

Euphrasie SERVANT
euphrasie.servant@etu.upmc.fr



Licence Sciences De la Vie
Université Pierre et Marie Curie

Les effets de l'AzoSpermine sur les récepteurs NMDA

Juillet 2018

Maître de stage : Laetitia Mony
Organisme d'accueil : Institut de Biologie
de l'Ecole Normale Supérieure, ENS,
CNRS UMR 8197, INSERM U 1024



Introduction	1
Architecture des récepteurs NMDA	1
Les récepteurs NMDA, des récepteurs fortement régulés	1
Une cible d'intérêt thérapeutique	1
L'optopharmacologie face aux limites de la pharmacologie classique	3
Développement de polyamines photosensibles comme inhibiteurs des récepteurs NMDA	3
Objectif	4
Matériel et méthodes	5
Organisme modèle	5
Voltage imposé à deux électrodes (TEVC)	5
Solutions d'enregistrements	6
Résultats et discussion	7
Conversion de l'AzoSpermine en configuration cis : établissement du protocole d'illumination	7
Caractérisation de l'activité de l'AzoSp sur les récepteurs NMDA	7
Un modulateur négatif des récepteurs NMDA puissant avec plusieurs sites et/ou modes de fixations	8
L'AzoSpermine agit comme un bloqueur du pore selon un processus dépendant du potentiel membranaire	8
Une composante d'inhibition commune aux deux conformations de l'AzoSpermine ?	9
Ratio d'activité cis/trans	9
Conclusion	9
Résumé	11
Summary	11
Bibliographie	12

Introduction

Les récepteurs ionotropiques sont des protéines transmembranaires constituées de plusieurs sous-unités protéiques qui s'assemblent pour constituer un canal ionique. L'ouverture de ce canal dépend de la présence d'une espèce chimique appelée neurotransmetteur. Lorsqu'un neurotransmetteur spécifique se lie au récepteur, un changement conformationnel du récepteur s'opère, et le canal s'ouvre. L'ouverture du pore permet le passage des ions au travers de la membrane, initiant le courant électrique à l'origine de la transmission nerveuse.

Le glutamate est un neurotransmetteur qui constitue le médiateur de la plupart des transmissions nerveuses synaptiques chez les Vertébrés. Au niveau post-synaptique, il agit notamment sur les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluR).

Architecture des récepteurs NMDA

Parmi les iGluR, on distingue trois familles de récepteurs qui sont les récepteurs AMPA, kaïnate, et NMDA (Fig. 1A) (Paoletti, Bellone et al. 2013).

Les récepteurs NMDA sont des tétramères, habituellement organisés en dimères de dimères. Le plus souvent, les récepteurs NMDA sont composés de deux sous-unités GluN1, et de deux sous-unités GluN2. Il existe quatre types de sous-unités GluN2 (GluN2A-D) encodées par quatre gènes différents (Kew and Kemp 2005). Chaque sous-unité a une organisation modulaire comprenant (Fig. 1B): au niveau extracellulaire, un domaine N-terminal (NTD), impliqué dans l'assemblage et la modulation de l'activité des récepteurs NMDA, et un domaine de liaison aux agonistes (glutamate sur GluN2 et glycine sur GluN1) (ABD); un domaine transmembranaire (TMD) contenant le pore ; et un domaine C-terminal intracellulaire impliqué dans la signalisation en aval.

Les récepteurs NMDA, des récepteurs fortement régulés

En plus de devoir lier un agoniste qui est le glutamate pour s'activer, les récepteurs NMDA ont la particularité de devoir lier simultanément un co-agoniste, la glycine pour pouvoir ouvrir leur canal ionique. À ce jour, c'est le seul récepteur connu nécessitant la présence d'un co-agoniste pour ouvrir son canal (Paoletti, Bellone et al. 2013).

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs complexes, capables d'être régulés par de nombreuses molécules. Certaines molécules peuvent se lier préférentiellement aux ABD et empêcher leur activation (antagonistes compétitifs). D'autres inhibiteurs se lient sur des sites du récepteur qui sont différents des ABD, appelés sites allostériques, et ces molécules sont des modulateurs allostériques du récepteur. (Fig. 1C)

Certaines molécules se fixent dans le canal, empêchant le passage des ions. C'est le cas du magnésium extracellulaire, des polyamines (ex : spermine), ou de composés pharmacologiques comme le MK-801, la mémantine ou la kétamine (Fig. 1D). (Williams 1997, Kew and Kemp 2005).

