

Université de Montréal

**ÉTUDE DE LA RELATION STRUCTURE-FONCTION  
DU SEGMENT S6 DU CANAL POTASSIQUE  $K_{Ca3.1}$ .**

par

Manuel Simoes

Département de Physique

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Physique  
option Biophysique et physiologie moléculaire

© Manuel Simoes, décembre 2005



QC

3

U54

2006

V. 010

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

ÉTUDE DE LA RELATION STRUCTURE-FONCTION  
DU SEGMENT S6 DU CANAL POTASSIQUE  $K_{Ca3.1}$ .

présentée par :  
Manuel Simoes

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Lucie Parent, président-rapporteur  
Rémy Sauvé, directeur de recherche  
Benoît Roux, co-directeur  
Jean-Yves Lapointe, membre du jury  
Régis Pomes, examinateur externe  
Normand Brisson, représentant du doyen de la FES



## Résumé

Le canal potassique dépendant de la concentration intracellulaire de calcium  $K_{Ca3.1}$ , représente une toute nouvelle cible pour des agents pharmacologiques destinés à modifier le fonctionnement des cellules épithéliales et alvéolaires. La connaissance de la structure d'une protéine est une donnée essentielle pour la compréhension de l'action des agents actifs qui modulent son activité. Puisque qu'il n'existe aucune structure cristallographique du canal  $K_{Ca3.1}$ , notre approche a consisté dans un premier temps à créer trois modèles tridimensionnels de la région du pore de  $K_{Ca3.1}$  basés sur les données cristallographiques de trois canaux potassiques différents ; le canal MthK dépendant du calcium intracellulaire, le canal Kv1.2 dépendant du potentiel membranaire et un modèle du canal KcsA dépendant du pH intracellulaire. Ces modèles atomiques furent par la suite testés dans le cadre d'expériences de SCAM (*Substituted-Cysteine Accessibility Method*) où chacun des résidus du pore fut muté en cystéine et son accessibilité mesurée en utilisant des sondes hydrophiles spécifiques (MTSET, MTSEA, MTSACE) au groupement thiol. Les résultats des expériences de SCAM effectuées avec l'agent MTSET présentent une inhibition totale pour les mutants V275C, T278C et V282C suggérant que les résidus V275, T278 et V282 tapissent la paroi du pore lorsque le canal est ouvert. Les résultats des expériences de SCAM avec les mutants A283C, V284C, V285C et A286C présentent une inhibition partielle du courant suggérant que ces résidus sont accessibles à l'eau et qu'ils sont plus éloignés de l'axe de conduction du canal. Afin de traduire les résultats obtenus par les expériences SCAM en données structurales, nous avons entrepris de modéliser le complexe canal-sonde au complet et de déterminer l'impact de la présence de la sonde sur le passage des ions dans le pore. Trois modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  dans sa configuration ouverte ont été modélisés à partir des structures cristallographiques des canaux KcsA, Kv1.2 et MthK. Les agents thiolates MTSET, MTSEA et MTSACE ont également été modélisés et incorporés dans les modèles 3D du canal  $K_{Ca3.1}$  pour simuler des expériences de SCAM. Ce travail, basé sur un modèle cinétique markovien de conduction des ions dans les canaux potassiques, a nécessité le calcul de l'effet électrostatique de la sonde sur l'énergie libre de

solvatation nécessaire à un ion  $K^+$  pour parcourir le pore du canal. La position de la sonde dans la structure du pore et le modèle cinétique de la conduction des ions, nous ont permis de calculer l'effet de la sonde sur la conductance unitaire des modèles du canal  $K_{Ca3.1}$ . La comparaison des résultats de SCAM, avec les prédictions de la conduction ionique pour chacun des modèles atomiques, nous a permis d'identifier la structure cristallographique du canal MthK comme étant celle qui rend au mieux compte des résultats expérimentaux. Les prédictions des modèles du pore du canal  $K_{Ca3.1}$  basées sur les structures cristallographiques du canal Kv1.2 et du canal KcsA sont incompatibles avec les résultats de SCAM. De manière plus générale cette méthode permet de confronter la conductance unitaire mesurée lors des expériences de SCAM avec un modèle atomique d'un canal.

**Mots-clés :** SCAM, diffusion ionique, énergie libre de solvatation, modélisation moléculaire, Poisson-Boltzmann

## Abstract

The calcium activated potassium channel of intermediate conductance  $K_{Ca3.1}$  is now recognized as a key determinant of the control of vascular tone by the endothelium and to the secretion of  $Cl^-$  ions in alveolar cells. This channel constitutes therefore a new target for pharmacological agents susceptible to affect the endothelium and/or alveolar functions. There is unfortunately no X-ray based structural data available for  $K_{Ca3.1}$ . This information is however required for the design of pharmacological agents aimed at controlling the channel activity. To get more insight into the  $K_{Ca3.1}$  structure, we used the Substituted-Cysteine Accessibility Method (SCAM) and computer based modeling to investigate the key structural features of the S6 transmembrane segment of the  $K_{Ca3.1}$  channel. This segment was chosen as it constitutes the channel pore region. The SCAM results obtained with the thiol-modifying agent MTSET provided clear indication for a total current block for the V275C, T278C and V282C mutants suggesting that V275, T278 and V282 were lining the channel pore in the open state. In contrast, results obtained with the A283C, V284C, V285C and A286C mutants yielded partial current inhibition indicating that all these residues were water accessible and more distant from the channel central axis. In order to translate the results from these SCAM experiments into structural data, three models of the open  $K_{Ca3.1}$  were first generated by homology modeling using the MthK, Kv1.2 and open KcsA structures as templates. The thiol-reacting reagents MTSET, MTSEA and MTSACE were next constructed *in silico* and incorporated into each of the channel proposed 3D models as to simulate a SCAM experiment. The solvation free energy of a  $K^+$  ion along the channel central axis was finally computed and the resulting energy profile incorporated into a Markovian kinetic model describing the diffusion of ions inside the  $K_{Ca3.1}$  channel pore. A comparison of the SCAM results with the predictions of the unitary conductance calculated for each atomic model of the  $K_{Ca3.1}$  channel indicated that the  $K_{Ca3.1}$  structure based on the MthK channel structural data best accounts for the SCAM experiments. The predictions arising from the  $K_{Ca3.1}$  models based on the Kv1.2 and the KcsA channel structures were found in contrast to be incompatible with the results of our SCAM

experiments. The computational procedure presented in this work constitutes therefore a valid approach by means of which it is possible to compare the unitary conductance measured during SCAM experiments with the atomic structure of a channel.

**Keywords** : SCAM, ion diffusion, Poisson-Boltzmann, solvation free energy, homology modeling

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
Liste des tableaux.....	XIV
Liste des figures.....	XV
Liste des figures des publications.....	XVIII
Liste des abréviations.....	XIX
I. INTRODUCTION.....	1
A. Bases du transport membranaire.....	1
A.1. <i>La membrane, une barrière infranchissable aux ions</i> .....	1
A.2. <i>Découverte des canaux ioniques</i> .....	4
A.3. <i>Caractéristiques des canaux potassiques</i> .....	6
A.4. <i>Les canaux potassiques dépendants du calcium intracellulaire</i> .....	8
B. Recension de la littérature : le canal $K_{Ca3.1}$ .....	10
B.1. <i>Historique de la découverte du canal <math>K_{Ca3.1}</math></i> .....	12
B.2. <i>Implication physiologique du canal <math>K_{Ca3.1}</math></i> .....	14
C. Structures cristallographiques de canaux potassiques.....	19
C.1. <i>Structures des canaux potassiques</i> .....	20
C.2. <i>Description de la structure cristallographique du canal <math>KcsA</math></i> .....	22
C.3. <i>Modèle du canal <math>KcsA</math> dans sa configuration ouverte (modèle de Perozo)</i> .....	26
C.4. <i>Description de la structure cristallographique du canal <math>MthK</math></i> .....	27
C.5. <i>Description de la structure cristallographique du canal <math>Kv1.2</math></i> .....	30
C.6. <i>Description du fonctionnement du filtre de sélectivité</i> .....	32
D. Justification de l'étude de la structure du canal $K_{Ca3.1}$ .....	34

E.	Stratégie de l'étude de la structure du canal $K_{Ca3.1}$ .....	34
E.1.	<i>Création des modèles du canal <math>K_{Ca3.1}</math></i> .....	37
E.2.	<i>Définition des MTS</i> .....	37
E.3.	<i>Diffusion dans le canal <math>K_{Ca3.1}</math></i> .....	37
F.	Littérature suggérée.....	38
II.	MÉTHODOLOGIE 1 <sup>ÈRE</sup> PARTIE.....	39
A.	Modélisation par homologie .....	39
A.1.	<i>Alignement de séquences en acides aminés</i> .....	39
A.2.	<i>Création des modèles <math>K_{Ca3.1}(KcsA)</math> et <math>K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)</math></i> .....	42
A.3.	<i>Création des modèles <math>K_{Ca3.1}(MthK)</math> et <math>K_{Ca3.1}(Kv1.2)</math></i> .....	44
A.4.	<i>Validation du modèle</i> .....	45
A.5.	<i>Comparaison des structures et calcul de la section efficace</i> .....	46
A.6.	<i>Prédictions des modèles du canal <math>K_{Ca3.1}</math></i> .....	47
B.	Partie Expérimentale .....	48
B.1.	<i>Électrophysiologie : Le patch-clamp</i> .....	48
B.2.	<i>Le protocole expérimental</i> .....	50
B.3.	<i>Le SCAM ou « Substituted-Cysteine Accessibility Method »</i> .....	53
III.	RESULTATS I : PREMIERE PUBLICATION (SCAM) .....	56
A.	Abstract .....	57
B.	Introduction .....	58
C.	Materials and methods .....	61
C.1.	<i>Cloning, sequencing and site directed mutagenesis of the IKCa channel</i> .....	61
C.2.	<i>Oocytes</i> .....	62
C.3.	<i>Patch-Clamp recording</i> .....	62
C.4.	<i>Data analysis</i> .....	63
C.5.	<i>Solutions</i> .....	65

C.6.	<i>Homology modeling</i> .....	66
D.	Results.....	67
D.1.	<i>Characterization of the recombinant IKCa channel cloned from HeLa cells</i> .	67
D.2.	<i>Effects of MTSET on S6 segment residues</i> .....	69
D.3.	<i>Influence of the charge on the MTS-channel interactions</i> .....	77
D.4.	<i>State dependent effect of MTSET</i> .....	78
D.5.	<i>Homology modeling</i> .....	81
E.	Discussion.....	82
E.1.	<i>Limits of the present study</i> .....	83
E.2.	<i>The V275-V282 region</i> .....	84
E.3.	<i>The A283-A286 region</i> .....	85
E.4.	<i>Model of the S6 segment</i> .....	87
F.	Conclusion.....	90
G.	Appendix.....	90
	Acknowledgments.....	92
H.	Reference List.....	92
IV.	CONCLUSIONS PRÉLIMINAIRES.....	98
V.	MÉTHODOLOGIE 2 <sup>E</sup> PARTIE.....	99
A.	Création et insertion des complexes Cys-SET, SEA et SACE.....	100
A.1.	<i>Création des complexes Cys-SET, SEA et SACE</i> .....	100
A.2.	<i>Insertion des complexes MTS sur une cystéine</i> .....	103
B.	Modèle de diffusion à un ion.....	104
B.1.	<i>Calcul du flux ionique dans un canal à un site de liaison</i> .....	105
C.	Détermination de la conduction dans le canal K <sub>Ca</sub> 3.1.....	108
C.1.	<i>Sites d'occupation des ions K<sup>+</sup> dans un canal potassique</i> .....	108

C.2.	<i>Conduction « multi-ions » : formalisme de Markov</i> .....	109
C.3.	<i>Dépendance en voltage des taux de transition</i> .....	112
C.4.	<i>Dépendance en énergie des taux de transition</i> .....	114
C.5.	<i>Calcul des taux de transition <math>k^0</math></i> .....	115
C.6.	<i>Détermination de l'influence des agents MTS sur le courant ionique</i> .....	116
D.	<i>Calcul de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation</i> .....	117
D.1.	<i>Calcul de l'énergie libre</i> .....	117
D.2.	<i>Énergie libre de solvation</i> .....	118
D.3.	<i>Rappel sur le principe de la dynamique moléculaire</i> .....	120
D.4.	<i>Le modèle continu de Born</i> .....	122
D.5.	<i>Une vision microscopique du modèle de Born</i> .....	122
D.6.	<i>Calcul du rayon de Born appliqué aux atomes des complexes Cys-SET, Cys-SEA et Cys-SACE</i> .....	126
D.7.	<i>Calcul de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation en utilisant le modèle continu de Born</i> .....	129
D.8.	<i>Calcul du profil de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation sur l'axe de diffusion d'un canal potassique</i> .....	130
VI.	<b>RÉSULTATS II : DEUXIEME PUBLICATION (MTS)</b> .....	133
A.	<b>Summary</b> .....	134
B.	<b>Introduction</b> .....	135
C.	<b>Theory and methods</b> .....	137
C.1.	<i>Creation of the Cys-SET, Cys-SACE and Cys-SEA complexes</i> .....	137
C.2.	<i>Insertion of the SET Patch on the protein</i> .....	141
C.3.	<i>Solvation Free Energy of Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE</i> .....	141
C.4.	<i>Radial distribution functions for Cys-SET, Cys-SACE and Cys-SEA</i> .....	142
C.5.	<i>Macroscopic continuum electrostatic calculation of the Cys-SET, Cys-SACE and Cys-SEA complexes</i> .....	143



C.6.	<i>Modeling of the KcsA channel</i> .....	144
C.7.	<i>Electrostatic free energy contribution calculation at <math>S_{ext}</math></i> .....	144
D.	Results .....	145
D.1.	<i>Artificial amino acid definition</i> .....	145
D.2.	<i>Atomic Born Radii associated to the atoms of the Cys-SET Complex</i> .....	147
D.3.	<i>Electrostatic free energy profile for an ion along the channel axis</i> .....	149
D.4.	<i>Predicted SCAM results for residues Y82 to L86</i> .....	151
E.	Discussion .....	155
E.1.	<i>Modeling the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residues</i> .....	156
E.2.	<i>Modeling SCAM experiments</i> .....	157
E.3.	<i>Limitations of the present study</i> .....	157
F.	Conclusions .....	158
G.	Reference List .....	160
VII.	RÉSULTAT III : APPLICATION AUX MODÈLES DU CANAL $K_{Ca3.1}$ .....	163
A.	Modèles du canal $K_{Ca3.1}$ .....	163
A.1.	<i>Comparaison des structures des modèles du canal <math>K_{Ca3.1}</math></i> .....	163
B.	Études des MTS insérés dans les modèles du canal $K_{Ca3.1}$ .....	166
B.1.	<i>Nombre d'agents MTS sur les modèles</i> .....	166
B.2.	<i>Orientation des MTS insérés dans le modèle <math>K_{Ca3.1}</math>(MthK)</i> .....	168
B.3.	<i>Orientation des agents MTS insérés dans les modèles <math>K_{Ca3.1}</math>(Kv1.2) et <math>K_{Ca3.1}</math>(KcsA/EPR)</i> .....	170
C.	SCAM modélisé sur le segment S6 du modèle $K_{Ca3.1}$ (MthK) .....	172
C.1.	<i>Profils de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation</i> .....	173
C.2.	<i>Calcul de la conduction dans le modèle du canal <math>K_{Ca3.1}</math>(MthK)</i> .....	176
C.3.	<i>Résultats du SCAM modélisé avec le MTSEA et le MTSACE</i> .....	178
D.	SCAM modélisé pour les modèles $K_{Ca3.1}$ (KcsA/EPR) et $K_{Ca3.1}$ (Kv1.2) .....	179

D.1.	<i>Détermination des inhibitions totales dans le modèle <math>K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)</math>....</i>	180
D.2.	<i>Détermination des inhibitions totales dans le modèle <math>K_{Ca3.1}(Kv1.2)</math> .....</i>	182
VIII.	DISCUSSION .....	185
A.	Hypothèses et limites de la technique du SCAM.....	185
A.1.	<i>Mesure du courant unitaire et probabilité d'ouverture du canal .....</i>	185
A.2.	<i>Liaison silencieuse et les cystéines endogènes.....</i>	186
A.3.	<i>Hypothèses sur la structure des mutants cystéine.....</i>	187
A.4.	<i>Accessibilité des résidus cystéine à l'eau.....</i>	187
A.5.	<i>Comparaison avec des résultats existants .....</i>	188
B.	Limite théorique de la modélisation du SCAM .....	188
B.1.	<i>Hypothèse sur la structure du modèle atomique.....</i>	188
B.2.	<i>Limite de la représentation d'un milieu continu.....</i>	189
B.3.	<i>Limite du mécanisme cinétique .....</i>	190
C.	Choix du meilleur modèle de canal $K_{Ca3.1}$ .....	190
D.	5Comparaison des résultats expérimentaux <i>versus</i> les résultats provenant des calculs numériques réalisés sur le modèle $K_{Ca3.1}(MthK)$ .....	193
D.1.	<i>Résultats expérimentaux compatibles avec le modèle <math>K_{Ca3.1}(MthK)</math>.....</i>	193
D.2.	<i>Résultats expérimentaux incompatibles avec le modèle <math>K_{Ca3.1}(MthK)</math>.....</i>	194
D.3.	<i>Relation entre la structure et la conductance du canal .....</i>	196
IX.	CONCLUSION.....	198
X.	BIBLIOGRAPHIE.....	199
ANNEXE I : CONTRIBUTION DE L'AUTEUR ET DES COAUTEURS AUX PUBLICATIONS .....		I
ANNEXE II : DIFFUSION.....		III
A.	Diffusion simple.....	III
B.	Électrodiffusion.....	IV

C.	Hypothèse de la conduction dans un canal .....	V
C.1.	<i>État stationnaire et l'hypothèse du potentiel moyen</i> .....	VI
C.2.	<i>Dimension de la diffusion</i> .....	VI
	ANNEXE III : RÉOLUTION DE L'ÉQUATION DE POISSON BOLTZMANN .....	VII
	ANNEXE IV : LOGICIELS ET MATÉRIELS UTILISÉS .....	XI
	ANNEXE V : RÉSULTATS BRUTS .....	XIV
D.	Rayons de Born après optimisation .....	XIV
E.	Fichiers de paramètres .....	XV
	ANNEXE VI : CURRICULUM VITAE .....	XXIII
	ANNEXE VII : AUTORISATION DES CO-AUTEURS ET DE L'ÉDITEUR .....	XXVI

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Tableau représentant les différences entre les 3 familles de canaux potassiques dépendants du $\text{Ca}^{2+}$ .....	9
Tableau II. Identité et homologie entre la structure primaire du canal $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ avec celles des canaux KcsA, MthK et Kv1.2.....	40
Tableau III. Rayon de Born des pseudo-résidus Cys-SET, Cys-SEA et Cys-SACE.....	XIV
Table R2.1 Structural parameter set for the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residues.....	139
Table R2.2 Atomic Born Radii of the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residues. ....	149

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure d'un phospholipide (sphingomyéline) .....	2
Figure 2. Énergie nécessaire pour approcher le centre d'un cation ( $Z=+1$ ) à la surface d'une membrane lipidique.....	3
Figure 3. Schéma de fonctionnement d'un canal et d'un transporteur .....	5
Figure 4. Structure secondaire du canal $K_{Ca}3.1$ .....	11
Figure 5 Mécanisme proposé par Busse <i>et al.</i> , 2002.....	15
Figure 6. Mécanisme de sécrétion des cellules épithéliales.....	18
Figure 7. Représentation en mode ruban de la structure cristallographique du canal KcsA encastré dans une membrane lipidique. ....	21
Figure 8. Représentations en mode ruban de la cristallographie du canal KcsA.....	23
Figure 9. Représentations en mode ruban du modèle ouvert du canal KcsA fait par le laboratoire du Dr. Eduardo Perozo.....	27
Figure 10. Représentations en mode ruban de la cristallographie du canal MthK. ....	28
Figure 11. Superposition des canaux potassiques KcsA, Kv1.2 et MthK.....	30
Figure 12. Représentations en mode ruban de la cristallographie du canal Kv1.2 .....	31
Figure 13. Le cycle de diffusion des ions dans le filtre de sélectivité .....	32
Figure 14. Stratégie développée dans cette thèse pour comprendre la conduction des ions $K^+$ dans le canal $K_{Ca}3.1$ .....	36
Figure 15. Structure primaire du canal $K_{Ca}3.1$ et alignement des séquences en acides aminés pour les canaux KcsA, MthK, Kv1.2 et $K_{Ca}3.1$ .....	40
Figure 16 Orientation des résidus du segment S6 par rapport à l'axe de diffusion. ....	47
Figure 17. Montage expérimental du patch-clamp pour le canal $K_{Ca}3.1$ .....	49
Figure 18. Exemple d'un enregistrement en canal unitaire.....	50
Figure 19. Description rapide du protocole expérimental utilisé pour mesurer l'activité du canal $K_{Ca}3.1$ . ....	52
Figure 20. Réactions et formules chimiques du MTSET, MTEA, MTSES et du MTSACE54	

Figure 21. Surface de la protéine Sortase B de <i>Staphylococcus Aureus</i> telle qu'elle est définie dans la structure cristallographique contenue dans le fichier PDB:1QWZ. ..	102
Figure 22. Superposition de toutes les configurations initiales adoptées par le pseudo-résidu Cys-SET lors de son insertion sur le résidu A282C.....	104
Figure 23. Exemple d'un mécanisme de conduction d'un ion à travers un canal.....	106
Figure 24. Représentation atomique des sites de liaison des ions $K^+$ dans le modèle de canal de $K_{Ca}3.1$ . .....	109
Figure 25. Mécanisme cinétique de conduction d'un ion $K^+$ à travers un canal potassique. ....	110
Figure 26. Variation du potentiel membranaire au travers du pore du canal potassique $K_{Ca}3.1$ (MthK).....	113
Figure 27. Représentation atomique des pseudo résidus MTSET, MTSEA, MTSACE....	127
Figure 28. Représentation d'une goutte d'eau (1000 molécules d'eau) contenant le pseudo-résidu Cys-SET. ....	128
Figure 29. Représentation en trois dimensions d'un modèle de canal $K_{Ca}3.1$ incorporé dans une membrane .....	131
Figure 30. Incorporation du canal dans une membrane diélectrique (représentation en 2 dimensions) .....	132
Figure 31. Distribution des résidus autour de l'axe Z.....	164
Figure 32. Superposition des segments S6 des modèles $K_{Ca}3.1$ (MthK), $K_{Ca}3.1$ (KcsA/EPR) et $K_{Ca}3.1$ (Kv1.2). ....	165
Figure 33. Représentation des pseudo-résidus Cys-SET insérés sur les modèles $K_{Ca}3.1$ (MthK), $K_{Ca}3.1$ (KcsA/EPR) et $K_{Ca}3.1$ (Kv1.2) .....	167
Figure 34. Représentation des pseudo-résidus Cys-SET insérés sur le modèle mutant V284C $K_{Ca}3.1$ (MthK) .....	168
Figure 35. Variation de la distance entre l'atome d'azote du MTS et l'ion $K^+$ .....	169
Figure 36. Distance moyenne entre la tête chargée du pseudo Cys-SET et l'axe de diffusion. ....	171

Figure 37. Représentation des résidus Cys-SET liés au mutant A287C du modèle $K_{Ca3.1}(Kv1.2)$ .....	172
Figure 38. Profils d'énergie libre pour transfert un ion $K^+$ à partir du milieu intracellulaire dans le canal. ....	173
Figure 39. Profils de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation d'un ion $K^+$ dans le pore du modèle $K_{Ca3.1}(MthK)$ . ....	174
Figure 40. Courbes Courant-Voltage du modèle $K_{Ca3.1}(MthK)$ .....	176
Figure 41. Résultats du SCAM modélisé avec l'agent MTSET .....	177
Figure 42. Résultats du SCAM modélisé avec les agents MTSEA et MTSACE .....	179
Figure 43. Profils de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation dans le modèle $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$ .....	180
Figure 44. Résultats du SCAM modélisé pour le modèle $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$ avec l'agent MTSET .....	182
Figure 45. Profils de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation dans le modèle $K_{Ca3.1}(Kv1.2)$ .....	183
Figure 46. Comparaison des résultats expérimentaux avec les valeurs calculées .....	191
Figure 47. Une boîte contenue dans la grille .....	VIII

## LISTE DES FIGURES DES PUBLICATIONS

Figure R1.1 Amino acid sequence alignment of IKCa membrane segment.....	60
Figure R1.2 Characterization of the IKCa channel cloned from HeLa cells. ....	64
Figure R1.3 Inside-out recordings illustrating the action of MTSET on IKCa mutants.....	68
Figure R1.4 Effects of MTSET on IKCa channel mutants. ....	70
Figure R1.5 Non stationary noise analysis of the interaction MTSET-IKCa mutants .....	72
Figure R1.6 Single channel analysis of the effect of MTSET on IKCa channel mutants. ..	74
Figure R1.7 Protection by MTSET of TEA block for the A283C and A286C mutants. ....	76
Figure R1.8 Effects of MTSES on IKCa mutants.....	77
Figure R1.9 State dependent action of MTSET. ....	80
Figure R1.10 Homology modeling of the IKCa. ....	89
Figure R2.1 Formation of the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residue. ....	136
Figure R2.2 Schematic and molecular representation of the Cys-SET, Cys-SEA and the Cys-SACE pseudo-residues .....	138
Figure R2.3 Contour plot of the Cys-SET potential energy as a function of the RMS deviation from the X-ray coordinates obtained for the Cys-SET of the <i>Sortase B</i> . ...	146
Figure R2.4 Superposition of the computed Cys-SET pseudo-residue to the Cys-SET complex from the <i>Sortase B</i> . X-ray crystallography.....	147
Figure R2.5 Born radius determination.....	148
Figure R2.6 Electrostatic contribution to the solvation free energy for a potassium ion. 150	
Figure R2.7 Molecular representation of the Cys-SET complex on the Y82C KcsA mutant.....	152
Figure R2.8 Modification of the electrostatic solvation free energy profile due to the presence of Cys-SET complexes on cysteine engineered on KcsA channel .....	153
Figure R2.9 Predict effects of MTSET, MTSEA and MTSACE on KcsA channel mutants. .....	154



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>AMPC</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion divalent calcium
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Ion chlore
<b>CAM</b>	Calmoduline
<b>CFTR</b>	<i>Cystic Fibrose Transmembrane Conductance Regulator</i>
<b>ChTX</b>	Charybdotoxine
<b>CPK</b>	Corey, Pauling et Koltun
<b>Cs<sup>+</sup></b>	Ion césium
<b>Fab</b>	<i>Fragment antigen-binding</i>
<b>IKCa</b>	Canal potassique de conductance intermédiaire activé par le calcium (K <sub>Ca</sub> 3.1)
<b>K<sup>+</sup></b>	Ion potassium
<b>K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA)</b>	Modèle atomique du canal K <sub>Ca</sub> 3.1 modélisé en prenant le canal KcsA comme structure de référence.
<b>K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2)</b>	Modèle atomique du canal K <sub>Ca</sub> 3.1 modélisé en prenant le canal Kv1.2 comme structure de référence.
<b>K<sub>Ca</sub>3.1(MthK)</b>	Modèle atomique du canal K <sub>Ca</sub> 3.1 modélisé en prenant le canal MthK comme structure de référence.
<b>K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR)</b>	Modèle atomique du canal K <sub>Ca</sub> 3.1 modélisé en prenant le modèle du canal KcsA ouvert réalisé par E. Perozo comme structure de référence.
<b>KcsA</b>	Canal potassique provenant de la bactérie <i>Streptomyces lividans</i>
<b>MthK</b>	<i>Methanothermobacter thermautotrophic</i>
<b>MTS</b>	Méthanethiosulfonate
<b>MTSACE</b>	<i>[2-(Aminocarbonyl)ethyl] methanethiosulfonate</i>
<b>MTSEA</b>	<i>(2-Aminoethyl) methanethiosulfonate hydrobromide</i>
<b>MTSES</b>	<i>(2-sulfonatoethyl) methanethiosulfonate</i>
<b>MTSET</b>	<i>[2-(trimethylammonium)ethyl] méthanethiosulfonate</i>
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ion sodium

<b>PB</b>	Poisson-Boltzmann
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	Ion divalent plomb
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Base</i>
<b>Rb<sup>+</sup></b>	Ion rubinium
<b>RMS</b>	<i>Root Mean Square</i>
<b>SCAM</b>	<i>Substituted-Cysteine Accessibility Method</i>
<b>TBA</b>	Tétrabutylammonium
<b>TEA</b>	Tétraéthylammonium
<b>Ti<sup>+</sup></b>	Ion thallium
<b>TM</b>	Segment transmembranaire
<b>VDW</b>	Van der Waals

*À ma mère, mon père et à mes grands-parents  
Maria Nunes Dos Santos et Carlos Pereira Simoes*

## Remerciements

Si mon aventure scientifique québécoise a été possible, c'est grâce aux Drs. Rémy Sauvé et Lucie Parent qui m'ont fait confiance lors de notre toute première rencontre. Cela m'a permis de m'installer rapidement à Montréal et de débiter ce doctorat. Je tiens également à exprimer ma gratitude à Rémy, pour ses années de recherche, de la liberté qu'il m'a laissée dans l'orientation de mes travaux ainsi que de l'opportunité d'explorer de nombreux aspects de la recherche.

Je remercie le Dr. Benoît Roux que j'ai d'abord connu comme professeur. Il a su me communiquer le goût pour son domaine d'étude et être disponible quand j'avais besoin de ses conseils.

La présence de Line Garneau ainsi que son travail dans le laboratoire m'ont été précieux et ont rendu possible l'achèvement de cette thèse. Elle a toujours su faire preuve de patience et de disponibilité. Je l'en remercie. Je remercie également son conjoint Pierre Larivière, qui m'a secouru quand je me suis cassé la jambe en pleine tempête de neige !!

Je remercie également le Dr. Umberto Banderali pour son support et sa gentillesse naturelle. Le plaisir de travailler au laboratoire n'aurait pas été aussi intense sans la présence de Bernadette Wallendorff et la bonne humeur du Dr. Pierre Bissonnette.

Ces remerciements perdraient leur sens si je ne les appliquais pas aussi au Dr. Olivier Peyronnet. Toujours prêt à rendre service et avec lequel les conversations ont été toujours agréables et souvent instructives.

Sylvia, Barbara, Thierry, Aurélie, Christian, Florian, Stéphane, Julie, Gigi, François et M'barek, mes amis de Montréal, merci pour les moments inoubliables que nous avons passés ensemble. J'espère que nous pourrons nous retrouver repartagés des moments ensemble ici ou ailleurs. Je remercie également Reine-Marie Bergeron avec laquelle nous avons fait du très bon travail.

Je n'oublie pas ceux, qui en France m'ont soutenu dans les périodes difficiles et qui ont su (à juste titre) profiter de ma présence au Québec pour venir me visiter. Mathieu Bonnet qui maintenant connaît bien la fraîcheur de l'hiver québécois. Sophie, Dr. Stéphanie Bocs, Francis, Aude et Carl ; J'espère que l'on pourra encore longtemps vivre d'autres moments agréables ensemble.

Et je finirai en remerciant tous les membres de la liste de discussion Gneuhcaincontri qui m'ont permis de rester connecté tout au long de ces années sur les priorités du moment de mes amis en France.

# I. INTRODUCTION

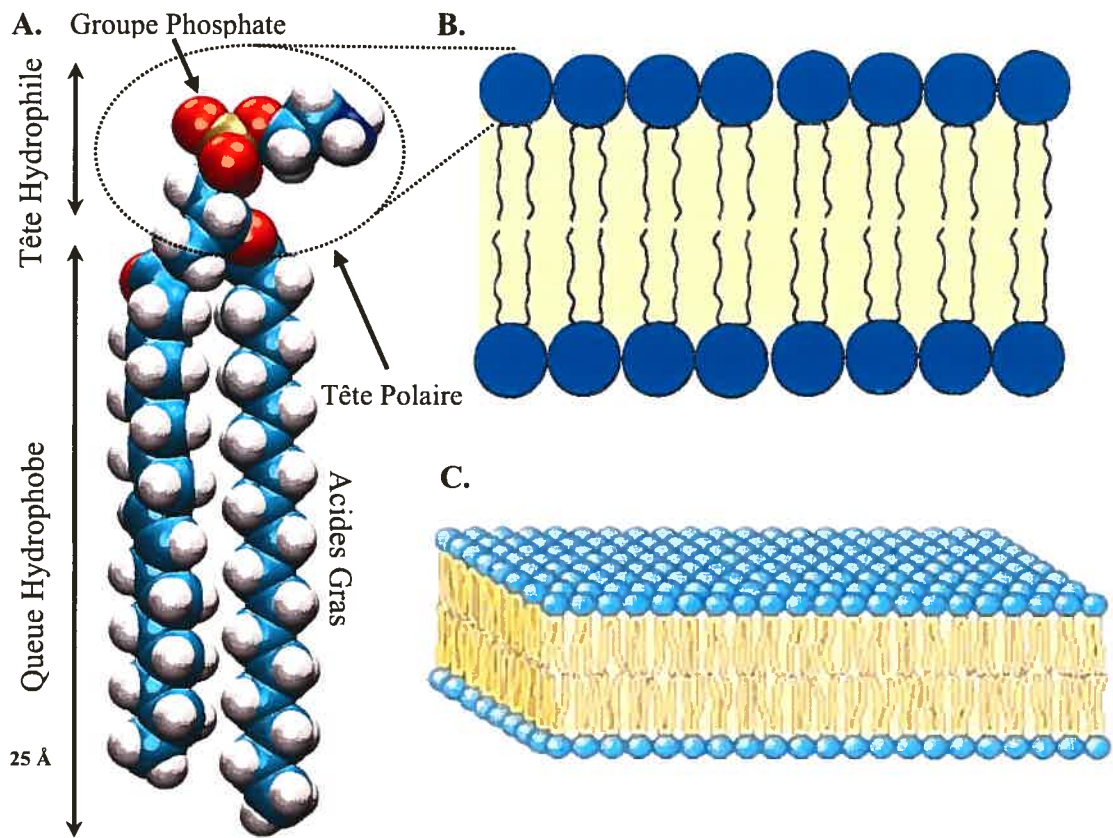
Dans cette introduction, nous allons commencer par poser le problème de la diffusion d'un ion à travers la membrane. Nous ferons une rapide présentation des canaux potassiques et plus particulièrement des canaux potassiques dont l'activation dépend de la concentration de calcium intracellulaire. Puis nous décrirons le canal  $K_{Ca3.1}$  qui est l'objet de notre étude ainsi que les cristallographies des canaux potassiques qui seront le support de notre travail. Nous achèverons cette introduction par une discussion sur l'intérêt de l'étude du canal  $K_{Ca3.1}$ .

## A. Bases du transport membranaire

Les cellules sont délimitées par une membrane bi-lipidique qui constitue une barrière sélective au passage des ions et des macromolécules. La membrane de la cellule protège et offre un environnement contrôlé à toute la machinerie cellulaire. Parallèlement, la membrane doit laisser passer les nutriments, les « déchets » et les signaux de communication qui permettent à la cellule de réagir adéquatement à son environnement et d'accomplir ses fonctions. Comment la cellule délimitée par une membrane peut-elle laisser passer sélectivement les ions ou les macromolécules alors qu'elle est conçue pour isoler et protéger la cellule ?

### *A.1. La membrane, une barrière infranchissable aux ions*

Les membranes sont constituées par une double couche lipidique d'une épaisseur de 40 à 50 Å. L'existence de la partie non polaire au centre de la bicouche (Figure 1) bloque pratiquement toute diffusion d'ions inorganiques ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$  ...) et freine considérablement la diffusion de solutés organiques polaires. Seuls quelques solutés très hydrophobes, par exemple les hormones stéroïdiennes, diffusent librement et rapidement à travers la bicouche. Un calcul simple d'énergie montre que les membranes représentent une barrière insurmontable pour les ions.



**Figure 1. Structure d'un phospholipide (sphingomyéline)**

**A.** Les atomes de carbone sont colorés en bleu métallique, les atomes d'hydrogène en gris, les atomes d'oxygène en rouge, l'atome de phosphore en jaune et en bleu foncé l'atome d'azote. Le phospholipide a une partie polaire (hydrophile) liée à l'atome de phosphore et une partie apolaire (hydrophobe) principalement constituée par deux chaînes d'atomes de carbone. Lorsque les phospholipides se constituent en bicouche les parties apolaires se font face pour ne présenter à la solution que la partie polaire du phospholipide. **B.** Représentation schématique d'une double couche de lipides avec leurs têtes polaires représentées en bleu et leurs queues hydrophobes représentées en jaune. **C.** Représentation des lipides dans une bicouche lipidique.

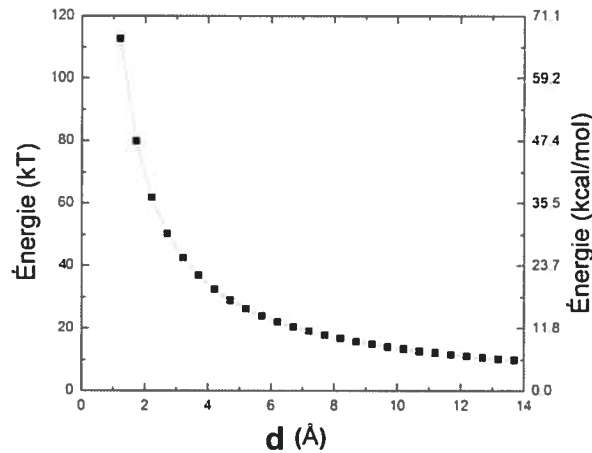
L'énergie nécessaire pour transférer un cation de rayon  $r$  d'un milieu aqueux et continu<sup>1</sup>, à l'intérieur d'une bicouche lipidique infiniment épaisse et de constante diélectrique  $\epsilon_m=2$ , est donnée par l'équation de Born (Schafer, Gunter *et al.*, 1974).

