; Callegari, M. G.; Ferrari, D.; Bolognesi, C.; Minelli, M.; Wieckowski, M. R.; Pinton, P.; Rizzuto, R.; Di Virgilio, F. Basal Activation of the P2X₇ ATP Receptor Elevates Mitochondrial Calcium and Potential, Increases Cellular ATP Levels, and Promotes Serum-Independent Growth. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16* (7), 3260–3272. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-1025>.
- (80) Amoroso, F.; Falzoni, S.; Adinolfi, E.; Ferrari, D.; Di Virgilio, F. The P2X7 Receptor Is a Key Modulator of Aerobic Glycolysis. *Cell Death Dis.* **2012**, *3* (8), e370–e370. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.105>.
- (81) Kan, L. K.; Seneviratne, S.; Drummond, K. J.; Williams, D. A.; O'Brien, T. J.; Monif, M. P2X7 Receptor Antagonism Inhibits Tumour Growth in Human High-Grade Gliomas. *Purinergic Signal.* **2020**, *16* (3), 327–336. <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09705-2>.
- (82) Solle, M.; Labasi, J.; Perregaux, D. G.; Stam, E.; Petrushova, N.; Koller, B. H.; Griffiths, R. J.; Gabel, C. A. Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7 Receptors. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (1), 125–132. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006781200>.
- (83) Chessell, I. P.; Hatcher, J. P.; Bountra, C.; Michel, A. D.; Hughes, J. P.; Green, P.; Egerton, J.; Murfin, M.; Richardson, J.; Peck, W. L.; Grahames, C. B. A.; Casula, M. A.; Yiangou, Y.; Birch, R.; Anand, P.; Buell, G. N. Disruption of the P2X7 Purinoceptor Gene Abolishes Chronic Inflammatory and Neuropathic Pain. *Pain* **2005**, *114* (3), 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.01.002>.

- (84) Sánchez-Nogueiro, J.; Marín-García, P.; Miras-Portugal, M. T. Characterization of a Functional P2X₇-like Receptor in Cerebellar Granule Neurons from P2X₇ Knock-out Mice. *FEBS Lett.* **2005**, *579* (17), 3783–3788. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.073>.
- (85) Masin, M.; Young, C.; Lim, K.; Barnes, S. J.; Xu, X. J.; Marschall, V.; Brutkowski, W.; Mooney, E. R.; Gorecki, D. C.; Murrell-Lagnado, R. Expression, Assembly and Function of Novel C-Terminal Truncated Variants of the Mouse P2X₇ Receptor: Re-Evaluation of P2X₇ Knockouts: MP2X₇ C-Terminal Truncated Variants. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165* (4), 978–993. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01624.x>.
- (86) Metzger, M. W.; Walser, S. M.; Aprile-Garcia, F.; Dedic, N.; Chen, A.; Holsboer, F.; Arzt, E.; Wurst, W.; Deussing, J. M. Genetically Dissecting P2rx₇ Expression within the Central Nervous System Using Conditional Humanized Mice. *Purinergic Signal.* **2017**, *13* (2), 153–170. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9546-z>.
- (87) Kaczmarek-Hajek, K.; Zhang, J.; Kopp, R.; Grosche, A.; Rissiek, B.; Saul, A.; Bruzzone, S.; Engel, T.; Jooss, T.; Krautloher, A.; Schuster, S.; Magnus, T.; Stadelmann, C.; Sirko, S.; Koch-Nolte, F.; Eulenburg, V.; Nicke, A. Re-Evaluation of Neuronal P2X₇ Expression Using Novel Mouse Models and a P2X₇-Specific Nanobody. *eLife* **2018**, *7*, e36217. <https://doi.org/10.7554/eLife.36217>.
- (88) Illes, P.; Khan, T. M.; Rubini, P. Neuronal P2X₇ Receptors Revisited: Do They Really Exist? *J. Neurosci.* **2017**, *37* (30), 7049–7062. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3103-16.2017>.
- (89) Miras-Portugal, M. T.; Sebastián-Serrano, Á.; de Diego García, L.; Díaz-Hernández, M. Neuronal P2X₇ Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology. *J. Neurosci.* **2017**, *37* (30), 7063–7072. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3104-16.2017>.
- (90) Alloisio, S.; Cervetto, C.; Passalacqua, M.; Barbieri, R.; Maura, G.; Nobile, M.; Marcoli, M. Functional Evidence for Presynaptic P2X₇ Receptors in Adult Rat Cerebrocortical Nerve Terminals. *FEBS Lett.* **2008**, *582* (28), 3948–3953. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.10.041>.
- (91) Cuadra, A. E.; Custer, E. E.; Bosworth, E. L.; Lemos, J. R. P2X₇ Receptors in Neurohypophysial Terminals: Evidence for Their Role in Arginine-Vasopressin Secretion: P2X₇R IN NEUROSECRETORY TERMINALS. *J. Cell. Physiol.* **2014**, *229* (3), 333–342. <https://doi.org/10.1002/jcp.24453>.
- (92) Maienschein, V.; Marxen, M.; Volknandt, W.; Zimmermann, H. A Plethora of Presynaptic Proteins Associated with ATP-Storing Organelles in Cultured Astrocytes. *Glia* **1999**, *26* (3), 233–244. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(199905\)26:3<233::aid-glia5>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199905)26:3<233::aid-glia5>3.0.co;2-2).