Une cible d'intérêt thérapeutique

Les récepteurs NMDA ont une très forte perméabilité au calcium. Le calcium joue un rôle fondamental dans la plasticité synaptique, qui est considérée comme la base cellulaire des processus d'apprentissage et de mémoire. Cependant, une sur-activation de ces récepteurs entraîne un excès de calcium dans la cellule, ce qui peut avoir des effets délétères. C'est l'excitotoxicité. Cette sur-activation peut être la cause de pathologies neuronales dégénératives telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson. Ainsi, les

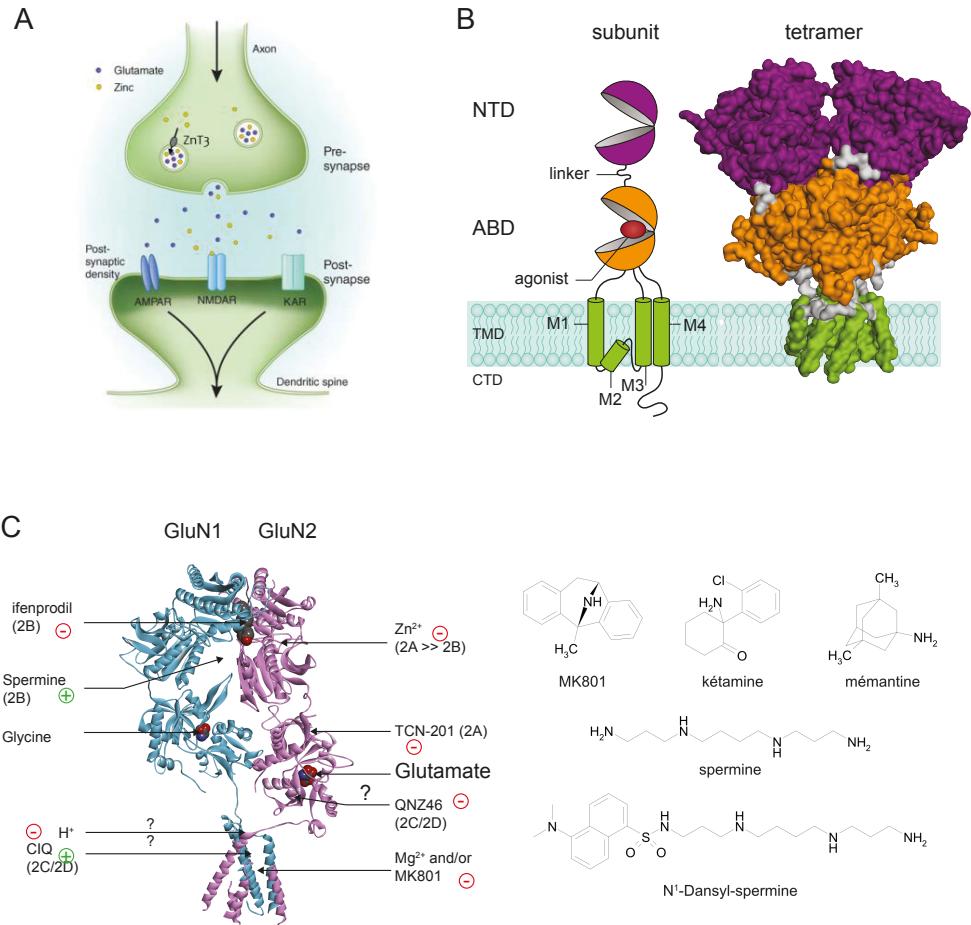


Figure 1 : Les récepteurs ionotropiques au glutamate : architecture et pharmacologie. (A) Schéma d'une synapse glutamatergique. (B) Architecture d'une sous-unité d'iGluR et structure cristallographique d'un récepteur NMDA tétramérique (pdb : 4PE5, Karakas and Furukawa, Science 2014). (C) Architecture d'un dimère GluN1 et GluN2 et sites des modulation allostérique. : potentiateur : inhibiteur. (D) Structures chimiques de bloqueurs du pore des récepteurs NMDA.

récepteurs NMDA sont des cibles d'un grand intérêt thérapeutique. Il est en particulier intéressant de développer des inhibiteurs des récepteurs NMDA afin de contrer les effets délétères de leur sur-activation. Les bloqueurs du pore sont des inhibiteurs puissants des récepteurs NMDA. Ils ont été largement utilisés comme outil d'étude des récepteurs NMDA, ainsi que, pour certains, dans le traitement de certaines pathologies neurologiques. Ainsi, la mémantine (Fig. 1D), un bloqueur du pore des récepteurs NMDA, est actuellement un des seuls médicaments autorisés sur le marché pour lutter contre les symptômes de la maladie d'Alzheimer (Mony, Kew et al. 2009). La kétamine (Fig. 1D) est, elle, actuellement utilisée comme anesthésique et analgésique (Kew and Kemp, 2005). Cependant, l'utilisation de ces composés est limitée par leurs nombreux effets secondaires (hallucinations, notamment), probablement à cause de leur action sur toutes les populations de récepteurs NMDA. Il est donc fondamental de développer des outils permettant le contrôle de l'activité des récepteurs NMDA dans une région précise du cerveau.

L'optopharmacologie face aux limites de la pharmacologie classique

La pharmacologie permet d'étudier la réponse des récepteurs à une substance chimique. Cependant les méthodes de la pharmacologie classique se heurtent à des limites. La diffusion du composé est lente et imprécise. Un composé chimique n'est jamais totalement spécifique et peut ainsi entrer en interaction avec une autre cible. Enfin, une fois relargué, on ne contrôle pas l'activité de ce composé.