<sup>1</sup> La constante diélectrique de l'eau est prise égale à  $\epsilon_{H_2O}=79$ .

$$W = \frac{Z^2 q^2}{8\pi\epsilon_0 r} \left( \frac{1}{\epsilon_m} - \frac{1}{\epsilon_{H_2O}} \right) \quad (1)$$

$\epsilon_0$ ,  $\epsilon_m$  et  $\epsilon_{H_2O}$  sont respectivement les constantes diélectriques dans le vide, dans la membrane et dans l'eau  
 $q$  et  $Z$  la charge et le nombre de valence.  
 $kT$  est l'énergie thermique.  
 $r$  rayon de l'ion

Pour un ion potassique et pour une température  $T=298$  K, l'équation de Born donne une barrière approximative de  $100 kT$  (Figure 2). Même en tenant compte de l'épaisseur de la membrane, l'énergie que doit fournir l'ion est encore trop importante pour qu'il puisse la traverser. Avec une membrane de  $50 \text{ \AA}$ , nous aurions encore une barrière de  $98 kT$ .  
*Comment dès lors les ions peuvent-ils traverser la membrane ?*



**Figure 2. Énergie nécessaire pour approcher le centre d'un cation ( $Z=+1$ ) à la surface d'une membrane lipidique.**

La température  $T$  est égale à  $298 \text{ °K}$ , la constante diélectrique de la membrane est fixée à  $2$  et celle de l'eau à  $79$ . L'énergie, en fonction de la distance séparant l'ion de la membrane.

Cette problématique s'est posée dans les années 1882-1883, où le physiologiste anglais Sydney Ringer<sup>2</sup>, démontra la nécessité d'utiliser une solution contenant les ions  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$  dans des proportions bien définies pour permettre le battement du cœur

<sup>2</sup> Physiologiste anglais (Norwich 1835-1910 Lasingham, Yorkshire).

d'une grenouille, la *Rana temporaria*<sup>3</sup>, préalablement prélevée (Ringer, S., 1882). Au cours du XXe siècle, les découvertes de l'implication des ions dans de nombreuses fonctions cellulaires n'ont fait que prendre de l'ampleur ; réplication cellulaire ( $\text{Ca}^{2+}$ ), variation du potentiel membranaire ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), activité musculaire ( $\text{Ca}^{2+}$ ), messenger secondaire ( $\text{Ca}^{2+}$ ), variation du volume cellulaire ( $\text{K}^+$ ), sécrétion cellulaire ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ).

## ***A.2. Découverte des canaux ioniques***

Les scientifiques posèrent dans un premier temps le problème en termes de perméabilité membranaire en admettant qu'à certains moments les ions pouvaient « soudainement » passer à travers la membrane et qu'à d'autres moments cela leur était impossible. Cette vision du problème ne faisait aucune hypothèse quant au mécanisme sous-jacent qui permettait « tout d'un coup » aux ions de passer. Suite à leurs travaux Hodgkin<sup>4</sup> et Keynes (Hodgkin, A. L. *et al.*, 1952) proposèrent que l'excitation et le retour au repos du courant à travers la membrane de l'axone géant du calmar (*Architeuthis*) pouvaient s'expliquer par la présence « de longs pores » traversant la membrane (Hodgkin, A. L. *et al.*, 1955). Lorsque ces pores sont ouverts, ils permettent aux ions de passer d'un côté à l'autre de la membrane générant ainsi un courant électrique. Ce modèle fut définitivement confirmé par la cristallographie aux rayons X du canal potassique KcsA en 1998 (Doyle, D. A. *et al.*, 1998).

Nous savons à présent que ces canaux ioniques sont des protéines transmembranaires (puisqu'elles traversent la membrane) qui créent un « passage » pour les ions et diminuent ainsi la barrière énergétique provenant de la membrane (Figure 3). D'autres mécanismes de transport d'ions à travers la membrane ont été par la suite découverts. La vitesse de diffusion des ions dans un canal ouvert est de  $10^6$  à  $10^8$  ions par seconde ce qui est de 1 000 à 10 000 fois supérieure aux autres types de transporteurs

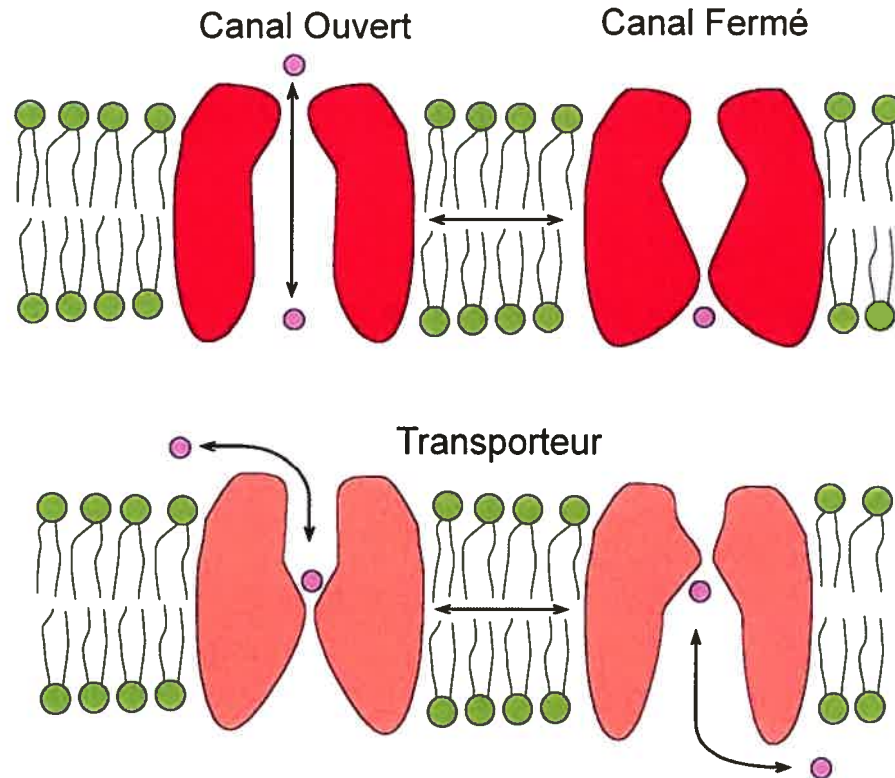
---

<sup>3</sup> La *Rana temporaria* est une grenouille assez commune en Europe.

<sup>4</sup> Le Dr. Sir Alan Lloyd Hodgkin recu le prix Nobel de médecine en 1963.



existant dans la membrane<sup>5</sup> (cotransporteur, échangeur, pompe...). La Figure 3 présente de manière schématique deux types de déplacements d'ions à travers la membrane.



**Figure 3. Schéma de fonctionnement d'un canal et d'un transporteur**

**A.** Schéma d'un canal dans son état ouvert et dans son état fermé. Le nombre d'ions (représentés en violet) pouvant franchir la membrane est de l'ordre de  $10^6$  à  $10^8$  ions à la seconde. **B.** Schéma d'un transporteur qui permet également à des solutés de franchir la membrane. Le nombre de molécules pouvant franchir la membrane est de l'ordre de 100 à 1000 molécules à la seconde.

La diffusion des ions dans un canal ionique est un phénomène spontané. Lorsque le canal est ouvert, les ions entrent ou quittent la cellule en fonction du potentiel électrochimique de l'ion perméant. Le potentiel électrochimique d'un ion dépend du potentiel cellulaire et de la différence de concentration pour cet ion entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Le mouvement des ions demeure passif en tout temps. D'autres protéines comme les pompes ioniques déplacent les ions dans le sens contraire du

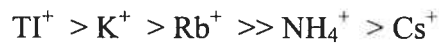
<sup>5</sup> On peut aussi la comparer à la vitesse des électrons dans un fil électrique en cuivre qui est de l'ordre du millimètre par seconde ce qui correspond (pour un canal de 10 nm de long) à  $10^5$  électrons par seconde.

potentiel électrochimique. La pompe aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ , par exemple, maintient une concentration très faible de calcium dans la cellule avec une concentration de calcium de l'ordre de 50 nM alors qu'elle est 1mM dans le milieu extracellulaire.

Les canaux sont classés, dans un premier temps, en fonction de leur sélectivité aux ions. On retrouve par exemple des canaux laissant passer préférentiellement les ions potassium, le sodium, le chlore ou encore le calcium. Les canaux potassiques sont de loin les canaux les plus sélectifs avec environ 1 000 ions  $\text{K}^+$  pour 1 ion  $\text{Na}^+$  et c'est de ce type de canaux dont il sera question dans cette thèse.

### ***A.3. Caractéristiques des canaux potassiques***

Les canaux potassiques sont des protéines ubiquitaires. La séquence de sélectivité<sup>6</sup> la plus commune pour ces canaux et pour tous les ions confondus est<sup>7</sup> :



Les canaux potassiques sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires comme le maintien du potentiel membranaire, la réplication cellulaire, l'excitabilité des cellules, la motricité, la régulation du volume cellulaire, le recyclage et la sécrétion d'ions  $\text{K}^+$ .

Un canal ionique n'est pas un système statique d'atomes. Ainsi, certains atomes ou groupes d'atomes peuvent changer de position au cours du temps et modifier la structure du canal. Certains mouvements de l'ordre de la picoseconde peuvent contribuer au processus de diffusion d'un ion. C'est particulièrement le cas lors de la diffusion des ions dans le filtre de sélectivité des canaux potassiques. À une plus grande échelle de temps (~ milliseconde ou plus), des modifications de structure peuvent fermer ou ouvrir le canal, moduler sa conductance (état de sous-conductance), sa probabilité d'ouverture, sa sensibilité pour un ligand, etc. De tels changements de configuration sont souvent couplés à des stimuli physiques ou chimiques comme un changement du potentiel membranaire,

---

<sup>6</sup> La séquence de sélectivité représente l'ordre des ions qui diffusent le plus rapidement à travers le canal.

une variation locale de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , la liaison d'un ligand au canal comme l'ATP ou une autre protéine, etc. Ce sont, par ces processus de régulation, que s'effectue le contrôle cellulaire de l'activité des canaux ioniques et donc le couplage entre fonction cellulaire et l'activité des canaux ioniques. L'activité des canaux peut aussi être modulée par des agents pharmacologiques de types drogues ou toxines. Certains agents peuvent être très sélectifs et n'inhiber qu'un seul type de canal alors que d'autres peuvent inhiber une plus large classe de canaux (comme tous les canaux potassiques et sodiques par exemple). De façon générale, tous les canaux potassiques sont inhibés par les ions  $\text{Ba}^{2+}$  et les ions  $\text{Cd}^{2+}$  ainsi que par le tétraéthylammonium (TEA) depuis le milieu intracellulaire ou extracellulaire et cela à des niveaux variables de concentration. D'autres toxines peptidiques sont également capables d'inhiber les canaux potassiques, comme la charybdotoxine (ChTx, avec 37 acides aminés) qui provient du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus*<sup>8</sup>, ou la dendrotoxine (DTX, avec 59 acides aminés) provenant du Mamba vert *Dendroaspis angusticeps*<sup>9</sup>. On peut constater qu'inhiber des canaux potassiques n'est pas compatible avec la vie (sur terre !). La structure tridimensionnelle de plusieurs toxines fut déterminés expérimentalement. Pour cette raison, les toxines ont été largement utilisées comme sondes afin de déterminer les paramètres structuraux décrivant les vestibules externes des canaux.

Les canaux potassiques peuvent être classés en plusieurs catégories fonctionnelles dont les plus importantes sont :

- **Les canaux activés par le voltage ( $\text{K}^+$  outward rectifiers) :** Ces canaux jouent un rôle clef dans l'excitabilité cellulaire. Ils sont impliqués dans la génération des

---

<sup>7</sup> Les ions  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  et le  $\text{Cs}^+$  ne sont pas des ions physiologiques.

<sup>8</sup> Un des scorpions les plus dangereux puisque sa piqûre est mortelle, présent en Afrique du Nord et au Moyen Orient.

<sup>9</sup> Un des serpents le plus vénéneux au monde que l'on retrouve principalement en Afrique australe et orientale.

potentiels d'action<sup>10</sup>. Dans cette catégorie, on retrouve les canaux  $K_v$  (un prototype très connu est le canal de type Shaker identifié chez la drosophile).

- **Les canaux à rectification entrante ( $K^+$  inward rectifiers)** : Les canaux  $K_{ir}$  permettent de stabiliser le potentiel membranaire. Certains canaux  $K_{ir}$  sont inhibés par l'ATP ce qui couple l'énergie cellulaire et l'activité électrique.
- **Les canaux qui sont activés par des ligands intracellulaires** : Dans cette catégorie, on retrouve les canaux activés par le  $Ca^{2+}$  et les canaux couplés aux protéines G. Les canaux activés par le  $Ca^{2+}$  intracellulaire permettent de longues hyperpolarisations et sont également impliqués dans la régulation du volume cellulaire, la motricité et l'excitabilité cellulaire. Les canaux présents dans cette catégorie sont SK ( $K_{Ca2.1}$ ,  $K_{Ca2.2}$ ,  $K_{Ca2.3}$ ), IK ( $K_{Ca3.1}$ ) et MaxiK ( $K_{Ca1.1}$ ).

Le canal  $K_{Ca3.1}$  auquel nous nous intéressons fait partie de la sous-famille des canaux sélectifs aux ions potassiques dont l'activation dépend de la concentration du calcium intracellulaire.

#### ***A.4. Les canaux potassiques dépendants du calcium intracellulaire***

Les canaux potassiques dépendants du calcium ( $K_{Ca}$ ) possèdent des structures particulières sensibles aux niveaux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire de sorte que lorsque la concentration d'ions  $Ca^{2+}$  augmente dans la cellule, le canal s'ouvre pour permettre le passage des ions  $K^+$  à travers la membrane. Ils sont présents dans la plupart des cellules de mammifères où leur principale fonction est d'établir un couplage entre les systèmes utilisant le  $Ca^{2+}$  comme messenger secondaire et le flux des ions  $K^+$  qui régule les propriétés électriques de la cellule. Trois types de canaux potassiques, dont l'activation est dépendante de la concentration du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, ont été identifiés en fonction de leurs propriétés de conduction et de leurs propriétés pharmacologiques (Vergara, C. *et al.*, 1998).

NOM DU CANAL	K <sub>Ca</sub> 1.1 (BK)	K <sub>Ca</sub> 3.1 (IK)	K <sub>Ca</sub> 2.1, 2.2, 2.3 (SK)
SENSIBILITÉ AU CALCIUM	K <sub>0.5</sub> =30μM (à 40mV)	K <sub>0.5</sub> = 300 nM	K <sub>0.5</sub> = 300 nM
CONDUCTANCE (*)	150-220 pS	20-50 pS	5-10 pS
PROBABILITÉ D'OUVERTURE DÉPENDANT DU VOLTAGE	OUI	NON	NON
DÉPENDANCE AU CALCIUM	Intrinsèque	Liaison à la Calmoduline	Liaison à la Calmoduline
SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES	hétéro tétramère composé d'unités α (7 TM) et β (1 TM).	6 TM (homo tétramère)	6 TM (homo tétramère)
NOMBRE D'ACIDES AMINÉS	536-575	427	1194
DISTRIBUTION	neurones, muscles	cellules endothéliales; érythrocytes; cellules épithéliales; monocytes; lymphocytes B et T; muscles lisses immatures.	neurones; cellules épithéliales; muscles lisses.
INHIBITEURS PEPTIDIQUES	charybdotoxine; ibériotoxine	charybdotoxine	apamine; scyllatoxine
INHIBITEURS DE SYNTHÈSE	paxilline	clotrimazole; TRAM-34	dequalinium; UCL 1684
ACTIVATEURS	NS 1619; DHS 1	1-EBIO; DCEBIO; CZ; ZOX; théophylline; caféine; IBMX	1-EBIO

**Tableau I.** Tableau représentant les différences entre les 3 familles de canaux potassiques dépendants du Ca<sup>2+</sup>.

Une grande partie des informations données par ce tableau ont été relevées dans la publication du Dr. Jensen (Jensen, B. S. *et al.*, 2001). (\*) Avec un potentiel membranaire de 0 mV dans des conditions symétriques de 150 mM KCl.

<sup>10</sup> Le potentiel d'action est l'élément constitutif de l'influx nerveux.

Cela inclut les canaux  $K_{Ca}1.1$  (ou BK pour « Big »),  $K_{Ca}3.1$  (IK pour « Intermediate ») et les  $K_{Ca}2.1$ ,  $K_{Ca}2.2$ ,  $K_{Ca}2.3$  (SK pour « Small ») (Gutman, G. A. *et al.*, 2003).

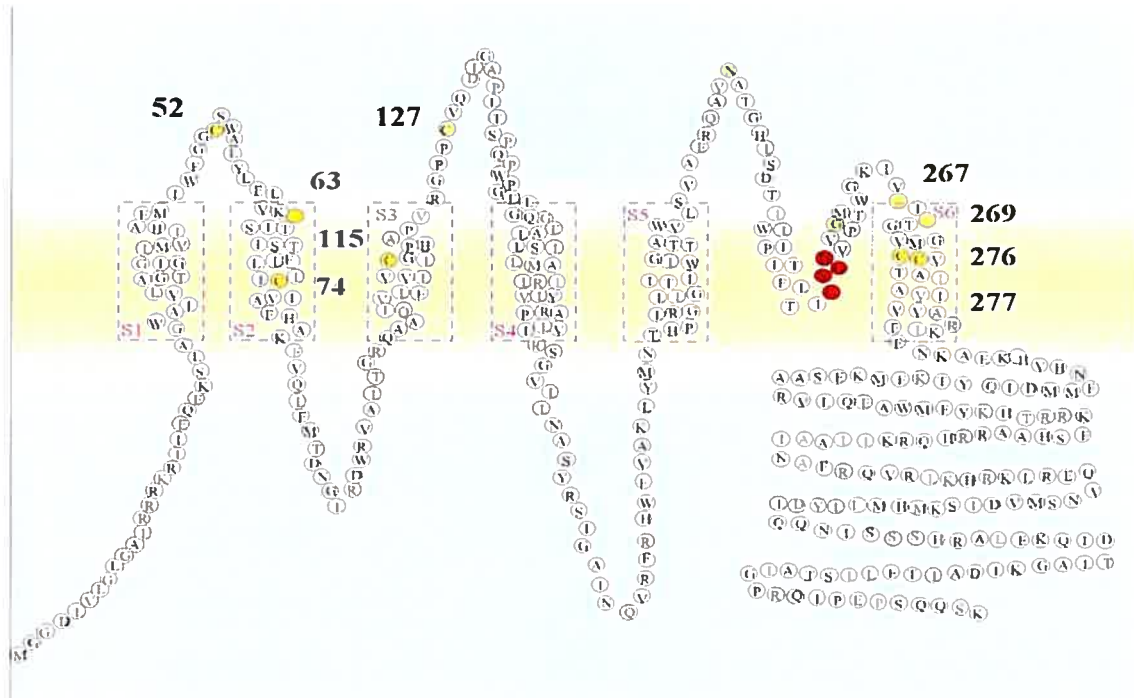
Le canal  $K_{Ca}1.1$  a une large conductance<sup>11</sup> (150-220 pS) et son fonctionnement est inhibé par la charybdotoxine et l'ibérottoxine.  $K_{Ca}3.1$  a une conductance intermédiaire (20-50 pS) et est inhibé par le clotrimazole (Rittenhouse, A. R. *et al.*, 1997) et le TRAM34 (Wulff, H. *et al.*, 2001). Et enfin, les canaux  $K_{Ca}2.1-3$  ont une faible conductance de 5 à 10 pS (Kohler, M. *et al.*, 1996). À la différence des canaux de type BK, la probabilité d'ouverture des canaux  $K_{Ca}2.x$  et  $K_{Ca}3.1$  est indépendante du potentiel membranaire et leurs sensibilités aux ions calcium sont principalement dues à la présence de la calmoduline liée sur la région C-terminale de la sous-unité principale de la protéine-canal (Khanna, R. *et al.*, 1999). Les sites de liaison du  $Ca^{2+}$  présents sur la partie C-terminale du canal  $K_{Ca}1.1$  participent à sa dépendance au calcium. Le Tableau I résume les différentes caractéristiques des 3 types de canaux potassiques dépendants du calcium (Jensen, B. S. *et al.*, 2001). Pour information, le canal  $K_{Ca}3.1$  a porté différents noms ; Sk4, KCa4, IK1, IKCa1, IKCa et « putative gards channel ».

## B. Recension de la littérature : le canal $K_{Ca}3.1$

Nous avons vu dans le Tableau I que le canal potassique  $K_{Ca}3.1$  est un homo tétramère dont chacun des monomères possède 6 segments transmembranaires numérotés de S1 à S6 (Figure 4). Sa probabilité d'ouverture dépend de la concentration intracellulaire en ion  $Ca^{2+}$  et sa sensibilité aux ions  $Ca^{2+}$  est due à la présence d'une calmodulines liées à chacune des parties C-terminales des 4 monomères.

---

<sup>11</sup> Mesurée dans des conditions symétriques de concentration en ion  $K^+$ .



**Figure 4. Structure secondaire du canal  $K_{Ca3.1}$ .**

Les cercles représentent les résidus de la séquence en acides aminés du canal  $K_{Ca3.1}$ . La membrane est représentée par la bande jaune claire et les 6 segments transmembranaires sont mis en valeur dans des rectangles. En jaune, ce sont les résidus cystéine endogènes, en rouge les résidus YGD représentant le filtre de sélectivité. La disposition des acides aminés correspond au profil d'hydrophobicité tel que défini par Kyte et Doolittle (Kyte, J. *et al.*, 1982).

La Figure 4 donne une idée de ce que nous savions sur la structure du canal autour de la membrane en 1999 au point de départ des travaux de cette thèse. Dans la première publication nous présenterons en détail les caractéristiques biophysiques du canal  $K_{Ca3.1}$  lorsqu'il est exprimé dans des œufs de *Xenopus laevis*.

Les chapitres suivants reprennent l'historique de la découverte du canal  $K_{Ca3.1}$  tel qu'il a été décrit par Jensen dans une revue de littérature (Jensen, B. S. *et al.*, 2001) ainsi qu'une recension de la littérature sur les implications du canal  $K_{Ca3.1}$  dans différentes pathologies.

### ***B.1. Historique de la découverte du canal $K_{Ca3.1}$***

Les premières descriptions d'une perméabilité membranaire aux ions  $K^+$  en fonction de la concentration intracellulaire de calcium (et dont le flux d'ions était dû à la présence du canal  $K_{Ca3.1}$ ) ont été rapportées chez le globule rouge durant les années 1940. Il a été observé que l'application d'un poison perturbant le cycle du glucose cellulaire, dans des globules rouges créait une augmentation de l'efflux d'ions  $K^+$  de ces cellules (Wilbrandt, W., 1940). Plus tard, vers la fin des années 50, un scientifique hongrois, G. Gardós, démontra que cette fuite du potassium provoquée par le processus d'inhibition était dépendante du calcium intracellulaire. Il fut alors admis que ce phénomène n'était pas une conséquence triviale d'un empoisonnement de l'érythrocyte mais représentait une propriété intrinsèque de la membrane des érythrocytes. L'activation de la perméabilité due à la présence de calcium intracellulaire dans des érythrocytes fut alors appelée phénomène ou expérience de Gardós. Dans les décennies qui ont suivi, les résultats du Dr. Gardós ont été reproduits et étendus dans de nombreux laboratoires. L'hypothèse faite sur les propriétés intrinsèques de la membrane d'érythrocyte fut réellement admise lorsqu'il fut possible de montrer que l'on pouvait obtenir les mêmes effets en utilisant des vésicules préparées à partir de membranes d'érythrocytes isolées (Knauf, P. A. *et al.*, 1975; Lew, V. L. *et al.*, 1982; Yingst, D. R. *et al.*, 1984). Il fut également démontré que le  $Pb^{2+}$  pouvait créer les mêmes effets que le  $Ca^{2+}$  (Riordan, J. R. *et al.*, 1971). Une étape importante fut franchie lorsqu'il a été possible de contrôler la concentration de  $Ca^{2+}$  sous la membrane. La synthèse de l'ionophore<sup>12</sup> au calcium, A23187, a permis de travailler avec des érythrocytes intacts<sup>13</sup>, et de faire varier la concentration de calcium dans la cellule sans perturber le métabolisme du globule rouge. Suivant les premières observations faites par Gardós, les efforts se sont concentrés sur le

---

<sup>12</sup> Un ionophore est une molécule soluble qui crée un passage dans la membrane et permet à une espèce ionique de la traverser. Leur action a été identifiée avant de savoir comment ils agissaient au niveau moléculaire.

<sup>13</sup> Cela a également permis d'améliorer la reproductibilité des résultats.



déplacement des charges (la diffusion des ions  $K^+$ ) associé au phénomène Gardós. Le docteur Ulrik Lassen à Copenhague mesura le potentiel membranaire à l'aide de microélectrodes classiques en les insérant directement dans des érythrocytes géants provenant de la salamandre<sup>14</sup>, *Amphiuma means*. À partir de cette expérience et dans ses versions améliorées, il fut possible de mesurer les potentiels membranaires au repos (-15 mV) et lors d'hyperpolarisation de la membrane (durant la période d'efflux d'ions  $K^+$ , -60 mV) (Lassen, U. V. *et al.*, 1974; Lassen, U. V. *et al.*, 1976). Il fut également démontré que cette hyperpolarisation correspondait au potentiel d'équilibre de Nernst pour des concentrations différentes d'ions  $K^+$  de part et d'autre de la membrane.

Même si les propriétés de l'effet Gardós connues à cette époque auraient pu être interprétées par une conduction des ions à travers un canal ionique, les résultats de ces expériences furent interprétés comme étant dus à un transporteur (dans ce cas, l'ion ne passe pas à travers un canal, mais il est transporté par une protéine d'un côté à l'autre). Ce n'est qu'avec la possibilité de mesurer le potentiel membranaire, les flux nets et les flux unidirectionnels des ions  $K^+$  (avec du potassium radioactif  $^{42}K^+$ ) que le courant ionique à travers la membrane fut identifié comme équivalent à un déplacement rapide d'ions dans un canal. La diffusion libre obéit aux équations classiques des ratios du flux établies par Ussing. Toutes déviations par rapport à ces équations donnent des informations essentielles sur le mécanisme qui permet la conduction des ions dans les canaux. Ces expériences ont démontré clairement que la diffusion des ions  $K^+$  dans l'effet Gardós suivait une version modifiée de l'équation Ussing avec un ratio  $K_{\text{entrant}}/K_{\text{sortant}}$  élevé à une puissance de 2,7 suggérant un processus de diffusion à la file indienne dans un canal. Nous pouvons noter qu'en 1955, 3 années avant l'étude du phénomène Gardós, Hodgkin et Keynes (Hodgkin, A. L. et Keynes, R. D., 1955) précédés par les travaux de Ussing<sup>15</sup>, avaient décrit exactement ce comportement pour les flux unidirectionnels de  $K^+$  dans l'axone de calmar. Ils ont été des visionnaires en expliquant que l'effet est dû à « un long

---

<sup>14</sup> C'est une salamandre qui ressemble à une grande anguille d'eau et que l'on retrouve en Amérique du Sud et sur la côte sud-est des Etats-Unis d'Amérique.

pore » qui, lorsqu'il est ouvert, contient plusieurs ions  $K^+$  (au moins trois si l'exposant est égal à 2,7) contraints de se déplacer en file indienne. Avec la cristallographie du canal KcsA, leur hypothèse fut complètement vérifiée.

Après l'identification du canal  $K_{Ca3.1}$  dans les érythrocytes par des méthodes électrophysiologiques de type « patch-clamp » (Grygorczyk, R. *et al.*, 1985), ce type de canal fut identifié dans d'autres types de cellules comme les lymphocytes-T et B (Mahaut-Smith, M. P. *et al.*, 1989). Le canal  $K_{Ca3.1}$  a été (tardivement) cloné pour la première fois par l'équipe du Dr. Ishii *et al.* en 1997 (Ishii, T. M. *et al.*, 1997). Notre laboratoire a également cloné le canal  $K_{Ca3.1}$  à partir de la séquence déposée dans Genbank (Klein, H. *et al.*, 1999) et ses propriétés seront décrites dans la première publication de cette thèse (page 56).

## ***B.2. Implication physiologique du canal $K_{Ca3.1}$***

De nombreux processus cellulaires d'importance clinique tels que la prolifération cellulaire dans les cas de resténose post-angioplastie (rétrécissement des artères et des vaisseaux sanguins), le contrôle par l'endothélium du tonus des muscles lisses vasculaires (EDHF), et la sécrétion de  $Cl^-$  et d'eau dans les cellules de la trachée (fibrose kystique) relèvent de l'activation d'un canal  $K^+$  activé par le  $Ca^{2+}$  de type  $K_{Ca3.1}$ .

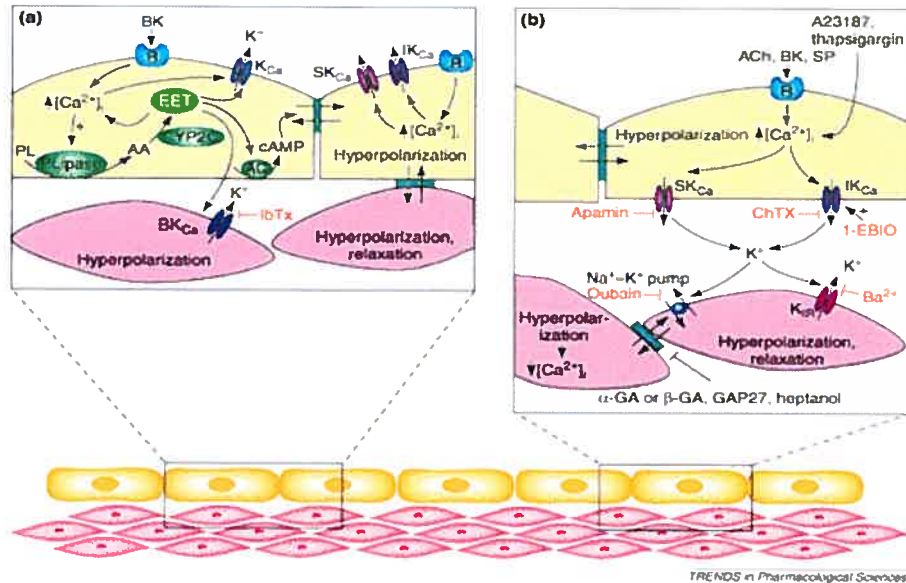
### **B.2.i Implication du canal $K_{Ca3.1}$ dans le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF)**

L'endothélium peut contrôler le tonus des muscles lisses vasculaires (MLV) via des mécanismes autres que la sécrétion de NO. L'effet de ces mécanismes produit une hyperpolarisation des cellules du MLV d'où la désignation EDHF. Cette hyperpolarisation peut provenir selon certains auteurs (Busse, R. *et al.*, 2002) d'une sécrétion d'ions  $K^+$  ou d'un couplage électrique entre les cellules endothéliales et des cellules de MLV avec lesquelles elles sont en contact. Cette

---

<sup>15</sup> dont les travaux avaient commencé dans les années 1940.

hyperpolarisation inhibe les canaux calciques dépendants du potentiel membranaire, réduisant ainsi la concentration intracellulaire d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  pour finalement relaxer les muscles lisses.



**Figure 5 Mécanisme proposé par Busse *et al.*, 2002**  
Trends Pharmacol Sci. 23: 374-380.

Le schéma propose deux mécanismes possibles d'hyperpolarisation des muscles lisses vasculaires par les cellules endothéliales. Chacun des deux mécanismes fait intervenir les canaux potassiques dépendants du calcium,  $\text{K}_{\text{Ca}3.x}$  ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ) et  $\text{K}_{\text{Ca}2.x}$  ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ) **a.** Selon un modèle proposé l'ouverture des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}3.x}$  et  $\text{K}_{\text{Ca}2.x}$  entraîne une hyperpolarisation des cellules endothéliales qui est transmise directement aux cellules des muscles vasculaires. **b.** Selon un autre modèle l'ouverture des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}3.x}$  et  $\text{K}_{\text{Ca}2.x}$  mène à une accumulation d'ions  $\text{K}^+$  dans l'espace entre les cellules endothéliales et les cellules du muscle vasculaire. Cette accumulation a pour effet d'hyperpolariser les cellules du muscle vasculaire par l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et des canaux  $\text{Kir}2.1$ . Les cellules du muscle lisse sont colorées en rose, et les cellules endothéliales sont colorées en orange.

Cette hyperpolarisation fait intervenir les canaux potassiques dépendants du calcium. En effet un nombre important de travaux ont montré que la relaxation des cellules de MLV pouvait être inhibée en présence de TRAM34 et d'apamine, des agents inhibiteurs des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  et  $\text{K}_{\text{Ca}2.x}$ .

La Figure 5 illustre quelques uns des mécanisme proposés. Ainsi après la stimulation des cellules endothéliales (Figure 5.a), les acides époxyeicosatriénoïques et leurs métabolites pourraient diffuser vers les cellules du

muscle lisse et activer les canaux de grande conductance  $BK_{Ca}$ . L'hyperpolarisation des cellules endothéliales due à l'activation des canaux SK et IKCa (les anciens noms des canaux  $K_{Ca2.x}$  et  $K_{Ca3.1}$ ) peut également se propager le long des cellules endothéliales ou vers les cellules du muscle lisse à travers des zones de jonctions. La Figure 5.b présente le cas où les cellules endothéliales déclenchent une accumulation d'ions  $K^+$ , dans l'espace entre les cellules endothéliales et les muscles vasculaires. Cette accumulation serait suffisante pour hyperpolariser les cellules MLV par un effet sur les canaux à courant rentrant  $K_{ir}$  et/ou les pompes  $Na^+-K^+$  et ATPases.

### **B.2.ii Implication du canal $K_{Ca3.1}$ dans les diarrhées sécrétoires**

L'activation de la sécrétion des ions  $Cl^-$  provenant des cellules cryptales<sup>16</sup> de l'intestin joue un rôle majeur dans la diarrhée sécrétoire. Ces cellules épithéliales tapissent la lumière de la crypte et contiennent tous les canaux ioniques, cotransporteurs, et les pompes pour un transport actif d'ions ainsi que pour une sécrétion d'ions  $Na^+$ ,  $Cl^-$  et des molécules d'eau. L'activation des canaux  $Cl^-$  à la membrane apicale des cellules épithéliales de la crypte produit un flux d'ion  $Cl^-$  dans la lumière de la crypte (figure 6.A). La différence de potentiel transépithéliale est suffisante pour déplacer les ions  $Na^+$  ainsi que les molécules d'eau, à travers la jonction épithéliale et permettre ainsi un transport net de sel et d'eau vers l'intestin (figure 6.C). La sortie des ions  $Cl^-$  implique une accumulation de charges positives dans la cellule. Pour maintenir le potentiel membranaire aux conditions de repos pendant la sécrétion d'ions  $Cl^-$ , les ions  $Na^+$  et  $K^+$  sont alors recyclés à travers la membrane basolatérale via les pompes  $Na^+/K^+$  ATPase et aussi le canal  $K_{Ca3.1}$  (figure 6.B). Dans des conditions pathologiques, comme lors de diarrhées sécrétoires ou suite à une infection par le virus du choléra, des

---

<sup>16</sup> Vue de surface, la paroi interne de l'intestin semble percée de petits trous, les **cryptes**. Ce sont des invaginations de l'épithélium de surface.

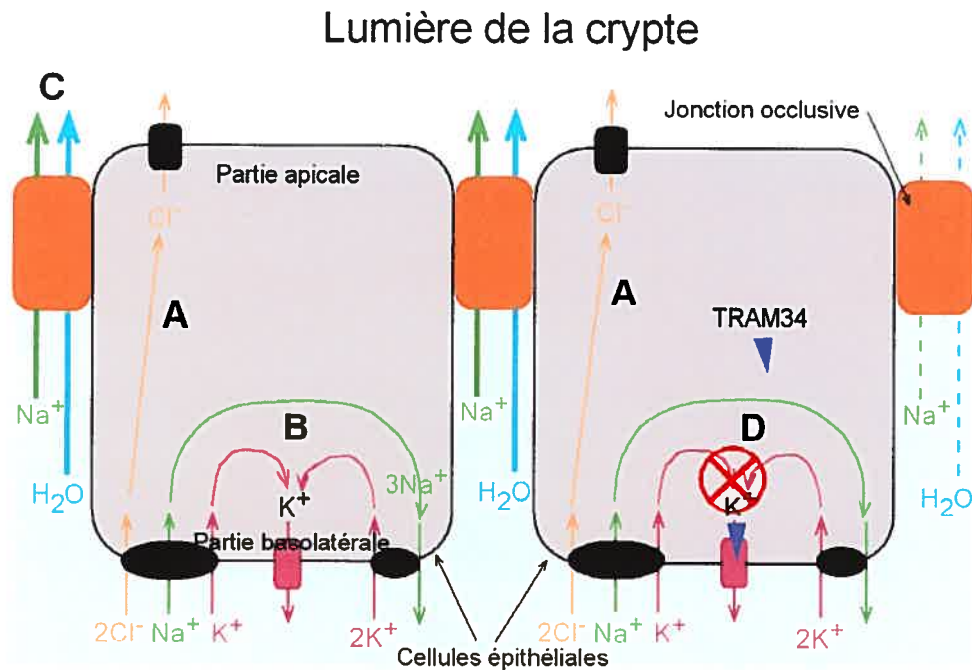
protéines de type kinine<sup>17</sup> sont rejetées dans l'intestin des mammifères où elles peuvent potentiellement activer la sécrétion des ions  $\text{Cl}^-$ . Ainsi la bradykinine stimule dans la crypte colique, aussi bien les chemins de signaux cellulaires dépendants du calcium (et donc du canal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ ), que ceux qui sont dépendants de l'AMP cyclique. Les sécrétions coliques dues à l'augmentation intracellulaire du calcium (ou à la présence des protéines de type kinine) augmentent la conduction des ions  $\text{K}^+$  du côté basolatéral ( $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ ) et stimulent donc la sécrétion d'ions à travers les canaux  $\text{Cl}^-$  dépendants de l'AMP cyclique du côté apical.