- (93) Di Virgilio, F.; Schmalzing, G.; Markwardt, F. The Elusive P2X7 Macropore. *Trends Cell Biol.* **2018**, *28* (5), 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.01.005>.
- (94) Dunning, K.; Martz, A.; Peralta, F. A.; Cevoli, F.; Boué-Grabot, E.; Compan, V.; Gautherat, F.; Wolf, P.; Chataigneau, T.; Grutter, T. P2X7 Receptors and TMEM16 Channels Are Functionally Coupled with Implications for Macropore Formation and Current Facilitation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (12), 6542. <https://doi.org/10.3390/ijms22126542>.
- (95) Kopp, R.; Krautloher, A.; Ramírez-Fernández, A.; Nicke, A. P2X7 Interactions and Signaling – Making Head or Tail of It. *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *12*, 183. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00183>.
- (96) Shrivastava, A. N.; Rodriguez, P. C.; Triller, A.; Renner, M. Dynamic Micro-Organization of P2X7 Receptors Revealed by PALM Based Single Particle Tracking. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00232>.
- (97) Toulme, E.; Khakh, B. S. Imaging P2X4 Receptor Lateral Mobility in Microglia. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (18), 14734–14748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.329334>.
- (98) Specht, E. A.; Braselmann, E.; Palmer, A. E. A Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging. *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, *79* (1), 93–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034055>.
- (99) Stepanenko, O.; Stepanenko, O.; Shcherbakova, D.; Kuznetsova, I.; Turoverov, K.; Verkhusha, V. Modern Fluorescent Proteins: From Chromophore Formation to Novel Intracellular Applications. *BioTechniques* **2011**, *51* (5). <https://doi.org/10.2144/000113765>.
- (100) Los, G. V.; Darzins, A.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Learish, R.; McDougall, M. G.; Encell, L. P.; Friedman-Ohana, R.; Wood, M.; Vidurgiris, M. HaloTagTM Interchangeable Labeling Technology for Cell Imaging, Protein Capture and Immobilization. *Promega Cell Notes*. 2005, pp 2–6.
- (101) Keppler, A.; Gendreizig, S.; Gronemeyer, T.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K. A General Method for the Covalent Labeling of Fusion Proteins with Small Molecules in Vivo. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (1), 86–89. <https://doi.org/10.1038/nbt765>.
- (102) Gautier, A.; Juillerat, A.; Heinis, C.; Corrêa, I. R.; Kindermann, M.; Beaufils, F.; Johnsson, K. An Engineered Protein Tag for Multiprotein Labeling in Living Cells. *Chem. Biol.* **2008**, *15* (2), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.01.007>.
- (103) Hughes, L. D.; Rawle, R. J.; Boxer, S. G. Choose Your Label Wisely: Water-Soluble Fluorophores Often Interact with Lipid Bilayers. *PLoS ONE* **2014**, *9* (2), e87649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087649>.

- (104) Noren, C.; Anthony-Cahill, S.; Griffith, M.; Schultz, P. A General Method for Site-Specific Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins. *Science* **1989**, *244* (4901), 182–188. <https://doi.org/10.1126/science.2649980>.
- (105) Nguyen, D. P.; Mahesh, M.; Elsässer, S. J.; Hancock, S. M.; Uttamapinant, C.; Chin, J. W. Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (6), 2240–2243. <https://doi.org/10.1021/ja412191m>.
- (106) Beliu, G.; Kurz, A. J.; Kuhlemann, A. C.; Behringer-Pliess, L.; Meub, M.; Wolf, N.; Seibel, J.; Shi, Z.-D.; Schnermann, M.; Grimm, J. B.; Lavis, L. D.; Doose, S.; Sauer, M. Bioorthogonal Labeling with Tetrazine-Dyes for Super-Resolution Microscopy. *Commun. Biol.* **2019**, *2* (1), 261. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0518-z>.
- (107) Nikić, I.; Kang, J. H.; Girona, G. E.; Aramburu, I. V.; Lemke, E. A. Labeling Proteins on Live Mammalian Cells Using Click Chemistry. *Nat. Protoc.* **2015**, *10* (5), 780–791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.045>.
- (108) Elia, N. Using Unnatural Amino Acids to Selectively Label Proteins for Cellular Imaging: A Cell Biologist Viewpoint. *FEBS J.* **2021**, *288* (4), 1107–1117. <https://doi.org/10.1111/febs.15477>.
- (109) Wang, Q.; Wang, L. New Methods Enabling Efficient Incorporation of Unnatural Amino Acids in Yeast. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (19), 6066–6067. <https://doi.org/10.1021/ja800894n>.
- (110) Greiss, S.; Chin, J. W. Expanding the Genetic Code of an Animal. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (36), 14196–14199. <https://doi.org/10.1021/ja2054034>.
- (111) Smolskaya, S.; Andreev, Y. Site-Specific Incorporation of Unnatural Amino Acids into Escherichia Coli Recombinant Protein: Methodology Development and Recent Achievement. *Biomolecules* **2019**, *9* (7), 255. <https://doi.org/10.3390/biom9070255>.
- (112) Tsukiji, S.; Miyagawa, M.; Takaoka, Y.; Tamura, T.; Hamachi, I. Ligand-Directed Tosyl Chemistry for Protein Labeling in Vivo. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5* (5), 341–343. <https://doi.org/10.1038/nchembio.157>.
- (113) Tamura, T.; Ueda, T.; Goto, T.; Tsukidate, T.; Shapira, Y.; Nishikawa, Y.; Fujisawa, A.; Hamachi, I. Rapid Labelling and Covalent Inhibition of Intracellular Native Proteins Using Ligand-Directed N-Acyl-N-Alkyl Sulfonamide. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 1870. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04343-0>.
- (114) Ojima, K.; Shiraiwa, K.; Soga, K.; Doura, T.; Takato, M.; Komatsu, K.; Yuzaki, M.; Hamachi, I.; Kiyonaka, S. Ligand-Directed Two-Step Labeling to Quantify Neuronal Glutamate Receptor Trafficking. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 831. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21082-x>.