Les progrès des techniques expérimentales ont permis de mettre au point des molécules dont on peut contrôler l'activité par la lumière (Kramer et al., Nat Neurosci. 2013). C'est le cas des agonistes « cagés », qui sont protégés par un groupement photolabile qui peut être enlevé par illumination (Fig. 2B). Alors que l'activation par illumination de molécules cagées est irréversible, l'utilisation de molécules photoconvertibles permet une modulation réversible des protéines. Ces ligands photoconvertibles sont obtenus en accolant un groupe photoisomérrable (Fig. 2A) sur le ligand de base. L'illumination du composé permet de le faire passer d'un état actif à inactif, et inversement (Fig 2A) (Kramer, Mourot et al. 2013) en temps réel et dans une région définie par la taille de la zone d'illumination. Ainsi on s'affranchit de la limite spatio-temporelle, ainsi que de la limite de réversibilité.

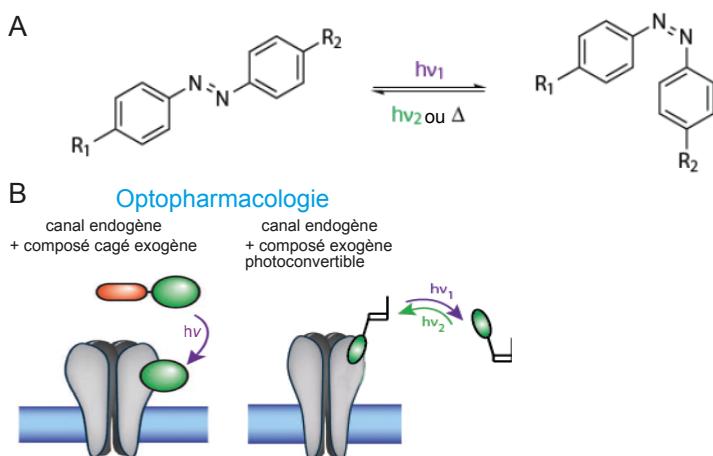


Figure 2 : Principe de l'optopharmacologie. (A) Structure chimique du groupement azobenzène, photoisomérrable entre une conformation *trans* (à gauche) à *cis* (à droite) et inversement en fonction de la longueur d'onde d'illumination. (B) Principe de l'optopharmacologie avec ligand cagé (irréversible, à gauche), et ligand photo-convertisible (réversible, à droite). D'après Kramer et al., 2013.

Développement de polyamines photosensibles comme inhibiteurs des récepteurs NMDA

Les polyamines sont des protéines ubiquitaires de l'organisme. Dans la cellule, elles participent à plusieurs types de réactions métaboliques (régulation du cycle cellulaire, où synthèse de protéine, par exemple). Les polyamines agissent différemment sur les récepteurs NMDA suivant le type de sous-unités qui les compose. Selon le voltage, elles inhibent l'activité des récepteurs NMDA en bloquant le pore selon un mécanisme dépendant du potentiel membranaire. De plus, elles potentialisent sélectivement les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN1 et GluN2B (Igarashi and Kashiwagi 2010). L'équipe de Pierre Paoletti, à l'IBENS, a développé une polyamine photosensible afin d'inhiber de façon photodépendante et réversible les récepteurs NMDA, l'AzoSpermine (AzoSp ; Fig. 3). L'AzoSp est une spermine sur laquelle un groupement photosensible de type azobenzene a été greffé. L'azobenzene, qui se trouve dans son état le plus stable en configuration *trans*, peut s'isomériser en *cis* après illumination à 365 nm (domaine UV) (Fig. 3). Après illumination par de la lumière visible (440-490 nm), il repasse en conformation *trans* (Venancio-Marques, Bergen et al. 2014).

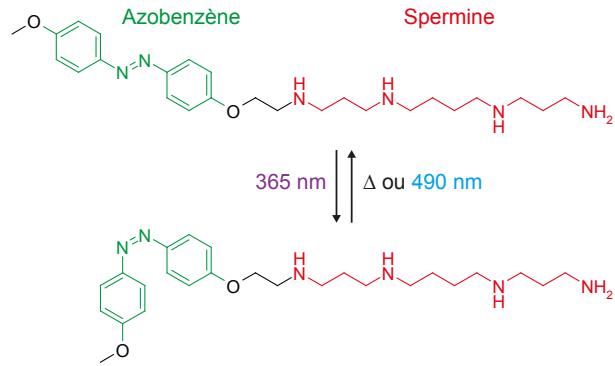


Figure 3 : Structure de l’AzoSp dans ses configurations trans (haut) et cis (bas)

Objectif

Avec Laetitia Mony, nous avons évalué les effets de l’AzoSp en configuration *cis* et *trans* sur des récepteurs NMDA GluN1/GluN2A. Le but était de trouver une concentration pour laquelle une configuration est active, alors que l’autre est inactive. Cela permettrait de mieux comprendre le rôle fonctionnel des récepteurs NMDA et d’entrevoir l’utilisation d’une espèce chimique à des fins thérapeutiques pour des pathologies impliquant une suractivation de ces récepteurs.

Matériel et méthodes

Organisme modèle

L'ovocyte de Xénope

Le modèle utilisé est l'ovocyte de Xénope. L'ovocyte de Xénope est une grosse cellule puisqu'elle mesure à peu près 1mm de diamètre, ce qui permet d'y injecter facilement de l'ADN.