Les canaux, les transporteurs et les pompes opèrent dans la sécrétion épithéliale de concert pour produire ces déplacements d'ions. L'inhibition d'une de ces voies réduit du coup le transport trans-épithélial d'ions  $\text{Cl}^-$  ainsi que la sécrétion des sels et des molécules d'eau associées. Le clotrimazole inhibe la sécrétion dans les cellules d'intestin humain via l'inhibition des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ . Le clotrimazole inhibe la sécrétion d'ions  $\text{Cl}^-$  dans la muqueuse du colon des moutons stimulée par la forskoline (installée dans des chambres Ussing<sup>18</sup>) par plus de 90% et la sécrétion induite par la toxine du choléra est réduite par plus de 94% dans l'intestin de souris. Le TRAM34 est un inhibiteur très spécifique du canal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  qui a été développé par l'équipe du Dr. Chandy (Wulff, H. *et al.*, 2000). Il est beaucoup plus sélectif que le clotrimazole puisqu'il n'a, par exemple, aucun effet sur les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}2.1}$  et  $\text{K}_{\text{Ca}1.x}$ . Cette très haute sélectivité permet de cibler le canal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  en interférant le moins possible avec les autres protéines. Son effet d'inhibition pour le canal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  ainsi que sa haute sélectivité permet d'envisager de l'utiliser comme outil pharmacologique (figure 6.D).

---

<sup>17</sup> Les kinines sont des protéines du plasma sanguin qui influencent les contractions musculaires des vaisseaux sanguins (vasodilatation lors d'une réaction inflammatoire), affectent la pression artérielle, augmentent le flux sanguin à travers le corps, augmentent la perméabilité des petits capillaires et stimulent les capteurs de douleurs.

<sup>18</sup> Ce modèle est adapté à une investigation fine du passage intestinal et de l'effet de principes actifs sur la physiologie intestinale.



**Figure 6. Mécanisme de sécrétion des cellules épithéliales.**

La cellule épithéliale de gauche décrit le mécanisme de sécrétion des molécules d'eau vers la lumière de la crypte du colon. À droite, la même cellule contenant le TRAM34, un inhibiteur du canal  $K_{Ca3.1}$ , empêche le recyclage des ions  $K^+$ . **A.** Diffusion des ions  $Cl^-$  à travers les cellules épithéliales vers la lumière de la crypte. **B.** Recyclage des ions  $K^+$  et  $Na^+$  pour maintenir le potentiel membranaire de la cellule épithéliale. **C.** Sécrétion des ions  $Na^+$  et diffusion des molécules d'eau dans la lumière de la crypte dues à la différence de potentiel trans-épithélial générée par la diffusion des ions  $Cl^-$  dans la lumière de la crypte. **D.** L'introduction du TRAM34 dans la cellule épithéliale inhibe le canal  $K_{Ca3.1}$  et empêche les ions  $Cl^-$  de diffuser à travers la cellule épithéliale jusqu'à la lumière de la crypte.

### B.2.iii Implication du canal $K_{Ca3.1}$ dans la fibrose kystique (ou mucoviscidose)

Les cellules qui forment l'épithélium de la trachée dans les poumons possèdent le même mécanisme de sécrétion que celui décrit pour la diarrhée sécrétoire. La diminution ou l'absence de sécrétion des ions  $Cl^-$  en réponse à une stimulation de la voie AMPc et une hyperpolarisation due aux ions  $Na^+$  sont les caractéristiques de la fibrose kystique (appelée aussi la mucoviscidose). Pour les malades, cela se caractérise par une insuffisance respiratoire due à une obstruction des voies respiratoires. La fibrose kystique atteint les individus ayant une mutation sur le canal chlore dépendant de l'AMPc localisé à la membrane apicale des

cellules épithéliales sécrétrices (une délétion du résidu phénylalanine à la position 508 du canal CFTR). Une des stratégies étudiées pour soigner cette maladie est de restaurer le flux des ions  $\text{Cl}^-$  en activant d'autres mécanismes de transport ionique. Un de ces mécanismes pourrait être l'activation du canal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  qui est connu pour stimuler la sécrétion du  $\text{Cl}^-$  à travers la partie apicale de la cellule. Le composé 1-EBIO est connu pour provoquer l'activation du canal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ . De plus, son introduction dans les cellules épithéliales T84 provoque une sécrétion des ions  $\text{Cl}^-$  à travers la partie apicale de la cellule épithéliale. Cette fois, c'est l'activation du canal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  qui peut être une voie potentielle de traitement thérapeutique.

### C. Structures cristallographiques de canaux potassiques

La création de nouvelles molécules par modélisation moléculaire et ciblées pour réguler le canal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  nécessite de connaître la structure du canal. La connaissance de la structure tridimensionnelle (3D) d'une protéine est indispensable pour comprendre le mécanisme d'action de ses ligands et l'élaboration de nouvelles molécules pharmacologiques. Or, il n'existe pas à ce jour de données cristallographiques du canal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ . Par contre, d'autres canaux potassiques ont été cristallographiés et peuvent être abondamment utilisés pour créer des modèles tridimensionnels du canal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  dans ses configurations fermée ou ouverte. Par la suite nous établirons si ces modèles peuvent rendre compte des résultats expérimentaux obtenus sur le canal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ . Après un bref rappel sur les premières structures cristallographiques réalisées nous décrirons les structures cristallographiques des canaux potassiques.

La première structure cristallographique d'une protéine a été réalisée en 1958 avec une résolution de 6 Å par le laboratoire du Dr. John C. Kendrew<sup>19</sup> pour une protéine soluble, la myoglobine (Kendrew, J. C. *et al.*, 1958). Cette protéine sert de réserve d'oxygène dans les muscles et est plus petite que l'hémoglobine. La structure cristallographique de l'hémoglobine suivit en 1964 par le laboratoire du Dr. Max Perutz

(Perutz, M. F. *et al.*, 1964). Jusqu'à la fin des années 1980 le nombre de structures cristallographiques n'excédait pas 40 par année avant « d'exploser » par la suite pour atteindre 5507 nouvelles structures cristallographiques en 2004. À la date de rédaction de cette thèse le site d'enregistrement des structures cristallographiques (sur le site de *Protein Data Bank*) comptait 35 701 structures depuis 1972. Il est cependant plus difficile d'obtenir une cristallographie d'une protéine membranaire lipophile. C'est pourquoi, la première structure cristallographique d'une protéine membranaire (le centre de réaction photosynthétique) n'a été obtenue qu'en 1985 (Deisenhofer, J. *et al.*, 1985) grâce aux travaux des Drs. J. Deisenhofer, R. Huber et M. Hartmut<sup>20</sup>. Cette structure provenait de la bactérie *Rhodospseudomonas viridis* et a été obtenue par diffraction des rayons X avec une résolution de 3 Å. Depuis la publication de la première structure cristallographique d'un canal potassique en 1998 (Doyle, D. A. *et al.*, 1998), l'étude de leur structure a permis de mieux comprendre certains des mécanismes de la conduction des ions K<sup>+</sup> communs à de nombreux canaux potassiques. Nous allons décrire ces structures dans les paragraphes suivants.

### ***C.1. Structures des canaux potassiques***

Le canal KcsA présenté à la Figure 7 et à la Figure 8 a été le premier canal ionique sélectif dont on a pu obtenir une structure cristallographique. C'est un canal potassique provenant de la bactérie, *Streptomyces lividans*<sup>21</sup> et dont l'activation dépend du pH intracellulaire. Il est généralement admis que la structure du canal KcsA correspond à la configuration fermée du canal. Une première cristallographie aux rayons X a été obtenue

---

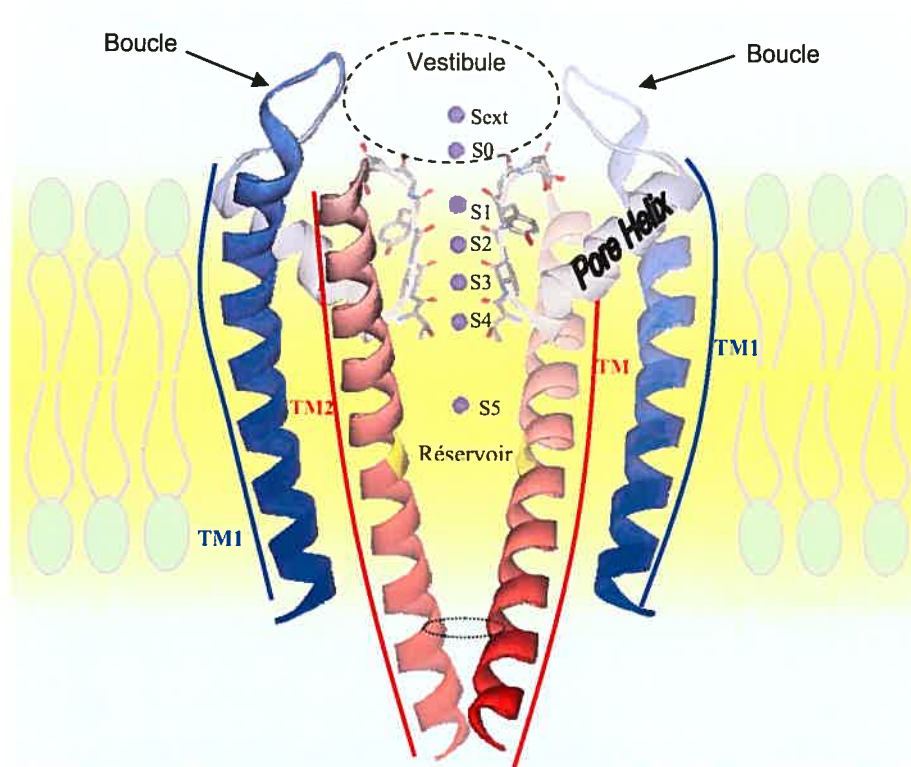
<sup>19</sup> Les Drs. Max F. Perutz et John C. Kendrew ont reçu le prix Nobel de chimie en 1962.

<sup>20</sup> Les Drs. Johann Deisenhofer, Robert Huber et Michel Hartmut ont partagé le prix Nobel de chimie en 1988.

<sup>21</sup> Ce sont des bactéries filamenteuses Gram<sup>+</sup> vivant dans le sol. Elles connaissent une différenciation morphologique unique chez les procaryotes qui aboutit à la sporulation et est accompagnée d'une différenciation métabolique caractérisée par la production de métabolites secondaires présentant une extraordinaire diversité de structures chimiques et d'activités biologiques (antibiotiques, antitumoraux, immunosuppresseurs, herbicides, insecticides).



en 1998 par l'équipe du laboratoire de R. MacKinnon<sup>22</sup> avec une résolution de 3,2 Å (Doyle, D. A. et al, 1998). À cette résolution, les ions  $K^+$  et les molécules d'eau n'étaient pas présents dans la cristallographie. De nouvelles cristallographies de cette protéine ont été réalisées par la suite avec une résolution de 2,1 Å (Figure 8) en utilisant les anticorps Fab et dans différentes conditions (Zhou, Y. *et al.*, 2001).



**Figure 7. Représentation en mode ruban de la structure cristallographique du canal KcsA encastré dans une membrane lipidique.**

Pour la lisibilité de la figure, nous n'avons représenté que deux monomères du tétramère. Coloré en bleu, on peut identifier le segment TM1, en rouge le segment TM2 et en gris les hélices du pore. Les atomes sur le filtre de sélectivité sont représentés sous leur forme atomique avec en rouge l'atome d'oxygène des groupements carbonyles et en violet les ions  $K^+$  occupant tous les sites de liaison de Sext à S5 (le fichier de coordonnées PDB:1K4C a été utilisé pour la figure). Le vestibule est délimité par les atomes des boucles extracellulaires et est représenté en pointillé. Le résidu GLY99 est représenté en jaune sur le segment TM2. Les lipides de la membrane sont représentés par des sphères vertes avec leurs queues hydrophobes en gris. La description des différentes zones du canal est discutée dans ce chapitre.

<sup>22</sup> Il a obtenu le prix Nobel de chimie en 2003.

## ***C.2. Description de la structure cristallographique du canal KcsA***

Le canal KcsA est un homo-tétramère de deux segments transmembranaires (dénommés TM1 et TM2).

Plusieurs régions sont rapidement identifiables par leur structure et leur fonction dans la conduction des ions du canal.

### **C.2.i Segment TM1**

Le segment TM1 est directement en contact avec les lipides de la membrane et le segment TM2. Aucun des résidus présents sur ce segment ne tapisse la paroi du pore. Néanmoins, cette partie de la protéine sera également intégrée dans nos modèles des canaux  $K_{Ca}3.1$ . Sa présence nous permettra d'évaluer l'accessibilité des résidus qui ne sont pas orientés vers le pore.

### **C.2.ii Boucles extracellulaires et le vestibule externe**

Les boucles extracellulaires, constituées de 11 acides aminés chacune (ALA50 à THR61) forment, avec les atomes présents à l'entrée du filtre de sélectivité, le vestibule externe. Le vestibule contient les sites de liaisons potassium S0 et Sext. La structure du vestibule externe du canal KcsA a déjà été utilisée comme structure de référence pour créer un modèle de vestibule du canal  $K_{Ca}3.1$ . Ce modèle a été utilisé pour comprendre la liaison entre la charybdotoxine (Tableau I), avec les résidus du vestibule du canal  $K_{Ca}3.1$ . Une étude basée sur les résidus chargés du vestibule, combinée à la mutation des résidus de la charybdotoxine, a permis de créer un nouvel inhibiteur spécifique pour le canal  $K_{Ca}3.1$ , démontrant la proximité de structure du vestibule externe entre le canal KcsA et le canal  $K_{Ca}3.1$  (Rauer, Heiko *et al.*, 2000). C'est également dans le vestibule externe que l'on retrouve deux sites de liaison aux ions  $K^+$ .

**Méthode expérimentale:** Diffraction par rayon X D.  
**Source:** *Streptomyces lividans*  
**Première Publication:** [Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R.](#): The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280 pp. 69 (1998)  
**Fichier PDB:** 1BL8 *Résolution [Å]:* 3,20  
**Date de Dépot:** 23 Juillet 1998 *R-Value:* 0,280

**CHRONOLOGIE**

**2001**  
[1J95](#), [1JVM](#), KcsA avec le TBA (Tétrabutylammonium) en présence d'ions K<sup>+</sup> et en présence d'ions Rb<sup>+</sup>, *Résolution:* 2,80 Å.  
[1K4C](#), Complexe KcsA-Fab avec une forte concentration d'ions K<sup>+</sup>, *Résolution:* 2,00 Å.  
[1K4D](#), Complexe KcsA-Fab avec une faible concentration d'ions K<sup>+</sup>, *Résolution:* 2,30 Å.

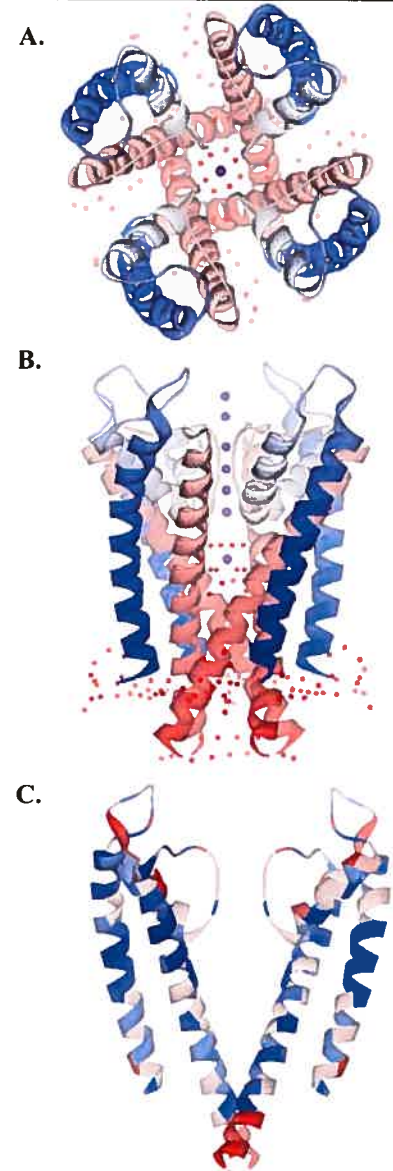
**2003**  
[1R3I](#), Complexe KcsA-Fab avec Rb<sup>+</sup>  
*Résolution:* 2,40 Å.  
[1R3J](#), Complexe KcsA-Fab avec une haute concentration de Ti<sup>+</sup>  
*Résolution:* 1,90 Å.  
[1R3K](#), Complexe KcsA-Fab avec une faible concentration de Ti<sup>+</sup>  
*Résolution:* 2,80 Å.  
[1R3L](#), Complexe KcsA-Fab avec présence d'ions Cs<sup>+</sup>,  
*Résolution:* 2,41 Å.

**2004**  
[1S5H](#), Complexe mutant KcsA-Fab T75C en présence d'ions K<sup>+</sup>,  
*Résolution:* 2,20 Å.

**2005**  
[1S5H](#), Complexe mutant KcsA-Fab T75C en présence d'ions K<sup>+</sup>  
*Résolution:* 2,20 Å.  
[2BOB](#), Complexe KcsA-Fab en présence d'ions Ti<sup>+</sup> et de l'inhibiteur TBA, *Résolution:* 2,76 Å.  
[2BOC](#), Complexe KcsA-Fab en présence d'ions Ti<sup>+</sup> et de l'inhibiteur TEAS, *Résolution:* 3,01 Å.

**2006**  
[1ZWI](#), [2ATK](#), Complexe mutant KcsA-Fab en présence d'ions K<sup>+</sup>, *Résolution:* 2,50 Å. (Cordero, J. et al., 2006)

## Canal Potassique KcsA



**Figure 8. Représentations en mode ruban de la cristallographie du canal KcsA.**

Coloré en bleu, nous pouvons identifier le segment TM1, en rouge le segment TM2, en blanc le filtre de sélectivité et les hélices du pore. En violet les sites d'occupation des ions K<sup>+</sup> et en rouge l'atome d'oxygène des molécules d'eau présentes dans la cristallographie (PBD:1K4C) A. Le canal KcsA vu du milieu extracellulaire. B. Vue de profil du canal. C. Représentation de deux monomères du canal KcsA. D. Petite fiche d'information sur la première structure cristallographique du canal KcsA ainsi que les autres structures du même canal réalisées jusqu'à la rédaction de cette thèse. Lorsqu'il n'y a pas d'indication contraire, les fichiers PDB proviennent de structures cristallographiques obtenues par le laboratoire de R. MacKinnon.

### C.2.iii Les *Pore Helix*

Les quatre segments sous forme d'hélices  $\alpha$ , appelées *Pore Helix*, (Figure 7) situées autour du filtre de sélectivité forment un segment dipolaire qui pointent vers le centre de la cavité et contribuent à stabiliser un cation monovalent au centre de la membrane, dans le site de liaison potassique S5 (Roux, B. *et al.*, 1999). L'effet électrostatique des hélices est important comparé à ceux observés pour des protéines solubles dans l'eau dû à la faible constante diélectrique dans la membrane. Les atomes de ces hélices  $\alpha$  contribuent directement à la conduction ionique du canal et devront être intégrés dans notre modèle du canal  $K_{Ca3.1}$ .

### C.2.iv Filtre de sélectivité

Un filtre de sélectivité étroit d'une longueur de 12 Å ne permet le passage des ions  $K^+$  et des molécules d'eau qu'en file indienne. Cinq sites de liaison des ions  $K^+$  ont été identifiés : le site S0 est à cheval entre le vestibule et le filtre de sélectivité, les sites S1 à S4 sont présents dans le filtre de sélectivité et S5 est au centre du réservoir externe. Le site Sext est présent dans le vestibule externe. Le processus de diffusion permettant aux ions de passer d'un site de liaison à l'autre sera abordé au chapitre « Méthodologie 2<sup>e</sup> partie ». Cette disposition des ions dans le filtre de sélectivité fait intervenir la force de répulsion des ions dans le mécanisme de conduction. C'est l'orientation des carbonyles<sup>23</sup> des résidus présents à l'entrée et dans le filtre de sélectivité qui permet la déshydratation des ions  $K^+$  et la sélectivité aux ions  $K^+$  du filtre de sélectivité, pour un moindre coût énergétique (Roux, B., 2005).

---

<sup>23</sup> Groupement CO faisant partie du squelette des protéines.

### **C.2.v Segment TM2 ou les *Inner Helix***

Les résidus du segment TM2 forment et tapissent la paroi du vestibule interne du canal dans lequel les ions  $K^+$  diffusent. C'est la disposition de ces résidus sur ce segment (appelé S6 pour le canal  $K_{Ca3.1}$ ) qui fait l'objet de la présente thèse.

### **C.2.vi Réservoir**

Au centre du canal, entre la partie cytosolique de la protéine et le filtre de sélectivité, un réservoir d'un diamètre d'environ 7 Å peut contenir une trentaine de molécules d'eau et au moins un  $K^+$  localisé au centre du canal (qui est aussi le centre de la membrane). Cette section est définie par les résidus du segment TM2 qui tapissent la paroi du réservoir. Les inhibiteurs connus, comme le TEA (Lenaeus, M. J. *et al.*, 2005) et le TBA (Zhou, Y. *et al.*, 2001), lorsqu'ils sont introduits dans le milieu intracellulaire, vont se fixer dans cette région du canal et inhiber la conduction des ions. Ils se lient aux atomes des résidus du segment TM2 et/ou à ceux du filtre de sélectivité présents dans le réservoir. Le réservoir rétrécit comme un entonnoir, lorsque l'on se rapproche du milieu intracellulaire, pour former une région étroite dénommée dans la littérature anglophone « bundle crossing section ».

### **C.2.vii Région étroite**

Cette région sépare le réservoir du canal du milieu intracellulaire et obstrue le passage des ions. Le rayon du pore dans cette région est réduit à 2,5 Å. Cette région est visible sur la Figure 8 A et la Figure 7.

La première structure cristallographique du canal KcsA (basée sur le fichier de coordonnées PDB:1BL8) a été construite en moyennant les coordonnées internes<sup>24</sup> des atomes constituant les 4 monomères. Les atomes de chacun des monomères sont donc symétriques par rapport à l'axe de diffusion des ions.

### ***C.3. Modèle du canal KcsA dans sa configuration ouverte (modèle de Perozo)***

En l'absence d'un modèle structural d'un canal potassique cristallisé dans sa configuration ouverte, l'équipe du Dr. Eduardo Perozo, a créé un modèle de structure ouverte (Figure 9) basé sur la structure cristallographique du canal KcsA (Perozo, E. *et al.*, 1999) et sur des données provenant d'expériences faites par résonance paramagnétique électronique<sup>25</sup> (RPE). Ces données démontrent le rôle important que joue le mouvement du segment interne TM2 articulé autour du résidu GLY99 dans les structures ouverte et fermée du canal (Figure 7). C'est à partir de ce résidu que l'on observe une différence d'orientation du segment TM2 entre le modèle ouvert et le modèle fermé du canal. Le modèle ouvert a été créé en utilisant les techniques de dynamique moléculaire et de minimisation d'énergie avec des contraintes harmoniques permettant d'augmenter progressivement le diamètre du pore intracellulaire de 3 Å par rapport à la structure du modèle fermé. C'était, jusqu'en mai 2002, le seul modèle atomique d'un canal potassique dans sa configuration ouverte. Dans notre première publication, nous avons utilisé cette structure pour comparer nos résultats expérimentaux réalisés quand le canal K<sub>Ca</sub>3.1 est dans sa configuration ouverte.

---

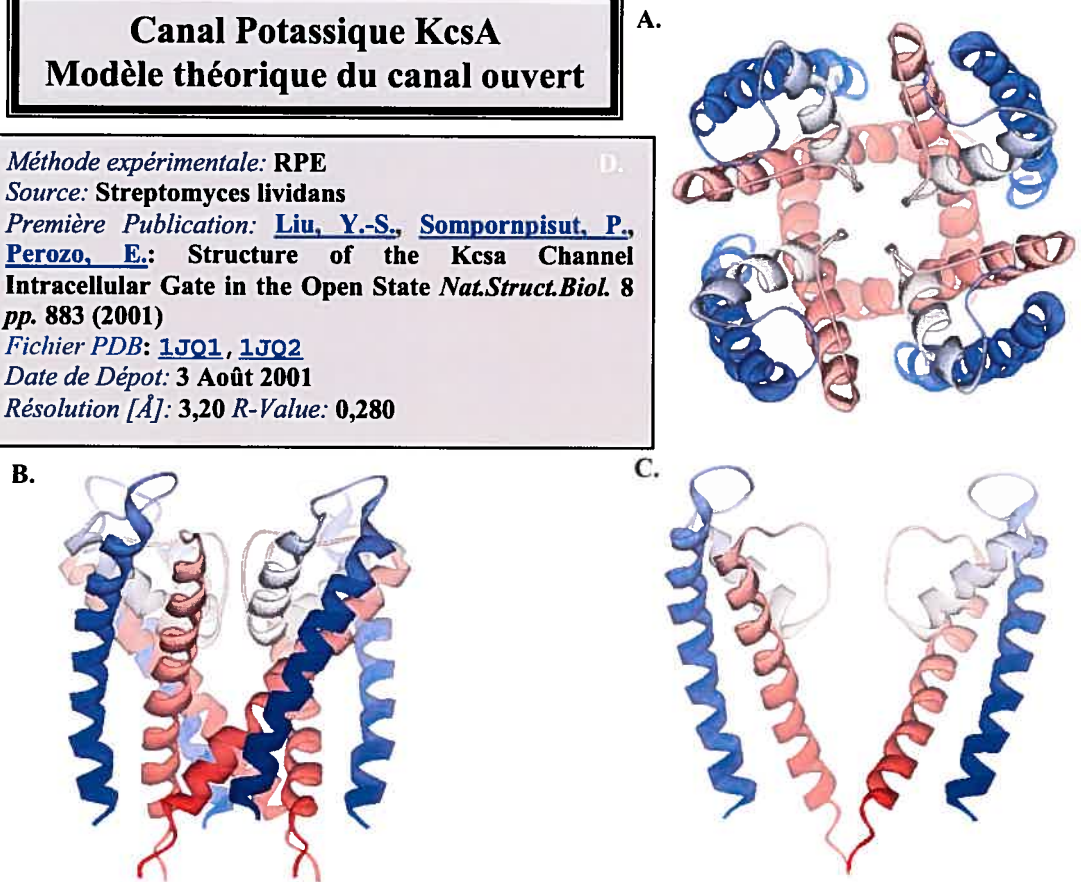
<sup>24</sup> Les coordonnées internes définissent la structure d'une protéine en donnant la position d'un atome (angles et distance) en fonction des autres atomes qui lui sont connectés.

<sup>25</sup> La résonance paramagnétique électronique (RPE, EPR en anglais) aussi appelé la résonance électronique de spin (RES) a été mise au point en 1945 par Zavoisky. La RPE permet de mesurer avec précision le nombre de centres paramagnétiques sans endommager l'échantillon.



**Canal Potassique KcsA  
Modèle théorique du canal ouvert**

*Méthode expérimentale:* RPE  
*Source:* *Streptomyces lividans*  
*Première Publication:* [Liu, Y.-S., Sompornpisut, P., Perozo, E.](#): Structure of the Kcsa Channel Intracellular Gate in the Open State *Nat.Struct.Biol.* 8 pp. 883 (2001)  
*Fichier PDB:* [1JO1](#), [1JO2](#)  
*Date de Dépot:* 3 Août 2001  
*Résolution [Å]:* 3,20 *R-Value:* 0,280



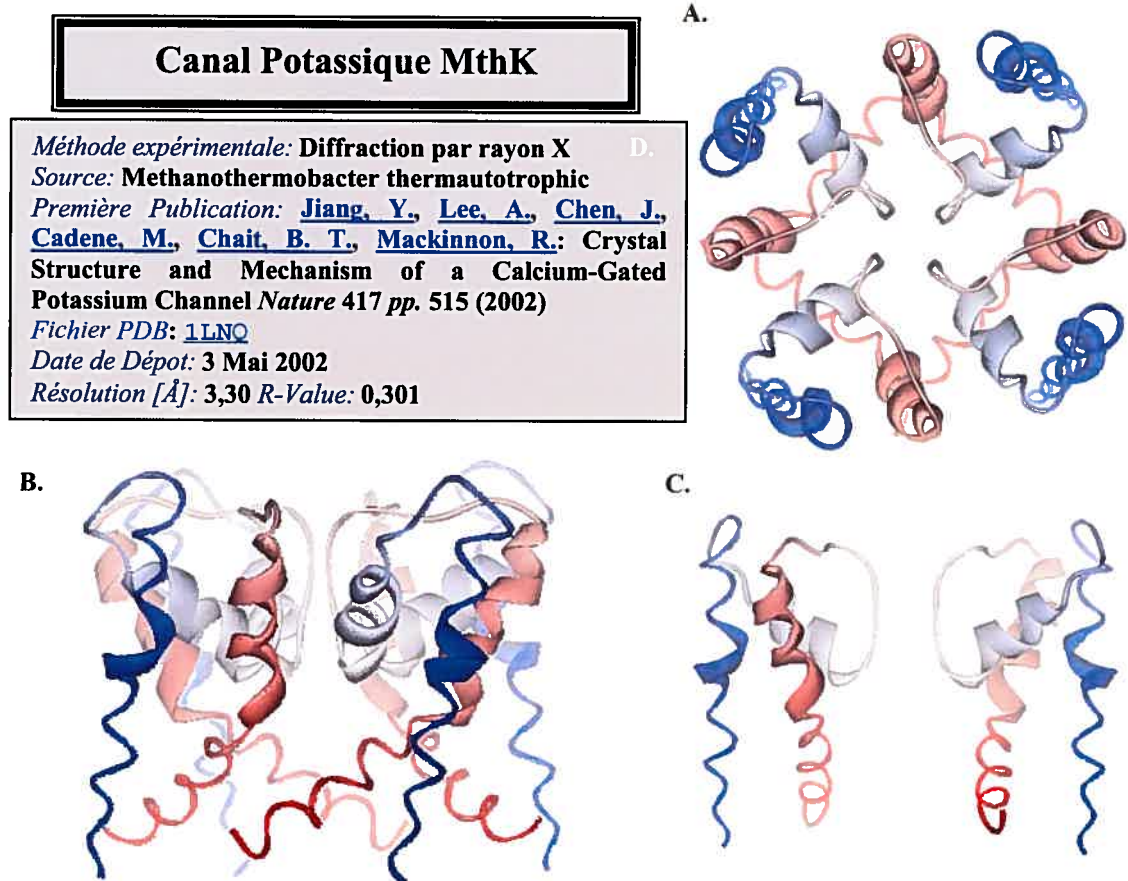
**Figure 9. Représentations en mode ruban du modèle ouvert du canal KcsA fait par le laboratoire du Dr. Eduardo Perozo.**

En bleu le segment TM1, en rouge le segment TM2, en blanc le filtre de sélectivité et les hélices du pore (PBD:1K4C) A. Le canal KcsA ouvert vu du milieu extracellulaire. B. Vue de profil du canal. C. Représentation de deux monomères du canal.

#### ***C.4. Description de la structure cristallographique du canal MthK***

Suite à la cristallographie du canal KcsA, d'autres canaux potassiques ont fait l'objet d'une cristallographie par la même équipe, dont le canal potassique MthK qui est la première structure cristallographique d'un canal dans sa configuration ouverte (**Figure 10**). De plus, comme le canal  $K_{Ca}3.1$ , l'activation du canal MthK dépend de la

concentration intracellulaire de calcium. Par contre, cette sensibilité est intrinsèque au canal contrairement au canal  $K_{Ca}3.1$  où elle est couplée à la calmoduline.



**Figure 10. Représentations en mode ruban de la cristallographie du canal MthK.**

Seule la partie membranaire du canal MthK est représentée. En bleu le segment TM1, en rouge le segment TM2, en blanc le filtre de sélectivité et les hélices du pore (PBD:1JQ1). A. Le canal MthK vu du milieu extracellulaire. B. Vue de profil du canal. C. Représentation de deux monomères du canal.

Le fichier de coordonnées PDB:1LNQ contient le canal MthK et son site intracellulaire sensible au calcium. La cristallographie a été faite avec une faible résolution, et plus particulièrement pour la partie transmembranaire du canal qui est faiblement résolue (avec une résolution de 3,30  $\text{\AA}$ ) puisque seuls les atomes du squelette sont donnés dans le



fichier de coordonnées<sup>26</sup>. Il faut donc reconstituer la chaîne latérale des résidus du canal. Le canal MthK a également été construit en moyennant les coordonnées internes des atomes constituant les 4 monomères.

Dans les limites de la résolution des structures cristallographique, il n'y a pas de changement majeur dans le filtre de sélectivité et dans les *Pore Helix*, entre le canal MthK et le KcsA. Les principales différences entre les deux structures cristallographiques s'observent au niveau des boucles extracellulaires, par un éloignement du segment TM1 par rapport à l'axe de diffusion et dans l'organisation du segment TM2.

#### **C.4.i Boucle extracellulaire**

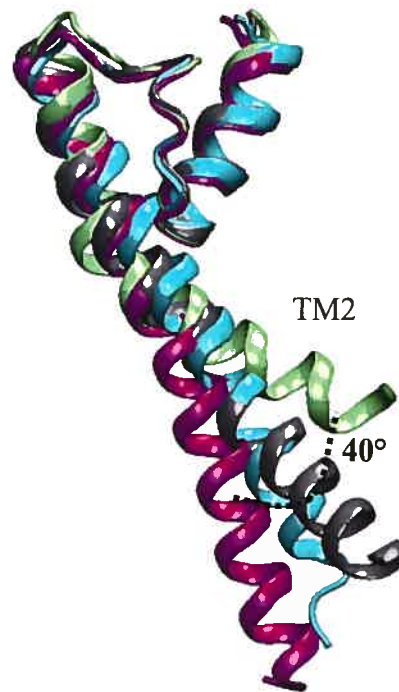
La boucle extracellulaire du canal MthK contient 7 acides aminés de moins que celle du canal KcsA (pour la comparer avec la boucle du canal KcsA voir à la page 22).

#### **C.4.ii Le segment TM2**

À partir du résidu GLY83 (que l'on nomme aussi la glycine universelle, elle est équivalente au résidu GLY99 pour le canal KcsA et au résidu GLY274 pour le canal K<sub>Ca</sub>3.1), il y a une brisure de 40 degrés du segment TM2 (Figure 11). C'est cette différence entre le canal KcsA et le MthK qui différencie l'état ouvert de l'état fermé. Il n'y a pas de goulot d'étranglement dans le canal MthK. Comme on peut également le constater sur la Figure 11, une fraction moins importante du segment TM2 (10 acides aminés de moins) a pu être obtenue dans la structure cristallographique du canal MthK par rapport à la structure cristallographique du canal KcsA.

---

<sup>26</sup> Quelques atomes C<sub>β</sub> sont également présents.



**Figure 11. Superposition des canaux potassiques KcsA, Kv1.2 et MthK.**

A. Superposition du segment TM2 d'un des monomères du canal KcsA (en violet), du modèle du canal KcsA ouvert (en bleu claire), du canal Kv1.2 (en gris) et du canal MthK (en vert). L'angle entre le segment TM2 du canal KcsA et celui du canal MthK est égal à  $40^\circ$ .

### ***C.5. Description de la structure cristallographique du canal Kv1.2***

Au moment de la soumission de cette thèse la structure cristallographique du canal Kv1.2 est la dernière cristallographie réalisée d'un canal potassique (Figure 12). À la différence des autres canaux potassiques qui ont fait l'objet d'une cristallographie, le canal Kv1.2 est un tétramère de 6 segments transmembranaires.