- (115) Cavasotto, C. N.; Abagyan, R. A. Protein Flexibility in Ligand Docking and Virtual Screening to Protein Kinases. *J. Mol. Biol.* **2004**, *337* (1), 209–225. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.003>.
- (116) Tamura, T.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. Native FKBP12 Engineering by Ligand-Directed Tosyl Chemistry: Labeling Properties and Application to Photo-Cross-Linking of Protein Complexes in Vitro and in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (4), 2216–2226. <https://doi.org/10.1021/ja209641t>.
- (117) Sacquin-Mora, S.; Lavery, R. Investigating the Local Flexibility of Functional Residues in Hemoproteins. *Biophys. J.* **2006**, *90* (8), 2706–2717. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.074997>.
- (118) Amaike, K.; Tamura, T.; Hamachi, I. Recognition-Driven Chemical Labeling of Endogenous Proteins in Multi-Molecular Crowding in Live Cells. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (88), 11972–11983. <https://doi.org/10.1039/C7CC07177A>.
- (119) Tamura, T.; Hamachi, I. Chemistry for Covalent Modification of Endogenous/Native Proteins: From Test Tubes to Complex Biological Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (7), 2782–2799. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b11747>.
- (120) Sakamoto, S.; Hamachi, I. Recent Progress in Chemical Modification of Proteins. *Anal. Sci.* **2019**, *35* (1), 5–27. <https://doi.org/10.2116/analsci.18R003>.
- (121) Shiraiwa, K.; Cheng, R.; Nonaka, H.; Tamura, T.; Hamachi, I. Chemical Tools for Endogenous Protein Labeling and Profiling. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27* (8), 970–985. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.06.016>.
- (122) Takaoka, Y.; Nishikawa, Y.; Hashimoto, Y.; Sasaki, K.; Hamachi, I. Ligand-Directed Dibromophenyl Benzoate Chemistry for Rapid and Selective Acylation of Intracellular Natural Proteins. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (5), 3217–3224. <https://doi.org/10.1039/C5SC00190K>.
- (123) Lohse, J.; Swier, L. J. Y. M.; Oudshoorn, R. C.; Médard, G.; Kuster, B.; Slotboom, D.-J.; Witte, M. D. Targeted Diazotransfer Reagents Enable Selective Modification of Proteins with Azides. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (4), 913–917. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00110>.
- (124) Yamaguchi, T.; Asanuma, M.; Nakanishi, S.; Saito, Y.; Okazaki, M.; Dodo, K.; Sodeoka, M. Turn-ON Fluorescent Affinity Labeling Using a Small Bifunctional O-Nitrobenzoxadiazole Unit. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (3), 1021–1029. <https://doi.org/10.1039/C3SC52704B>.
- (125) Denda, M.; Morisaki, T.; Kohiki, T.; Yamamoto, J.; Sato, K.; Sagawa, I.; Inokuma, T.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.; Otaka, A. Labelling of Endogenous Target Protein via N–S Acyl Transfer-Mediated Activation of N-Sulfanylethylanilide. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (26), 6244–6251. <https://doi.org/10.1039/C6OB01014H>.

- (126) Kojima, H.; Fujita, Y.; Takeuchi, R.; Ikebe, Y.; Ohashi, N.; Yamamoto, K.; Itoh, T. Cyclization Reaction-Based Turn-on Probe for Covalent Labeling of Target Proteins. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27* (3), 334–349.e11. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.01.006>.
- (127) Matsuo, K.; Nishikawa, Y.; Masuda, M.; Hamachi, I. Live-Cell Protein Sulfonylation Based on Proximity-driven *N*-Sulfonyl Pyridone Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (3), 659–662. <https://doi.org/10.1002/anie.201707972>.
- (128) Hughes, C. C.; Yang, Y.-L.; Liu, W.-T.; Dorrestein, P. C.; Clair, J. J. L.; Fenical, W. Marinopyrrole A Target Elucidation by Acyl Dye Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (34), 12094–12096. <https://doi.org/10.1021/ja903149u>.
- (129) Fujishima, S.; Yasui, R.; Miki, T.; Ojida, A.; Hamachi, I. Ligand-Directed Acyl Imidazole Chemistry for Labeling of Membrane-Bound Proteins on Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (9), 3961–3964. <https://doi.org/10.1021/ja2108855>.
- (130) Koshi, Y.; Nakata, E.; Miyagawa, M.; Tsukiji, S.; Ogawa, T.; Hamachi, I. Target-Specific Chemical Acylation of Lectins by Ligand-Tethered DMAP Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (1), 245–251. <https://doi.org/10.1021/ja075684q>.
- (131) Tamura, T.; Song, Z.; Amaike, K.; Lee, S.; Yin, S.; Kiyonaka, S.; Hamachi, I. Affinity-Guided Oxime Chemistry for Selective Protein Acylation in Live Tissue Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (40), 14181–14191. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07339>.
- (132) Tamura, T.; Takato, M.; Shiono, K.; Hamachi, I. Development of a Photoactivatable Proximity Labeling Method for the Identification of Nuclear Proteins. *Chem. Lett.* **2020**, *49* (2), 145–148. <https://doi.org/10.1246/cl.190804>.
- (133) Takaoka, Y.; Kioi, Y.; Morito, A.; Otani, J.; Arita, K.; Ashihara, E.; Ariyoshi, M.; Tochio, H.; Shirakawa, M.; Hamachi, I. Quantitative Comparison of Protein Dynamics in Live Cells and in Vitro by In-Cell 19F-NMR. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (27), 2801. <https://doi.org/10.1039/c3cc39205h>.
- (134) Tamura, T.; Kioi, Y.; Miki, T.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. Fluorophore Labeling of Native FKBP12 by Ligand-Directed Tosyl Chemistry Allows Detection of Its Molecular Interactions in Vitro and in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (18), 6782–6785. <https://doi.org/10.1021/ja401956b>.
- (135) Ueda, T.; Tamura, T.; Hamachi, I. In Situ Construction of Protein-Based Semisynthetic Biosensors. *ACS Sens.* **2018**, *3* (3), 527–539. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00894>.
- (136) Wakayama, S.; Kiyonaka, S.; Arai, I.; Kakegawa, W.; Matsuda, S.; Ibata, K.; Nemoto, Y. L.; Kusumi, A.; Yuzaki, M.; Hamachi, I. Chemical Labelling for Visualizing Native AMPA Receptors in Live Neurons. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 14850. <https://doi.org/10.1038/ncomms14850>.