Ce modèle est économique car les Xénopes produisent des milliers d'ovocytes. Les ovocytes sont entourés d'une membrane pellucide qui les rend très résistants à la manipulation, ainsi qu'aux contaminations bactériennes. Enfin, l'ovocyte de Xénope possède une machinerie de transcription et traduction qui permet une forte expression de protéines hétérologues à partir de l'injection d'ADN dans son noyau.

Expression hétérologue des récepteurs NMDA

On injecte l'ADN d'intérêt dans les ovocytes de Xénope à l'aide d'un microinjecteur contenant un capillaire rempli avec l'ADN d'intérêt. Pour l'étude des effets de l'AzoSp, nous avons injecté de l'ADN codant pour les sous-unités sauvages GluN1 et GluN2A (50 nL d'un mélange 1 :1 à 10 ng/ μ L par ovocyte). Une expression suffisante des récepteurs NMDA GluN1/GluN2A à la membrane des ovocytes est généralement obtenue 24 à 48h après l'injection. Après injection, les ovocytes sont conservés à 18°C dans du Barth (milieu salin comprenant [en mM] : 88 NaCl ; 1 KCl ; 0,33 Ca(NO₃)₂ ; 0,41 CaCl₂ ; 0,82 MgSO₄ ; 2,4 NaHCO₃ ; 7,5 HEPES ; pH ajusté à 7,6 avec NaOH), additionné de gentamycine (un antibiotique pour empêcher les contaminations bactériennes), et d'APV. L'APV est un antagoniste sélectif des récepteurs NMDA qui va empêcher une activation potentielle des canaux en cas de présence de glutamate contaminant dans la solution d'incubation des ovocytes. En effet, rappelons que les récepteurs NMDA sont très perméables au calcium, et qu'une trop grande concentration de calcium dans la cellule a des effets néfastes et peut à long terme induire la mort des ovocytes.

Voltage imposé à deux électrodes (TEVC)

Pour mesurer le courant induit par la présence de récepteurs NMDA, nous utilisons la technique de voltage imposé à deux électrodes (Fig. 4A). Une microélectrode impose un potentiel de membrane (voltage) déterminé, ce qui induit l'apparition de mouvements d'ions à travers la membrane de l'ovocyte. La deuxième électrode injecte un courant opposé à celui provoqué par les mouvements d'ions afin de maintenir le potentiel imposé constant. C'est ce courant injecté que l'on mesure, qui est proportionnel à la conductance de la membrane, et donc à l'état d'ouverture des récepteurs exprimés (Fig. 4B). Les données ont été collectées grâce à un amplificateur Oocyte Clamp OC- 725A (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) relié à un ordinateur via une interface Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Les données ont été acquises et analysées par le logiciel pClamp 10.5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Durant l'enregistrement, les ovocytes sont perfusés par une solution de Ringer (en mM : 60 NaCl ; 0,3 BaCl₂, 40 HEPES ; 2,5 KOH ; pH ajusté à 7,3 avec HCl), additionnée ou non d'agents pharmacologiques.

Solutions d'enregistrements

Les solutions d'AzoSp ont été fabriquées à partir de solutions stock à 10, 1 et 0,1mM dans l'eau. Les solutions d'AzoSp *trans* (forme stable) ont été obtenues par simple dilution à la concentration voulue de la solution stock dans le Ringer, dans le noir. Les solutions d'AzoSp *cis* ont été en plus illuminées pendant 20min à 365 nm (domaine UV), directement dans la burette contenant la solution à l'aide d'une LED (CoolLED pE-2,

Andover, UK) à son maximum d'intensité (Fig. 4B). Les solutions sont ensuite conservées dans le noir (on les entoure d'aluminium) pour éviter toute interconversion *cis-trans*.

On rajoute dans les solutions d'AzoSp les agonistes (glutamate et glycine, sans lesquels les récepteurs NMDA ne peuvent s'activer) en concentration sur-saturante (100 μ M). On rajoute également un chélateur du zinc, le DTPA (à 10 μ M). Le DTPA va chélater le zinc contaminant (environ 20 nM) pour l'empêcher d'interagir avec les récepteurs NMDA. En effet, à cette concentration, le zinc inhibe à 50 % les récepteurs NMDA GluN1/GluN2A.



Figure 4 : Techniques pour l'étude de l'activité de l'AzoSp sur les récepteurs NMDAs xe. (A) Voltage imposé à deux électrodes (TEVC) sur ovocyte de Xénope. Gauche, schéma d'un ovocyte de xénope avec des récepteurs laissant passer le courant, et dont le courant est mesuré par TEVC. Droite, exemple de courants enregistrés par TEVC. (B) eSet-up d'éclairage pour l'obtention d'une solution d'AzoSp *cis*.

Résultats et discussion

Conversion de l’AzoSpermine en configuration *cis* : établissement du protocole d’illumination

Comme pour la grande majorité des dérivés d’azobenzène, la forme stable de l’AzoSp est la configuration *trans* (Beharry and Woolley 2011). Pour obtenir une solution d’AzoSp en configuration *cis*, il faut l’illuminer avec de la lumière UV (365 nm). Pour s’assurer que le protocole d’illumination permet bien à l’AzoSp de s’isomériser complètement de *trans* à *cis*, et pour tester sa photostabilité en *cis*, nous avons enregistré les spectres UV-visible d’une solution d’AzoSp à 1 μ M, avant et après illumination à 365 nm (Fig. 5 et voir Matériel et Méthodes).