### Canal Potassique Kv1.2

*Méthode expérimentale:* Diffraction par rayon X

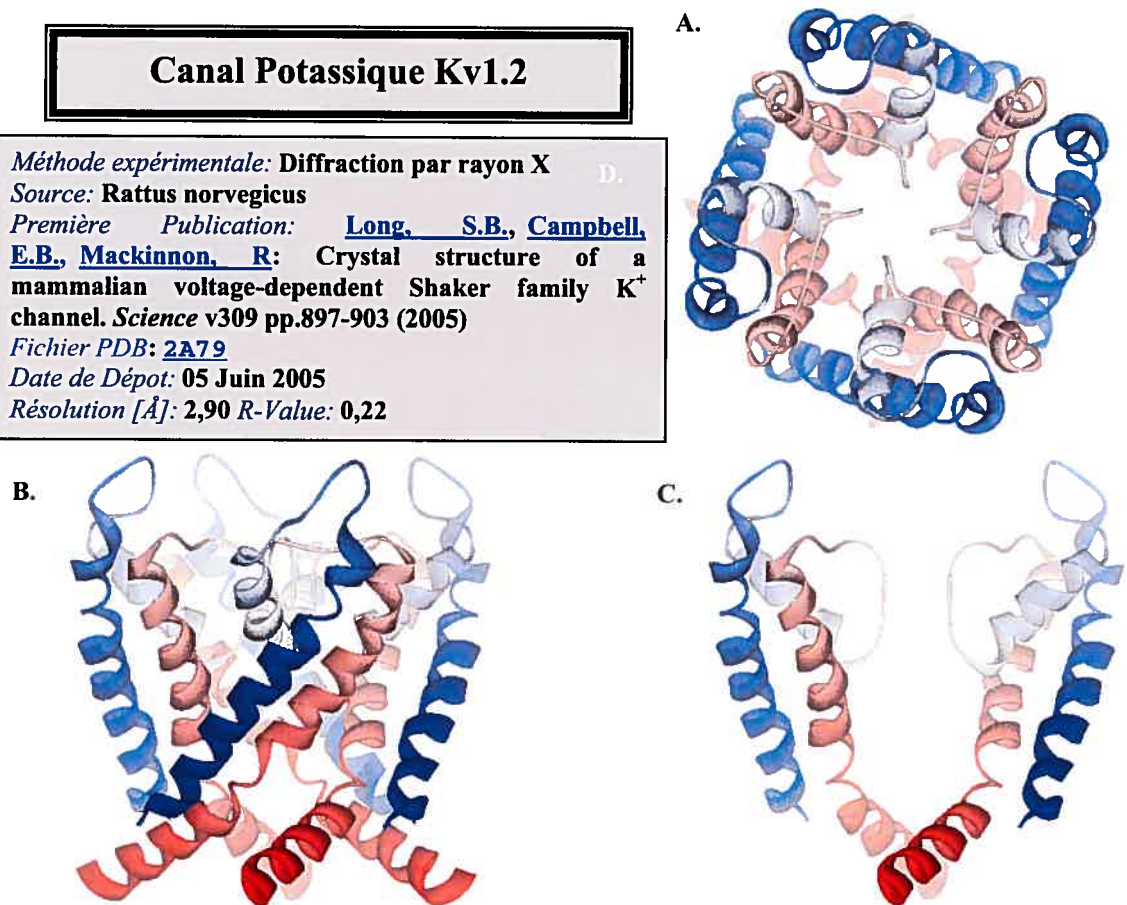
*Source:* *Rattus norvegicus*

*Première Publication:* [Long, S.B., Campbell, E.B., Mackinnon, R:](#) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* v309 pp.897-903 (2005)

*Fichier PDB:* [2A79](#)

*Date de Dépot:* 05 Juin 2005

*Résolution [Å]:* 2,90 *R-Value:* 0,22



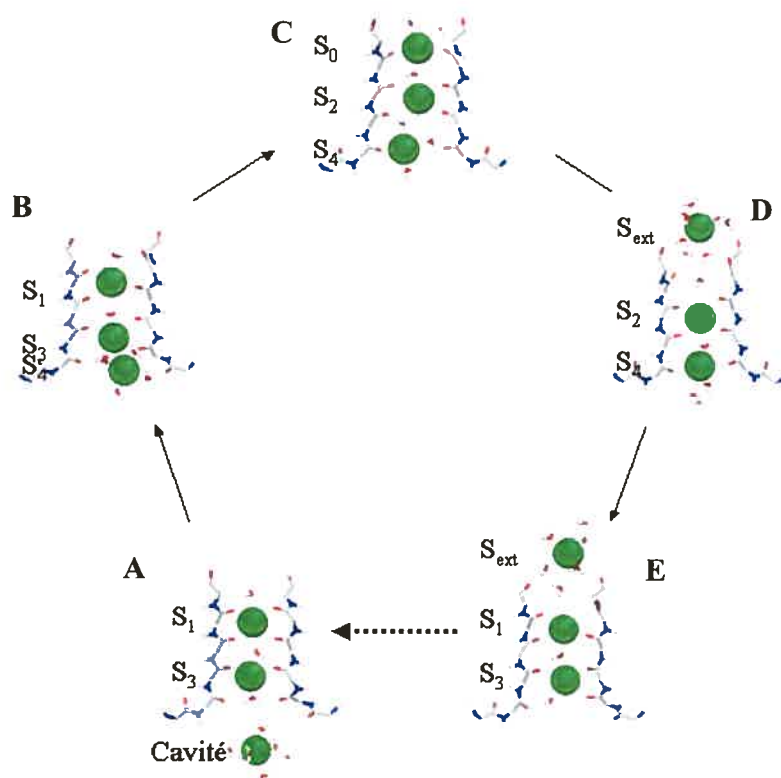
**Figure 12. Représentations en mode ruban de la cristallographie du canal Kv1.2**

Seuls les segments S6 et S5 sont représentés. En bleu le segment S5, en rouge le segment S6, en blanc le filtre de sélectivité et les hélices du pore (PBD:2A79). A. Le canal Kv1.2 vu du milieu extracellulaire. B. Vue de profil du canal. C. Représentation de deux monomères du canal.

L'activation de ce canal dépend du potentiel membranaire. C'est un canal appartenant à la même famille que le canal de type Shaker. On constate encore une très grande conservation dans la structure tridimensionnelle du filtre de sélectivité et des *Pore Helix* du canal Kv1.2 par rapport aux autres structures cristallographiques déjà présentées.

### C.6. Description du fonctionnement du filtre de sélectivité

La disposition des ions dans le filtre de sélectivité influence et modifie les champs électriques perçus par un ion  $K^+$  dans le réservoir ou dans le vestibule du canal. Il est donc important de savoir comment les ions traversent le filtre de sélectivité. Cinq étapes permettent d'expliquer la conduction des ions dans le filtre de sélectivité. Les schémas de la Figure 13 dépeignent assez bien la conduction des ions à travers le filtre de sélectivité des canaux potassique.



**Figure 13. Le cycle de diffusion des ions dans le filtre de sélectivité**

« A. Le cycle de diffusion des ions commence dans une configuration qui place deux ions dans le filtre de sélectivité (S3, S1) alors qu'un seul ion est présent dans la large cavité hydrophile. B. Les ions se déplacent ensuite de façon concertée vers un état qui place d'abord trois ions dans le filtre (S4, S3, S1). C. Les ions présents dans les sites S3 et S1 progressent vers les sites S2 et S0 (site légèrement à l'extérieur du filtre de sélectivité). D. L'ion présent dans le site S0 s'échappe finalement dans le site S\_ext. E. Ce mouvement entraîne le déplacement des ions logés dans les sites S2 et S4 vers les sites S1 et S3 respectivement, le site S1 ayant été laissé vacant par l'ion qui est sorti. ». La figure et sa description ont été reprises après autorisation de tous les auteurs et de l'éditeur (Parent, L. *et al.*, 2002).

« La flèche en pointillé signifie que l'ion externe (S-externe) doit s'éloigner du canal vers le milieu extracellulaire avant qu'un autre ion provenant du milieu intracellulaire puisse pénétrer dans la cavité. Les ions sont ainsi revenus à la configuration initiale et le cycle de diffusion peut se répéter. Les calculs de Bernèche et Roux ont démontré qu'aucune de ces étapes n'implique des variations d'énergie libre aussi importantes que celles qui sont associées aux fluctuations thermiques spontanées observées dans tout système moléculaire. Les variations de potentiel transmembranaire, mesurées pendant le potentiel d'action par exemple, suffisent à pousser les ions  $K^+$  vers l'extérieur sans que les ions aient à surmonter des barrières d'énergie significatives qui s'opposeraient aux mouvements des ions. Le canal potassique peut en conséquence conduire les ions très rapidement. »

La figure et sa description sont reprises de la publication<sup>27</sup> (Parent, L. et al, 2002) dans la revue franco-canadienne *Médecine/Sciences* ; une autre publication pertinente sur le fonctionnement du filtre de sélectivité et la conduction ionique est disponible (Roux, B., 2005). La représentation des états qu'occupent les ions dans le filtre de sélectivité sera détaillée dans le chapitre « Méthodologie II » sous forme d'un processus de Markov. Dans le processus de Markov, nous tiendrons compte d'états plus instables comme les configurations [S5,S4,S2] et [S5,S4,S2,S0]. C'est l'orientation des carbonyles des résidus présents à l'entrée et dans le filtre de sélectivité qui permet la déshydratation des ions  $K^+$  pour un moindre coût énergétique. L'ion  $K^+$  entre dans le filtre de sélectivité entouré d'atomes d'oxygène des carbonyles qui se substituent aux atomes d'oxygène de la molécule d'eau. La sélectivité ionique du filtre de sélectivité est principalement assurée par les atomes des groupements carbonyles. Pour l'exemple, le site de liaison S2 est entouré par 8 groupements carbonyles. Ce sont leurs interactions, électrostatiques et de van der Waals, avec l'ion présent en S2 ainsi que leurs interactions mutuelles qui permet à la fois la conduction et la sélection ionique dans le filtre de sélectivité (Noskov, S. Y. et al., 2004).

---

<sup>27</sup> La figure et sa description ont été reprises après autorisation de l'éditeur.

## **D. Justification de l'étude de la structure du canal $K_{Ca3.1}$**

Malgré la mise en évidence du rôle important du canal  $K_{Ca3.1}$  tant au niveau de la régulation du tonus dans les muscles lisses vasculaires que dans les processus de sécrétion des ions dans les cellules de la trachée, il n'existe aucune donnée quant à la structure du pore et/ou de la région impliquée dans l'ouverture du canal  $K_{Ca3.1}$ . Ces données sont pourtant essentielles afin d'élaborer une stratégie pharmacologique ciblée impliquant les canaux  $K_{Ca3.1}$ . C'est dans ce contexte que nous avons entrepris une recherche dont le but était de fournir une première description au niveau atomique de la région du pore du canal  $K_{Ca3.1}$ .

Dans un cadre théorique, les simulations numériques à partir de structures connues ou de modèles théoriques sont des outils pour mieux comprendre l'action des résidus (et des atomes les constituants) dans des systèmes complexes et à une échelle inaccessible expérimentalement. La structure atomique aide à comprendre les effets que peuvent avoir des mutations (qu'elles soient contrôlées en laboratoire ou dues à des maladies génétiques), des inhibiteurs, des activateurs ou d'autres ligands sur la structure et la fonction d'une protéine. Elle permet aux biologistes expérimentateurs de mieux localiser sur une séquence en acides aminés les résidus importants dans la fonction d'une protéine.

Un autre objectif est de donner des outils aux laboratoires pharmaceutiques permettant de concevoir de nouvelles molécules (ou de mieux choisir parmi les molécules déjà connues) dont la structure atomique est étudiée pour agir spécifiquement sur une zone bien localisée d'un seul type de protéine afin de contrôler son activité.

## **E. Stratégie de l'étude de la structure du canal $K_{Ca3.1}$**

La Figure 14 présente une synthèse graphique de la stratégie qui a prévalu pour obtenir les résultats contenus dans les deux publications et dans le chapitre « Résultats III ». L'intérêt de cette figure est de présenter les liens entre les différentes parties expérimentales et théoriques de cette thèse. Le but de cette thèse est de mieux

comprendre le rapport entre la structure du segment S6 et la fonction de conduction du canal potassique  $K_{Ca3.1}$ . Pour atteindre ce but, nous nous sommes donnés plusieurs objectifs qui ont été séparés en trois étapes. Suit un résumé succinct des différentes étapes de nos travaux qui sont détaillées dans la Figure 14.

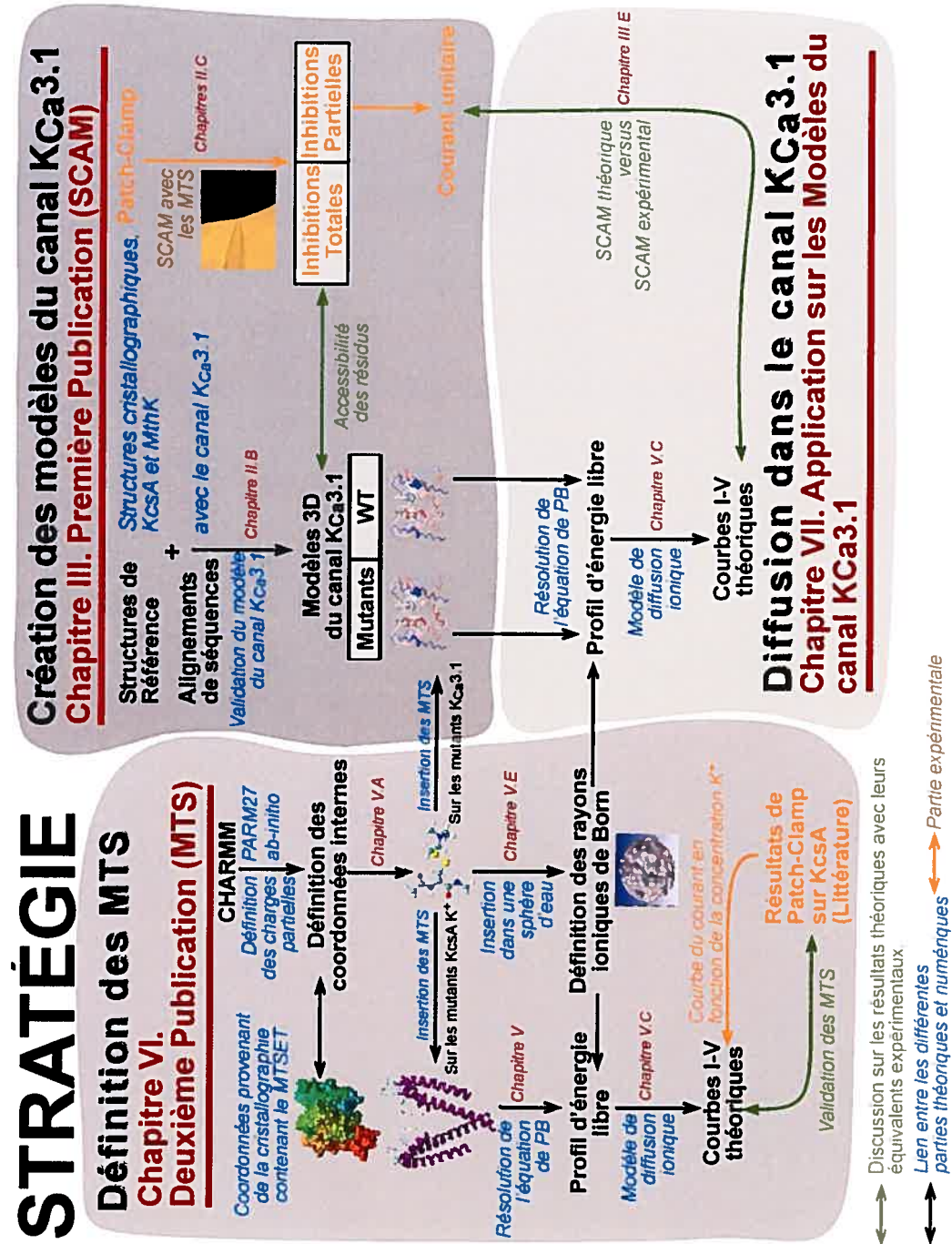


Figure 14. Stratégie développée dans cette thèse pour comprendre la conduction des ions K<sup>+</sup> dans le canal KCa3.1.



### ***E.1. Création des modèles du canal $K_{Ca3.1}$***

#### **Correspondant aux chapitres *Méthodologie I & Première publication (SCAM)***

Nous ferons dans le chapitre « Méthodologie I » un rappel sur la technique expérimentale du patch-clamp appliquée au SCAM et décrirons une technique de création de modèles tridimensionnels. Pour créer des modèles tridimensionnels du segment S6 du canal  $K_{Ca3.1}$ , nous utiliserons les structures cristallographiques existantes de canaux potassiques. Nous comparerons alors l'orientation des résidus du segment S6 de notre modèle, aux résultats expérimentaux de SCAM présentés dans la première publication.

### ***E.2. Définition des MTS***

#### **Correspondant aux chapitres : *Méthodologie II & Deuxième publication (MTS)***

Pour mieux interpréter certaines des données provenant des expériences de patch-clamp, il nous faudra incorporer les atomes des agents MTS directement sur nos modèles tridimensionnels. La deuxième publication définit ces atomes et présente une méthode permettant d'évaluer leurs effets sur la conduction ionique du canal potassique  $KcsA$ . Le chapitre « Méthodologie II » aborde les différents aspects théoriques utilisés dans la deuxième publication.

### ***E.3. Diffusion dans le canal $K_{Ca3.1}$***

#### **Correspondant aux chapitres : *Méthodologie II & Résultats III***

Nous incorporons les agents MTS directement sur les modèles tridimensionnels du canal  $K_{Ca3.1}$ . Dans le chapitre « Méthodologie II » nous présenterons un modèle cinétique de diffusion ionique du canal  $K_{Ca3.1}$ , que nous appliquerons en présence et en absence des agents MTS. Les valeurs calculées de la conductance ionique des modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  seront alors directement comparées aux valeurs expérimentales obtenues dans la première publication.

## **F.Littérature suggérée**

### **Sur les canaux ioniques et les expériences de patch-clamp**

*Ion Channels of Excitable Membranes*

**Bertil Hille**

Sinaur (2001), 3<sup>rd</sup> ed.

*Le patch-clamp : Une nouvelle façon de voir les canaux ioniques*

**Rémy Sauvé**

Médecine/sciences (1987) 3, pp. 538-45

### **Sur le canal $K_{Ca}3.1$**

*The  $Ca^{2+}$ -Activated Channel of Intermediate Conductance : A Molecular Target  
Novel Treatments ?*

**B.S. Jensen, D. Strobaek, S-P. Olesen et P. Christophersen**

Current Drug Target (2001) 2, pp. 401-422

### **Sur l'étude des propriétés des canaux ioniques *in-silico***

*Theoretical and computational models of biological channels*

**Benoît Roux, Toby Allan, Simon Bernèche et Wonpil Im**

Quarterly Reviews of Biophysics (2004) 37, pp. 15-103, Cambridge University Press

## II. MÉTHODOLOGIE 1<sup>ÈRE</sup> PARTIE

Dans l'introduction, nous avons exposé l'intérêt et le but des travaux présentés dans cette thèse ainsi que dans les deux publications qui en font partie. Ce chapitre introduit les travaux contenus dans la première publication. Nous traiterons des techniques utilisées pour créer les modèles du canal  $K_{Ca3.1}$ . Le modèle du canal  $K_{Ca3.1}$ , dans sa configuration fermée, sera défini à partir des données de la cristallographie du canal KcsA. Les modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  dans sa configuration ouverte, seront générés à partir du modèle ouvert du canal KcsA fait par E. Perozo et des données cristallographiques des canaux MthK et Kv1.2. L'accessibilité et l'orientation des résidus du segment S6 des modèles numériques seront comparées aux résultats expérimentaux de patch-clamp (avec la méthode du SCAM).

### A. Modélisation par homologie

La question que nous nous posons n'est donc pas tant de savoir quelle est la structure du canal  $K_{Ca3.1}$  mais de savoir si la structure du canal potassique KcsA dans sa configuration fermée, et les structures des canaux KcsA, MthK et Kv1.2 pour la configuration ouverte, peuvent expliquer les résultats des expériences de SCAM. La modélisation par homologie est alors la méthode la plus adaptée puisqu'elle permet d'obtenir un modèle atomique d'une protéine, dont la structure n'est pas connue, en utilisant sa similarité de séquence avec des protéines pour lesquelles nous avons des structures cristallographiques. Ainsi un logiciel de modélisation tel que Modeller permet de générer de nombreux modèles tridimensionnels du canal  $K_{Ca3.1}$  à partir d'un alignement de séquences entre le canal  $K_{Ca3.1}$  et les canaux KcsA et MthK dont les structures ont déjà été résolues.

#### A.1. Alignement de séquences en acides aminés

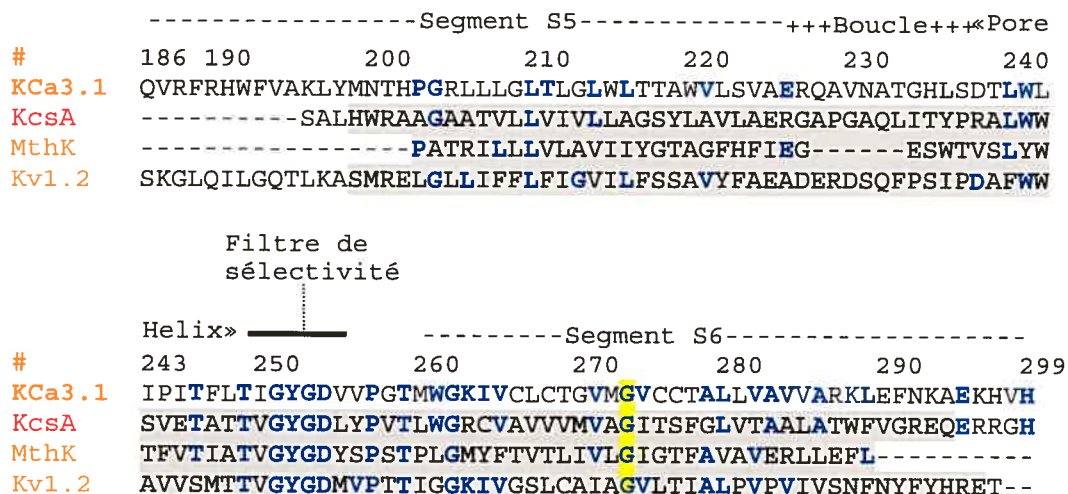
L'alignement de séquences est la première étape pour construire un modèle tridimensionnel d'une protéine par homologie. Il est généralement admis que 20% des acides aminés doivent être identiques sur l'ensemble de la séquence pour pouvoir générer des modèles fiables de la protéine étudiée, même si d'autres facteurs comme la similarité des fonctions peuvent moduler ce critère de sélection.

	<b>K<sub>Ca</sub>3.1</b>	<b>KcsA</b>	<b>MthK</b>	<b>Kv1.2</b>
Identité	du segment S5 au segment S6	22 %	24 %	26 %
	du <i>Pore Helix</i> au segment S6	30 %	28 %	33 %
Homologie	du segment S5 au segment S6	35 %	38 %	43 %
	du <i>Pore Helix</i> au segment S6	46 %	47 %	49 %

**Tableau II. Identité et homologie entre la structure primaire du canal K<sub>Ca</sub>3.1 avec celles des canaux KcsA, MthK et Kv1.2.**

L'identité et l'homologie des différentes séquences sont calculées à partir des alignements présentés à la Figure 15 en utilisant le serveur <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html?>

Dans notre cas, nous modélisons une protéine partageant la même fonction avec les structures de références (des canaux potassiques) et dont l'identité avec les canaux KcsA, MthK et Kv1.2 est de l'ordre de 30 % lorsqu'elle est calculée entre la partie codant le *Pore Helix* jusqu'à la fin du segment S6 (Tableau II).



**Figure 15. Structure primaire du canal K<sub>Ca</sub>3.1 et alignement des séquences en acides aminés pour les canaux KcsA, MthK, Kv1.2 et K<sub>Ca</sub>3.1**

Les régions colorées en gris correspondent à la séquence utilisée pour réaliser la structure du modèle. La numérotation des acides aminés est celle du canal K<sub>Ca</sub>3.1. Un résidu coloré en bleu est identique à celui porté sur la séquence du canal K<sub>Ca</sub>3.1. Le fond jaune sur le résidu glycine correspond à la glycine universelle, GLY99 pour la séquence du KcsA et GLY274 pour la séquence du canal K<sub>Ca</sub>3.1. Le filtre de sélectivité aux ions K<sup>+</sup> est reconnaissable par sa séquence GYGD. Le *gap* entre la séquence du canal K<sub>Ca</sub>3.1 et la séquence du canal MthK est dû à l'absence de grandes boucles extracellulaires sur le canal MthK.

La Figure 15 présente les alignements de séquences que nous utilisons pour créer les différents modèles du canal K<sub>Ca</sub>3.1. Pour déterminer l'alignement nous avons utilisé les logiciels SAM-T02, BLAST et Phyre. Ces logiciels d'alignement de séquences d'acides aminés utilisent différents algorithmes.

- *SAM-T02*<sup>28</sup> pour « Sequence Alignment and Modeling system », est basé sur le modèle des chaînes de Markov cachées. Il prend également en compte la structure secondaire et il identifie des parties transmembranaires des protéines membranaires (Karplus, K. *et al.*, 1998; Karplus, K. *et al.*, 2001).
- *BLAST*<sup>29</sup> pour « Basic Local Alignment Search Tool », est basé sur la reconnaissance de régions de similitude entre les séquences plutôt que la recherche du meilleur alignement. Cet utilise une matrice de substitution pour évaluer la pertinence des mutations (Altschul, S. F. *et al.*, 1990).
- *Phyre*<sup>30</sup>, anciennement *3D-pssm*<sup>31</sup>, utilise de nombreux critères pour comparer une séquence en acides aminés avec les autres séquences de protéines dont la structure est connue. Il utilise également Psi-Blast et compare la pertinence d'un alignement en fonction de la position des acides aminés dans une structure tridimensionnelle (Kelley, L. A. *et al.*, 2000; Fischer, D. *et al.*, 1999).

La séquence GYGD est conservée à 90% pour l'ensemble des séquences primaires des canaux potassiques connus. Cette séquence constitue le cœur du filtre de sélectivité présent à l'entrée extracellulaire du canal. Les différents alignements réalisés avec ces logiciels n'insèrent pas (ou peu) de *gap* entre la séquence GYGD du filtre de sélectivité et les derniers résidus du segment S6 (la séquence LEF). Un *gap* dans l'alignement entre la séquence du canal K<sub>Ca</sub>3.1 et la séquence du canal de référence, nous obligerait à modifier

---

<sup>28</sup> <http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/HMM-apps/T02-query.html>

<sup>29</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?Jform=1>

<sup>30</sup> <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>

<sup>31</sup> <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/>

le squelette du modèle par rapport à la structure de référence, c'est pourquoi nous n'avons introduit aucun *gap*.

### ***A.2. Création des modèles $K_{Ca3.1}(KcsA)$ et $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$***

Pour créer les modèles du canal  $K_{Ca3.1}(KcsA)$  et  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$  nous avons utilisé les logiciels Modeller (Sali, A. *et al.*, 1993) et Charmm (Brooks, B. R. *et al.*, 1983). Ces deux modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  font l'objet de la première publication et sont également traités dans le chapitre « Résultats III ». Les fichiers d'entrée de Modeller sont les fichiers de coordonnées atomiques des structures pour lesquelles une structure cristallographique est disponible (le canal KcsA, ou le modèle du canal KcsA ouvert) en format PDB (pour [Protein Data Bank](http://www.pdb.org)<sup>32</sup>) et un alignement de séquences entre ces structures et le modèle que nous voulons créer (Figure 15).

Modeller utilise comme structure de départ le squelette<sup>33</sup> de la (ou des) protéine(s) de référence(s)<sup>34</sup>. Dans le cas du canal  $K_{Ca3.1}$ , nous avons utilisé deux structures ; soit celle du KcsA pour le canal  $K_{Ca3.1}$  dans sa configuration fermée ainsi que celle du modèle de Perozo pour la configuration ouverte du canal  $K_{Ca3.1}$ . Les configurations spatiales des atomes des résidus de la cristallographie sont conservées si elles correspondent à des résidus identiques entre les deux séquences. Modeller remplace les résidus non homologues de la structure de référence par ceux du canal  $K_{Ca3.1}$  en utilisant sa bibliothèque de rotamères. Le programme Modeller possède une bibliothèque de structures de rotamères donnant la position relative des atomes du radical d'un acide aminé en fonction des résidus adjacents sur la séquence. Sa banque de structures se base sur une série de 105 familles prises parmi 416 structures connues. Le squelette de la structure initiale servant à générer des modèles est parfaitement superposable à la structure de référence. Le modèle atomique initial créé, le programme Modeller applique des contraintes de distance et d'angle entre chaque atome en fonction de leur nature et de

---

<sup>32</sup> La banque de données est disponible gratuitement sur le site Internet [www.pdb.org](http://www.pdb.org).

<sup>33</sup> Ou encore appelé en anglais le « backbone » qui contient les atomes de types C, C $\alpha$ , O et N.

leurs liaisons. Nous appliquons également des contraintes de symétrie pour obtenir un homotétramère. Les atomes de chacun des monomères sont symétriques les uns par rapport aux autres relativement à l'axe de symétrie Z (qui est aussi l'axe de conduction des ions). Une fois toutes les contraintes fixées, une dynamique moléculaire classique (chauffage, équilibre, simulation) est appliquée. La méthode Monte-Carlo est utilisée pour générer des positions atomiques de départ légèrement différentes de la structure initiale. Chaque dynamique moléculaire qui s'en suit permet de créer un modèle du canal K<sub>Ca</sub>3.1 différent. Avec l'augmentation de la puissance de calcul des ordinateurs, il est possible de générer plus d'une centaine de modèles rapidement<sup>35</sup>. Parmi tous les modèles fournis par Modeller, il faut choisir ceux qui sont le plus pertinents, c'est-à-dire qu'en absence d'information supplémentaire sur la structure atomique, ce sont les modèles qui respectent le mieux les contraintes imposées lors de la dynamique moléculaire qui sont conservés. La valeur de la fonction objective fournie par Modeller pour chaque modèle créé, est un paramètre qui permet de comparer les différents modèles entre eux et de mettre en évidence si le modèle satisfait correctement aux contraintes imposées. Plus la valeur de la fonction objective est faible, meilleur est le respect des contraintes spatiales, énergétiques et celles nécessaires pour imposer la symétrie du tétramère. Cette fonction ne peut donc être reliée directement à l'énergie. La valeur de la fonction objective n'a de sens que si elle est comparée à des valeurs obtenues pour les mêmes systèmes d'atomes sur lesquels les mêmes contraintes ont été appliquées.

Lors des dynamiques moléculaires exécutées par Modeller, la structure peut s'éloigner de manière significative de la structure initiale, pour permettre par exemple l'arrangement des acides aminés insérés. Il est donc nécessaire de s'assurer de la qualité du modèle ; la superposition du squelette de la structure de référence au modèle K<sub>Ca</sub>3.1 en est un bon indice. Nous cherchons à obtenir un modèle du canal K<sub>Ca</sub>3.1 qui soit le plus proche possible de la structure du canal KcsA pour la configuration fermée du canal et le

---

<sup>34</sup> traduit par *template* en anglais

plus proche possible du modèle de Perozo pour le modèle du canal ouvert. La déviation des atomes dans les modèles du canal K<sub>Ca</sub>3.1 par rapport aux structures de référence peut être obtenue en superposant les squelettes des structures de références à ceux des modèles d’K<sub>Ca</sub>3.1. Ce calcul est appelé RMS pour « *Root Mean Square* » dont l’équation est :

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i^N (r_i - R_i)^2} \quad (2)$$

*N* est le nombre d’atomes du squelette contenus par chacun des modèles comparés.  
*R<sub>i</sub>* correspond à la position de l’atome appartenant à la structure cristallographique.  
*r<sub>i</sub>* correspond à la position de l’atome appartenant à la structure du modèle.

Plus la valeur de la RMS est faible et plus les structures sont proches l’une de l’autre. La superposition des deux structures permet également une évaluation visuelle de la structure proposée puisque le squelette du modèle doit se superposer le plus possible à la structure connue.

### A.3. Création des modèles K<sub>Ca</sub>3.1(MthK) et K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2)

Pour les modèles du canal K<sub>Ca</sub>3.1 réalisés avec les structures de références du canal MthK et du canal Kv1.2, nous avons préféré effectuer les minimisations et les dynamiques moléculaires en utilisant le programme CHARMM plutôt que par le logiciel Modeller dans l’optique de contrôler plus facilement les processus menant à la création d’un modèle. Les modèles K<sub>Ca</sub>3.1(MthK) et K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2) font l’objet du chapitre « Résultats III ». Le programme Modeller est toujours utilisé pour le choix de l’orientation des rotamères des acides aminés, mais cette fois un seul modèle est généré. Nous n’utilisons donc plus la fonction objective.

Les atomes d’hydrogène ont été rajoutés à la structure en utilisant la fonction HBUILD du programme CHARMM. Les chaînes latérales ont été optimisées avec l’algorithme de minimisation, Newton-Raphson (ABNR). Nous avons utilisé des contraintes harmoniques pour les atomes du squelette pour contrôler leur déviation et

<sup>35</sup> Environ 2 heures avec un ordinateur de type PC possédant un microprocesseur P4 d’une fréquence de 3.0 GHz pour une protéine de 400 acides aminés



conserver la structure secondaire du canal de référence. Une dynamique moléculaire de Langevin de 5 ps avec un pas de 0,002 ps a été également appliquée aux chaînes latérales pour relaxer la structure. Pour tous les modèles, la validation de la structure a été faite en utilisant des logiciels qui évaluent la qualité d'une structure atomique d'une protéine.

#### A.4. Validation du modèle

Cette étape consiste à vérifier si notre modèle atomique ne contient pas d'aberrations énergétiques et si sa structure est compatible avec les structures déjà connues. Nous avons utilisé deux méthodes différentes (et donc deux logiciels) pour vérifier si nos modèles du canal K<sub>Ca</sub>3.1 ne contenaient pas des défauts de structure connus.

- **Procheck**<sup>36</sup> : Cette méthode se base sur une bibliothèque des rotamères les plus rencontrés dans les protéines. Elle compare les coordonnées internes des atomes du modèle avec une bibliothèque constituée par des protéines ayant fait l'objet d'une cristallographie. Cette méthode de vérification est très rapide, de l'ordre de la minute (Morris, A. L. *et al.*, 1992; Laskowski, R. A. *et al.*, 1993).
- **ProQ**<sup>37</sup> - **Protein Quality Predictor** : Il est basé sur un moteur neuronal et des données structurales comme la structure secondaire et l'accessibilité des résidus (Cristobal, S. *et al.*, 2001).

D'autres logiciels ont été utilisés de manière moins systématique.

- **Prosa 2003**<sup>38</sup> : Cette méthode se base sur la comparaison de l'énergie interne et de l'énergie d'interaction calculée par résidu entre le modèle et la structure de référence (Sippl, M. J., 1993).
- **Mol Probity**<sup>39</sup> : Ce serveur Internet permet d'évaluer la qualité d'un modèle atomique en identifiant, entre autres, les atomes trop proches les uns des autres (Lovell, S. C. *et al.*, 2003).

---

<sup>36</sup> <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html>

<sup>37</sup> <http://www.sbc.su.se/~bjorn/ProQ/>

<sup>38</sup> <http://www.proceryon.com/solutions/prosa.html>

<sup>39</sup> <http://kinemage.biochem.duke.edu/molprobity/index-king.html>

Le modèle choisi est celui qui possède la plus faible valeur de la fonction objective (uniquement pour les modèles  $K_{Ca3.1}(KcsA)$  et  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$ ) et valeur RMS pour la plus faible valeur énergétique. Il faut rester critique aussi bien sur la structure du modèle que sur les résultats des logiciels qui les analysent, plus particulièrement lorsqu'ils utilisent des bases de données. Leurs banques de données sont principalement créées à partir de protéines globulaires. Or, les contraintes liées à la membrane et au potentiel transmembranaire engendrent des structures qui seraient difficiles, voire impossibles, pour des protéines globulaires. Le filtre de sélectivité en est un bon exemple.

#### ***A.5. Comparaison des structures et calcul de la section efficace***

La substitution des acides aminés du canal de référence par ceux du canal  $K_{Ca3.1}$ , va modifier la surface de la protéine, la surface de la paroi du pore ainsi que ses propriétés électrostatiques. Nous serons donc souvent amenés à comparer les différentes structures des modèles du canal  $K_{Ca3.1}$ . Pour travailler et analyser les structures tridimensionnelles de nos modèles, nous avons utilisé le logiciel CHARMM (Brooks, B. R. et al, 1983) et le logiciel VMD de visualisation des structures de protéines.

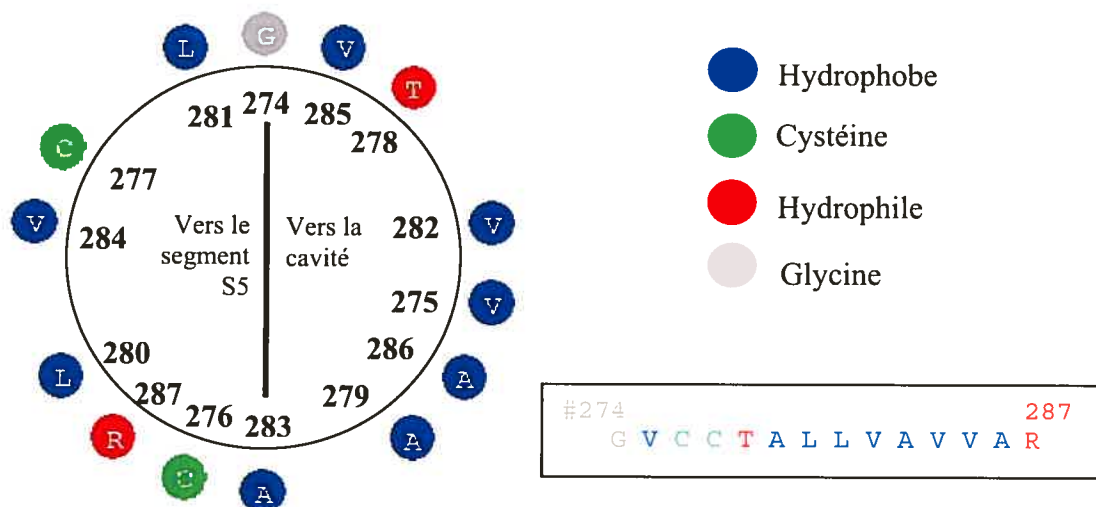
Pour comparer le pore des différents modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  nous serons amenés à calculer leur section efficace. Dans la première publication, le calcul de la section efficace nous permettra de comparer le pore d'un modèle du canal  $K_{Ca3.1}$  dans sa configuration fermée avec sa configuration ouverte. Dans le chapitre « Résultats III » nous comparons les sections efficaces du pore de tous les modèles du canal  $K_{Ca3.1}$ .