- (137) Arttamangkul, S.; Plazek, A.; Platt, E. J.; Jin, H.; Murray, T. F.; Birdsong, W. T.; Rice, K. C.; Farrens, D. L.; Williams, J. T. Visualizing Endogenous Opioid Receptors in Living Neurons Using Ligand-Directed Chemistry. *eLife* **2019**, *8*, e49319. <https://doi.org/10.7554/eLife.49319>.
- (138) de Jonge, N.; Peckys, D. B. Live Cell Electron Microscopy Is Probably Impossible. *ACS Nano* **2016**, *10* (10), 9061–9063. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02809>.
- (139) Wolf, D. E. The Optics of Microscope Image Formation. In *Methods in Cell Biology*; Elsevier, 2013; Vol. 114, pp 11–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407761-4.00002-6>.
- (140) Born, M.; Wolf, E.; Bhatia, A. B.; Clemmow, P. C.; Gabor, D.; Stokes, A. R.; Taylor, A. M.; Wayman, P. A.; Wilcock, W. L. *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*, 7th ed.; Cambridge University Press, 1999. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139644181>.
- (141) Young, T.; Young, T. *A Course of Lectures on Natural Philosophy and the Mechanical Arts. By Thomas Young.*; Printed for J. Johnson,: London :, 1807. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.22458>.
- (142) Yin, Z.; Kanade, T.; Chen, M. Understanding the Phase Contrast Optics to Restore Artifact-Free Microscopy Images for Segmentation. *Med. Image Anal.* **2012**, *16* (5), 1047–1062. <https://doi.org/10.1016/j.media.2011.12.006>.
- (143) Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* **1873**, *9* (1), 413–468. <https://doi.org/10.1007/BF02956173>.
- (144) Hildenbrand, G.; Rapp, A.; Spöri, U.; Wagner, C.; Cremer, C.; Hausmann, M. Nano-Sizing of Specific Gene Domains in Intact Human Cell Nuclei by Spatially Modulated Illumination Light Microscopy. *Biophys. J.* **2005**, *88* (6), 4312–4318. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.056796>.
- (145) Noll, F.; Lutsch, G.; Bielka, H. Structure of IgG and IgY Molecules in Ribosome—Antibody Complexes as Studied by Electron Microscopy. *Immunol. Lett.* **1982**, *4* (3), 117–123. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(82\)90021-9](https://doi.org/10.1016/0165-2478(82)90021-9).
- (146) Coster, H. G. L. The Physics of Cell Membranes. *J. Biol. Phys.* **2003**, *29* (4), 363–399. <https://doi.org/10.1023/A:1027362704125>.
- (147) Hink, M. A.; Griep, R. A.; Borst, J. W.; van Hoek, A.; Eppink, M. H. M.; Schots, A.; Visser, A. J. W. G. Structural Dynamics of Green Fluorescent Protein Alone and Fused with a Single Chain Fv Protein. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (23), 17556–17560. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001348200>.
- (148) Choquet, D. ". *Neuron* **2014**, *84* (6), 1116–1119. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.002>.

- (149) Gustafsson, M. G. L. Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy. SHORT COMMUNICATION. *J. Microsc.* **2000**, *198* (2), 82–87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>.
- (150) Schermelleh, L.; Carlton, P. M.; Haase, S.; Shao, L.; Winoto, L.; Kner, P.; Burke, B.; Cardoso, M. C.; Agard, D. A.; Gustafsson, M. G. L.; Leonhardt, H.; Sedat, J. W. Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy. *Science* **2008**, *320* (5881), 1332–1336. <https://doi.org/10.1126/science.1156947>.
- (151) Heintzmann, R.; Huser, T. Super-Resolution Structured Illumination Microscopy. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (23), 13890–13908. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00218>.
- (152) Song, L.; Lu-Walther, H.-W.; Förster, R.; Jost, A.; Kielhorn, M.; Zhou, J.; Heintzmann, R. Fast Structured Illumination Microscopy Using Rolling Shutter Cameras. *Meas. Sci. Technol.* **2016**, *27* (5), 055401. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/27/5/055401>.
- (153) O’Holleran, K.; Shaw, M. Optimized Approaches for Optical Sectioning and Resolution Enhancement in 2D Structured Illumination Microscopy. *Biomed. Opt. Express* **2014**, *5* (8), 2580. <https://doi.org/10.1364/BOE.5.002580>.
- (154) Vicidomini, G.; Bianchini, P.; Diaspro, A. STED Super-Resolved Microscopy. *Nat. Methods* **2018**, *15* (3), 173–182. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4593>.
- (155) Galiani, S.; Harke, B.; Vicidomini, G.; Lignani, G.; Benfenati, F.; Diaspro, A.; Bianchini, P. Strategies to Maximize the Performance of a STED Microscope. *Opt. Express* **2012**, *20* (7), 7362. <https://doi.org/10.1364/OE.20.007362>.
- (156) Klar, T. A.; Jakobs, S.; Dyba, M.; Egner, A.; Hell, S. W. Fluorescence Microscopy with Diffraction Resolution Barrier Broken by Stimulated Emission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97* (15), 8206–8210. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8206>.
- (157) Willig, K. I.; Rizzoli, S. O.; Westphal, V.; Jahn, R.; Hell, S. W. STED Microscopy Reveals That Synaptotagmin Remains Clustered after Synaptic Vesicle Exocytosis. *Nature* **2006**, *440* (7086), 935–939. <https://doi.org/10.1038/nature04592>.
- (158) Kittel, R. J. Bruchpilot Promotes Active Zone Assembly, Ca²⁺ Channel Clustering, and Vesicle Release. *Science* **2006**, *312* (5776), 1051–1054. <https://doi.org/10.1126/science.1126308>.
- (159) Galbraith, C. G.; Galbraith, J. A. Super-Resolution Microscopy at a Glance. *J. Cell Sci.* **2011**, *124* (10), 1607–1611. <https://doi.org/10.1242/jcs.080085>.
- (160) Lauterbach, M. A.; Ullal, C. K.; Westphal, V.; Hell, S. W. Dynamic Imaging of Colloidal-Crystal Nanostructures at 200 Frames per Second. *Langmuir* **2010**, *26* (18), 14400–14404. <https://doi.org/10.1021/la102474p>.