Le spectre de la solution d’AzoSp dans le noir est typique du composé sous configuration *trans*, avec un pic principal d’absorption à 360 nm. Après 20 min, comme après 40 min d’illumination, le spectre est typique de l’AzoSp en configuration *cis*, avec deux pics à 315 et 460 nm. Entre 20 min et 40 min d’illumination, le spectre n’a pas évolué. 20 min d’illumination sont donc suffisantes pour atteindre le niveau maximal de forme *cis*.

Au bout d’une heure dans le noir, on observe une légère réapparition du pic à 360 nm caractéristique de l’AzoSp *trans*, mais les pics caractéristiques du *cis* à 315 nm et 460 nm sont toujours présents. Au bout d’une heure, le *cis* a donc commencé à s’isomériser en *trans*. Cela indique que les expériences avec le composé en *cis* doivent se faire dans l’heure suivant l’illumination.

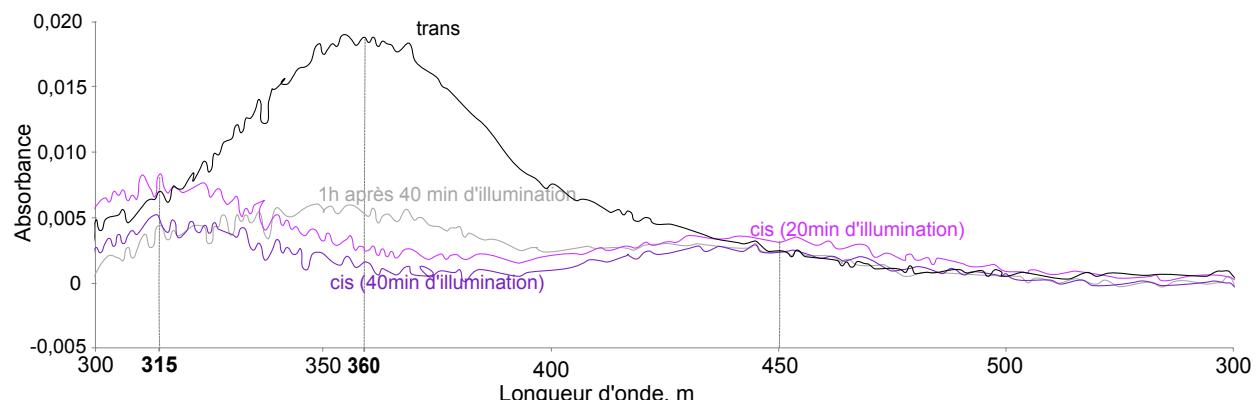


Figure 5 : Caractérisation de la configuration de l’AzoSpermine en solution

Spectres UV-visible d’une solution d’AzoSpermine de 1 μ M en dans le noir (*trans*, trace noire), et après 20 min (*cis*, trace violet clair) et 40 min d’illumination (trace violet foncé) à 365 nm, puis une heure après la fin de l’illumination UV (trace grise).

Caractérisation de l’activité de l’AzoSp sur les récepteurs NMDA

Nous avons évalué l’activité des récepteurs NMDA par électrophysiologie (voir Matériel et Méthodes) en présence d’AzoSp majoritairement en *trans* ou en *cis*, sur des ovocytes de Xénope exprimant le récepteur NMDA GluN1/GluN2A. Ces mesures nous ont permis d’obtenir des traces de courant illustrées en figure 6A.

Un modulateur négatif des récepteurs NMDA puissant avec plusieurs sites et/ou modes de fixations

L’AzoSp sous ses deux configurations inhibe les récepteurs NMDA GluN1/GluN2A. Plus la concentration d’AzoSp augmente, plus l’inhibition est importante (Fig. 6A,B). Les courbes dose-réponse à l’équilibre indiquent des affinités relatives (IC_{50}) de 70 et 90 nM pour les formes *trans* et *cis*, respectivement (Fig. 6B). L’AzoSp a donc une affinité 7000 fois plus élevée que la spermine dont il est dérivé ($IC_{50} \approx 500 \mu M$; (Chao, Seiler et al. 1997)), comme cela a été montré pour d’autres polyamines aromatiques (Chao, Seiler et al. 1997, Igarashi, Shirahata et al. 1997). A l’équilibre, la forme *trans* a une IC_{50} plus faible pour les récepteurs GluN1/GluN2A que la forme *cis*, mais cela cache dénormes disparités en fonction de la concentration. En effet, le *cis* inhibe plus que le *trans* à faible concentration (10-30 nM), alors que le *trans* inhibe plus que le *cis* à plus fortes concentrations.