La section efficace est calculée dans un parallépipède rectangle, de 18 Å de côté (selon l'axe X et Y) et de 3 Å d'épaisseur, selon l'axe Z. Le parallépipède est centré et perpendiculaire à l'axe de diffusion des ions et l'axe Z est parallèle à l'épaisseur du parallépipède. L'intérieur du parallépipède est constitué d'une grille dont les points sont séparés de 0,5 Å (selon les trois axes). Tous les points de la grille n'étant pas à l'intérieur

du rayon de van der Waals d'un atome sont considérés comme occupant un espace vide. Si le volume d'un espace vide est au moins égal au volume d'une molécule d'eau, il est alors comptabilisé. En déplaçant le parallépipède le long de l'axe de diffusion nous en déduisons la section efficace du pore du canal le long de l'axe de diffusion (Z).

### A.6. Prédictions des modèles du canal $K_{Ca3.1}$

Les premières informations directement utilisables des modèles ont trait à la disposition de chacun des résidus par rapport à l'axe de diffusion. La Figure 16 présente la distribution des résidus autour du segment S6. Les résidus C276, C277, L280, L281, V284 et R287 sont orientés vers le segment S5 et les résidus, V275, T278, A279, V282, V285 et A286 sont orientés vers la cavité et donc vers l'axe de diffusion des ions.



**Figure 16 Orientation des résidus du segment S6 par rapport à l'axe de diffusion.**

La séquence primaire contenant les résidus mutés lors des expériences de SCAM (excepté la GLY274) a été utilisée pour obtenir cette représentation de la distribution des résidus autour du segment S6. La ligne verticale noire sépare la partie du segment S6 exposée vers la cavité de l'autre partie qui est exposée vers le segment S5. Le logiciel Antheprot a été utilisé pour cette représentation.

Les résidus faisant face à l'axe de diffusion des ions sont ceux qui tapissent le pore et ils sont directement en contact avec les molécules d'eau que contient le pore. Ces résidus sont susceptibles d'être accessibles et de réagir lors de nos expériences de SCAM. Les

informations structurales provenant des expériences de patch-clamp nous permettrons alors d'évaluer la capacité de notre modèle à pouvoir expliquer les résultats expérimentaux.

## **B. Partie Expérimentale**

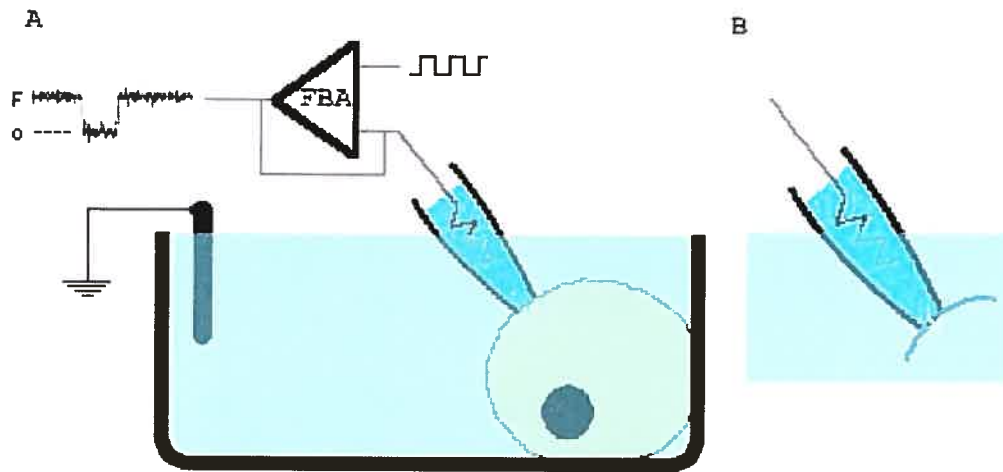
Les développements en électrophysiologie, en particulier la mise au point dans le début des années 80 de la technique du patch-clamp, a rendu possible l'étude des canaux ioniques au niveau du canal individuel. Ces études ont permis, entre autres, de mettre en évidence à la fois la diversité et l'universalité des canaux ioniques comme structure de transport transmembranaire et de déterminer comment certains mécanismes de contrôle qui régissent l'activité des canaux ioniques sont reliés à l'ensemble des processus biochimiques qui ont cours à l'intérieur de la cellule. Les concepts fondamentaux à la base de ce type de mesures ont, en grande partie, été élaborés lors d'études sur des membranes artificielles à partir de molécules dites « formeurs de pore », dont la plus connue est la gramicidine (Hladky, SB *et al.*, 1972).

Les expériences de patch-clamp permettent de façon générale de mesurer un courant traversant la membrane. Ici, nous allons appliquer la technique du patch-clamp à la méthode du SCAM afin d'évaluer la position des résidus du segment S6 par rapport à l'axe de diffusion des ions.

### ***B.1. Électrophysiologie : Le patch-clamp***

Puisque les ions sont des particules chargées, la diffusion des ions dans un canal se traduit par un courant électrique. Le courant qui résulte de la diffusion de  $10^7$  ions monovalents par seconde à travers un canal est de l'ordre de 1,6 pA. La technique du patch-clamp est la seule qui rend possible l'étude des caractéristiques des flux ioniques à travers un canal unique.

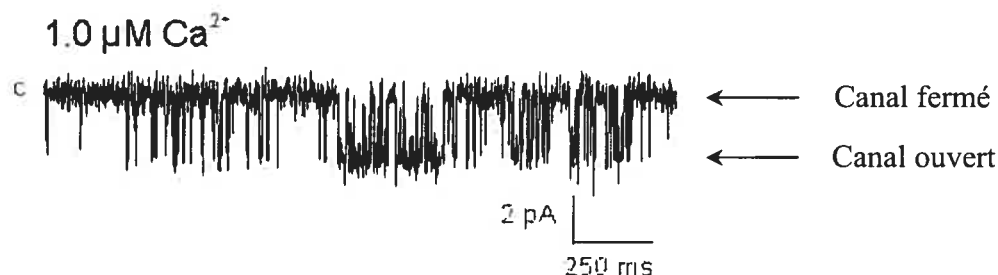
Cette technique fut introduite d'abord par Neher et Sackmann en 1976 (Neher, E. *et al.*, 1976; Hamill, OP *et al.*, 1981) et décrite dans sa forme améliorée en 1981 par Hamill (Hamill, OP *et al.*, 1981).



**Figure 17. Montage expérimental du patch-clamp pour le canal  $K_{Ca3.1}$**

**A.** Le patch-clamp est une technique permettant de mesurer le courant à travers les canaux ioniques. La microélectrode est posée sur la membrane d'une cellule qui exprime des canaux ioniques à sa surface. Un ion qui entre dans la cellule est considéré comme un courant négatif, un courant sortant est un courant positif. **B.** La configuration de patch-clamp excisé (*outside-out* ou *inside-out*) permet d'étudier un seul canal tout en pouvant contrôler la concentration d'un côté de la membrane ainsi que le potentiel membranaire.

Cette méthode permet d'isoler électriquement une infime partie de la membrane cellulaire en pressant sur la surface externe d'une cellule une pipette de verre dont la pointe, de l'ordre de  $1\mu\text{m}$  a été préalablement polie par chauffage. On obtient ainsi des résistances de contact entre le verre et la membrane de l'ordre du  $10^9$  Ohms ce qui permet un rapport signal/bruit suffisant pour détecter l'ouverture et la fermeture des canaux unitaires. Il faut que le courant électrique qui traverse les zones de contact entre la pipette et la membrane sont inférieur au picoampère et rend alors possible la mesure des fluctuations de courant inférieur à  $0,2\text{ pA}$  à une fréquence de  $1\text{ kHz}$  ou plus. Un montage électrique extérieur permet d'imposer une différence de potentiel membranaire de valeur définie ( $V_m$ ), et de mesurer le courant  $I$  entre les électrodes dans le bain et la pipette. La configuration excisée (ou appelé *inside-out* en anglais) est obtenue en arrachant la microélectrode de la surface de la cellule. Lorsque la microélectrode est soulevée, elle emporte un morceau de membrane qui reste attaché à la microélectrode. Cette configuration permet de plonger la partie intracellulaire de la membrane dans une solution dont nous pouvons contrôler la composition (Figure 17.B).



### Figure 18. Exemple d'un enregistrement en canal unitaire

Sur cet enregistrement on observe l'ouverture et la fermeture d'un seul canal potassique  $K_{Ca3.1}$ . La probabilité d'ouverture du canal dépend de la concentration de calcium intracellulaire (ici la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  est de  $1,0 \mu\text{M}$ ) avec une différence de potentiel imposé de  $-60 \text{ mV}$ . La figure est tirée de la première publication de cette thèse.

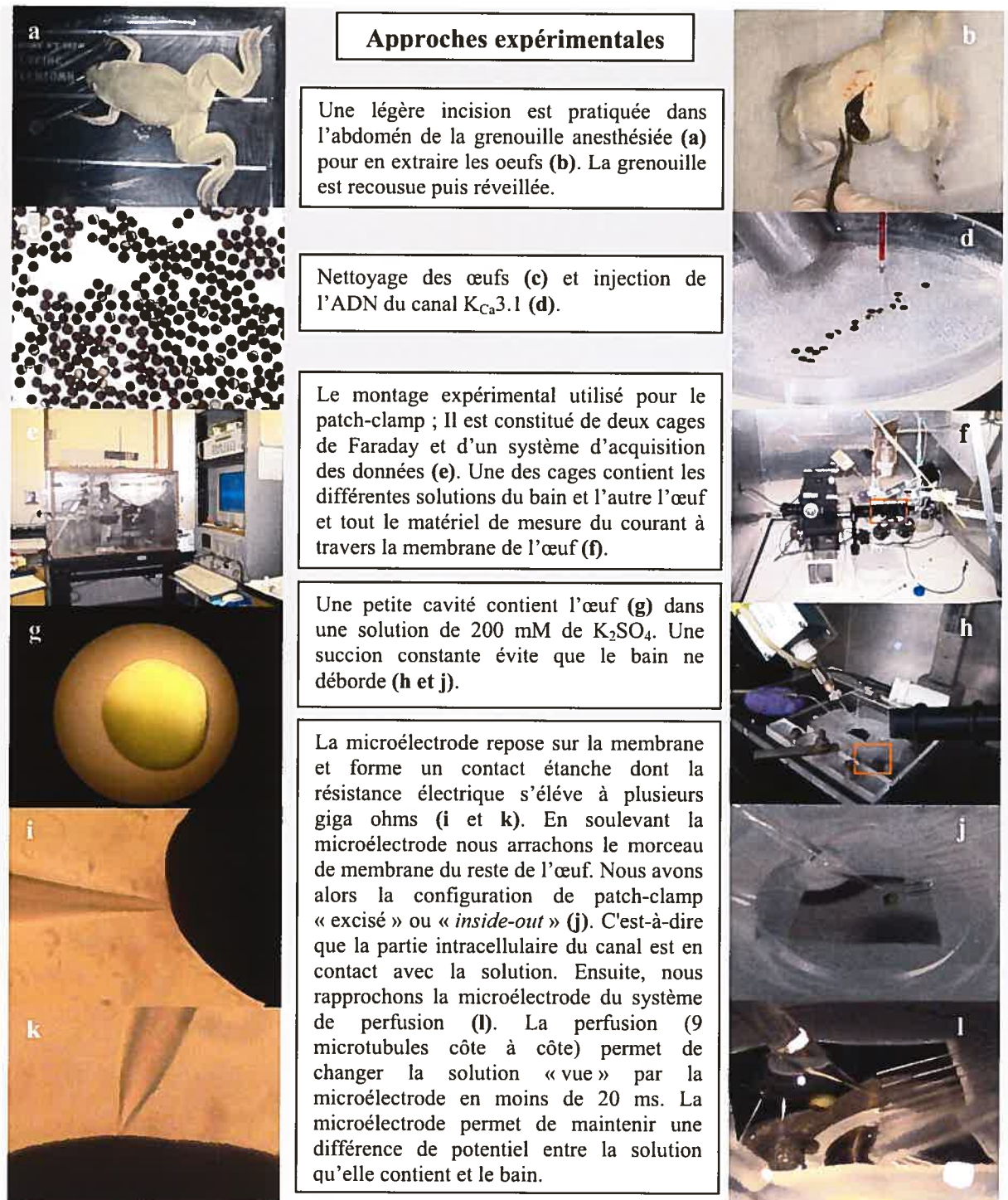
L'activité des courants ioniques peut dépendre du potentiel membranaire de même que de la présence d'agonistes dans le milieu intracellulaire. Il est possible grâce à la méthode du patch-clamp en configuration patch excisé de contrôler ces deux paramètres expérimentalement (Figure 16). Les caractéristiques électrophysiologiques (courbe courant-voltage, conductance unitaire, sensibilité au calcium) du canal  $K_{Ca3.1}$  sont présentées dans la première publication de cette thèse.

### B.2. Le protocole expérimental

Les œufs d'une grenouille *Xenopus leavis* sont obtenus suite à une incision abdominale comme le montre la photo a) de la Figure 18. La grenouille a été préalablement anesthésiée dans un bain de tricaine. Les œufs sont extraits et débarrassés de leur membrane folliculaire qui avait pour fonction de les irriguer en sang (c). L'ADN du canal  $K_{Ca3.1}$  est co-injecté avec un plasmide codant pour protéine fluorescente verte (GFP), dans le noyau des œufs (d). Les œufs sont alors conservés de 4 à 5 jours dans un incubateur à une température constante de  $18^\circ\text{C}$  pour leur donner le temps d'exprimer l'ADN injecté. Seuls les œufs ayant une fluorescence verte sont gardés pour les expériences. Si la protéine donnant une fluorescence verte aux œufs a été exprimée, il y a alors de grandes chances qu'il en soit de même avec la partie de l'ADN codant pour le

canal. Inversement si la protéine de fluorescente n'a pas été exprimée il y a peu de chance pour que le canal le soit. Cette procédure est utilisée pour éviter d'étudier des œufs n'ayant pas exprimé le canal  $K_{Ca3.1}$ . Avant d'utiliser l'œuf, nous enlevons sa membrane vitelline qui a comme fonction de lui donner une résistance physique. Cette opération nécessite de plonger l'œuf dans un bain hyperosmotique (un bain de mannitol) qui en compressant la membrane plasmique de l'œuf sur lui-même rend plus visible et accessible la membrane vitelline. La membrane s'enlève alors à l'aide de micropinces sous microscope optique. Une fois l'œuf installé sur le montage de patch-clamp dans un bain d'une solution de  $K_2SO_4$ , une microélectrode est posée sur la membrane de l'œuf (j). La microélectrode est une micropipette qui contient une électrode en argent baignant dans une solution ayant la même composition que celle du bain. Une fois la configuration excisée obtenue, on déplace la microélectrode devant un système de perfusion. Sur la Figure 19 (i) et (j) le système de perfusion est représenté par une série de tuyaux de verre contenant chacun une solution différente. Ils peuvent par exemple contenir des agents comme les méthaneethiosulfonate (MTS). Des solutions contenant des concentrations différentes de calcium libre permettront de vérifier si l'activité du canal est dépendante de la concentration de calcium. Cela permet à la fois de vérifier que l'on a « le bon canal » et de vérifier s'il est bien présent dans la membrane. D'autres solutions contiennent les agents MTS qui ont été utilisés pour la présente thèse.





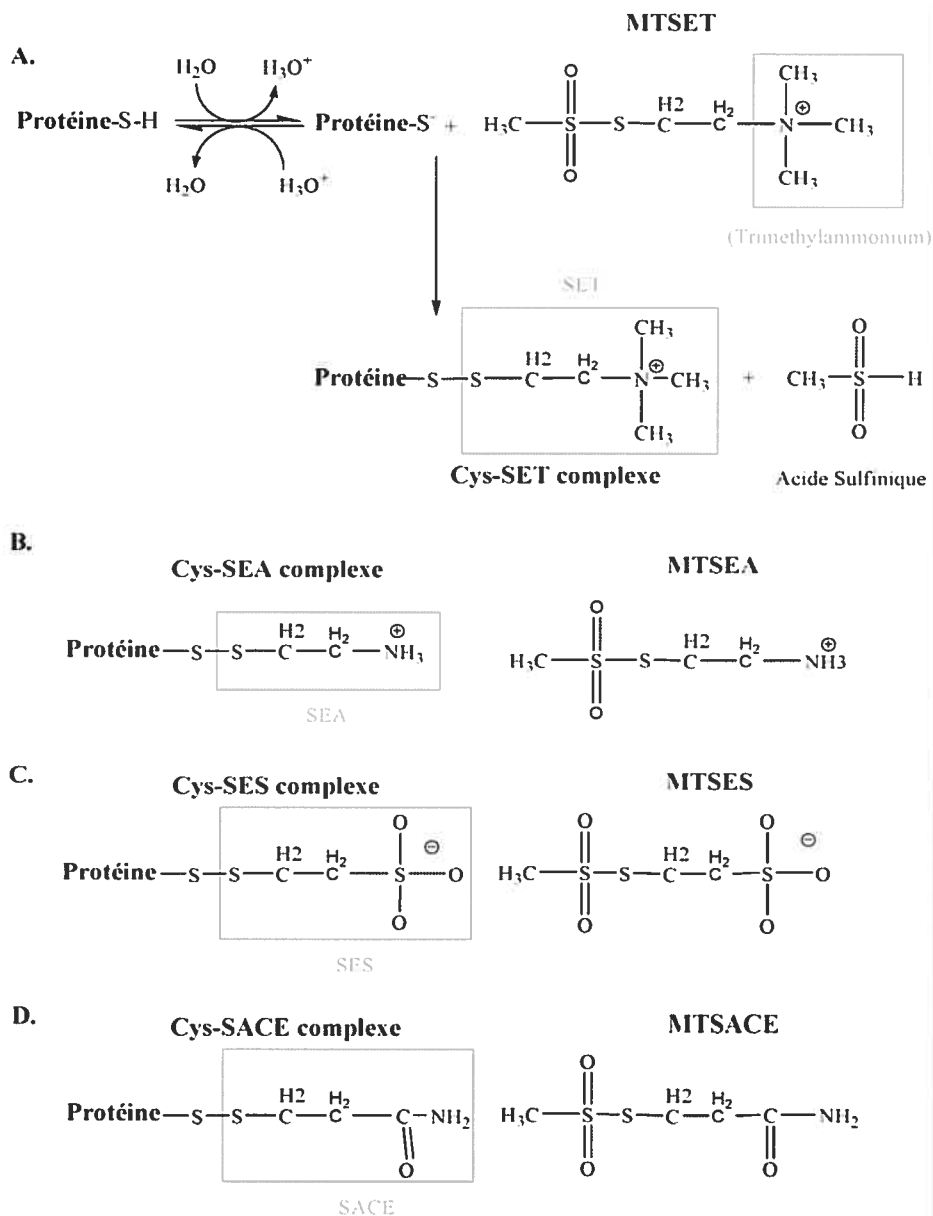
**Figure 19. Description rapide du protocole expérimental utilisé pour mesurer l'activité du canal  $K_{Ca3.1}$ .**



### ***B.3. Le SCAM ou « Substituted-Cysteine Accessibility Method »***

Le SCAM est une méthode puissante pour étudier la structure des canaux ioniques. Elle combine la mutagenèse dirigée et une modification chimique du canal. La mutagenèse dirigée est utilisée pour muter en cystéine, le résidu cible. La modification chimique est due à l'introduction d'un agent thiolate MTS. L'agent thiolate réagit spécifiquement, en présence d'une molécule d'eau, avec l'atome de soufre du résidu cystéine et s'y lie de manière covalente (Figure 20 A.). La présence de l'agent thiolate lié à la cystéine est susceptible, si la cystéine est proche de l'axe de conduction des ions, de perturber la diffusion des ions à travers le canal. La mesure de cette perturbation est faite par des expériences de patch-clamp en configuration *inside-out*. L'agent MTS joue le rôle d'une sonde. Une sonde chargée positivement est perfusée dans le bain, et ne peut entrer dans le canal qu'en passant par son entrée intracellulaire. Dans le canal potassique, le pore est tapissé par les résidus du segment S6, mais la grande taille de la sonde ne lui permet pas de passer à travers le filtre de sélectivité.

Au long de cette thèse nous avons utilisé quatre agents MTS différents ; le MTSET, le MTSEA, MTSES et le MTSACE. Le MTSET et le MTEA sont chargés positivement, le MTSES est chargé négativement et le MTSACE est neutre mais polaire (leur formule chimique est donnée dans la Figure 20 et leur structure tridimensionnelle ainsi que leur distribution sont visibles à la Figure 27). La charge positive du MTSET, en fait une très bonne sonde pour suivre le même parcours que l'ion  $K^+$  même si la section efficace du MTSET est légèrement supérieure à celle du rayon de van der Waals du  $K^+$ . Le MTSEA est également un agent oxydant chargé positivement (+1) grandement utilisé mais sa plus grande perméabilité dans les lipides que le MTSET peut l'amener à suivre un autre chemin que de celui de l'ion  $K^+$  (Holmgren, M. *et al.*, 1996), nous lui avons préféré le MTSET lorsque cela était possible.



**Figure 20. Réactions et formules chimiques du MTSET, MTEA, MTSES et du MTSACE**

**A.** Réaction chimique du MTSET avec une cystéine et la formule chimique du fragment SET. **B.** Formule chimique du MTSEA et du fragment SEA une fois que le MTSEA a réagi avec le résidu cystéine. **C.** Pour information nous avons également représenté la formulation chimique du MTSES et du fragment SES une fois que le MTSES a réagi avec le résidu cystéine. **D.** Formulation chimique du MTSACE et du fragment SACE une fois que le MTSACE a réagi avec le résidu cystéine.

L'analyse des courants mesurés en patch-clamp pour différentes cystéines mutées sur le canal nous permet de comparer les effets de chacune de ces perturbations en fonction de la position du résidu muté. La technique du SCAM permet donc d'évaluer l'accessibilité relative des résidus sur le segment S6.

À partir d'un modèle atomique tridimensionnel de la position des résidus du segment S6 par rapport à l'axe de diffusion, nous pouvons prédire la zone de mutation qui fait face à l'axe de diffusion des ions. Après les expériences de patch-clamp nous comparerons les résultats expérimentaux à notre modèle 3D du canal K<sub>Ca</sub>3.1. Nous essayerons de comprendre si les résultats sont compatibles avec notre modèle.

### **III. RESULTATS I : PREMIERE PUBLICATION (SCAM)**

## **CYSTEINE MUTAGENESIS AND COMPUTER MODELIZATION OF THE S6 REGION OF AN INTERMEDIATE CONDUCTANCE IKCa CHANNEL**

Manuel Simoes, Line Garneau, Hélène Klein, Umberto Banderali, Fadi Hobeila,  
Benoit Roux<sup>&</sup>, Lucie Parent and Rémy Sauvé\*

Reproduced from

*The Journal of General Physiology* (2002) **120** pp. 99-116

By copyright permission of The Rockefeller University Press

**Département de physiologie,  
Groupe de recherche en transport membranaire  
Faculté de médecine, Université de Montréal  
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7  
& Weill Medical College of Cornell University**

---

---

\* Corresponding author: Dr. Rémy Sauvé  
Département de physiologie  
Université de Montréal  
C.P. 6128, Succursale Centre-ville  
Montréal, Qc.  
Canada H3C 3J7  
[REDACTED]  
Phone: (514) 343-5813  
Fax: (514) 343-7146

## A. Abstract

Cysteine scanning mutagenesis (SCAM) and computer based modeling were used to investigate key structural features of the S6 transmembrane segment of the calcium activated  $K^+$  channel of intermediate conductance IKCa. Our SCAM results show that the interaction of MTSET with cysteines engineered at positions 275, 278 and 282 leads to current inhibition. This effect was state dependent as MTSET appeared less effective at inhibiting IKCa in the closed (zero  $Ca^{2+}$  conditions) than open state configuration. Our results also indicate that the last four residues in S6, from A283 to A286, are entirely exposed to water in open IKCa channels whereas MTSET can still reach 283C and 286C with IKCa maintained in a closed state configuration. Notably, the internal application of MTSET or MTSES caused a strong  $Ca^{2+}$  dependent stimulation of the A283C, V285C and A286C currents. However, in contrast to the wild type IKCa, the MTSET-stimulated A283C and A286C currents appeared to be TEA insensitive, indicating that the MTSET binding at positions 283 and 286 impaired the access of TEA to the channel pore. 3-D structural data were next generated through homology modeling using the KcsA structure as template. In accordance with the SCAM results, the 3-D models predict that the V275, T278 and V282 residues should be lining the channel pore. However, the pore dimensions derived for the A283-A286 region can not account for the MTSET effect on the closed A283C and A286 mutants. Our results suggest that the S6 domain extending from V275 to V282 possesses features corresponding to the inner cavity region of KcsA, and that the C-terminus end of S6, from A283 to A286, is more flexible than predicted on the basis of the closed KcsA crystallized structure alone. According to this model, closure by the gate should occur at a point located between the T278 and V282 residues.

**Key Words:** cysteine, calcium activated potassium channel, channel pore, HeLa cells.

**Abbreviations:** EDHF: Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor, EGTA: ethylene glycol bis ( $\beta$ -amino-ethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, HEPES: N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[ethanesulfonicacid, MTS: methanethiosulfonate, MTSEA: 2-Aminoethyl methanethiosulfonate hydrobromide, MTSES: Sodium (2-sulfonatoethyl) methanethiosulfonate, MTSET: [2-(Trimethylammonium)ethyl] methanethiosulfonate bromide, TEA: tetraethylammonium]

## B. Introduction

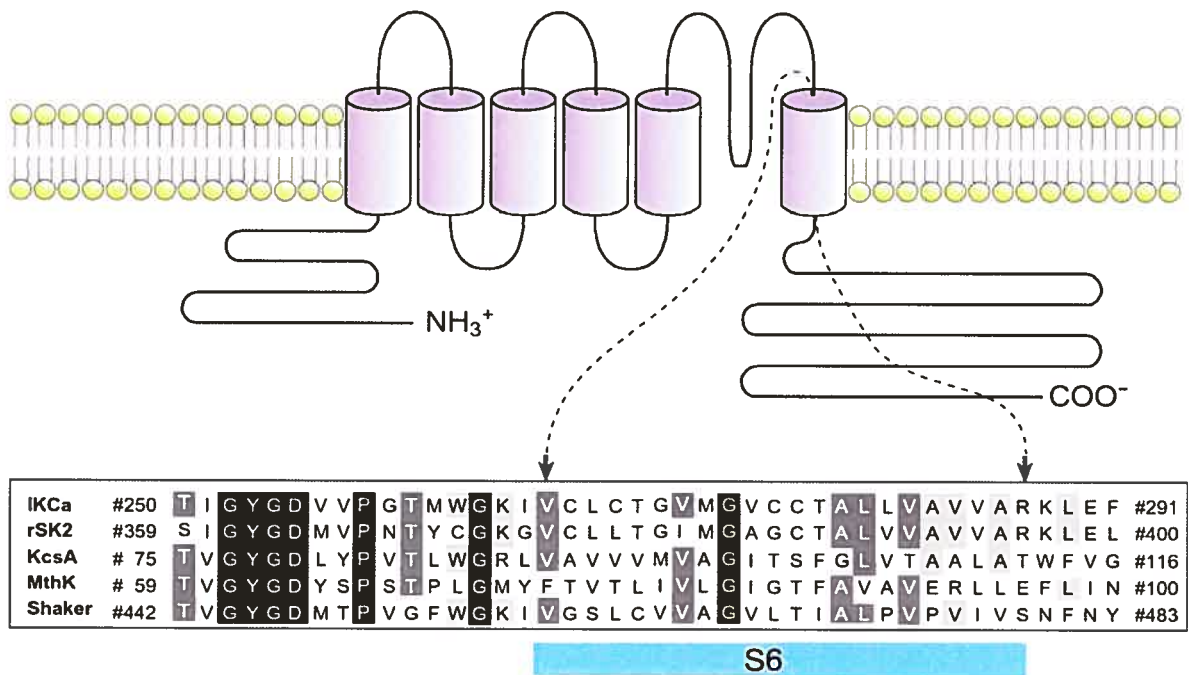
Calcium activated potassium channels of intermediate conductance (IKCa) play a prominent role in a large variety of cellular events such as the EDHF-based regulation of vascular tone *v*, the sustained efflux of Cl<sup>-</sup> ions in secretory epithelia (Singh *et al.*, 2001; Devor *et al.*, 1996) and the proliferation of T-lymphocytes (Logsdon *et al.*, 1997; Grissmer *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1999; Ghanshani *et al.*, 2000) and other cell types (Rane, 2000; Langille *et al.*, 1986). IKCa channels belong to one of the three main classes of calcium activated potassium channels (K(Ca<sup>2+</sup>)) identified to date on the basis of their permeation properties and pharmacology (Vergara *et al.*, 1998). These include the charybdotoxin (ChTX) and iberiotoxin sensitive MaxiK channels of large conductance (150-220 pS); the 20-50 pS IKCa channels inhibited by ChTX (Amara and Sonders, 1998) and clotrimazole (Rittenhouse *et al.*, 1997) and the apamine-sensitive and -insensitive SK channels of small conductance (< 10 pS) (Kohler *et al.*, 1996). MaxiK, SK and IKCa channels differ also in terms of their permeation and gating properties. For instance, in contrast to the MaxiK, both SK and IKCa channels are voltage insensitive and demonstrate a non-ohmic current/voltage relationship with a conductance two to three times higher for inward than outward currents. Furthermore, the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the SK and IKCa arises from the Ca<sup>2+</sup>-binding protein, calmodulin, constitutively bound to the channels (Xia *et al.*, 1998; Khanna *et al.*, 1999), and not as documented for the MaxiK channel from the direct binding of Ca<sup>2+</sup> to an integral part of the channel structure (Schreiber and Salkoff, 1997).

IKCa channels are mostly expressed in non-excitabile cells (Rittenhouse *et al.*, 1997; Jager H. and Grissmer S., 2004; Gutman *et al.*, 2003; Parent *et al.*, 2002) although reports have documented the presence of IKCa in vascular smooth muscles where they may contribute to muscle plasticity (Neylon *et al.*, 1999). These channels have been recently cloned from different tissue preparations (Logsdon *et al.*, 1997; Ishii *et al.*, 1997; Joiner *et al.*, 1997; Vandorpe *et al.*, 1998; Warth *et al.*, 1999) leading to a gene product comprising 425 to 427 amino acids with a predicted topology of six transmembrane segments S1-S6, and a pore motif between S5 and S6. Amino acid sequence alignments have revealed furthermore that the human IKCa channels identified so far are 42-45% identical and 50-55% conserved as compared with SK channels, indicating that IKCa are more closely related to SK than MaxiK. Little is known however on the 3D-structural organization of IKCa. Homology modeling and toxin binding studies have already provided evidence for topological similarities between the external vestibule region of IKCa and other K<sup>+</sup> channels (Rauer *et al.*, 2000). In addition, the crystal structure of the rat SK2 calmodulin-binding domain (residues 395-430) has recently been reported, enabling for the first time molecular modeling of the IKCa-calmodulin complex which underlies channel gating (Vergara *et al.*, 1998). However, despite the importance of these results, structural data concerning the IKCa channel pore and gating regions are still lacking.

The first direct structural data for pore formation in K<sup>+</sup> channels came with the solved structure of the KcsA channel, a bacterial potassium channel with two transmembrane domains (Vergara *et al.*, 1998). In the crystal structure of the pore region, the P loop of KcsA forms the ion selectivity filter and the  $\alpha$ -helical M2 lines the long inner vestibule between the selectivity filter and the cytoplasm. Of equal interest is the observation that on the intracellular side, the M2 helices are joined together by the residues T107 and A111 to form a pore with a diameter smaller than 4.5 Å (Doyle *et al.*, 1998; Berneche and Roux, 2000). By analogy, these results suggest a key role of the S6

segments to the pore formation in IKCa and a contribution of the residues in the C-terminal segment of S6 to the channel gate.

The present study aims to investigate the structural features of the S6 segment from an IKCa channel cloned from HeLa cells. Figure R1.1 shows an alignment of the 42 amino acids spanning the S6 segment in IKCa, rSK2, KcsA and voltage-gated Shaker channels. Although there is little amino acid identity between IKCa, Shaker and KcsA in the S6 C-terminal region, it is possible to align the upper part by using the conserved GYGD motif to constrain the entire alignment. This analysis indicates that there is a correspondence between the valine and threonine at positions 275 and 278 in IKCa and the cavity-lining residues I100 and F103 in KcsA. A similar equivalence also prevails between the T278 and V282 residues in IKCa and the I470 and V474 in Shaker, two amino acids reported to contribute to pore lining (Holmgren *et al.*, 1996b).



**Figure R1.1 Amino acid sequence alignment of IKCa membrane segment.**

The sequence alignment of the Pore + S6 region of IKCa, rSK2, KcsA and Shaker was based on the conserved GYGD pore motif. Sequence similarities of 100 % and 75% are shaded in black and gray respectively. The S6 segment in IKCa is presented as extending from V266 to the A286.



These observations strongly suggest that the region spanning from V275 to A286 in IKCa is most likely to play a crucial role in the IKCa channel pore formation and gating mechanism. The binding of one calmodulin molecule to two adjacent monomers as described by Schumacher *et al.*, (2001) (Schumacher *et al.*, 2001) in their work on the closely related rSK2 channel, argues however for structural changes in the IKCa S6 segment different from those prevailing during channel opening for voltage dependent channels. A study was thus undertaken in which we examined the effects of the water soluble MTS derivatives MTSES and MTSET on the single channel conductance and gating properties of cysteine IKCa mutants for the region comprised between V275 and A286. These results and the structural 3-D data generated by homology modeling using as templates structures for the closed and open KcsA channel point toward distinct domains for the S6 segment; a first region extending from V275 to V282 with features corresponding to the inner cavity region of KcsA, and a second region in the C-terminus end of S6, from A283 to A286 that would be more flexible than predicted on the basis of the closed KcsA crystallized structure alone.

## C. Materials and methods

### *C.1. Cloning, sequencing and site directed mutagenesis of the IKCa channel*

IKCa channel cDNAs were obtained from HeLa cells by PCR using two oligonucleotides designed from the reported hKCa4 sequence (GenBank AF022150). These two oligonucleotides (from 1-23 and 1270 to 1284) were chosen to yield a 1281 bp fragment containing the entire coding sequence of the human IKCa channel. The PCR fragments were cloned into the pMT21 mammalian expression vector (Jorgensen *et al.*, 1983b) and sequenced by the dideoxynucleotide chain termination method using the T7 Sequenase kit (USB, Cleveland, OH) with synthetic oligonucleotides as primers. Sequencing the PCR product obtained from HeLa cells revealed a 100% identity with the

sequences reported for the hKCa4, hIK1 (GenBank AF022150) and hSK4 (GenBank AF000972) channels. Site-directed mutagenesis of IKCa channels were carried out using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). To obtain the 10 X/C consecutive point mutations, amino acid changes were introduced by using 25 mer mutated oligonucleotides (V275/C, T278/C, A279/C, L280/C, L281/C, V282/C, A283/C, V284/C, V285/C, A286/C) and wild-type IKCa as template. All mutations were confirmed by sequencing the entire codon region in both directions on both strands.

### ***C.2. Oocytes***

Mature oocytes (stage V or VI) were obtained from *Xenopus laevis* frogs anesthetized with 3-aminobenzoic acid ethyl ester. The follicular layer was removed by incubating the oocytes in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free Barth's solution containing collagenase (1.6 mg/ml, Sigma) for 45 minutes. The composition of the Barth's solution was (in mM): 88 NaCl, 3 KCl, 0.82  $\text{MgSO}_4$ , 0.41  $\text{CaCl}_2$ , 0.33  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  and 5 HEPES (pH 7.6). Defolliculated oocytes were stored at 18 °C in Barth's solution supplemented with 5% horse serum, 2.5 mM Na pyruvate, 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin. Oocytes were studied 3-5 days after co-injection of 0.92ng to 9.2ng of the cDNA coding for IKCa in pMT21 and 1.38 ng of cDNA coding for a green fluorescent protein that was used as a marker for nuclear injection (Jorgensen *et al.*, 1983a).

Prior to patch-clamping, defolliculated oocytes were kept in a hypertonic solution containing (in mM) 250 KCl, 1  $\text{MgSO}_4$ , 1 EGTA, 50 sucrose and 10 HEPES buffered at pH 7.4 with KOH. The vitelline membrane was then peeled off using forceps, and the oocyte was transferred to a superfusion chamber for patch-clamp measurements.