- (161) Donnert, G.; Keller, J.; Wurm, C. A.; Rizzoli, S. O.; Westphal, V.; Schönle, A.; Jahn, R.; Jakobs, S.; Eggeling, C.; Hell, S. W. Two-Color Far-Field Fluorescence Nanoscopy. *Biophys. J.* **2007**, *92* (8), L67–L69. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104497>.
- (162) Hell, S. W.; Jakobs, S.; Kastrup, L. Imaging and Writing at the Nanoscale with Focused Visible Light through Saturable Optical Transitions. *Appl. Phys. Mater. Sci. Process.* **2003**, *77* (7), 859–860. <https://doi.org/10.1007/s00339-003-2292-4>.
- (163) Chen, F.; Tillberg, P. W.; Boyden, E. S. Expansion Microscopy. *Science* **2015**, *347* (6221), 543–548. <https://doi.org/10.1126/science.1260088>.
- (164) Sarkar, D.; Kang, J.; Wassie, A. T.; Schroeder, M. E.; Peng, Z.; Tarr, T. B.; Tang, A.-H.; Niederst, E.; Young, Jennie. Z.; Tsai, L.-H.; Blanpied, T. A.; Boyden, E. S. *Expansion Revealing: Decrowding Proteins to Unmask Invisible Brain Nanostructures*; preprint; Bioengineering, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.08.29.273540>.
- (165) Wassie, A. T.; Zhao, Y.; Boyden, E. S. Expansion Microscopy: Principles and Uses in Biological Research. *Nat. Methods* **2019**, *16* (1), 33–41. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0219-4>.
- (166) Chen, F.; Wassie, A. T.; Cote, A. J.; Sinha, A.; Alon, S.; Asano, S.; Daugharthy, E. R.; Chang, J.-B.; Marblestone, A.; Church, G. M.; Raj, A.; Boyden, E. S. Nanoscale Imaging of RNA with Expansion Microscopy. *Nat. Methods* **2016**, *13* (8), 679–684. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3899>.
- (167) Betzig, E. Proposed Method for Molecular Optical Imaging. *Opt. Lett.* **1995**, *20* (3), 237. <https://doi.org/10.1364/OL.20.000237>.
- (168) Moerner, W. E.; Kador, L. Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid. *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *62* (21), 2535–2538. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.62.2535>.
- (169) Orrit, M.; Bernard, J. Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a *p*-Terphenyl Crystal. *Phys. Rev. Lett.* **1990**, *65* (21), 2716–2719. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.65.2716>.
- (170) Dickson, R. M.; Cubitt, A. B.; Tsien, R. Y.; Moerner, W. E. On/off Blinking and Switching Behaviour of Single Molecules of Green Fluorescent Protein. *Nature* **1997**, *388* (6640), 355–358. <https://doi.org/10.1038/41048>.
- (171) Patterson, G. H.; Lippincott-Schwartz, J. A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells. *Science* **2002**, *297* (5588), 1873–1877. <https://doi.org/10.1126/science.1074952>.
- (172) Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifacio, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* **2006**, *313* (5793), 1642–1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>.

- (173) Hess, S. T.; Girirajan, T. P. K.; Mason, M. D. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophys. J.* **2006**, *91* (11), 4258–4272. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>.
- (174) Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X. Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). *Nat. Methods* **2006**, *3* (10), 793–796. <https://doi.org/10.1038/nmeth929>.
- (175) Sauer, M.; Heilemann, M. Single-Molecule Localization Microscopy in Eukaryotes. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (11), 7478–7509. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00667>.
- (176) Goncalves, J.; Bartol, T. M.; Camus, C.; Levet, F.; Menegolla, A. P.; Sejnowski, T. J.; Sibarita, J.-B.; Vivaudou, M.; Choquet, D.; Hosy, E. Nanoscale Co-Organization and Coactivation of AMPAR, NMDAR, and MGluR at Excitatory Synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117* (25), 14503–14511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922563117>.
- (177) Rahbek-Clemmensen, T.; Lycas, M. D.; Erlendsson, S.; Eriksen, J.; Apuschkin, M.; Vilhardt, F.; Jørgensen, T. N.; Hansen, F. H.; Gether, U. Super-Resolution Microscopy Reveals Functional Organization of Dopamine Transporters into Cholesterol and Neuronal Activity-Dependent Nanodomains. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 740. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00790-3>.
- (178) Henriques, R.; Griffiths, C.; Hesper Rego, E.; Mhlanga, M. M. PALM and STORM: Unlocking Live-Cell Super-Resolution. *Biopolymers* **2011**, *95* (5), 322–331. <https://doi.org/10.1002/bip.21586>.
- (179) Wombacher, R.; Heidbreder, M.; van de Linde, S.; Sheetz, M. P.; Heilemann, M.; Cornish, V. W.; Sauer, M. Live-Cell Super-Resolution Imaging with Trimethoprim Conjugates. *Nat. Methods* **2010**, *7* (9), 717–719. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1489>.
- (180) Lukinavičius, G.; Umezawa, K.; Olivier, N.; Honigsmann, A.; Yang, G.; Plass, T.; Mueller, V.; Reymond, L.; Corrêa, I. R.; Luo, Z.-G.; Schultz, C.; Lemke, E. A.; Heppenstall, P.; Eggeling, C.; Manley, S.; Johnsson, K. A Near-Infrared Fluorophore for Live-Cell Super-Resolution Microscopy of Cellular Proteins. *Nat. Chem.* **2013**, *5* (2), 132–139. <https://doi.org/10.1038/nchem.1546>.
- (181) Huang, B.; Wang, W.; Bates, M.; Zhuang, X. Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science* **2008**, *319* (5864), 810–813. <https://doi.org/10.1126/science.1153529>.
- (182) Lakadamyali, M.; Babcock, H.; Bates, M.; Zhuang, X.; Lichtman, J. 3D Multicolor Super-Resolution Imaging Offers Improved Accuracy in Neuron Tracing. *PLoS ONE* **2012**, *7* (1), e30826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030826>.

- (183) Sigal, Y. M.; Speer, C. M.; Babcock, H. P.; Zhuang, X. Mapping Synaptic Input Fields of Neurons with Super-Resolution Imaging. *Cell* **2015**, *163* (2), 493–505. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.033>.
- (184) Zhang, J.; Carver, C. M.; Choveau, F. S.; Shapiro, M. S. Clustering and Functional Coupling of Diverse Ion Channels and Signaling Proteins Revealed by Super-Resolution STORM Microscopy in Neurons. *Neuron* **2016**, *92* (2), 461–478. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.014>.
- (185) Nirenberg, V. A.; Yifrach, O. Bridging the Molecular-Cellular Gap in Understanding Ion Channel Clustering. *Front. Pharmacol.* **2020**, *10*, 1644. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01644>.
- (186) Ye, X. Multi-Scale Methodology: A Key to Deciphering Systems Biology. *Front. Biosci.* **2005**, *10* (1–3), 961. <https://doi.org/10.2741/1590>.
- (187) Ellis, G. F. R.; Kopel, J. The Dynamical Emergence of Biology From Physics: Branching Causation via Biomolecules. *Front. Physiol.* **2019**, *9*, 1966. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01966>.
- (188) Zhang, W.; Hu, C.; Zhu, Z.; Luo, H. Effect of P2X7 Receptor on Tumorigenesis and Its Pharmacological Properties. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *125*, 109844. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109844>.
- (189) Allsopp, R. C.; Dayl, S.; Schmid, R.; Evans, R. J. Unique Residues in the ATP Gated Human P2X7 Receptor Define a Novel Allosteric Binding Pocket for the Selective Antagonist AZ10606120. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 725. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00732-5>.
- (190) Terrier, F.; MacCormack, P.; Kizilian, E.; Hallé, J.-C.; Demerseman, P.; Guir, F.; Lion, C. Non-Linear Brønsted Correlations: Evidence for a Levelling off in the Reactivity of Oximate Ions in Aqueous Solution. *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1991**, No. 1, 153–158. <https://doi.org/10.1039/P29910000153>.
- (191) Ford, R.; Leroux, F.; Stocks, M. Novel Adamantane Derivatives. WO 03/080579 A1, October 2, 2003.
- (192) Kwak, S.-H.; Shin, S.; Lee, J.-H.; Shim, J.-K.; Kim, M.; Lee, S.-D.; Lee, A.; Bae, J.; Park, J.-H.; Abdelrahman, A.; Müller, C. E.; Cho, S. K.; Kang, S.-G.; Bae, M. A.; Yang, J. Y.; Ko, H.; Goddard, W. A.; Kim, Y.-C. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Quinolinone and Quinoline-Based P2X7 Receptor Antagonists and Their Anti-Sphere Formation Activities in Glioblastoma Cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 462–481. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.023>.
- (193) Michaels, H. A.; Zhu, L. Ligand-Assisted, Copper(II) Acetate-Accelerated Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. - Asian J.* **2011**, *6* (10), 2825–2834. <https://doi.org/10.1002/asia.201100426>.