Les traces représentatives (Fig. 6A) montrent en outre des allures de réponses très différentes en fonction de l’isomère d’AzoSp appliqué (comparer les traces pour 100 nM d’AzoSp *cis* et *trans* à -60mV, Fig. 6A). À 100nM d’AzoSp, la forme *trans* présente une première composante d’inhibition rapide dont l’action est rapidement réversible, et laisse place à une deuxième composante plus lente. À 100nM d’AzoSpermine en conformation *cis*, la composante lente n’est pas présente. À 300 nM de l’isomère *trans*, le courant augmente très rapidement avec 50% d’inhibition au niveau de la première composante, avant de se stabiliser autour de 80% d’inhibition. En conformation *cis*, l’état d’équilibre est beaucoup plus lent à atteindre

Ces différentes composantes sont probablement induites par différents sites ou modes de fixation de l’AzoSp, probablement à cause des propriétés (stériques et électroniques) différentes de la molécule selon ses configurations.

L’AzoSpermine agit comme un bloqueur du pore selon un processus dépendant du potentiel membranaire

Il a été montré que les polyamines et leurs dérivés inhibent l’activité des récepteurs NMDA en bloquant le pore du récepteur (Chao, Seiler et al. 1997, Igarashi, Shirahata et al. 1997, Williams 1997). Les polyamines sont des molécules fortement chargées positivement. Au potentiel imposé auquel sont réalisés les enregistrements, -60 mV, l’intérieur de la membrane est fortement chargé négativement. Les polyamines vont donc être attirées par ce potentiel de membrane vers l’intérieur du pore des récepteurs NMDA où, étant trop volumineuses pour perméer, elles bloqueront le passage des ions. L’obstruction du pore par les polyamines est ainsi un processus fortement dépendant du potentiel membranaire, et plus prononcé à des potentiels hyperpolarisés. (Chao, Seiler et al. 1997, Igarashi, Shirahata et al. 1997, Williams 1997).

Pour déterminer les sites de liaison à l’origine des différentes composantes d’inhibition des AzoSp *cis* et *trans*, nous avons testé l’inhibition induite par 100 nM d’AzoSp à un potentiel imposé de -30 mV. Les inhibitions à l’équilibre sont de 62,5 et 22,8 %, respectivement pour les AzoSp *cis* et *trans* à -30mV, alors qu’elles sont de 44 et de 68 %, respectivement, à -60mV (Fig. 6C). En outre, les deux composantes d’inhibition (rapide et lente) de l’AzoSp *trans* sont affectées par le potentiel membranaire. Toutes les composantes d’inhibition induites par les Azosp *cis* et *trans* étant dépendantes du potentiel membranaire, elles reflètent donc très probablement une fixation des composés dans le pore.

Il est intéressant, enfin, de noter que la vitesse de dissociation de l’AzoSp en *trans* est beaucoup plus faible que celle de l’isomère *cis* (38 s vs 8,4 s, respectivement, pour perdre 10 % de l’inhibition à l’équilibre, Fig. 6D). Ceci pourrait s’expliquer par le fait que la forme

trans est moins polaire que la forme *cis* (Venancio-Marques, Bergen et al. 2014). L'isomère *trans* aura donc plus d'affinité pour le vestibule à l'entrée du pore, qui contient de nombreux résidus hydrophobes (Masuko, Namiki et al. 2009).

Une composante d'inhibition commune aux deux conformations de l'AzoSpermine ?

La courbe dose-réponse de l'AzoSp *cis* à l'équilibre et celle de la première composante (rapide) d'inhibition de l'AzoSp *trans*, ont des valeurs d'inhibition très similaires (Fig. 6B). On peut donc imaginer que la première composante d'inhibition du *trans* soit la même que la composante principale du *cis*, mais qu'une deuxième composante, lente, s'ajoute pour l'isomère *trans* à plus fortes concentrations.

Ratio d'activité *cis/trans*

Le ratio d'activité *cis/trans* à l'équilibre est maximal pour une concentration d'environ 175 µM et atteint un pic de 2,55 (Fig. 6E). Une différence d'activité qui est 2,55 fois plus élevée n'est pas suffisante pour dire que nous avons trouvé une concentration pour laquelle l'une des configurations de l'AzoSp est active et l'autre non (il aurait fallu un rapport au moins égal à 10). Il sera donc nécessaire de modifier la structure chimique de l'AzoSp afin de concevoir des bloqueurs du pore photodépendants avec une meilleure différence d'activité *cis/trans*.

Conclusion

L'AzoSp est donc un modulateur négatif puissant de l'activité des récepteurs NMDA GluN1/GluN2A. Cette molécule agit selon un mode d'action dépendant du voltage complexe qui semble être médié par la fixation au pore (de la même façon que les polyamines en général) avec une plus grande affinité globale pour la forme *trans*. Toutefois, avec un écart maximal d'activité de 2,55, nous n'avons pas rempli l'objectif qui était de trouver une concentration pour laquelle une configuration est active et l'autre non. Pour mettre en évidence les modes de fixation au pore de l'AzoSp, l'idéal serait de cristalliser le récepteur avec l'AzoSp à l'intérieur. On pourrait aussi plus simplement muter le récepteur au niveau de résidus du pore supposés entrer en interaction avec l'AzoSp, et observer l'effet de la mutation sur l'inhibition par le composé.