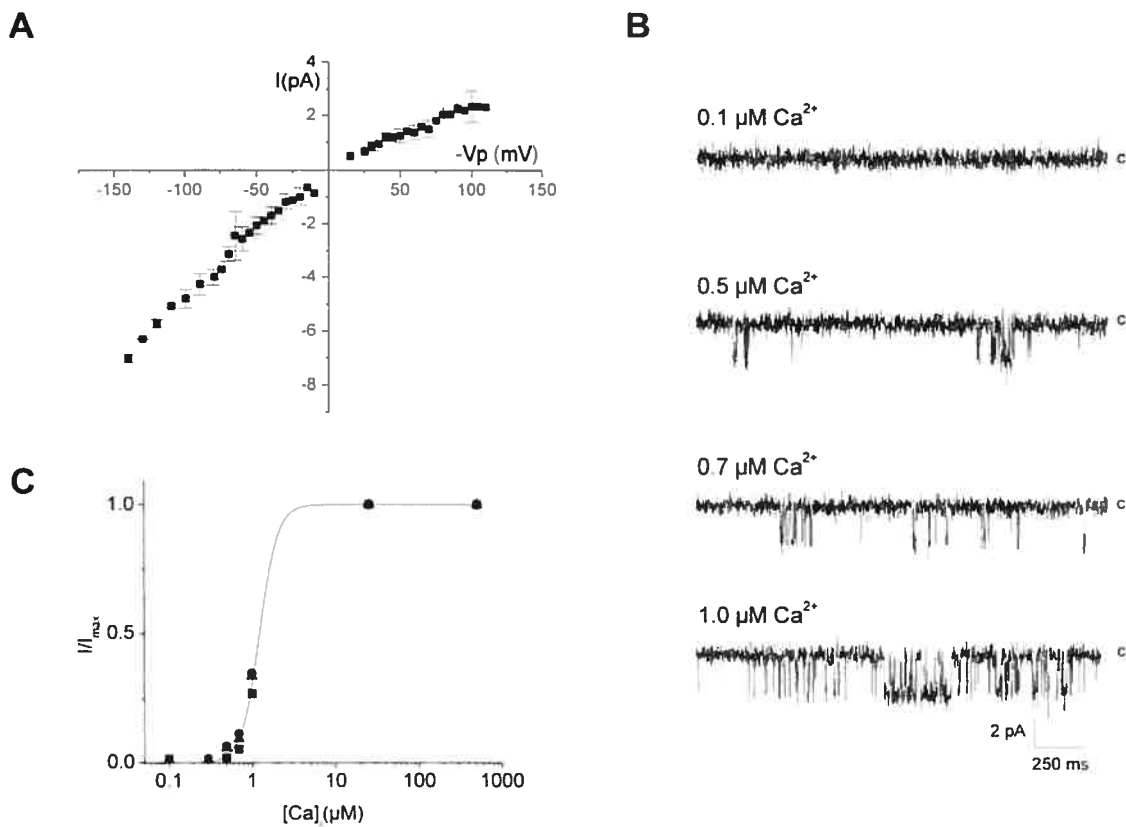
### ***C.3. Patch-Clamp recording***

Single channel recordings were carried out in the inside-out patch-clamp configuration using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instrument, Union City, CA). Patch pipettes were pulled from borosilicate capillaries using a Narishige pipette puller

(Model PP-83) and used uncoated. The resistance of the patch electrodes ranged from 4 to 10 M $\Omega$ . Unless specified otherwise, the membrane potential is expressed as  $-V_p$ , where  $V_p$  is the pipette applied potential. Data acquisition was performed using a Digidata 1320A acquisition system (Axon Instrument, Union City, CA) at a sampling rate of 2.0 kHz with filtering at 500 Hz. When required, the open channel probability,  $P_o$ , was estimated from current amplitude histograms on the basis of a binomial distribution as described elsewhere (Morier and Sauvé, 1994). The stationarity of the control recordings was tested according to the criteria defined in a previous work (Denicourt *et al.*, 1996). Experiments were performed at room temperature (24 °C).

#### ***C.4. Data analysis***

The water accessibility of the targeted cysteine residues was estimated from the time constant of the MTS-dependent inhibition ( $\tau_i$ ) or activation ( $\tau_a$ ) of the IKCa-induced  $K^+$  currents, while structural changes resulting from MTS binding to the protein were inferred from the change in current amplitude and open probability measured at the single channel level.



**Figure R1.2 Characterization of the IKCa channel cloned from HeLa cells.**

**A.** Current/voltage properties of the IKCa channel measured in symmetrical 200  $\text{K}_2\text{SO}_4$  conditions. The unitary conductance for inward and outward currents was estimated at 49 pS and 20 pS respectively. **B.** Inside-out single channel recordings of the wild type IKCa channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes for internal  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations ranging from 0.1  $\mu\text{M}$  to 1.0  $\mu\text{M}$ . Experiments carried out in symmetrical 200 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pH 7.4 conditions. The pipette potential was maintained at 60 mV throughout. Current traces were filtered at 500 Hz and the letter c refers to the zero current level. **C.** Normalized mean current at a constant  $V_p$  of 60 mV from four different experiments plotted as a function of the internal  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. The sigmoide curve was computed according to a Hill equation with  $[\text{Ca}]_{1/2} = 1.2 \pm 0.03$   $\mu\text{M}$  and Hill coefficient of  $4.3 \pm 0.4$  ( $n=4$ ).

The state dependency of the MTSET action was tested in site protection experiments in which the modulatory effect of MTSET on the open channel (3  $\mu\text{M}$  internal  $\text{Ca}^{2+}$ ) was measured after an initial MTSET application in nominally  $\text{Ca}^{2+}$  free conditions. Our approach consisted essentially in measuring the ratio  $\langle I \rangle(\text{test}) / \langle I \rangle(\text{ctr})$ , where  $\langle I \rangle(\text{ctr})$  and  $\langle I \rangle(\text{test})$  correspond respectively to the mean current values before and after MTSET application and washout in 3  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , with (Figure R1.9 A) or without

(Figure R1.3) a pre-application of MTSET in zero  $\text{Ca}^{2+}$  conditions. Experiments in which a MTSET pretreatment in  $\text{Ca}^{2+}$  free conditions failed to modify the  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  ratio as compared to control (no pretreatment) were interpreted as indicating a targeted cysteine less accessible to MTSET when channels are maintained in a closed state configuration. Mean current values were computed using the QuB single channel software (Qin *et al.*, 1996; Qin *et al.*, 1997) and the rates of modification induced by MTSET estimated from the time constants of inhibition ( $\tau_i$ ) or activation ( $\tau_a$ ) obtained by curve fitting to a single exponential the time integral of the unitary currents (Origin, Microcal Software Inc., Northampton, MA).

Non stationary noise analysis on current transients during MTSET application was performed by computing the current variance and mean value on successive short time segments of equal length,  $T_0$ . This procedure generated for each record an ensemble of  $N_p$  ordered pairs  $[(\sigma_1, \langle I \rangle_1), (\sigma_2, \langle I \rangle_2), (\sigma_3, \langle I \rangle_3), \dots, (\sigma_{N_p}, \langle I \rangle_{N_p})]$ , with  $T_0 N_p$  equals to the total length of the record. The ratios  $\sigma^2/\langle I \rangle$  and  $\sigma^2/\langle I \rangle^2$  were computed for each interval  $T_0$  and analyzed in terms of the model presented in Appendix 1.

### C.5. Solutions

The solution referred to as 200  $\text{K}_2\text{SO}_4$  had a composition as follow (in mM): 200  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1.8  $\text{MgCl}_2$ , 10 Hepes buffered with KOH at pH 7.4. Sulfate salts were used to avoid contributions coming from endogenous  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent chloride channels and to selectively chelate contaminant divalent cations such as  $\text{Ba}^{2+}$  (maximum 0.5nM in 200 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ). Solutions with submicromolar  $\text{Ca}^{2+}$  concentration were prepared from 200  $\text{K}_2\text{SO}_4$  solutions with 1 mM EGTA plus  $\text{CaCl}_2$ . Unless specified otherwise we used EGTA-free standard 200  $\text{K}_2\text{SO}_4$  solutions with a contaminant free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration estimated at 3  $\mu\text{M}$ . The final free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration for all solutions was confirmed by Fura 2 measurements as described elsewhere (simoneau *et al.*, 1996). Solutions with 30 mM TEA contained 1.0 mM  $\text{CaCl}_2$  plus 500  $\mu\text{M}$  EGTA as to minimize contaminations by divalent and trivalent cations due to use of TEA chloride at a high concentration. MTSES,

MTSET and MTSACE (Anatrace Inc., Maumee, OH, USA) were added directly into the recording saline a few minutes prior to use. Our study was limited to the MTSET, MTSES and MTSACE reagents as they were reported to be of comparable size and membrane impermeant (Holmgren *et al.*, 1996b).

## ***C.6. Homology modeling***

### **C.6.i Open KcsA structure :**

Coordinates of the open KcsA structure were computed according to the procedure described elsewhere (Roux *et al.*, 2000). Briefly, a crude model was constructed in agreement with the current data derived from electron paramagnetic spectroscopy (EPR) implicating that the opening and closing of the channel involve movements of the inner helices which presumably result in a change in the diameter of the narrow pore lined by hydrophobic residues (Perozo *et al.*, 1999). The model was refined using molecular dynamics and energy minimization in the presence of artificial harmonic energy restraints designed to increase the diameter of the pore on the inner side by 3 Å relative to the closed channel X-ray structure; an additional restraint maintained the symmetry of the tetramer (Roux *et al.*, 2000). Structural data for the closed KcsA channel were obtained from the protein data bank 1BL8 file.

### **C.6.ii IKCa modeling :**

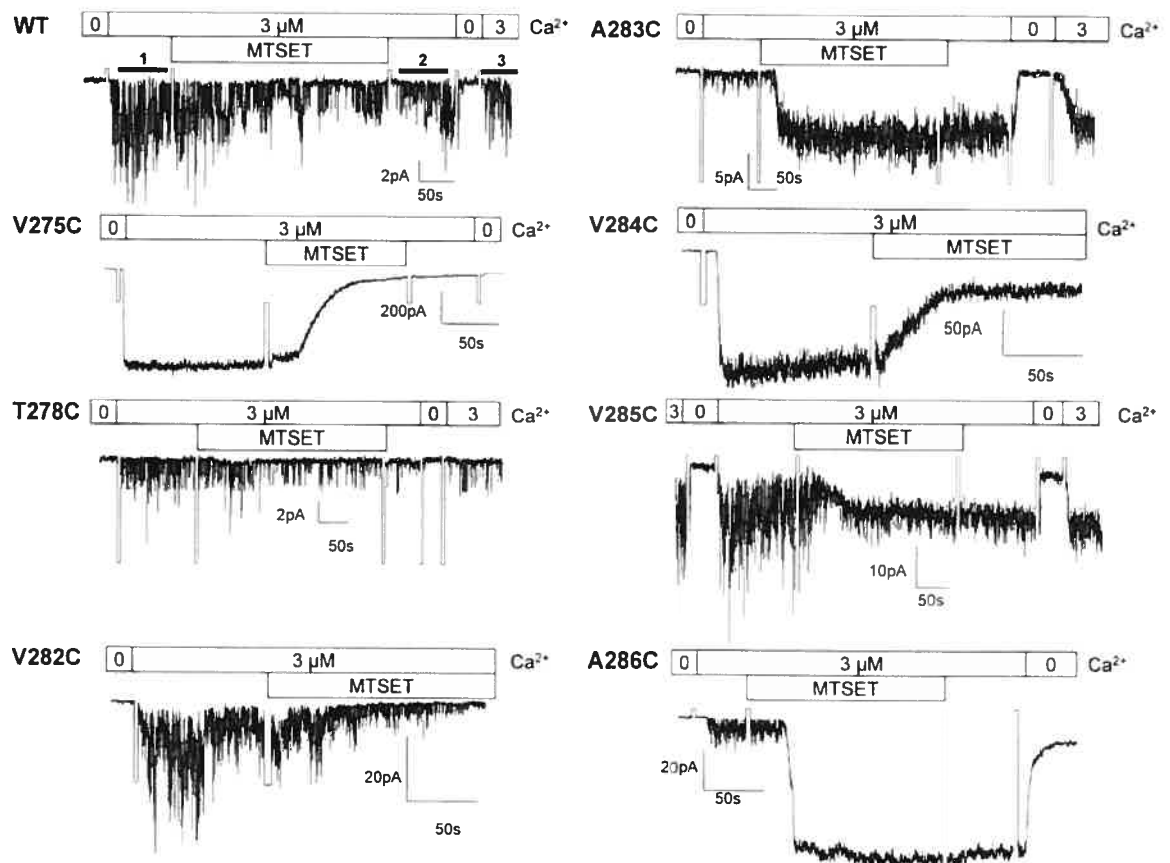
Automated homology modeling was performed with Modeller V4 (Sali and Blundell, 1993) and involved the generation of 50 models of the IKCa channel pore using either the open or closed KcsA channel structure as templates. Energy minimization was carried on the model with the lowest objective function (roughly related to the energy of the model) using Charmm (Brooks *et al.*, 1983).

**Statistics :** Results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance between two independent populations was inferred from Students's t statistics and set at  $p < 0.05$ .

## D. Results

### *D.1. Characterization of the recombinant IKCa channel cloned from HeLa cells*

The IKCa channel cloned from HeLa cells was first characterized in a series of inside-out patch-clamp experiments carried out on *Xenopus laevis* oocytes injected with wild type IKCa cDNA. The single channel current voltage relationship measured in symmetrical 200 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> is presented in Figure R1.2A. The channel showed a clear inwardly rectifying behavior with a unitary conductance for inward and outward currents of  $49 \pm 1$  pS (n=3) and  $20 \pm 3$  pS (n=6) respectively. These values confirm that the basic permeation properties of the recombinant IKCa are identical to the native IKCa channel in HeLa cells (Parent *et al.*, 2002). Inside-out single channel recordings measured in symmetrical 200 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conditions for internal Ca<sup>2+</sup> concentrations ranging from 0.1  $\mu$ M to 1  $\mu$ M are presented in Figure R1.2B. In these experiments the voltage was maintained at  $-V_p = -60$  mV throughout. Raising the internal Ca<sup>2+</sup> concentration from 0.1  $\mu$ M to 1  $\mu$ M significantly increased the single channel activity as seen by the greater number of channel openings per s. The resulting dose-response curve is illustrated in Figure R1.2C. The sigmoidal curve was computed according to a Hill equation with  $[Ca]_{1/2} = 1.2 \pm 0.1$   $\mu$ M and a Hill coefficient of  $4.3 \pm 0.4$  (n=4). Channel activity appeared voltage insensitive as no significant changes in the channel open probability were detected for voltages ranging from -150 mV to 150 mV (data not shown).



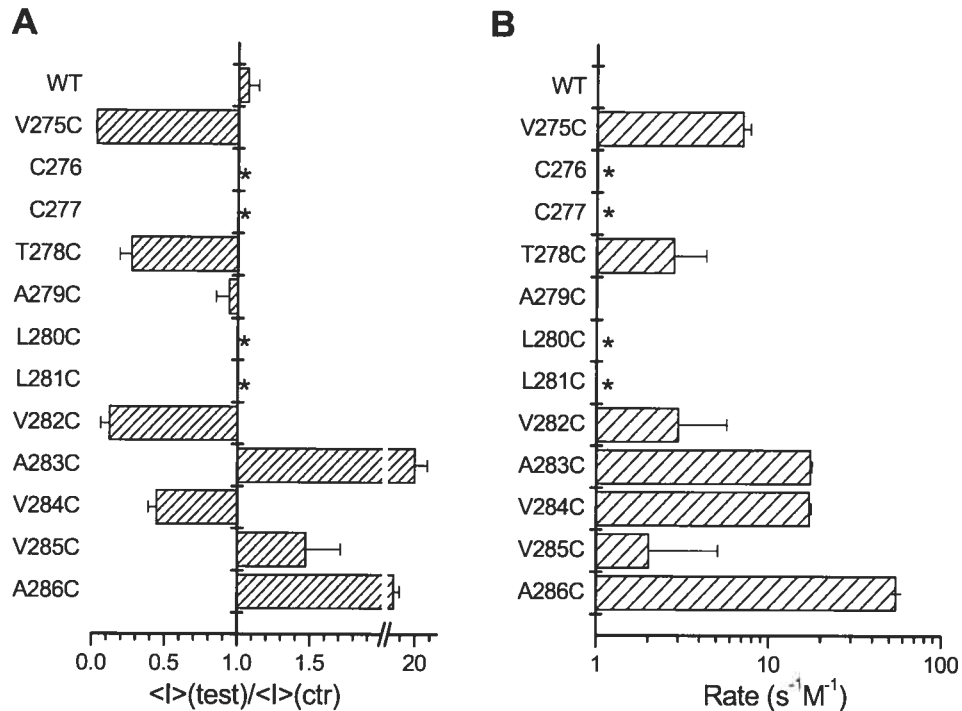
**Figure R1.3** Inside-out recordings illustrating the action of MTSET on IKCa mutants.

Inside-out current records measured in symmetrical 200 mM  $K_2SO_4$  + 3  $\mu M$  internal  $Ca^{2+}$  conditions. The pipette potential was 60 mV throughout. The effect of the MTSET reagent on channel activity was estimated from the ratio  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  where  $\langle I \rangle(\text{ctr})$  is the mean current measured in 3  $\mu M$   $Ca^{2+}$  before drug application (labeled line 1 in WT) and  $\langle I \rangle(\text{test})$ , the mean current obtained at the same  $Ca^{2+}$  concentration (labeled line 3 in WT) following the sequential washout of the drug with a  $Ca^{2+}$  containing (3  $\mu M$ ) (labeled line 2 in WT) and a  $Ca^{2+}$  free 200 mM  $K_2SO_4$  solution. The drug was systematically applied for five minutes with a total washout period of 2 minutes. This procedure insures that the observed effects of the MTS reagents are resulting from a covalent binding of the drug to the targeted cysteine, and not from non-specific channel interactions with the open or closed channel. Strong inhibition (> 75%) of channel activity was observed with V275C, T278C and V282C following exposure to MTSET (5 mM) for 5 min, with a complete inhibition recorded with the V275C and V282C mutants. The V284C channel showed a maximal inhibition of 50% despite a steady state current value reached after 45 s. Notably, MTSET caused an increase in inward currents when applied on the A283C, A286C and to a lesser extent V285C mutants. The current increase remained  $Ca^{2+}$  and clotrimazole sensitive, ruling out nonspecific effects of MTSET. There were no significant variations in mean currents with A279C suggesting that this residue may not MTSET accessible.



### ***D.2. Effects of MTSET on S6 segment residues***

Inside-out recordings were first undertaken to determine which residues within the V275 to A286 S6 segment are accessible to MTSET (10 Å X 5.8 Å) (Kuner *et al.*, 1996) applied internally. As seen in Figure R1.3, control experiments performed with wild type IKCa recombinant channels showed only a transient inhibition of channel activity that could be recovered after washout of the drug. With the exception of L280C and L281C which failed to yield detectable single channel events all the IKCa mutants tested appeared functional and displayed an inward rectifying behavior. Figure R1.3 provides direct evidence that the interaction of MTSET with V275C, T278C, V282C and V284C leads to a significant inhibition of channel activity when the channel is maintained in the open state. In contrast, the covalent binding of MTSET to A283C, V285C and A286C caused an increase of the IKCa currents. There was no significant effect of MTSET on the A279C mutant, suggesting either that the 279C residue was not accessible to MTSET or that the MTSET-279C interaction was silent. Globally, the recordings presented in Figure R1.3 support a structural model where all the residues of the S6 segment from V282 to A286 are freely accessible to water from the cytoplasmic side of the membrane when the channel is in the open state.

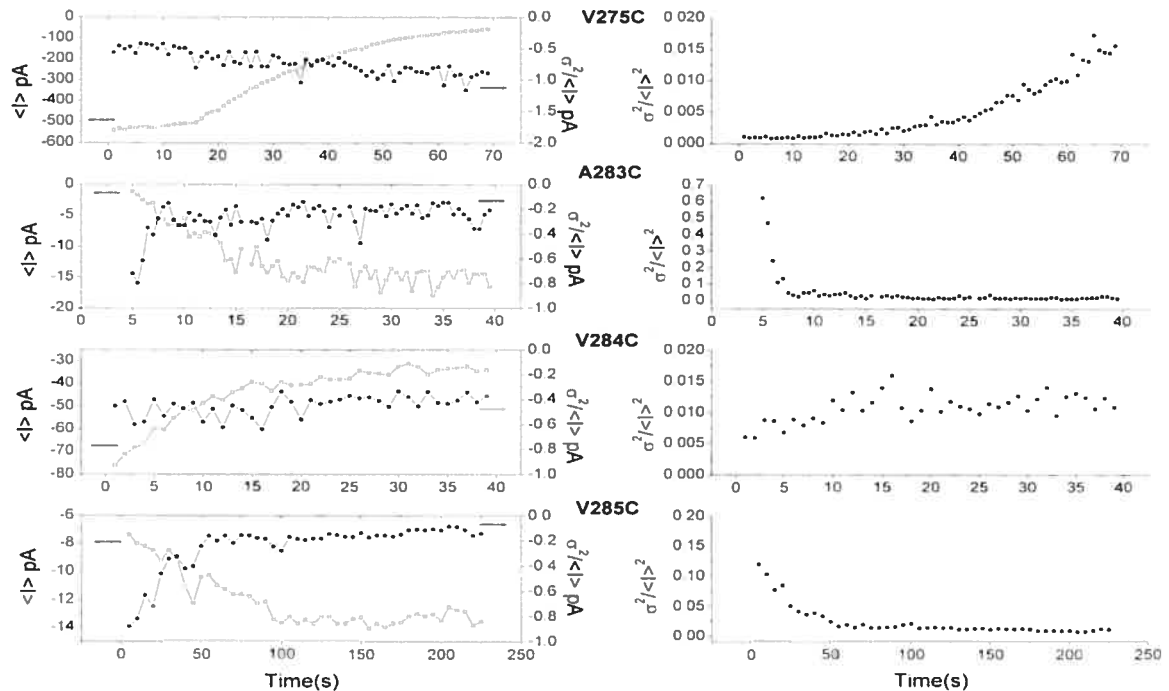


**Figure R1.4 Effects of MTSET on IKCa channel mutants.**

**A.** Histogram representation of the mean current ratio  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  obtained with MTSET for the amino acids spanning the V275-A286 domain. WT refers to the wild type form of IKCa. Experiments performed in  $3 \mu\text{M}$  internal  $\text{Ca}^{2+}$  (open channel). A ratio of 1 indicates a total absence of MTS-dependent effects on channel activity. C276 and C277 refer to endogenous cysteine and are labeled as \*. Similarly, experiments could not be performed on the L280C and L281C mutants due to the absence of detectable single channel events in these cases. **B.** Column representation of the modification rate for the MTSET-dependent channel inhibition and/or activation expressed in  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . With the exception of V285C ( $2.0 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  ( $n=5$ )), modification rates for MTSET interactions were higher for the residues within the A283-A286 S6 region with values of  $17 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  ( $n=2$ ),  $17 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  ( $n=5$ ) and  $54 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  ( $n=2$ ) for A283C, V284C and A286C respectively as compared with  $7 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  ( $n=4$ ) for 275C,  $2.5 \pm 1.5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  ( $n=6$ ) for T278C and  $2.9 \pm 2 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  ( $n=4$ ) for V282C. These results show that A286 is the residue most accessible to MTSET within the S6 segment extending from V275 to A286.

A characterization of interaction MTSET-IKCa mutants is presented in Figure R1.4. As seen, a near total inhibition of channel activity was recorded with the V275C and V282C mutants, with  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  ratios of  $0.05 \pm 0.01$  ( $n=5$ ) and  $0.12 \pm 0.06$  ( $n=4$ ) respectively. MTSET appeared however less potent at inhibiting the T278C and

V284C channels. This was particularly clear with the V284C mutant for which we found a steady state mean current ratio  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  of  $0.45 \pm 0.10$  (n=5), as compared with  $0.25 \pm 0.07$  (n=7) for T278C. As mentioned earlier, the interaction MTSET-A283C, -A286C and to a lesser extent -V285C caused a drastic increase in IKCa channel currents. The MTSET-induced current increases remained  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive (0.1 - 1  $\mu\text{M}$ ) and could be inhibited by clotrimazole (50  $\mu\text{M}$ ) (data not shown), indicating that channel activation did not result from a nonspecific effect of MTSET on the channel structure. The estimated  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  ratios ranged from  $1.6 \pm 0.2$  (n=5) for A285C to more than  $20 \pm 4$  (n=4) for A283C, suggesting a distinct structural organization for the residues located within the A283 to A286 S6 region (Figure R1.4A). Of particular interest is also the observation that the rate of modification for the interaction MTSET-V285 residue was more than 10 times smaller relative to rates estimated for the A283C, V284C and A286C mutants (figure 4B). This observation is compatible with V285 being less accessible to MTSET relative to the neighboring A283, V284 and A286 residues. In addition, the rates of modification for the A283C, V284C and A286C channels were significantly higher as compared with the residues located between V275 and V282. Globally these results provide evidence for a maximum accessibility to MTSET at the level of the cysteine at position 286.

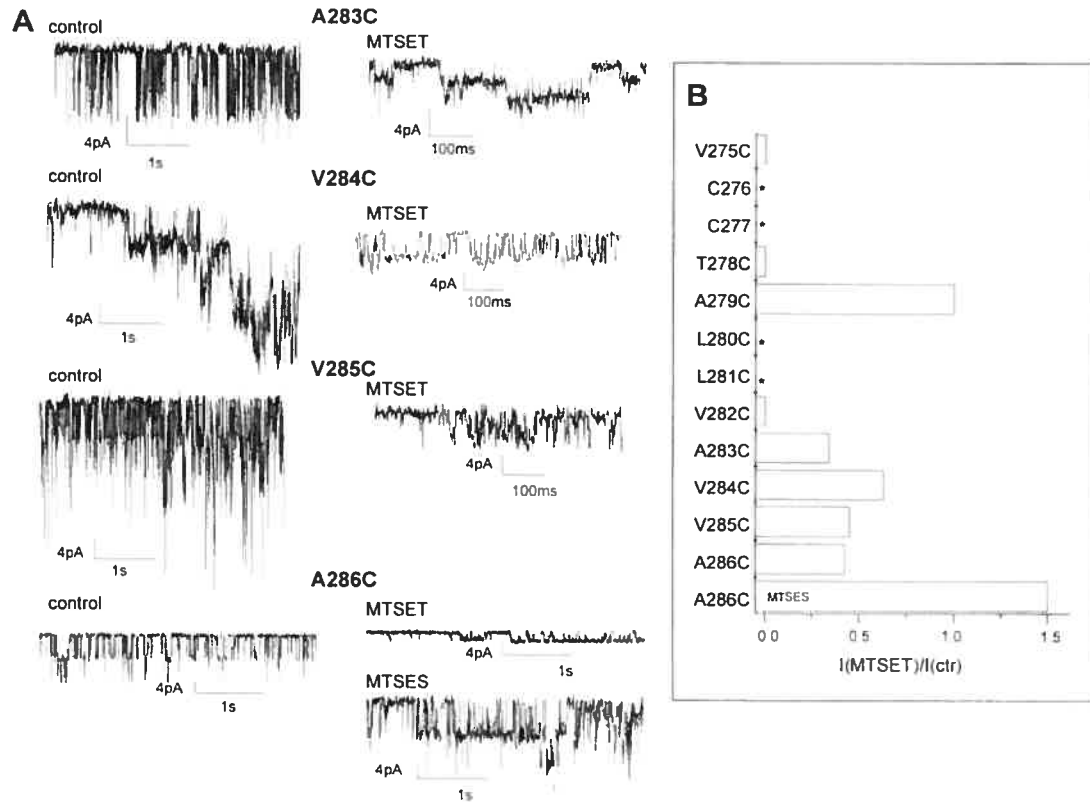


**Figure R1.5 Non stationary noise analysis of the interaction MTSET-ICa mutants**

Relationship between the current variance  $\sigma^2$  and the mean current  $\langle I \rangle$  during MTSET application illustrated for the V275C, A283C, V284C and V285C mutants.  $\langle I \rangle$  and  $\sigma^2$  were measured on successive time periods of 1 s for A283C, V284C and V285C and 0.5 s for V275C. The V275C mutant displayed a constant  $\sigma^2/\langle I \rangle$  (left panel right scale) ratio despite an important decrease in  $\langle I \rangle$  (left panel left scale), indicating an important inhibition of the channel unitary current. This proposal is also supported by the fact that the ratio  $\sigma^2/\langle I \rangle^2$  (right panel) increases in this case with a time constant equal to  $\tau_i$ , the inhibition time constant measured for  $\langle I \rangle$ . A similar noise pattern was also observed with the V284C mutant, although in this case the variations in  $\sigma^2/\langle I \rangle$  and  $\sigma^2/\langle I \rangle^2$  can be accounted for a partial inhibition of the channel unitary current plus a decrease in channel open probability. A different noise behavior is however observed with the A283C and V285C channels. The decrease in  $\sigma^2/\langle I \rangle^2$  observed with A283C correlates the increase in mean current with the  $\sigma^2/\langle I \rangle$  ratio remaining constant for time  $> 7.5$  s. This noise pattern would be compatible with a system where  $P_B > P_O$  with  $P_O$  and  $P_B \ll 1$ , thus supporting a model whereby the action of MTSET consists either to increase the channel open probability or recruit silent A283C mutants. The results obtained with V285C follow a similar pattern, although in this case the fact that the measured variation in  $\sigma^2/\langle I \rangle^2$  is more important than the mean current increase favors a system where  $P_B > P_O$  with  $P_O \ll 1$ .

The mechanisms underlying the MTSET-dependent channel inhibition and/or activation were next investigated through single channel and noise analysis. The results presented in Figure R1.5 confirm that the ratio  $\sigma^2$  (current variance)/ $\langle I \rangle$  (mean current) remained nearly constant (from -0.7 to -0.8) during MTSET application on V275C despite an important time dependent decrease of the channel mean current value (see

Appendix-1). Also, the ratio  $\sigma^2/\langle I \rangle^2$  increased with a time constant equal to  $\tau_i$ , the mean time of macroscopic current inhibition. The results presented in Figure R1.5 thus support a model whereby MTSET causes a total inhibition of the V275C mutant, resulting in a gradual decrease in the number of active channels. Such a mechanism was confirmed through direct single channel recordings where the binding of MTSET was seen to irreversibly block the V275C channels with the unbound channel open probability,  $P_o$ , remaining unchanged. A similar noise pattern namely; a constant  $\sigma^2/\langle I \rangle$  ratio coupled to a time dependent increase in  $\sigma^2/\langle I \rangle^2$ , was also obtained with the T278C and V282C mutants (data not shown). In the former case our results support a combined action of MTSET involving both a decrease in open probability plus a near complete (> 70%) channel block. These observations contrast with the noise data derived for the residues located within the C-terminus end of S6 (A283 to A286). More specifically, the binding of MTSET to either 283C, 284C, 285C or 286 produced a partial and not total inhibition of the channel unitary current amplitude (Figure R1.6). For instance, the unitary current amplitude,  $I$ , measured at -140 mV for the A286C mutant was estimated at 3.1 pA in the presence of MTSET as compared with 7.4 pA before MTSET application. Also, the observation of a MTSET-dependent increase in mean current for the A283C, V285C and A286C mutants requires that the action of the thiol reagent includes to overcome the partial inhibition in unitary conductance, either an increase in the channel open probability or an augmentation of the total number of active IKCa channels or both. For instance the four fold decrease in  $\sigma^2/\langle I \rangle$  for the A283C mutant following internal MTSET application can in part be accounted for by the 65% inhibition in unitary current amplitude measured at the single channel level, the remaining MTSET-dependent decrease in  $\sigma^2/\langle I \rangle$  ratio being attributable to an increase in the channel open probability (Figure R1.6).



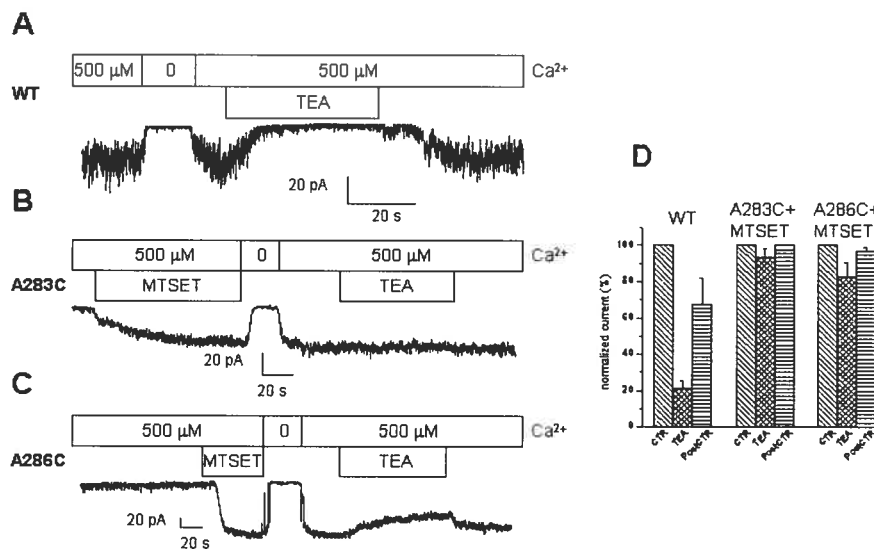
**Figure R1.6 Single channel analysis of the effect of MTSET on IKCa channel mutants.**

**A.** Inside-out single channel recordings obtained from IKCa mutants under low  $\text{Ca}^{2+}$  conditions at an internal MTSET concentration of 5 mM. The applied voltage  $-V_p$  corresponded to -140 mV throughout. Large negative potentials were used in these experiments to optimize the signal to noise ratio, the current jump amplitude at -60 mV being barely detectable ( $< 0.3$  pA) after MTSET treatment except for the A286C mutant. The action of MTSET on 283C and 286C is seen to result in a substantial increase in open channel probability, in accordance with the increase in mean current observed with the A283C and A286C mutants. **B.** Bar graph representation of the effect of MTSET (5 mM) and MTSES (5mM) on the unitary current amplitude of IKCa mutants.  $I(\text{MTSET})$  and  $I(\text{ctr})$  correspond to the unitary current amplitude measured at -140 mV in the presence or absence of MTSET or MTSES (5mM) respectively. \* refers to endogenous cysteine or non functional mutants as mentioned in fig.4. A ratio of 1 indicates an absence of MTSET- or MTSES- based effect on the channel unitary conductance. As seen, internal application of MTSET caused a near inhibition of the unitary current amplitude for the V275C, T278C and V282C mutant channels. A partial inhibition ranging from 40 % (V284C) to 70% (A283C) was observed with mutants obtained by cysteines substitution of the residues in the C-terminal region of S6 (A283-A286). In contrast, the application of the negatively charged MTSES reagent on A286C resulted in an increased unitary current amplitude. These observations suggest that that the presence of charged groups at the cytoplasmic entrance of the pore can modulate the exit rate of  $\text{K}^+$  from the channel cavity into the cytosolic solution.

More importantly, the 20 fold decrease in  $\sigma^2/\langle I \rangle^2$  ratio estimated in this case correlates well with the magnitude of the observed increase in mean current from  $-0.7$  pA to  $-16$  pA, suggesting a system where  $P_B > P_O$  with  $P_B$  and  $P_O \ll 1$  (see appendix 1). These results can thus be interpreted in terms either of a drastic change in the overall number of active channels, or as increase in open probability (see Figure R1.5 and appendix 1). A similar noise behavior was obtained with the A286C mutant (data not shown), although in this particular case the single channel recordings presented in Figure R1.5 support a MTSET-dependent current stimulation based mainly on an increase in open probability without an augmentation in the overall number of channels. The noise pattern for the V285C channel is also consistent with an action of MTSET mediated by effect on the channel open probability with  $P_B > P_O$  and  $P_O \ll 1$ , rather than the activation of silent V285C channels. In support of this proposal is the 4.5 fold MTSET-dependent reduction in the channel closed probability ( $1-P_O$ ) calculated from the 9 fold decrease in  $\sigma^2/\langle I \rangle$  ratio for a 50% reduction in unitary current amplitude, and the 20 fold decrease in  $\sigma^2/\langle I \rangle^2$  ratio despite a maximum 180% increase in mean current value. Finally, the time independent  $\sigma^2/\langle I \rangle$  ratio and the relatively modest increases  $\sigma^2/\langle I \rangle^2$  shown in Figure R1.5 for the V284C mutant, added to the 40% inhibition unitary current measured in this case (Figure R1.6) provide evidence for an effect of MTSET involving mainly both a partial inhibition of the channel unitary conductance and a two fold increase of the channel closed state probability. Globally these results indicate two distinct regions in S6 namely: a region extending from V275 to V282 where a total inhibition of channel activity was observed, and a second region from A283 to A286 with the interactions MTSET -A283, -A286 and to a lesser extent -V285 leading to channel activation.

MTSET-protection experiments were also conducted in which the pore structure of the MTSET-activated A283C and A286C mutant channels was investigated using the hydrophilic blocking agent TEA as probe. The control inside-out recordings presented in Figure R1.7 show that the internal application of 30 mM TEA caused a near total block ( $> 79\%$ ) of the wild-type IKCa currents. These results confirmed previous observations

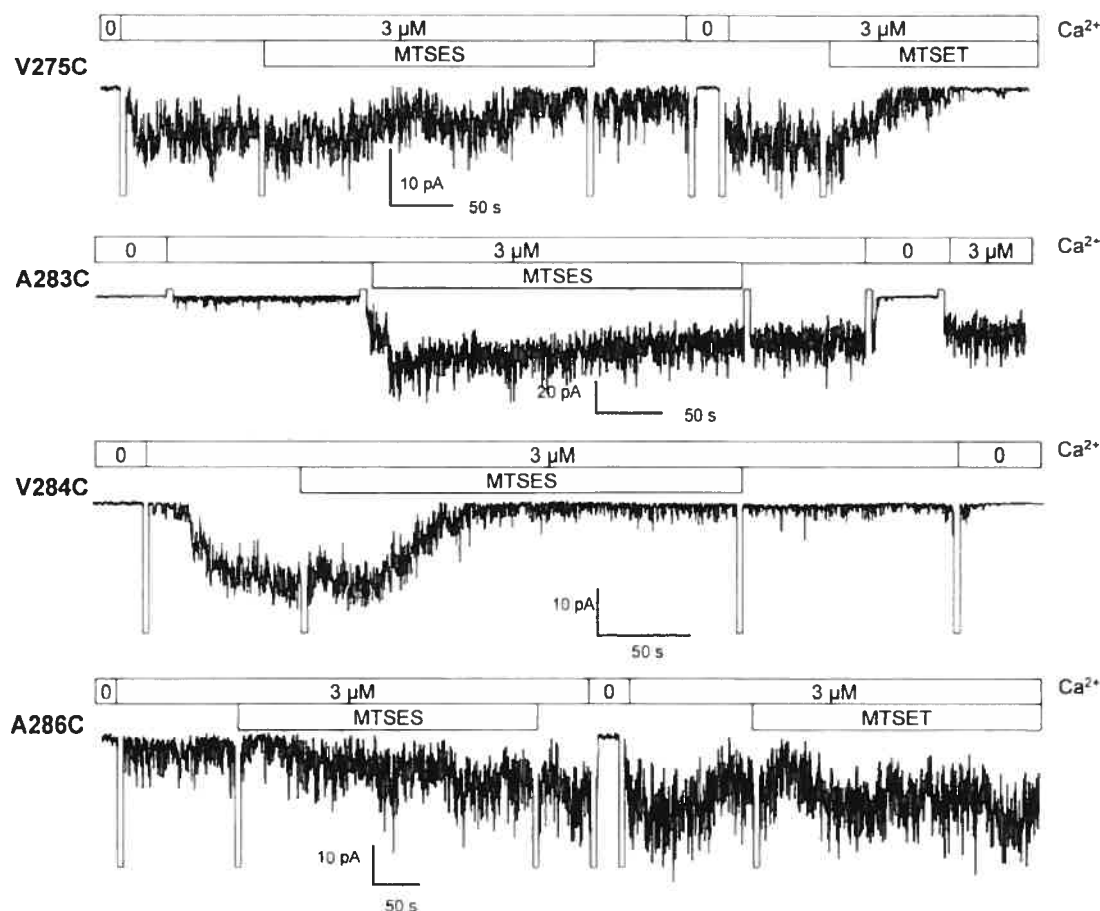
reported on the effect of internal TEA on the IKCa channels present in human red blood cells (Dunn, 1998). In contrast, there was no TEA-dependent block of the A283C and A286C currents following stimulation by internal MTSET. In fact, the percentage of TEA-related inhibition decreased from more than  $79\% \pm 4$  ( $n=6$ ) for the wild-type IKCa channel to less than  $6.5\% \pm 4.6$  ( $n=3$ ) for the MTSET-stimulated A283C mutant (Figure R1.7D). These observations strongly suggest that, in addition to an important effect on channel gating, the binding of MTSET to the cysteine engineered at position 283 or 286 leads to a narrowing of the pore such that TEA can no longer reach its blocking site.