- (194) Zhou, Z.; Fahrni, C. J. A Fluorogenic Probe for the Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Ligation Reaction: Modulation of the Fluorescence Emission via $^3(n, \pi^*) \rightarrow ^1(\pi, \pi^*)$ Inversion. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (29), 8862–8863. <https://doi.org/10.1021/ja049684r>.
- (195) Bindels, D. S.; Haarbosch, L.; van Weeren, L.; Postma, M.; Wiese, K. E.; Mastop, M.; Aumonier, S.; Gotthard, G.; Royant, A.; Hink, M. A.; Gadella, T. W. J. MScarlet: A Bright Monomeric Red Fluorescent Protein for Cellular Imaging. *Nat. Methods* **2017**, *14* (1), 53–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4074>.
- (196) Heidler, P.; Link, A. N-Acyl-N-Alkyl-Sulfonamide Anchors Derived from Kenner’s Safety-Catch Linker: Powerful Tools in Bioorganic and Medicinal Chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (3), 585–599. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.045>.
- (197) Guile, S. D.; Alcaraz, L.; Birkinshaw, T. N.; Bowers, K. C.; Ebden, M. R.; Furber, M.; Stocks, M. J. Antagonists of the P2X₇ Receptor. From Lead Identification to Drug Development. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (10), 3123–3141. <https://doi.org/10.1021/jm801528x>.
- (198) Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17* (7), 522–524. <https://doi.org/10.1002/anie.197805221>.
- (199) Finkelstein, H. Darstellung organischer Jodide aus den entsprechenden Bromiden und Chloriden. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1910**, *43* (2), 1528–1532. <https://doi.org/10.1002/cber.19100430257>.
- (200) Janks, L.; Sprague, R. S.; Egan, T. M. ATP-Gated P2X₇ Receptors Require Chloride Channels To Promote Inflammation in Human Macrophages. *J. Immunol.* **2019**, *202* (3), 883–898. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801101>.
- (201) Tong, L. Structure and Function of Biotin-Dependent Carboxylases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70* (5), 863–891. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1096-0>.
- (202) Schermelleh, L.; Heintzmann, R.; Leonhardt, H. A Guide to Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *J. Cell Biol.* **2010**, *190* (2), 165–175. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002018>.
- (203) He, Y.; Yao, X.; Taylor, N.; Bai, Y.; Lovenberg, T.; Bhattacharya, A. RNA Sequencing Analysis Reveals Quiescent Microglia Isolation Methods from Postnatal Mouse Brains and Limitations of BV2 Cells. *J. Neuroinflammation* **2018**, *15* (1), 153. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1195-4>.
- (204) Blasi, E.; Barluzzi, R.; Bocchini, V.; Mazzolla, R.; Bistoni, F. immortalization of Murine Microglial Cells by a V-Raf / v-Myc Carrying Retrovirus. *J. Neuroimmunol.* **1990**, *27* (2–3), 229–237. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90073-V](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90073-V).

- (205) Henn, A. The Suitability of BV2 Cells as Alternative Model System for Primary Microglia Cultures or for Animal Experiments Examining Brain Inflammation. *ALTEx* **2009**, 83–94. <https://doi.org/10.14573/altex.2009.2.83>.
- (206) Cizkova, D.; Devaux, S.; Le Marrec-Croq, F.; Franck, J.; Slovinska, L.; Blasko, J.; Rosocha, J.; Spakova, T.; Lefebvre, C.; Fournier, I.; Salzet, M. Modulation Properties of Factors Released by Bone Marrow Stromal Cells on Activated Microglia: An in Vitro Study. *Sci. Rep.* **2015**, 4 (1), 7514. <https://doi.org/10.1038/srep07514>.
- (207) Viceconte, N.; Burguillos, M. A.; Herrera, A. J.; De Pablos, R. M.; Joseph, B.; Venero, J. L. Neuromelanin Activates Proinflammatory Microglia through a Caspase-8-Dependent Mechanism. *J. Neuroinflammation* **2015**, 12 (1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0228-x>.
- (208) Chen, C.; Yuanyuan, Q. Effect of Wasabi Extract on Inflammatory Response of BV2 Cells Induced by Lipopolysaccharide. *E3S Web Conf.* **2019**, 78, 01011. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20197801011>.
- (209) Jolivel, V.; Brun, S.; Binamé, F.; Benyounes, J.; Taleb, O.; Bagnard, D.; De Sèze, J.; Patte-Mensah, C.; Mensah-Nyagan, A.-G. Microglial Cell Morphology and Phagocytic Activity Are Critically Regulated by the Neurosteroid Allopregnanolone: A Possible Role in Neuroprotection. *Cells* **2021**, 10 (3), 698. <https://doi.org/10.3390/cells10030698>.
- (210) Asatryan, L.; Ostrovskaya, O.; Lieu, D.; Davies, D. L. Ethanol Differentially Modulates P2X4 and P2X7 Receptor Activity and Function in BV2 Microglial Cells. *Neuropharmacology* **2018**, 128, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.030>.
- (211) Ismail, E. N.; Jantan, I.; Vidyadaran, S.; Jamal, J. A.; Azmi, N. Phyllanthus Amarus Prevents LPS-Mediated BV2 Microglial Activation via MyD88 and NF-KB Signaling Pathways. *BMC Complement. Med. Ther.* **2020**, 20 (1), 202. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02961-0>.
- (212) Huang, M.-Y.; Tu, C.-E.; Wang, S.-C.; Hung, Y.-L.; Su, C.-C.; Fang, S.-H.; Chen, C.-S.; Liu, P.-L.; Cheng, W.-C.; Huang, Y.-W.; Li, C.-Y. Corylin Inhibits LPS-Induced Inflammatory Response and Attenuates the Activation of NLRP3 Inflammasome in Microglia. *BMC Complement. Altern. Med.* **2018**, 18 (1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2287-5>.
- (213) Dai, X.; Li, N.; Yu, L.; Chen, Z.; Hua, R.; Qin, X.; Zhang, Y.-M. Activation of BV2 Microglia by Lipopolysaccharide Triggers an Inflammatory Reaction in PC12 Cell Apoptosis through a Toll-like Receptor 4-Dependent Pathway. *Cell Stress Chaperones* **2015**, 20 (2), 321–331. <https://doi.org/10.1007/s12192-014-0552-1>.