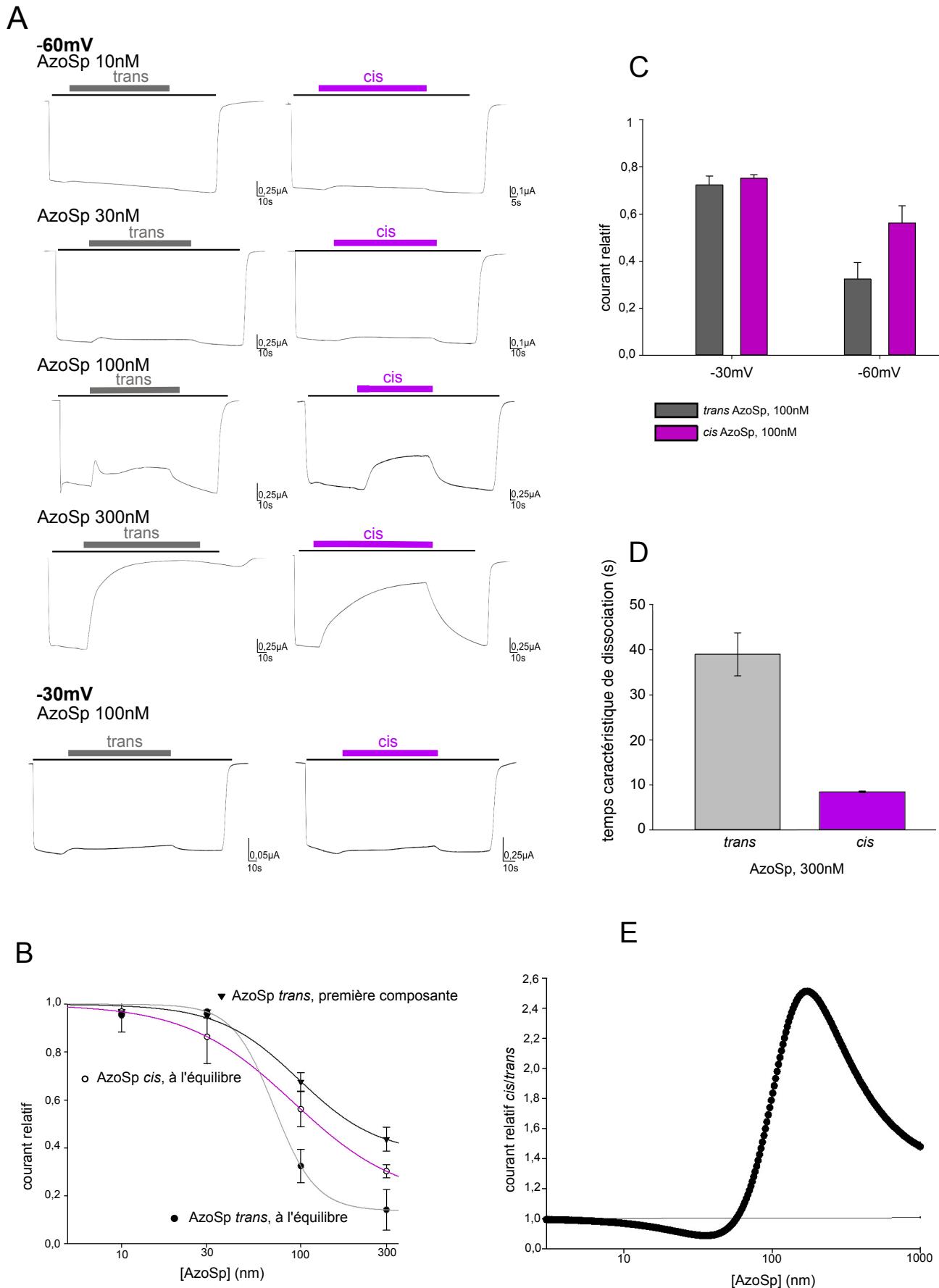


Figure 6 : Résultats : inhibition des récepteurs NMDA par l’AzoSp. (A) Courants représentatifs de récepteurs GluN1/GluN2A en présence d’AzoSp *trans* et *cis* à différentes concentrations, à un potentiel de membrane imposé de -60 mV, et également à 100 nM à un potentiel imposé de -30 mV. (B) Courbes dose-réponse des AzoSp *trans* (noir) et *cis* (violet) mesurées à l’équilibre, ainsi qu’au niveau de la première composante d’inhibition de l’AzoSp *trans* (gris), à un potentiel imposé de -60mV. (C) Inhibition induite par 100 nM d’AzoSp *cis* ou *trans* en fonction du potentiel de membrane imposé (-30mV ou -60mV). (D) Temps nécessaire pour obtenir un lavage de 10 % de l’inhibition à l’équilibre de l’AzoSp *cis* ou *trans*, à une concentration de 300 nM. (E) Rapport des courants relatifs en présence d’AzoSp *cis*, sur les courants relatifs en présence d’AzoSp *trans* en fonction de la concentration.

Résumé

Les récepteurs NMDA sont une famille de récepteurs ionotropiques activés par le glutamate, le neurotransmetteur excitateur le plus commun dans le cerveau des mammifères. Ces récepteurs jouent un rôle central dans la transmission synaptique et dans les phénomènes de plasticité. Ils sont également impliqués dans de nombreux troubles neuropsychiatriques, comme les attaques vasculaires cérébrales, où la schizophrénie. Comprendre le rôle fonctionnel de ces récepteurs dans le cerveau, est fondamental pour développer de nouvelles stratégies pour agir contre les effets délétères de la dérégulation des récepteurs NMDA. Cependant, leur étude est limitée par le manque de spécificité et la faible résolution spatiale et temporelle des outils disponibles.