**Figure R1.7 Protection by MTSET of TEA block for the A283C and A286C mutants.**

**A.** Inside-out current recording illustrating the blocking action of TEA (30 mM) on the wild type IKCa channel. **B.** Inside-out recording demonstrating the lack of TEA-dependent block with the A283C mutant after application of MTSET. **C.** Inside-out recording illustrating the reduced effectiveness of TEA on the A286C mutant stimulated by MTSET. **D.** Histogram summarizing the effects of TEA on the wild type IKCa channel (WT), and on the A283C and A286C mutants activated by MTSET. WT channel was blocked at  $79\% \pm 4$  ( $n=6$ ) whereas the blocking effect of TEA was reduced to  $6.5\% \pm 4.6$  ( $n=3$ ) for the A283C + MTSET mutant and to  $27\% \pm 7$  ( $n=3$ ) for the A286 mutant stimulated by MTSET.





**Figure R1.8 Effects of MTSES on IKCa mutants.**

Inside-out current records measured in symmetrical 200 mM  $K_2SO_4$  + 3  $\mu M$  internal  $Ca^{2+}$  conditions. The pipette potential was 60 mV throughout. In contrast to MTSET, MTSES failed to cause over a 5 min period a significant decrease of the V275C-induced currents. As observed with MTSET however, MTSES succeeded in strongly inhibiting the V284C mutant and to stimulate the inward currents generated by A283C and A286C. Also illustrated are MTSES protection experiments performed on V275C and A286C where MTSES (5 mM) was applied prior MTSET (5 mM). These experiments confirmed that a cysteine at position 275 is not accessible to MTSES and that the binding of MTSET to 286C prevents the interaction MTSES-V286C.

### ***D.3. Influence of the charge on the MTS-channel interactions***

Experiments were next performed to evaluate if the presence of a positive charge on MTSET influences the interactions between MTSET and the cysteines engineered at positions 283 to 286. Inside-out recordings with the negatively charged MTSES reagent are presented in Figure R1.8. As illustrated, all the mutants generated by cysteine

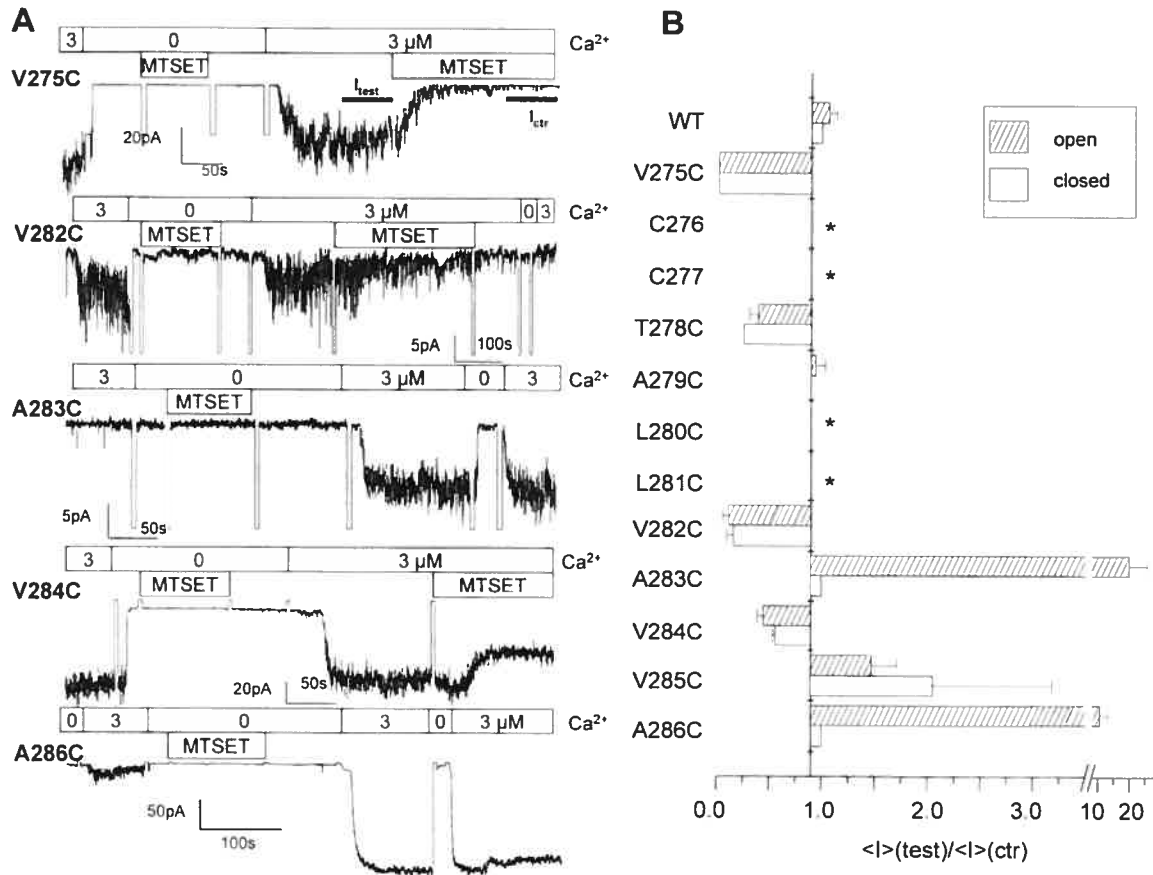
mutagenesis for the residues spanning the A283 to A286 S6 domain were sensitive to MTSES. For instance, Figure R1.8 shows a MTSES-based inhibition of the V284C channel activity resulting in a mean  $I(\text{test})/I(\text{ctr})$  ratio of  $0.21 \pm 0.04$  ( $n=7$ ). Also, as observed with MTSET, internal applications of MTSES caused large increase of the A283C and A286C related currents with  $I(\text{test})/I(\text{ctr})$  values ranging from  $3.0 \pm 0.6$  ( $n=2$ ) (A286C) to more than  $7.0 \pm 3$  ( $n=4$ ) (A283C). Notably, the single channel recordings presented in Figure R1.6 show that the application of MTSES on A286C resulted in a 50% increase in unitary current amplitude from a value of 8.0 pA in control conditions to 12 pA after MTSES treatment. These results contrast with the 60 % unitary current inhibition measured with A286C when MTSET was used as thiol modifying agent. Finally, experiments in which MTSES was applied before MTSET on A286C channels failed to demonstrate an additional stimulation by MTSET (Figure R1.8). The recordings in Figure R1.8 also indicate that in contrast to MTSET, the V275C mutant was not significantly affected by MTSES ( $I(\text{test})/I(\text{ctr}) = 0.95 \pm 0.2$ ;  $n= 3$ ). In fact, experiments in which MTSES was applied prior to MTSET showed no evidence for MTSES protecting V275C against the inhibitory action of MTSET (Figure R1.8). These results clearly indicate that the accessibility of the 275C residue to MTS reagents of comparable size is charge specific, with channel inhibition being limited to the positively charged MTSET only. The internal application of MTSES succeeded however to block the T278C mutant with a  $I(\text{test})/I(\text{ctr})$  values of  $0.27 \pm 0.01$  ( $n=3$ ) (data not shown). Globally, these results demonstrate that the amino acids from T278 to A286 are significantly more accessible to the negatively charged MTSES reagent relative to V275C, for which a large difference in channel inhibition potency was observed between MTSET and MTSES.

#### ***D.4. State dependent effect of MTSET***

Experiments were next conducted in which the action of MTSET in 3  $\mu\text{M}$  internal  $\text{Ca}^{2+}$  conditions was tested after an initial MTSET exposure in nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free

conditions. Typical recordings are presented in Figure R1.9A. As seen, MTSET could inhibit the V275C mutant whether the channels were initially exposed to MTSET in zero internal  $\text{Ca}^{2+}$  conditions (Figure R1.9) or not (Figure R1.3). Similarly, there was no significant differences in the  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  ratios measured for the T278C and V282C mutants with (Figure R1.9) or without (Figure R1.3) MTSET preconditioning in zero internal  $\text{Ca}^{2+}$ . These observations provide evidence for the 275C, 278C and 282C residues becoming less accessible to MTSET in the closed as compared to the open IKCa channel structure.

State dependent MTSET interactions were also recorded with the V284C and V285C channels. There were no significant differences in  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  ratios relative to control (no MTSET pre-treatment) whether the V284C or V285C mutants were initially exposed to MTSET in zero  $\text{Ca}^{2+}$  or not. In contrast, the stimulatory action of MTSET on the A283C and A286C mutants clearly appeared state independent with MTSET activating both channels when applied in zero internal  $\text{Ca}^{2+}$  conditions. More important a second MTSET application in the presence of 3  $\mu\text{M}$  internal  $\text{Ca}^{2+}$  failed in these cases to initiate an additional current increase (data not shown). These results suggest that the residues at positions 283 and 286 are accessible to MTSET independently of the channel open-closed configuration.



**Figure R1.9 State dependent action of MTSET.**

**A.** Inside-out recordings showing the state dependency of the MTSET action on IKCa mutants. The accessibility to MTSET of the substituting cysteine was estimated in MTSET protection experiments as discussed in Materials and Methods. The applied potential was maintained at -60 mV throughout. **B.** Bar graph representation of the ratio [ $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$ ] measured with (closed) or without (open) MTSET preconditioning in zero internal Ca<sup>2+</sup> conditions. The  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  ratios obtained for the second MTSET application in the perfusion protocol illustrated in figure 9A were estimated at  $0.02 \pm 0.006$  ( $n=3$ ) for V275C,  $0.26 \pm 0.02$  ( $n=2$ ) for T278C,  $0.16 \pm 0.06$  ( $n=3$ ) for V282C,  $0.54 \pm 0.05$  ( $n=2$ ) for V284 and  $2 \pm 1$  ( $n=3$ ) for V285C respectively. These values are not significantly different from the  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  ratios measured without an initial MTSET exposure in zero internal Ca<sup>2+</sup>. In contrast the  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  values estimated for A283C and A286C mutants decreased drastically from  $19 \pm 5$  ( $n=5$ ) and  $10 \pm 0.54$  in the absence of MTSET preconditioning in zero external Ca<sup>2+</sup>, to  $1.0 \pm 0.05$  ( $n=5$ ) and  $1.0 \pm 0.02$  ( $n=3$ ) for the perfusion protocol illustrated in 9A. These observations support a model whereby A283 and A286 remained accessible to MTSET in conditions where channels were maintained in the closed state.

### ***D.5. Homology modeling***

An analysis of the structural features of the S6 transmembrane segment in IKCa was performed by homology modeling using as templates the closed rigid KcsA channel structure obtained by X-ray crystallography (Doyle *et al.*, 1998) and a computer derived structure for KcsA in the open state (Roux *et al.*, 2000; Perozo *et al.*, 1999). Surface and ribbon representations of the open IKCa S5-P-S6 regions are illustrated in 10B and 10C respectively while a surface representation of the closed IKCa channel S5-P-S6 structure is presented in 10A. A surface representation of a single S6 segment for the open channel is also illustrated in 10B. The open and closed channel models first predict that with the exception of the Cys at position 267 which faces the selectivity filter, the endogenous cysteines at 269, 276 and 277 should be oriented away from the pore lumen (yellow in 10C). Most interestingly, the models for the open (10B and 10C) and the closed (10A) channel suggest that V275, T278, and V282 are lining the channel pore with the V275 and T278 residues contributing to a central inner cavity similar to the one described for KcsA. The A279 residue should also be facing the pore lumen, but this prediction is not supported by our SCAM experiments. Finally, the V284 and V285 residues are shown to be oriented directly opposite to the pore lumen, in contrast to the A286 side chain which is directed towards the pore central axis. A color representation of the MTSET-modification rate for channel inhibition and/or activation is superimposed on the closed and open IKCa channel structures. Clearly, residues not predicted to be facing the pore lumen (A283, V284 and V285) turned out to be accessible to MTSET. This is particularly true for the valines at position 284 and 285 respectively. In addition there is no structural correlation between the slow (blue) and intermediate (orange) rates of modification and the orientation of the residues relative to the pore central axis. For instance, the residue V284 which is predicted to be opposite to the pore lumen led to a rate of modification the magnitude of which was comparable to that of the cavity lining residue V275. Notably, the fastest rate of modification (red) was obtained by cysteine substitution of the A286

residue, which should be located according to the open IKCa structure at the complete end of S6 facing the pore lumen. The pore cross section area computed for the closed channel structure is presented in Figure R1.10D. The results of these calculations reveal that the channel cavity should be extending from V272 to T278, with a maximum inner width of approximately 10 Å at the level of V275. A cavity of that size could easily accommodate a single MTSET molecule which averages a cross diameter of 5.8 Å (Kuner *et al.*, 1996). Hence for that region, our models based on the closed and open KcsA structures agree with the MTSET results. The correlation between the data and the models however decreases for residues in the C-terminus end of S6 region. Indeed, the closed channel structure predicts a cross section area for the 279-292 region too small (<2 Å) to account for the state independent effects of MTSET observed with A283C and A286C (Figure R1.9). Homology modeling provided finally information on the location of the putative gate by comparing the predicted structures for the closed and open IKCa channel (Figure R1.10A and R1.10B). Whereas the cross section area of the pore differed by approximately 25% at the level of the cavity between the open and closed channel structures, important differences in the pore inner diameter are predicted between these structures starting at T278 (figure R1.10D). These qualitative considerations would thus support important structural changes at the level of the T278-V282 residues during gating.

## E. Discussion

This is the first report attempting to describe some of the structural features of the inner pore region of an IKCa channel. Our results clearly suggest functional differences between the residues located in the C-terminal region of S6 (A283 to A286), and those located from V275 to V282. In support of this conclusion are the single channel observations that MTSET totally blocked the V275C, T278C and V282C IKCa mutants while inhibiting partially channels where cysteines were substituting for the residues in the C-terminus end of S6 (A283 to A286). Furthermore, the interaction of MTSET with

the cysteines at positions 283, 286 and to a lesser extent 285, led to a strong channel activation and to a narrowing of the channel pore as revealed by the absence of TEA block on the MTSET-stimulated A283C and A286C mutants. The negatively charged MTSES could also affect channel gating following binding with cysteines in the C-terminal region of S6, and interact with residues up to T278. Finally, the action of MTSET on the A283C and A286C mutants was found to be state independent in contrast to V275C, T278C, V282, V284 and V285 which showed a reduced MTSET accessibility for the closed IKCa structure.

### ***E.1. Limits of the present study***

Several assumptions are attached to the interpretation of cysteine mutagenesis. It is assumed for instance that the cysteine substitution does not dramatically alter the protein structure as to expose endogenous cysteines which would normally be buried. The S6 segment of IKCa contains four of the nine channel endogenous cysteines over a ten amino acid span covering the C267 to the C277 domain. We can not currently rule out a possible contribution of those endogenous residues to the MTS-based effects reported in this work. For instance, the conservative substitution of the cysteine at position 276 by a serine led to a non functional channel, indicating that the C276 residue is critical for channel proper functioning. Similarly, the C276 and C277 are located adjacent to the key V275 and T278 residues and might have contributed to the effects measured with the V275C and T278C mutants. The possible contribution of an auxiliary protein that would be MTSET sensitive can not also be currently ruled out. In fact, the presence of an auxiliary protein has already been emphasized in a recent work on the regulation by ATP of the IKCa channel (Gerlach *et al.*, 2001). Such an interaction is not expected however to modify the channel permeation properties, but may alter channel gating.

Our results show a transient non covalent inhibition by MTSET of the wild type IKCa channel. A non covalent MTSET-dependent current inhibition has also been reported for the Kir6.2 channel by Cui *et al.*, (2002) (Cui *et al.*, 2002). It has first to be noticed

that we never observed a partial recovery from a non covalent block following MTSET or MTSES removal in all the experiments performed according to the protocols illustrated in Figure R1.3 and Figure R1.9. Furthermore the perfusion protocol we used to measure the effect of MTS reagents includes an extensive washout period in zero and standard  $3 \mu\text{M}$  internal  $\text{Ca}^{2+}$ . This procedure insures that the estimated  $\langle I \rangle(\text{test})/\langle I \rangle(\text{ctr})$  ratios reflect an irreversible binding of the reagent to a targeted cysteine residue and not a transient non covalent interaction. A transient current block of the wild type IKCa by MTSET is however to be expected if MTSET can diffuse up to the channel inner cavity. This proposal is in fact supported by the observation that MTSET blocked the V275C mutant (Figure R1.3). The absence of a non covalent MTS contribution to the experiments illustrated in Figure R1.3 and Figure R1.9 can thus be seen as an indication that the covalent binding of MTS reagents to a targeted cysteine located between the cytoplasmic channel entrance and the V275 residue impairs the access of a MTS molecule to the cavity region, thus preventing a non covalent MTS-based action. As such, the observation that the binding of MTSET to A283C and A286C impaired the blocking action of TEA (Figure R1.7) provides indirect evidence that the binding of MTSET with residues in the C-terminal end of S6 can in deed limit the access of molecules such as MTSET to the channel pore.

### ***E.2. The V275-V282 region***

The amino acid alignment presented in Figure R1.1 locates the V275 and T278 residues of IKCa within the structurally identified hydrophobic lined cavity defined by the I100 and F103 residues in KcsA. The V275 and T278 residues in IKCa are therefore expected to contribute to the hydrophobic lumen of the IKCa channel cavity. This proposal is confirmed through homology modeling which predicts that V275, T278 and V282 should be facing the pore lumen with C276 and C277 opposite to the pore. The possibility of V275 lining the channel inner cavity has also been inferred from a molecular analysis of the interactions between IKCa and triarylmethanes such as



clotrimazole (Wulff *et al.*, 2001). The pore cross section area for the open IKCa structure computed for the V275-V282 domain yielded values ranging from 28 Å<sup>2</sup> to 44 Å<sup>2</sup>, with a cavity about 10 Å wide at the level of V275. Clearly, the dimensions of the pore in the cavity should be suitable to accommodate at least a single MTSET molecule of 5.8 Å diameter and a theoretical cross section area of 26 Å<sup>2</sup> (Kuner *et al.*, 1996). These computational results are thus compatible with the observed total block of V275C, T278C and V282C measured at the single channel level in the presence of MTSET. The absence of an inhibitory action on V275C by MTSES is also expected as a structural analysis of the MTSES reagent locates the negatively charged moiety of the molecule approximately 7 Å from the reactive atom, directly inside the channel inner cavity for a MTSES molecule bound to 275C. Also the observation that MTSES succeeded at inhibiting the T278C mutant indicates that the IKCa channel can accommodate a negatively charged group up to a point corresponding to the V282 residue located 7 Å below 278C. It follows that the valine at position 282 can not formally be a constitutive part of the channel inner cavity as the presence of a negative group inside the cavity is energetically unfavorable (Roux *et al.*, 2000; Roux and MacKinnon, 1999). Finally, the MTSET-dependent inhibition of the V275C, T278C and V282C mutants was found to be impaired when the channel was maintained in the closed configuration (zero Ca<sup>2+</sup> conditions). These observations and the differences in pore dimensions from L280 to A286 between the closed and open IKCa channels, support an IKCa model where the channel cavity becomes less accessible to MTSET upon channel closure.

### ***E.3. The A283-A286 region***

The region comprising the residues A283 to A286 in S6 is distinctive in many ways. First, all the residues between A283 and A286 were found to be sensitive to MTSET in the open channel configuration. The C-terminal region of S6 (A283-A286) is unlikely therefore to be embedded in the membrane where the accessibility to MTSET would be restricted. Second, one of the key observation of the present study concerns the

increase in current triggered by MTSET and/or MTSES when applied to the A283C, A286C and to a lesser extent V285C mutants. The A283C, A286C and V285C channels clearly remained  $\text{Ca}^{2+}$  and clotrimazole (data not shown) sensitive, indicating that the observed current stimulation did not result from some deleterious modifications of the channel structure. If, as suggested (Wulff *et al.*, 2001), the inhibitory action of clotrimazole on IKCa involves binding to residues in the channel inner cavity, the observation that clotrimazole and not TEA (Figure R1.7) block the MTSET-activated A283C and A286C currents suggests that clotrimazole has access to the cavity region through a hydrophobic pathway. In addition, this stimulatory action required the presence of internal  $\text{Ca}^{2+}$  and was not charge dependent as similar effects were measured with MTSET, MTSES and the neutral MTS reagent MTSACE (data not shown). More importantly our results indicate that the binding of MTSET or MTSES to A283C and A286C either activated silent IKCa channel mutants that did not contribute to the  $\text{K}^+$  current before application of the thiol modifying agent, or caused an increase of the channel open probability such that  $P_O \ll P_B$  with  $P_O \ll 1$ . The single channel recordings presented in Figure R1.6 for the A286C mutant better support in our opinion a model whereby  $P_O \ll P_B$ , suggesting that most of the observed current noise behaviour can be explained in terms of an increase in open probability. We can not however currently rule out the possibility that the A283C, and to a lesser extent, the A286C IKCa mutants represent a “rundown” form of IKCa which can be reactivated by MTSET or MTSES. Notably, the MTSET-dependent increase in current intensity recorded with A283C and A286C appeared to be state independent, thus providing evidence for a pore structure in which the A283 and A286 residues are accessible to the hydrophilic MTSET reagent when IKCa channels are in a closed state configuration. Important changes in MTSET accessibility were however observed with the V284C and V285C mutants indicating that V284 and V285 become exposed to water following channel opening. These observations support a structural model whereby the S6 region from A283 to A286 undergoes an important reorganization during gating.

An additional feature of the C-terminus end of S6 concerns the contribution of electrostatic effects to the MTSET- and MTSES based changes in unitary current. Our results indicate that the binding of the positively charged MTS reagent MTSET to the cysteines substituting for the residues A283 to A286 leads to a 40-70% inhibition of the unitary current amplitude. In contrast, we observed an increase in unitary current amplitude with the A286C and A283C (data not shown) mutants after treatment with the negatively charged MTS reagent MTSES. These results strongly suggest that the variations in  $K^+$  currents related to the presence of either MTSET or MTSES at positions 283 through 286 involved electrostatic interactions such that the presence of a charged group near the cytoplasmic entrance of the pore affects the exit rate of  $K^+$  from the cavity into the cytosolic solution.

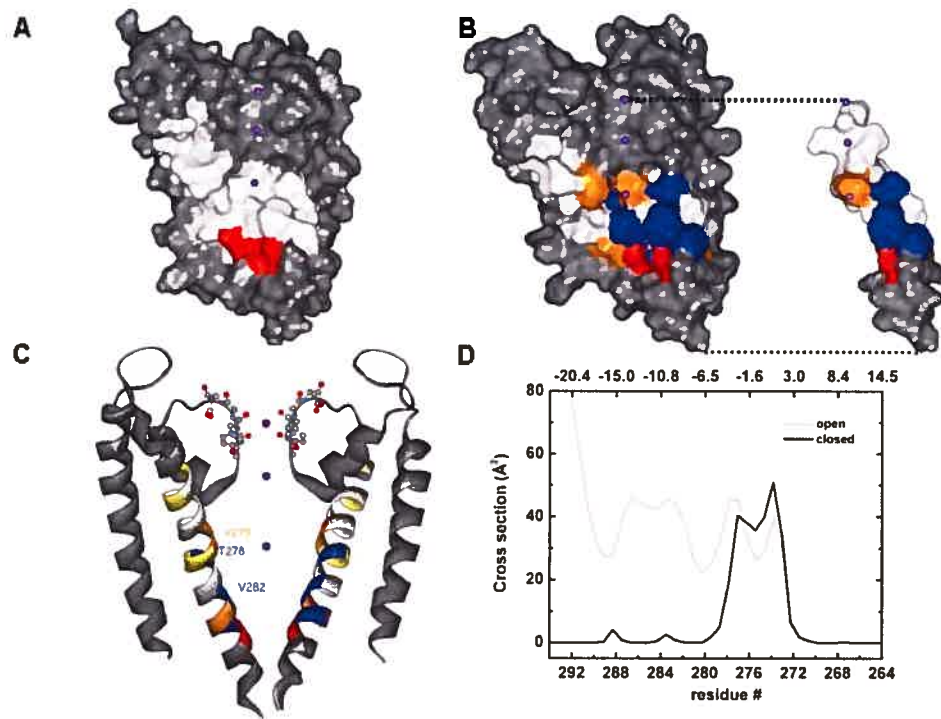
#### ***E.4. Model of the S6 segment***

Several conclusions on the structural organization of the IKCa S6 segment can also be drawn on the basis of the results presented in this work. For instance, the SCAM data relative to the C-terminal segment of S6 (A283-A286) challenge the predicted structures for the closed IKCa channel derived from homology modeling using a rigid representation of KcsA. The observation that the residue A283 was accessible to MTSET for the closed IKCa channel argues for a pore structure in which the C-terminal of S6 is wider than predicted from a rigid closed KcsA structure. In fact, the proposed closed IKCa model predicts that the pore sectional area for the region extending from A279 to K292 should be less than  $2 \text{ \AA}^2$ . In addition, modeling of the closed A283C and A286C mutants indicates that the cysteines at positions 283 and 286 should be in contact with the pore lumen, implicating that MTSET needs to diffuse inside the pore to reach the targeted cysteine residues. As such, the observation that the binding of MTSET to A283C or A286C impaired the blocking action of TEA argues for a narrowing of the channel pore resulting either from a direct occlusion by MTSET of the pore lumen or from a displacement of the S6 segment substantial enough as to decrease the pore cross section

area. In the former case, the results obtained with TEA provide evidence for a structure of the S6 segment where the A283 and A286 residues are facing the pore lumen in accordance with the closed and open models proposed for IKCa. Our results also indicate that MTSET caused a greater protection against TEA block with the A283C than A286C mutant. This observation can be interpreted as indicating that the channel pore in the open state is wider at the level of the A286 as compared with the A283 residue. The calculations presented in Figure R1.10 D do not however predict important variations in cross section area at the level of the A283 and A286 residues. The absence of correlations between the solvent exposure calculations (Figure R1.10) and the SCAM results, in particular the state independent action of MTSET with the A283C and A286C mutants, strongly suggest in our view that the similarity-based models derived from the rigid closed form of KcsA do not provide a valid description of the C-terminus end of the S6 segment (residues 283 to 286).

A better correlation between the SCAM results for the A283-A286 S6 domain and the closed KcsA structure can however be achieved if it is hypothesized that the C-terminus end of S6 is highly flexible. If present, this flexibility could account for the observation that MTSET reached the pore lining 283C residue in conditions where the A283C mutant was maintained in a closed state conformation, and that the pore is wider at A286 as compared with A283. Furthermore, the cross section calculations presented in Figure R1.10 predict little variations in pore dimensions between the open and closed states within the S6 region extending from K264 to T278. The results of these calculations argue therefore for strong structural constraints for the T264-K278 S6 segment not present within the A283 –A286 domain. The data derived from homology modeling and SCAM experiments would thus support a model in which the domain extending from V275 to V282 possesses features corresponding to the inner cavity region of KcsA, and where the C-terminus end of S6, from A283 to A286, is more flexible than predicted on the basis of the closed KcsA crystallized structure alone. Under these

conditions, the channel hypothetical gate can not be located down the A283 residue, and should be at a point restricted to a region extending from V278 to V282.



**Figure R1.10 Homology modeling of the IKCa.**

Computer modelization of the IKCa channel using either the closed or open KcsA channel structure as template. Surface and ribbon representations of the open IKCa S5-P-S6 region are illustrated in **B** and **C** respectively. Panel **B** also includes a surface representation of a single S6 segment for the open channel. The molecular surface computed for the closed IKCa S5-P-S6 region is presented in **A**. According to the proposed models, the residues V275, T278 and V282 are lining the pore lumen resulting in a cavity 10 Å wide at the level of V275. Also, the endogenous cysteines (yellow in 9C) at positions 269, 276 and 277 are presented as facing opposite to the pore lumen, whereas the C267 residue is predicted to be oriented towards the selectivity filter. A color representation of the MTSET modification rate for channel inhibition and/or activation is superimposed on the closed and open IKCa channel structures. Residues with slow ( $< 5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), intermediate ( $5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  to  $20 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) and fast ( $> 80 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) rates of modification are colored in blue, orange and red respectively. The pore lining residue A286 is seen as being the most accessible (red), whereas residues with the slowest rates of modification (blue) turned out to be located either inside (T278) or opposite to the pore lumen (V285). Panel **B** also illustrates that all the residues from A283 to A286 are accessible to MTSET irrespectively of their orientation relative to the pore central axis. **D**. Cross section area for residues 264 to 292 computed for the open and closed IKCa structures. Z refers to the channel axial distance with  $Z = 0$  at V275. The closed channel structure predicts a central cavity extending from residues 272 to 278. The cross section area for residues spanning the 282 to 286 region appeared under these conditions too small to accommodate an MTSET molecule of 5.8 Å diameter assuming a rigid structure for IKCa. A flexible structure extending below V282 can however account for the SCAM results.

The possibility of a highly flexible region near the channel gate was also recently proposed for the Shaker channel (del Camino and Yellen, 2001). It was argued in this case that closure of the gate was taking place between the residues at positions 474 (282 IKCa) and 478 (286 IKCa), with the region below 478 showing considerable flexibility. Furthermore results of blocker protection experiments on the Shaker V476C mutant have led to the proposal of a “bent S6” model whereby a bent in the inner S6 transmembrane segment is introduced at the level of the P473-V474-P475 residues (del Camino *D. et al.*, 2000). IKCa lacks a similar P-X-P motif that could disrupt the S6 helical structure, the P-V-P sequence in Shaker corresponding to the L281-V282-A283 sequence in IKCa (Figure R1.1). Our results are nevertheless in agreement with the findings reported for the Shaker channel which assign to the P473-P475 region (L281-A283) a determinant role to the channel gating process. Finally, it is clear that in our case the stimulation by MTSET of the A283C, V285C and A286C channels will require a model whereby A283, V285 and A286 participate actively to the coupling mechanism relating the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent conformational change of calmodulin to the actual opening of the pore.

## F. Conclusion

Globally our results would support a model of the S6 transmembrane segment of IKCa where the region extending from V275 to V282 can be correctly approximated by the crystal structure of the KcsA channel. The structural features of the C-terminal region of S6 appeared however more compatible with a flexible structural model of KcsA, with A283 and A286 participating to the activation process.

## G. Appendix

Let us consider a system consisting of  $N_t$  identical channels reacting with MTSET according to the following irreversible kinetic scheme:



Let  $n_o$  stand for the number of unbound channels and  $P_o$ ,  $I_o$  the associated open channel probability and unitary current amplitude. If the interaction of MTSET channel leads to a change in current amplitude ( $I_B$ ) and open probability  $P_B$ , the current mean value  $\langle I \rangle$  at any time during MTSET application will be given by:

$$\langle I \rangle = n_o P_o I_o + n_B P_B I_B,$$

where  $n_B$  is the number of channels bonded to MTSET given by  $N_t - n_o$ . Similarly, the variance at any time will correspond to:

$$\sigma^2 = n_o P_o (1 - P_o) I_o^2 + n_B P_B (1 - P_B) I_B^2$$

According to this model, the application of MTSET should lead to a time-dependent change in  $\sigma^2 / \langle I \rangle$  from an initial value equal to  $I_o (1 - P_o)$  to a final steady-state value given by  $I_B (1 - P_B)$ . Similarly, the  $\sigma^2 / \langle I \rangle^2$  ratio is expected to vary from  $(1 - P_o) / N_t P_o$  to  $(1 - P_B) / N_t P_B$  in a time-dependent manner.

In conditions where the binding of MTSET causes a total inhibition of the channel unitary current amplitude, ( $I_B = 0$ ) the ratio  $\sigma^2 / \langle I \rangle$  is predicted to be time independent with a value equal to

$$\frac{\sigma^2}{\langle I \rangle} (1 - P_o) I_o$$

whereas the ratio  $\sigma^2 / \langle I \rangle^2$  will be given by :

$$\frac{\sigma^2}{\langle I \rangle^2} = \frac{(1 - P_o) I_o}{\langle I \rangle} = \frac{(1 - P_o)}{n_o P_o}$$

The ratio  $\sigma^2 / \langle I \rangle^2$  will be independent of the unitary current amplitude and increase with a time constant equal to that measured for the current inhibition process.

In conditions where the binding of MTSET results in an increase of the channel open probability such that  $P_B \gg P_o$  with  $P_o \ll 1$ , the ratio  $\sigma^2 / \langle I \rangle$  becomes approximately equal to :

$$\frac{\sigma^2}{\langle I \rangle} = \frac{P_o I_o^2 n_o}{P_B I_B N_t - n_o} + (1 - P_B) I_B$$

This equation predicts that the contribution of the first term will decrease with an apparent time constant faster than the observed relaxation time for current activation, with  $\sigma^2 / \langle I \rangle$  reaching a constant value corresponding to  $(1 - P_B) I_B$ . Under these same conditions the ratio  $\sigma^2 / \langle I \rangle^2$  will decrease from  $\sim 1/P_O N_t$  to  $(1 - P_B)/P_B N_t$ , resulting in a  $(\sigma^2 / \langle I \rangle^2)_{\text{before MTSET}} / (\sigma^2 / \langle I \rangle^2)_{\text{after MTSET}}$  value greater than expected from the ratio  $P_B / P_O$  computed from the variations in mean current alone.

Finally, a current noise pattern where  $(\sigma^2 / \langle I \rangle^2)_{\text{before MTSET}} / (\sigma^2 / \langle I \rangle^2)_{\text{after MTSET}} \approx P_O / P_B$ , with  $P_O / P_B$  computed from the variations in mean current may be indicative of a system in which both  $P_O$  and  $P_B \ll 1$  or where the total number of functional channel varies from  $N_{t_{\text{initial}}}$  to  $N_{t_{\text{final}}}$  with little variation in unitary current  $I$  and open probability  $P_O$ . These systems cannot be discriminated on the basis of a noise analysis alone.

*Note added in proof.* The structure of the calcium-activated MthK  $K^+$  channel determined recently by X-ray crystallography shows that the intracellular entrance of the pore has a diameter of  $\sim 12 \text{ \AA}$ , in good qualitative agreement with the current modeling of IKCa (Jiang *et al.*, 2002a,b).

## Acknowledgments

We thank Dr. Mats Eriksson for his valuable help with the homology modeling procedure, Ms Julie Verner for expert oocyte preparation and Mr Claude Gauthier for drawings. This work was performed with grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 7769) and the Canadian Heart & Stroke Foundation to R.S. and with a joint grant from the Fonds Concerté Action Recherche to R. S. and L.P.

## H. Reference List

Berneche, S. and B. Roux. 2000. Molecular dynamics of the KcsA  $K(+)$  channel in a bilayer membrane. *Biophys. J.* 78:2900-2917.