- (214) Crews, F. T.; Vetreno, R. P. Neuroimmune Basis of Alcoholic Brain Damage. In *International Review of Neurobiology*; Elsevier, 2014; Vol. 118, pp 315–357. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801284-0.00010-5>.
- (215) Asatryan, L.; Ostrovskaya, O.; Lieu, D.; Davies, D. L. Ethanol Differentially Modulates P2X4 and P2X7 Receptor Activity and Function in BV2 Microglial Cells. *Neuropharmacology* **2018**, *128*, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.030>.
- (216) Khater, I. M.; Nabi, I. R.; Hamarneh, G. A Review of Super-Resolution Single-Molecule Localization Microscopy Cluster Analysis and Quantification Methods. *Patterns* **2020**, *1* (3), 100038. <https://doi.org/10.1016/j.patter.2020.100038>.
- (217) Ripley, B. D. Modelling Spatial Patterns. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **1977**, *39* (2), 172–192. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1977.tb01615.x>.
- (218) Sander, J.; Ester, M.; Kriegel, H.-P.; Xu, X. Density-Based Clustering in Spatial Databases: The Algorithm GDBSCAN and Its Applications. *Data Min. Knowl. Discov.* **1998**, *2* (2), 169–194. <https://doi.org/10.1023/A:1009745219419>.
- (219) Mazouchi, A.; Milstein, J. N. Fast Optimized Cluster Algorithm for Localizations (FOCAL): A Spatial Cluster Analysis for Super-Resolved Microscopy. *Bioinformatics* **2016**, *32* (5), 747–754. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv630>.
- (220) Levet, F.; Hosy, E.; Kechkar, A.; Butler, C.; Beghin, A.; Choquet, D.; Sibarita, J.-B. SR-Tesseler: A Method to Segment and Quantify Localization-Based Super-Resolution Microscopy Data. *Nat. Methods* **2015**, *12* (11), 1065–1071. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3579>.
- (221) Mayhew, T. M.; Mühlfeld, C.; Vanhecke, D.; Ochs, M. A Review of Recent Methods for Efficiently Quantifying Immunogold and Other Nanoparticles Using TEM Sections through Cells, Tissues and Organs. *Ann. Anat. - Anat. Anz.* **2009**, *191* (2), 153–170. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2008.11.001>.
- (222) Dalvit, C.; Veronesi, M.; Vulpetti, A. Fluorine NMR Functional Screening: From Purified Enzymes to Human Intact Living Cells. *J. Biomol. NMR* **2020**, *74* (10–11), 613–631. <https://doi.org/10.1007/s10858-020-00311-3>.
- (223) Uno, S.; Kamiya, M.; Yoshihara, T.; Sugawara, K.; Okabe, K.; Tarhan, M. C.; Fujita, H.; Funatsu, T.; Okada, Y.; Tobita, S.; Urano, Y. A Spontaneously Blinking Fluorophore Based on Intramolecular Spirocyclization for Live-Cell Super-Resolution Imaging. *Nat. Chem.* **2014**, *6* (8), 681–689. <https://doi.org/10.1038/nchem.2002>.
- (224) Frei, M. S.; Hoess, P.; Lampe, M.; Nijmeijer, B.; Kueblbeck, M.; Ellenberg, J.; Wadepohl, H.; Ries, J.; Pitsch, S.; Reymond, L.; Johnsson, K. Photoactivation of Silicon Rhodamines via a Light-Induced Protonation. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 4580. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12480-3>.

- (225) Bannas, P.; Adriouch, S.; Kahl, S.; Braasch, F.; Haag, F.; Koch-Nolte, F. Activity and Specificity of Toxin-Related Mouse T Cell Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2 Depends on Its Association with Lipid Rafts. *Blood* **2005**, *105* (9), 3663–3670. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3325>.
- (226) Garcia-Marcos, M.; Peérez-Andréés, E.; Tandel, S.; Fontanils, U.; Kumps, A.; Kabréé, E.; Goémez-Muñoz, A.; Marino, A.; Dehayé, J.-P.; Pochet, S. Coupling of Two Pools of P2X7 Receptors to Distinct Intracellular Signaling Pathways in Rat Submandibular Gland. *J. Lipid Res.* **2006**, *47* (4), 705–714. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500408-JLR200>.
- (227) Barth, K.; Weinhold, K.; Guenther, A.; Young, M. T.; Schnittler, H.; Kasper, M. Caveolin-1 Influences P2X7 Receptor Expression and Localization in Mouse Lung Alveolar Epithelial Cells: Caveolin-1 and P2X7 Expression in Lung Cells. *FEBS J.* **2007**, *274* (12), 3021–3033. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05830.x>.
- (228) Galbiati, F.; Razani, B.; Lisanti, M. P. Emerging Themes in Lipid Rafts and Caveolae. *Cell* **2001**, *106* (4), 403–411. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00472-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00472-X).
- (229) Pike, L. J. Rafts Defined: A Report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* **2006**, *47* (7), 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>.
- (230) Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C. The Mystery of Membrane Organization: Composition, Regulation and Roles of Lipid Rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (6), 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.
- (231) Płóciennikowska, A.; Hromada-Judycka, A.; Borzęcka, K.; Kwiatkowska, K. Co-Operation of TLR4 and Raft Proteins in LPS-Induced pro-Inflammatory Signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72* (3), 557–581. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1762-5>.
- (232) Levental, I.; Lingwood, D.; Grzybek, M.; Coskun, U.; Simons, K. Palmitoylation Regulates Raft Affinity for the Majority of Integral Raft Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (51), 22050–22054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016184107>.
- (233) Gonnord, P.; Delarasse, C.; Auger, R.; Benihoud, K.; Prigent, M.; Cuif, M. H.; Lamaze, C.; Kanellopoulos, J. M. Palmitoylation of the P2X7 Receptor, an ATP-gated Channel, Controls Its Expression and Association with Lipid Rafts. *FASEB J.* **2009**, *23* (3), 795–805. <https://doi.org/10.1096/fj.08-114637>.
- (234) Grinthal, A.; Guidotti, G. CD39, NTPDase 1, Is Attached to the Plasma Membrane by Two Transmembrane Domains. Why? *Purinergic Signal.* **2006**, *2* (2), 391–398. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-5907-8>.