Grâce à la haute résolution spatiale et temporelle de la lumière, l'optopharmacologie permet de surmonter les limitations de la pharmacologie classique. Cette méthode permet de contrôler l'activité d'un récepteur donné à l'aide d'un ligand soluble et photoisomérisable, dont l'activité peut être modulée de manière réversible selon les conditions d'éclairages. L'AzoSpermine est un polyamine rendu photosensible, grâce à l'ajout d'un groupement azobenzene photoswitchable sur une spermine. Ce groupement azobenzene peut alterner entre une configuration *cis* et *trans*, selon la longueur d'onde à laquelle il est illuminé.

Les polyamines ont deux effets majeurs sur les récepteurs NMDA : ils agissent en bloqueur du pore selon un processus voltage-dépendant de tous les sous-types de récepteurs NMDA, et ils potentient spécifiquement les GluN2B-.

Nous avons essayé de trouver une concentration pour laquelle une configuration de l'AzoSpermine est active, et l'autre ne l'est pas.

Alors que les deux isomères ont des modes d'action différents, ils inhibent tous les deux les récepteurs NMDA GluN1/GluN2A, avec une activité plus prononcée pour la forme *trans*.

Summary

NMDA receptors are a family of excitatory ionotropic receptors activated by glutamate, the major excitatory neurotransmitter in the mammalian brain. These receptors play a central role in synaptic transmission and plasticity. They are also involved in many neuropsychiatric disorders including stroke, or schizophrenia. Understanding the functional role of these receptors in the brain is fundamental to develop new strategies to counteract the deleterious effects of NMDA receptor deregulation.

However, this understanding is limited by the lack of specificity and low spatio-temporal resolution of the currently available tools. Taking advantage of the high spatio-temporal resolution of light, optopharmacology allows overcoming the limitations of classical pharmacology. This method allows to control the activity of a given receptor with a soluble, photo-isomerisable ligand, whose activity on the receptor can be reversibly switched on and off depending on the illumination conditions.

The AzoSpermine is a polyamine for which photosensitivity was conferred by incorporating within the molecule, a photoswitchable, azobenzene moiety that can alternate between a *trans* and a *cis* configuration depending on the illumination wavelengths.

Polyamines produce two main effects on NMDA receptors : a voltage-dependent pore block, affecting all NMDAR sub-types; and a GluN2B- specific potentiation.

We aimed to find a concentration of AzoSpermine where one of its configurations is active, and the other is not.

While the two isomers have different types of behaviors, they both inhibit GluN1/GluN2A NMDA receptors, with a greater activity for the *trans* isomer.

Bibliographie

- Beharry, A. A. and G. A. Woolley (2011). "Azobenzene photoswitches for biomolecules." *Chem Soc Rev* **40**(8): 4422-4437.
- Chao, J., N. Seiler, J. Renault, K. Kashiwagi, T. Masuko, K. Igarashi and K. Williams (1997). "N1-dansyl-spermine and N1-(n-octanesulfonyl)-spermine, novel glutamate receptor antagonists: block and permeation of N-methyl-D-aspartate receptors." *Mol Pharmacol* **51**(5): 861-871.
- Igarashi, K. and K. Kashiwagi (2010). "Modulation of cellular function by polyamines." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(1): 39-51.
- Igarashi, K., A. Shirahata, A. J. Pahk, K. Kashiwagi and K. Williams (1997). "Benzyl-polyamines: novel, potent N-methyl-D-aspartate receptor antagonists." *J Pharmacol Exp Ther* **283**(2): 533-540.
- Kew, J. N. and J. A. Kemp (2005). "Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology." *Psychopharmacology (Berl)* **179**(1): 4-29.
- Kramer, R. H., A. Mourot and H. Adesnik (2013). "Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins." *Nat Neurosci* **16**(7): 816-823.
- Masuko, T., R. Namiki, Y. Nemoto, M. Miyake, Y. Kizawa, T. Suzuki, K. Kashiwagi, K. Igarashi and T. Kusama (2009). "Neuroprotection by tosyl-polyamine derivatives through the inhibition of ionotropic glutamate receptors." *J Pharmacol Exp Ther* **331**(2): 522-530.
- Mony, L., J. N. Kew, M. J. Gunthorpe and P. Paoletti (2009). "Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential." *Br J Pharmacol* **157**(8): 1301-1317.
- Paoletti, P., C. Bellone and Q. Zhou (2013). "NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease." *Nat Rev Neurosci* **14**(6): 383-400.
- Venancio-Marques, A., A. Bergen, C. Rossi-Gendron, S. Rudiuk and D. Baigl (2014). "Photosensitive polyamines for high-performance photocontrol of DNA higher-order structure." *ACS Nano* **8**(4): 3654-3663.
- Williams, K. (1997). "Interactions of polyamines with ion channels." *Biochem J* **325** (Pt 2): 289-297.
- Williams, K. (1997). "Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines." *Cell Signal* **9**(1): 1-13.