- (235) Papanikolaou, A.; Papafotika, A.; Murphy, C.; Papamarcaki, T.; Tsolas, O.; Drab, M.; Kurzchalia, T. V.; Kasper, M.; Christoforidis, S. Cholesterol-Dependent Lipid Assemblies Regulate the Activity of the Ecto-Nucleotidase CD39. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (28), 26406–26414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413927200>.
- (236) Savio, L. E. B.; de Andrade Mello, P.; Santos, S. A. C. S.; de Sousa, J. C.; Oliveira, S. D. S.; Minshall, R. D.; Kurtenbach, E.; Wu, Y.; Longhi, M. S.; Robson, S. C.; Coutinho-Silva, R. P2X7 Receptor Activation Increases Caveolin-1 Expression and Macrophage Lipid Raft Formation Boosting CD39 Activity. *J. Cell Sci.* **2020**, jcs.237560. <https://doi.org/10.1242/jcs.237560>.
- (237) Savio, L. E. B.; de Andrade Mello, P.; Figliuolo, V. R.; de Avelar Almeida, T. F.; Santana, P. T.; Oliveira, S. D. S.; Silva, C. L. M.; Feldbrügge, L.; Csizmadia, E.; Minshall, R. D.; Longhi, M. S.; Wu, Y.; Robson, S. C.; Coutinho-Silva, R. CD39 Limits P2X7 Receptor Inflammatory Signaling and Attenuates Sepsis-Induced Liver Injury. *J. Hepatol.* **2017**, *67* (4), 716–726. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.021>.
- (238) Head, B. P.; Patel, H. H.; Roth, D. M.; Murray, F.; Swaney, J. S.; Niesman, I. R.; Farquhar, M. G.; Insel, P. A. Microtubules and Actin Microfilaments Regulate Lipid Raft/Caveolae Localization of Adenylyl Cyclase Signaling Components. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (36), 26391–26399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602577200>.
- (239) Cao, L.; Tanga, F. Y.; DeLeo, J. A. The Contributing Role of CD14 in Toll-like Receptor 4 Dependent Neuropathic Pain. *Neuroscience* **2009**, *158* (2), 896–903. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.10.004>.
- (240) Fessler, M. B.; Parks, J. S. Intracellular Lipid Flux and Membrane Microdomains as Organizing Principles in Inflammatory Cell Signaling. *J. Immunol.* **2011**, *187* (4), 1529–1535. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100253>.
- (241) Miller, Y. I.; Navia-Pelaez, J. M.; Corr, M.; Yaksh, T. L. Lipid Rafts in Glial Cells: Role in Neuroinflammation and Pain Processing. *J. Lipid Res.* **2020**, *61* (5), 655–666. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000468>.
- (242) Robinson, L. E.; Shridar, M.; Smith, P.; Murrell-Lagnado, R. D. Plasma Membrane Cholesterol as a Regulator of Human and Rodent P2X7 Receptor Activation and Sensitization. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (46), 31983–31994. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574699>.
- (243) Graham, F. L.; van der Eb, A. J. A New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA. *Virology* **1973**, *52* (2), 456–467. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90341-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90341-3).
- (244) Olivier, N.; Keller, D.; Rajan, V. S.; Gönczy, P.; Manley, S. Simple Buffers for 3D STORM Microscopy. *Biomed. Opt. Express* **2013**, *4* (6), 885. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.000885>.

(245) Glushonkov, O.; Réal, E.; Boutant, E.; Mély, Y.; Didier, P. Optimized Protocol for Combined PALM-DSTORM Imaging. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 8749. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27059-z>.

Benoît ARNOULD

Stratégie de marquage covalente du récepteur P2X7 natif pour microscopie super-résolutive

Résumé

Le récepteur ionotrope activé par l'ATP extracellulaire P2X7 est un acteur central de la signalisation purinergique. Il exerce un rôle encore mal compris, notamment dans le maintien de l'homéostasie du système nerveux central. Ses implications neuropathologiques sont nombreuses et liées à l'inflammation et à la propagation de cette dernière. Aucun outil d'étude robuste n'a montré une sélectivité suffisante pour étudier la fine dynamique pathophysiologique de cette protéine. Ces travaux de thèses proposent le développement et l'application d'une approche de marquage covalent d'affinité afin de greffer une molécule d'intérêt sur le récepteur endogène. Le réactif de marquage issu de ces travaux, appelé LNASAB, nous a permis d'explorer l'organisation nanométrique du récepteur P2X7 microgliale par microscopie super-résolutive, ainsi que la dynamique des nanodomains qu'il compose en conditions pro-inflammatoires.

Résumé en anglais

P2X7, a ligand-gated ion channel activated by extracellular ATP, is a major feature of purinergic signaling. Its functions is yet to be elucidated, notably in the central nervous system homeostasis balance. Its neuropathological implications are numerous and highly related to inflammation and its propagation. We are currently lacking selective tools to decipher the fine neuropathological dynamic on this protein. The current work here presents the development and application of an innovative chemical approach base on affinity to covalently decorate this receptor with a biotin. The final reagent, called LNASAB, allows us to perform super-resolution in microglia in different pro-inflammatory conditions and explore the dynamics of nanodomain form by P2X7.