- Brooks,B.R., R.E.Bruccoleri, B.D.Olafson, D.J.States, S.Swaminathan, and M.Karplus. 1983. A program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J.Com.Chem.* 4:187-217.
- Brugnara,C., L.De Franceschi, and S.L.Alper. 1993.  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  transport in erythrocytes: Comparison of binding and transport inhibition by scorpion toxins. *J.Biol.Chem.* 268:8760-8768.
- Cai,S., L.Garneau, and R.Sauvé. 1998. Single-channel characterization of the pharmacological properties of the  $\text{K}(\text{Ca}^{2+})$  channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. *J.Membr.Biol.* 163:147-158.
- Cui,Y., W.Wang, and Z.Fan. 2002. Cytoplasmic vestibule of the weak inward rectifier kir6.2 potassium channel. *J.Biol.Chem.* 277:10523-10530.
- del Camino D., M.Holmgren, Y.Liu, and G.Yellen. 2000. Blocker protection in the pore of a voltage-gated  $\text{K}^+$  channel and its structural implications. *Nature* 403:321-325.
- del Camino,D. and G.Yellen. 2001. Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage- gated  $\text{K}(+)$  channel. *Neuron* 32:649-656.
- Denicourt,N., S.Cai, L.Garneau, M.Gagnan-Brunette, and R.Sauvé. 1996. Evidence from incorporation experiments for an anionic channel of small conductance at the apical membrane of the rabbit distal tubule. *Biochim.Biophys.Acta* 1285:155-166.
- Devor,D.C., A.K.Singh, R.A.Frizzell, and R.J.Bridges. 1996. Modulation of  $\text{Cl}^-$  secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a  $\text{Ca}^{(2+)}$ -dependent  $\text{K}^+$  channel. *Am.J.Physiol.* 271:L775-L784
- Doyle,D.A., J.M.Cabral, R.A.Pfuetzner, A.Kuo, J.M.Gulbis, S.L.Cohen, B.T.Chait, and R.MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of  $\text{K}^+$  conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Dunn,P.M. 1998. The action of blocking agents applied to the inner face of  $\text{Ca}(2+)$ -activated  $\text{K}^+$  channels from human erythrocytes. *J.Membr.Biol.* 165:133-143.
- Gerlach,A.C., C.A.Syme, L.Giltinan, J.P.Adelman, and D.C.Devors. 2001. ATP-dependent activation of the intermediate conductance,  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel, hIK1, is conferred by a C-terminal domain. *J.Biol.Chem.* 276:10963-10970.
- Ghanshani,S., H.Wulff, M.J.Miller, H.Rohm, A.Neben, G.A.Gutman, M.D.Cahalan, and K.G.Chandy. 2000. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell

- activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J.Biol.Chem.* 275:37137-37149.
- Grissmer,S., A.N.Nguyen, and M.D.Cahalan. 1993. Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *J.Gen.Physiol.* 102:601-630.
- Holmgren,M., Y.Liu, Y.Xu, and G.Yellen. 1996. On the use of thiol-modifying agents to determine channel topology. *Neuropharmacology* 35:797-804.
- Ishii,T.M., C.Silvia, B.Hirschberg, C.T.Bond, and J.P.Adelman. 1997. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:11651-11656.
- Jensen,B.S., N.Odum, N.K.Jorgensen, P.Christophersen, and S.P.Olesen. 1999. Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca(2+)-activated K(+) channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:10917-10921.
- Joiner,W.J., L.-Y.Wang, M.D.Tang, and L.K.Kaczmarek. 1997. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:11013-11018.
- Khanna,R., M.C.Chang, W.J.Joiner, L.K.Kaczmarek, and L.C.Schlichter. 1999. hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J.Biol.Chem.* 274:14838-14849.
- Klein,H., L.Garneau, M.Coady, G.Lemay, J.Y.Lapointe, and R.Sauvé. 1999. Molecular Characterization of an Inwardly Rectifying K<sup>+</sup> Channel from HeLa Cells. *J.Membr.Biol.* 167:43-52.
- Kohler,m., B.Hirschberg, C.T.Bond, J.M.Kinzie, N.V.Marrion, J.Maylie, and J.P.Adelman. 1996. Small-conductance,calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273:1709-1714.
- Kuner,T., L.P.Wollmuth, A.Karlin, P.H.Seeburg, and B.Sakmann. 1996. Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 17:343-352.
- Langille,B.L., M.A.Reidy, and R.L.Kline. 1986. Injury and repair of endothelium at sites of flow disturbances near abdominal aortic coarctations in rabbits. *Arteriosclerosis* 6:146-154.

- Liu, Y., M. Holmgren, M. E. Jurman, and G. Yellen. 1997. Gated access to the pore of a voltage-dependent  $K^+$  channel. *Neuron* 19:175-184.
- Logsdon, N. J., J. Kang, J. A. Togo, E. P. Christian, and J. Aiyar. 1997. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272:32723-32726.
- Marchenko, S. M. and S. O. Sage. 1996. Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. *J. Physiol. (Lond)* 492:53-60.
- Morier, N. and R. Sauvé. 1994. Analysis of a novel double-barreled anion channel from rat liver rough endoplasmic reticulum. *Biophys. J.* 67:590-602.
- Neylon, C. B., R. J. Lang, Y. Fu, A. Bobik, and P. H. Reinhart. 1999. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel in vascular smooth muscle: relationship between  $K(Ca)$  channel diversity and smooth muscle cell function. *Circ. Res.* 85:e33-e43
- Perozo, E., D. M. Cortes, and L. G. Cuello. 1999. Structural rearrangements underlying  $K^+$ -channel activation gating. *Science* 285:73-78.
- Qin, F., A. Auerbach, and F. Sachs. 1996. Estimating single-channel kinetic parameters from idealized patch-clamp data containing missed events. *Biophys. J.* 70:264-280.
- Qin, F., A. Auerbach, and F. Sachs. 1997. Maximum likelihood estimation of aggregated Markov processes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 264:375-383.
- Rane, S. G. 2000. The growth regulatory fibroblast IK channel is the prominent electrophysiological feature of rat prostatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:457-463.
- Rauer, H., M. D. Lanigan, M. W. Pennington, J. Aiyar, S. Ghanshani, M. D. Cahalan, R. S. Norton, and K. G. Chandy. 2000. Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets  $Ca^{2+}$ -activated over voltage-gated  $K^+$  channels. *J. Biol. Chem.* 275:1201-1208.
- Rittenhouse, A. R., D. H. Vandorpe, C. Brugnara, and S. L. Alper. 1997. The antifungal imidazole clotrimazole and its major in vivo metabolite are potent blockers of the calcium-activated channel in murine erythroleukemia cells. *J. Membrane Biol.* 157:177-191.
- Roux, B., S. Berneche, and W. Im. 2000. Ion channels, permeation, and electrostatics: insight into the function of KcsA. *Biochemistry* 39:13295-13306.

- Roux,B. and R.MacKinnon. 1999. The cavity and pore helices in the KcsA K<sup>+</sup> channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 285:100-102.
- Sali,A. and T.L.Blundell. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J.Mol.Biol.* 234:779-815.
- Sauvé,R., L.Parent, C.Simoneau, and G.Roy. 1988. External ATP triggers a biphasic activation process of a calcium-dependent K<sup>+</sup> channel in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflügers Arch.* 41:469-481.
- Sauvé,R., C.Simoneau, R.Monette, and G.Roy. 1986. Single-channel analysis of the potassium permeability in HeLa cancer cells: Evidence for a calcium-activated potassium channel of small unitary conductance. *J.Membrane Biol.* 92:269-282.
- Schmid-Antomarchi,H., A.Schmid-Alliana, G.Romey, M.A.Ventura, V.Breitmayer, M.A.Millet, H.Husson, B.Moghrabi, M.Lazdunski, and B.Rossi. 1997. Extracellular ATP and UTP control the generation of reactive oxygen intermediates in human macrophages through the opening of a charybdotoxin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel. *J.Immunol.* 159:6209-6215.
- Schreiber,M. and L.Salkoff. 1997. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys.J.* 73:1355-1363.
- Schumacher,M.A., A.F.Rivard, H.P.Bachinger, and J.P.Adelman. 2001. Structure of the gating domain of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Nature* 410:1120-1124.
- Simoneau,C., D.Thuringer, S.Cai, L.Garneau, G.Blaise, and R.Sauvé. 1996. Effects of halothane and isoflurane on bradykinin-evoked Ca<sup>2+</sup> influx in bovine aortic endothelial cells. *Anesthesiology* 85:366-379.
- Singh,S., C.A.Syme, A.K.Singh, D.C.Devor, R.J.Bridges, L.C.Lambert, A.DeLuca, and R.A.Frizzell. 2001. Benzimidazolone Activators of Chloride Secretion: Potential Therapeutics for Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Bicarbonate and chloride secretion in Calu-3 human airway epithelial cells. *J.Gen.Physiol.* 296:600-611.
- Vandorpe,D.H., B.E.Shmukler, L.Jiang, B.Lim, J.Maylie, J.P.Adelman, F.L.de, M.D.Cappellini, C.Brugnara, and S.L.Alper. 1998. cDNA Cloning and Functional Characterization of the Mouse Ca<sup>2+</sup>-gated K<sup>+</sup> Channel, mIK1. Roles in regulatory volume decrease and erythroid differentiation. *J.Biol.Chem.* 273:21542-21553.

- 
- Vergara,C., R.Latorre, N.V.Marrion, and J.P.Adelman. 1998. Calcium-activated potassium channel. *Current Opinion in Neurobiology* 8:321-329.
- Warth,R., K.Hamm, M.Bleich, K.Kunzelmann, H.T.von, R.Schreiber, E.Ullrich, M.Mengel, N.Trautmann, P.Kindle, A.Schwab, and R.Greger. 1999. Molecular and functional characterization of the small Ca(2+)-regulated K<sup>+</sup> channel (rSK4) of colonic crypts. *Pflugers Arch.* 438:437-444.
- Wulff,H., G.A.Gutman, M.D.Cahalan, and K.G.Chandy. 2001. Delineation of the clotrimazole/tram-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, *ikca1*. *J.Biol.Chem.* 276:32040-32045.
- Xia,X.M., B.Fakler, A.Rivard, G.Wayman, T.Johnson-Pais, J.E.Keen, T.Ishii, B.Hirschberg, C.T.Bond, S.Lutsenko, J.Maylie, and J.P.Adelman. 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395:503-507.
- Yamamoto,Y., K.Imaeda, and H.Suzuki. 1999. Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J.Physiol.* 514 ( Pt 2):505-513.

## IV. CONCLUSIONS PRÉLIMINAIRES

Les expériences d'accessibilité du MTSET sur les résidus cystéine des différents mutants  $K_{Ca3.1}$  nous permettent de découper la structure du canal en 3 parties, en fonction du degré d'inhibition du courant par le MTSET. La première partie, correspond à la cavité interne formée d'hélices  $\alpha$  (les mutants 275C au 278C). Les résidus 275C et 278C sont accessibles et donnent une inhibition complète du canal après introduction du MTSET. Par contre les cystéines endogènes ne réagissent pas avec l'agent MTSET (sur le canal sauvage). Ce résultat s'explique facilement sur la base de notre modèle tridimensionnel du canal  $K_{Ca3.1}$ , ces résidus étant orientés vers le segment S5 et donc peu accessibles aux agents MTSET. La seconde section du canal ne réagit pas avec l'agent MTSET ou ne permet pas l'expression du mutant (résidu 279 à 281).

La troisième section du segment S6 s'étend du résidu 282 jusqu'au résidu 287. Cette section est caractérisée par une accessibilité de tous les acides aminés même si l'ajout du MTSET donne des résultats différents sur la conduction du canal : inhibition totale du courant pour le mutant A282C, une inhibition partielle pour les mutants 283C, 285C et 286C accompagnée d'une augmentation de la probabilité d'ouverture pour les mutants 283C et 286C. Le modèle tridimensionnel que nous proposons permet d'interpréter clairement les résultats d'accessibilité du MTSET quand il donne un résultat clair, comme une inhibition totale du canal (275C, 278C et 282C). Par contre il est plus difficile, sur la simple base de la position du résidu dans le modèle tridimensionnel du canal  $K_{Ca3.1}$ , d'évaluer le degré d'inhibition partielle attendu pour un résidu. Dans la suite de cette thèse et plus particulièrement dans la deuxième publication, nous allons établir une méthode permettant d'évaluer plus finement la perturbation du MTSET sur la conductance d'un canal à partir de sa représentation tridimensionnelle. Pour cette étude nous allons utiliser un canal dont la structure est connue, le canal KcsA.

## V. MÉTHODOLOGIE 2<sup>E</sup> PARTIE

Ce chapitre a pour objet d'introduire les théories et les méthodologies qui ont été utilisées pour obtenir les résultats présentés dans la deuxième publication et le chapitre « *Application aux modèles du canal  $K_{Ca3.1}$*  ».

Une absence d'effet, ou une inhibition totale du canal après introduction des agents MTS dans le milieu intracellulaire est facilement interprétable. Par contre, il devient moins évident d'interpréter les résultats expérimentaux donnant une inhibition partielle de la conduction du canal. Si nous voulons comprendre les effets des agents MTS sur la conduction des ions dans le canal  $K_{Ca3.1}$ , il nous faut incorporer les molécules MTS à notre modèle atomique et évaluer leurs effets perturbateurs sur la structure et la diffusion des ions. Dans ce chapitre, nous allons établir la méthodologie permettant de créer et d'insérer, un modèle atomique des résidus cystéine liés à une molécule MTS. Nous serons alors en mesure d'évaluer la perturbation due à la présence du MTS sur la conduction ionique et de la comparer aux mesures expérimentales.

Pour établir notre méthodologie il est souhaitable d'utiliser un canal dont la structure est connue, comme le KcsA, plutôt qu'un des modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  dont la structure n'a pas encore été validée. De plus, puisque le complexe Cystéine + MTSET a déjà fait l'objet d'une cristallographie, à la différence des autres agents MTS, il sera utilisé comme modèle pour définir tous les autres agents MTS. Les sondes, MTSET, MTSEA et MTSACE seront donc définies et liées aux cystéines de la structure cristallographique du canal KcsA. Une fois le MTSET incorporé dans le canal KcsA, nous déterminerons son effet sur la conductance du canal et nous comparerons nos résultats aux données expérimentales déjà publiées. Nous évaluerons alors si la perturbation sur le courant ionique est due à leur volume et/ou à leur charge. C'est l'objectif de la deuxième publication. Finalement nous appliquerons cette méthode sur le canal  $K_{Ca3.1}$  dans le chapitre « *Application aux modèles du canal  $K_{Ca3.1}$*  ». Nous avons utilisé deux méthodes différentes pour calculer la conduction ionique dans les canaux potassiques. La première

méthode sera utilisée dans la deuxième publication pour calculer la conduction ionique du canal KcsA. Elle se base sur des mesures expérimentales du courant du canal KcsA en fonction de la concentration extracellulaire de l'ion  $K^+$ . La seconde méthode sera utilisée pour le canal  $K_{Ca3.1}$  dans le chapitre « *Application aux modèles du canal  $K_{Ca3.1}$*  » et prend en compte le mécanisme de diffusion des ions dans le filtre de sélectivité.

## A. Création et insertion des complexes Cys-SET, SEA et SACE

Pour pouvoir simuler la position et le déplacement des atomes, il faut définir les relations qui lient tous les atomes entre eux. Les coordonnées internes définissent les distances, les angles et les angles diédraux entre chaque atome d'une molécule. Les charges partielles de tous les atomes doivent également être définies. Pour cela, nous nous référons à la publication de (A.D.Mackerell, Jr. *et al.*, 1998) qui établit comment les atomes des résidus ont été définis et intégrés au champ de force de CHARMM.

### A.1. Création des complexes Cys-SET, SEA et SACE

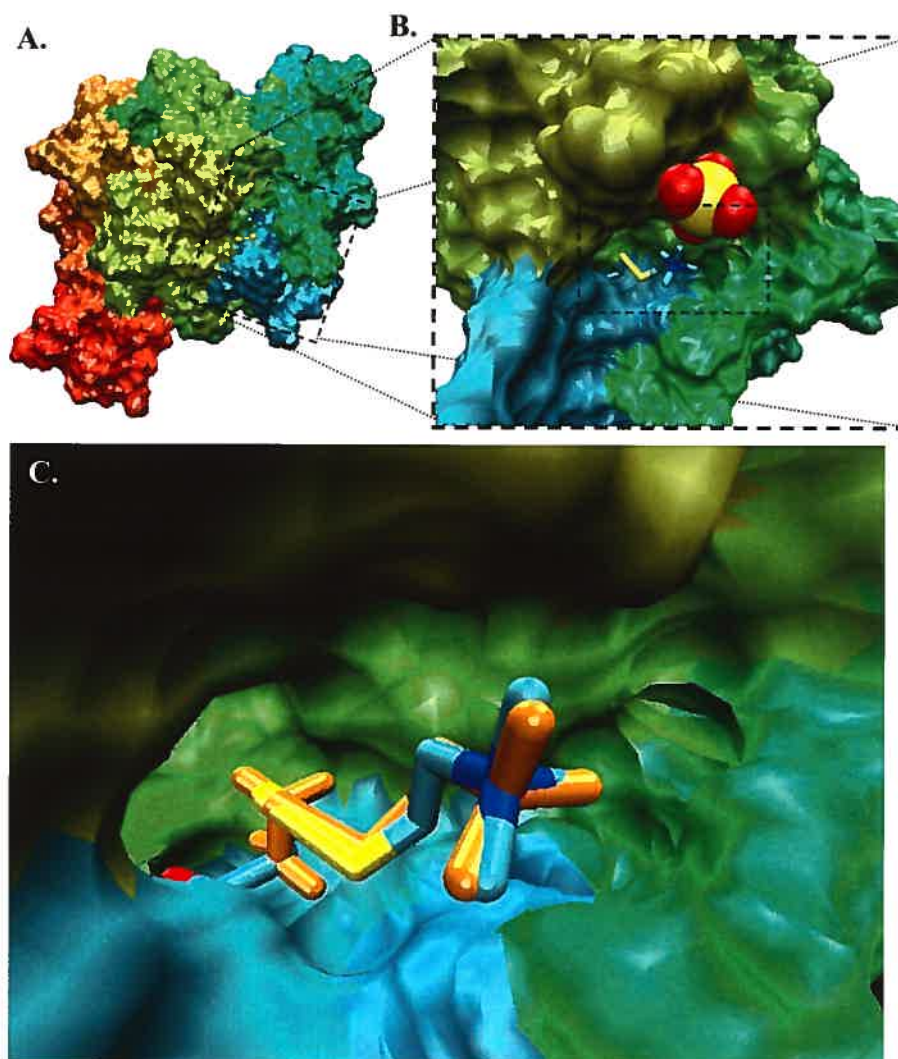
Deux structures cristallographiques de la protéine Sortase B. de la bactérie *Staphylococcus Aureus* contiennent le complexe Cysteine + MTSET (Cys-SET). L'une a une résolution de 1,75 Å (PDB:1QWZ) et contient également des molécules d'eau, trois ions nickel et un ion sulfate localisé proche du pseudo-résidu Cys-SET. Une seconde structure a été obtenue avec une résolution de 2,50 Å (PDB:1QXA) et contient également un peptide Gly3 proche du pseudo-résidu Cys-SET (Zong, Y. *et al.*, 2004). Dans ces deux structures, les atomes du complexe Cys-SET partagent les mêmes distances interatomiques, ainsi que les mêmes angles et diédraux. Ils sont également localisés dans un espace assez restreint (Figure 21). La principale différence entre ses deux structures se situe au niveau du carbone bêta et de la liaison disulfure. L'angle formé par les atomes  $\widehat{C_\beta S S}$  est égal à 150° dans le fichier de structure PDB :1QWZ à comparer à un angle de 100° pour la structure 1QXA, ce qui est plus proche de la valeur définie dans PARMM22 pour les ponts cystéine, 103,3°. Une étude plus approfondie de



l'environnement des complexes Cys-SET montre que dans la cristallographie 1QXA, le peptide Gly3 est en contact avec le complexe Cys-SET, pouvant ainsi générer des contraintes additionnelles à la configuration de ce dernier. C'est pourquoi, pour définir nos acides aminés artificiels, on choisira plutôt le fichier cristallographique 1QWZ pour extraire toutes les coordonnées internes.

Les charges partielles ont été reprises à partir des groupements d'atomes identiques déjà définis dans CHARMM. Ainsi pour le pseudo résidu Cys-SET, les valeurs des charges partielles du groupement triméthylammonium ont été reprises du résidu RESI:NC5 (un analogue du éthyl tétraméthylammonium) définie dans le fichier de paramètres PARM27 du champ de force de CHARMM. Pour cela, nous nous sommes servis des mêmes paramètres utilisés pour définir les charges partielles des résidus présents dans le fichier de paramètres PARM27 du champ de force de CHARMM (Brooks, B. R. et al, 1983).

Il n'existe pas de structures cristallographiques qui permettraient de définir les pseudo-résidus Cys-SEA et Cys-SACE. Pour les définir, nous allons utiliser les atomes du pseudo-résidu Cys-SET que partagent les pseudo-résidus Cys-SEA et Cys-SACE. Pour les autres atomes nous utiliserons les paramètres définis par défaut dans le fichier de paramètre PARM27.



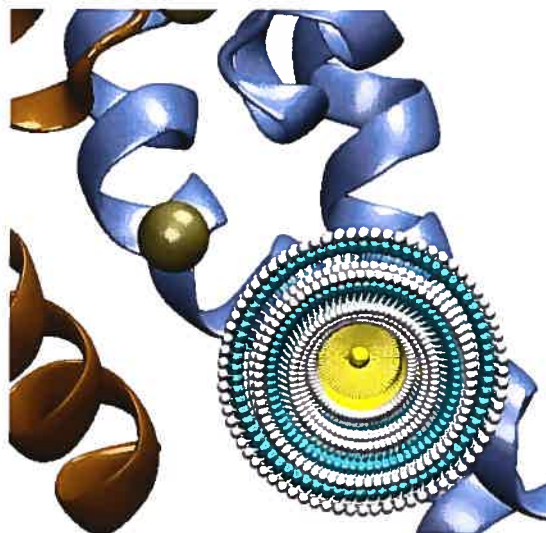
**Figure 21. Surface de la protéine Sortase B de *Staphylococcus Aureus* telle qu'elle est définie dans la structure cristallographique contenue dans le fichier PDB:1QWZ.**

A. Protéine entière, les acides aminés sont colorés dans un dégradé de couleurs commençant par le rouge pour les acides aminés de la partie N-terminale jusqu'en bleu clair pour les derniers acides aminés proches de la partie C-terminale. Les atomes du complexe Cys-SET sont représentés en mode CPK et sont agrandis sur la figure suivante B. Les atomes jaunes et rouges sont ceux d'une molécule de  $\text{SO}_4$  proche de la tête chargée du fragment SET représenté en mode licorne. C. Superposition des atomes du fragment contenu dans la cristallographie et en orange les atomes du fragment SET développé dans cette thèse.

### ***A.2. Insertion des complexes MTS sur une cystéine***

Une fois tous les atomes définis, il reste à insérer le pseudo-résidu sur une cystéine déjà présente sur une protéine. Les atomes du groupement SET (tel que défini sur la Figure 20 du chapitre précédent) sont créés et liés à l'atome de soufre de la cystéine auquel on aura préalablement supprimé l'atome d'hydrogène. L'énergie de la configuration adoptée par les atomes du pseudo résidu Cys-SET est calculée après avoir optimisé les coordonnées du modèle par minimisation d'énergie. On applique sur les atomes du groupement SET une rotation d'un angle de  $5^\circ$  autour de l'axe formé par les atomes Carbone-Soufre (voir la Figure 20). L'énergie de la configuration adoptée par le pseudo résidu est de nouveau calculée après 200 pas d'optimisation par minimisation d'énergie. Ce processus est répété pour un tour entier autour de l'axe de rotation. Une seule configuration des atomes du pseudo-résidu Cys-SET est conservée, celle de plus basse énergie. Le squelette ainsi que tous les autres atomes de la protéine à l'exception des atomes du pseudo-résidu et des atomes d'hydrogène restent immobiles lors de l'optimisation. Ce processus est utilisé pour parcourir le maximum de configurations possibles autour des atomes du résidu muté. Cela permet également d'éviter que les atomes du pseudo-résidu inséré ne se trouvent piégés dans la protéine (Figure 22). Cela peut être le cas lorsque le résidu muté est dans une région fortement encombrée par les atomes des autres résidus.

Dans le cas où plus d'un pseudo-résidu doit être inséré sur la protéine, le premier pseudo-résidu est inséré tel que décrit précédemment. Les autres pseudo-résidus Cys-SET sont par la suite insérés de manière symétrique par rapport au premier pseudo-résidu. Les pseudo-résidus sont ensuite relaxés lors d'une dynamique moléculaire de 5 ps puis optimisés par une minimisation d'énergie de 200 pas (ABNR).



**Figure 22. Superposition de toutes les configurations initiales adoptées par le pseudo-résidu Cys-SET lors de son insertion sur le résidu A282C.**

L'ion  $K^+$  en représentation de van der Waals est localisé au centre du réservoir d'un modèle du canal  $K_{Ca3.1}$  dont les résidus sont représentés en mode ruban. Cette « fleur » correspond à la superposition de 72 configurations du fragment SET du pseudo résidu Cys-SET. Chacune des configurations est obtenue par rotation de 5° autour de l'axe formé par les atomes  $C_{\beta}-S_x$ .

Durant tous les processus de dynamique moléculaire ou de minimisation, le solvant n'est pas représenté de manière explicite mais implicite par l'intermédiaire de la constante diélectrique  $\epsilon_w$  et le paramètre de friction  $\beta^{40}$ . Le paramètre  $\beta$  simule la friction exercée par le solvant sur les atomes du pseudo-résidu. Les résultats de cette méthode ainsi que sa sensibilité à la constante diélectrique seront présentés et discutés dans la publication qui suit ce chapitre.

## B. Modèle de diffusion à un ion

Nous sommes intéressés à calculer la conduction ionique à travers un modèle du canal  $K_{Ca3.1}$  avec et sans la présence des MTSET liés aux cystéines. Dans ce but, il nous faut un modèle théorique de diffusion des ions dans les canaux potassiques. Nous allons utiliser le formalisme des chaînes de Markov qui décrit le processus de diffusion d'un ion

---

<sup>40</sup> La constante diélectrique agit lors des minimisations et pendant la dynamique moléculaire, alors que le paramètre  $\beta$  n'agit que lors des dynamiques moléculaires.

par une succession de transitions entre différentes configurations des ions dans les sites de liaison. Les ions suivent une trajectoire par sauts discrets, aléatoires dans l'espace et continus en fonction du temps. Chacun des états discrets du processus de Markov définit une configuration possible d'occupation des sites de liaison par plusieurs ions ainsi que le chemin qui relie les configurations les unes aux autres. Un taux de transition définit le passage d'une configuration à une autre.

### ***B.1. Calcul du flux ionique dans un canal à un site de liaison***

La Figure 23 présente le cas simple où le canal possède un seul site de liaison S1 qui peut être occupé ou libre. Puisque le flux est le même partout dans le canal, nous le calculerons entre le milieu extracellulaire et le site de liaison S1. Soit  $C_o$  la valeur de la concentration de l'ion du côté extracellulaire,  $C_i$  la valeur de la concentration du côté intracellulaire et  $k_{12}\Delta t$  la probabilité qu'un ion occupe le site S1 depuis le milieu intracellulaire à l'intérieur d'un temps  $\Delta t$  ( $k_{12}$  est le nombre moyen de sauts par seconde pour un ion pour  $\Delta t$  qui tend vers 0) l'équation du flux d'occupation du site s'écrit :

$$P(\text{vide}, t + \Delta t) = P(\text{vide}, t)(1 - C_o\gamma k_{32}\Delta t - C_i\gamma k_{12}\Delta t) + P(\text{occupé}, t)(k_{21}\Delta t + k_{23}\Delta t) \quad (3)$$

où le terme  $\gamma$  représente ici un facteur qui tient compte de la relation entre la concentration du substrat en solution et la concentration de ce même substrat près de l'entrée du canal. L'équation différentielle s'écrit :

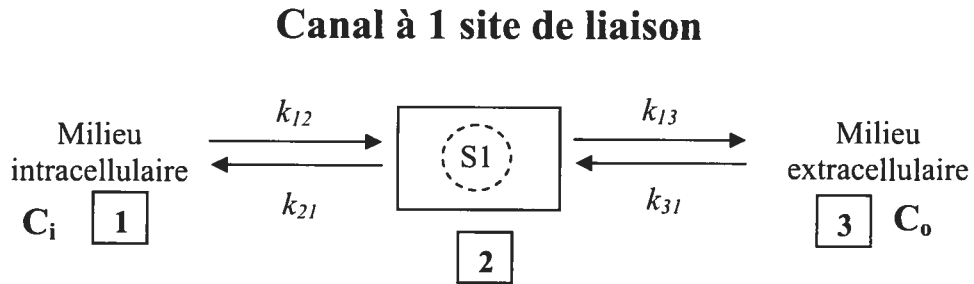
$$\frac{dP(\text{vide}, t)}{dt} = -P(\text{vide}, t)(C_o\gamma k_{32} + C_i\gamma k_{12}) + P(\text{occupé}, t)(k_{21} + k_{23}) \quad (4)$$

Les conditions du régime stationnaire imposent que :

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{dP(\text{vide}, t)}{dt} = 0 \quad (5)$$

$$P(\text{vide}, t) + P(\text{occupé}, t) = 1 \quad (6)$$

<b>Conditions du régime stationnaire</b>
<b>Système conservatif</b>



**Figure 23. Exemple d'un mécanisme de conduction d'un ion à travers un canal**

La dynamique de conduction des ions à travers le canal à un site de liaison, peut être décrite par un chemin réactionnel avec un site de liaison S1 séparant le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire. En 1 l'ion est dans le milieu intracellulaire, en 2 l'ion occupe le site de liaison S1 et enfin en 3 l'ion est présent dans le milieu extracellulaire. Des taux de transition  $k_{i,j}$  sont définis entre le site de liaison et les milieux 1 et 3.

Nous réécrivons les expressions de  $P(\text{vide})$  et  $P(\text{occupé})$  dans le cas du régime stationnaire :

$$P(\text{vide}, \infty) = \frac{k_{21} + k_{23}}{k_{23} + k_{21} + C_o \gamma k_{32} + C_i \gamma k_{12}} \quad (7)$$

de même

$$P(\text{occupé}, \infty) = \frac{C_o \gamma k_{32} + C_i \gamma k_{12}}{k_{23} + k_{21} + C_o \gamma k_{32} + C_i \gamma k_{12}} \quad (8)$$

Puisque le flux est indépendant de la position il en résulte que :

$$J = C_o \gamma k_{12} P(\text{vide}, \infty) - k_{21} P(\text{occupé}, \infty) \quad (9)$$

et

$$J = \frac{C_o \gamma k_{32} k_{13} - C_i \gamma k_{12} k_{21}}{k_{23} + k_{21} + C_o \gamma k_{32} + C_i \gamma k_{12}} \quad (10)$$

Le potentiel de Nernst est donné par l'équation

$$V_N = \frac{k_B T}{q} \ln \left[ \frac{C_o}{C_i} \right] \quad (11)$$

Nous réécrivons l'expression du flux

$$J = \frac{C_o \gamma k_{21} k_{32} \left( 1 - \frac{k_{12} k_{23}}{k_{21} k_{32}} e^{-qV_s/k_B T} \right)}{k_{23} + k_{21} + C_o \gamma k_{32} + C_i \gamma k_{12}} \quad (12)$$

Il est possible de simplifier cette expression en développant les taux de transition. La géométrie du canal et la présence de charges électriques qui pourraient influencer le mouvement de l'ion sont contenues dans les taux de transition  $k_{ij}$ . L'expression du taux de transition  $k_{i,j}$  est donnée par la théorie du taux absolu de réaction pour passer de l'état  $i$  à l'état  $j$  :

$$k_{ij} = \nu e^{-\Delta G_{i,j}/k_B T} e^{-q\Delta\psi_{i,j}/k_B T} \quad (13)$$

Les termes  $\Delta G_{i,j}$  représentent la barrière d'énergie à surmonter pour un ion passant du site  $i$  au site  $j$ . Les termes  $\Delta\psi_{i,j}$  représentent la différence du potentiel transmembranaire entre le site de liaison  $i$  et le sommet de la barrière d'énergie précédent le site  $j$ .  $k_B T$  est l'énergie thermique de l'ion à la une température  $T$  donnée. Le facteur pré exponentiel  $\nu$  est le facteur de transition universel<sup>41</sup> indépendant du potentiel. Le potentiel transmembranaire  $\Delta\psi_{i,j}$  a pour effet de modifier le taux de transition entre l'état occupé et l'état libre. Le principe de microréversibilité impose, en absence de gradient de concentration et de gradient de potentiel membranaire, que le produit des taux de transition décrivant un chemin fermé soit égal au produit des taux de transition du chemin dans le sens inverse. Dans un modèle à un ion la condition de microréversibilité entre les états de configuration [S1 libre] et [S1 occupé] s'écrit selon l'équation suivante.

**Condition de microréversibilité**

$$\frac{k_{32} k_{21}}{k_{23} k_{12}} = e^{-qV/k_B T} \quad (14)$$

$V$  est le potentiel membranaire  
 $k_B$  la constante de Boltzmann  
 $T$  la température  
 $q$  la charge de l'ion  
 $k_X$  sont les taux de transition définis à la Figure 23

<sup>41</sup> Dans la théorie des états de transition, ce facteur est égal à  $\kappa k_b T/h$  mais son évaluation dans les liquides fait l'objet de beaucoup de discussion. Ce terme est à relié à la facilité de mobilité de l'ion (interaction avec les autres atomes...). Le facteur pré exponentiel est souvent un facteur arbitraire.

De l'équation (10) et (14), nous en déduisons une nouvelle expression du flux :

$$J = \frac{\gamma k_{21} k_{32} C_o \left(1 - e^{(V-V_v)q/k_b T}\right)}{k_{23} + k_{21} + C_o \gamma k_{32} + C_i \gamma k_{12}} \quad (15)$$

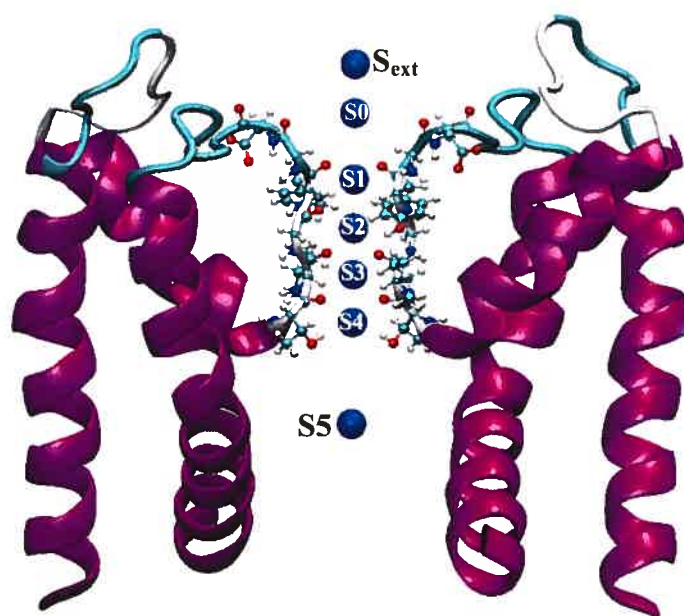
## C. Détermination de la conduction dans le canal $K_{Ca3.1}$

Dans ce chapitre, nous allons développer la théorie de conductance pour l'appliquer aux canaux potassiques et plus particulièrement aux modèles du canal  $K_{Ca3.1}$ .

### C.1. Sites d'occupation des ions $K^+$ dans un canal potassique

La région du pore des canaux potassiques possède 7 sites de liaison aux ions  $K^+$  numérotés de  $S_{ext}$  dans le milieu extracellulaire à S5 au centre du canal (Zhou, Y. *et al*, 2001). Chacun de ces sites de liaison correspond à une position d'équilibre qu'occupent les ions  $K^+$  durant le processus de diffusion à travers le canal. Les sites S1 à S4 sont présents dans le filtre de sélectivité, les sites  $S_{ext}$  et S0 sont situés dans le vestibule extracellulaire alors que le site de liaison S5 est localisé dans la cavité centrale du canal. Plusieurs ions sont présents simultanément dans le filtre de sélectivité. Nous sommes alors dans le cadre d'une diffusion multi-ions, où les ions peuvent interagir les uns avec les autres.



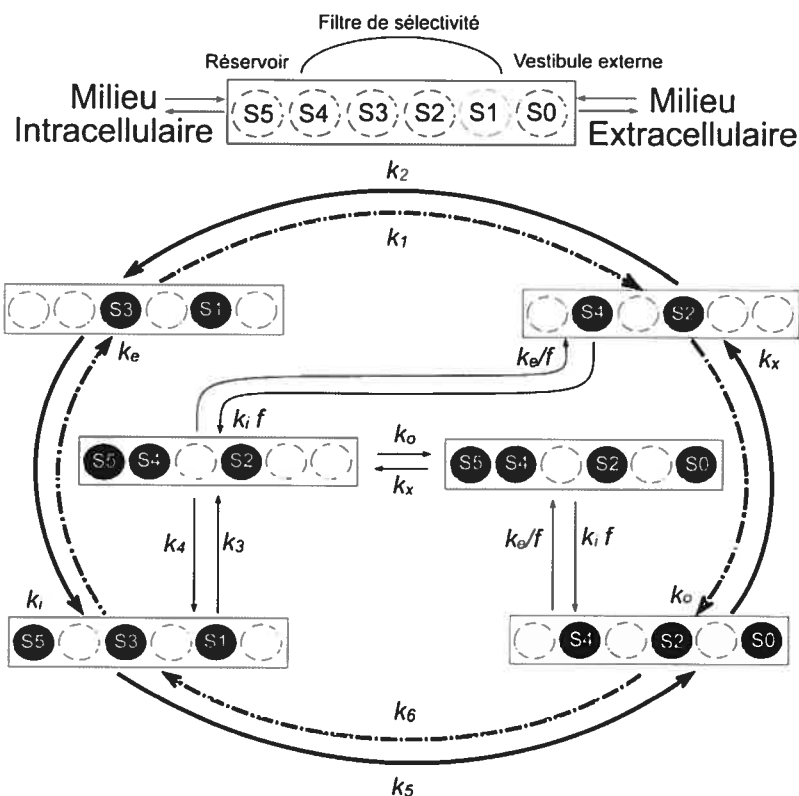


**Figure 24. Représentation atomique des sites de liaison des ions  $K^+$  dans le modèle de canal de  $K_{Ca}3.1$ .**

Le modèle du canal  $K_{Ca}3.1$ , réalisé avec la structure du canal MthK, est représenté sous forme de rubans et les atomes des résidus du filtre de sélectivité (résidu 250 à 255) sont représentés sous leur forme atomique (CPK). Tous les sites de liaison de  $S_{ext}$  à  $S_5$  sont représentés par une sphère bleue de 1 Å de rayon.

### ***C.2. Conduction « multi-ions » : formalisme de Markov***

Nous étudions maintenant une diffusion à la file indienne avec plusieurs ions simultanément présents dans le canal. Nous allons également utiliser le formalisme des chaînes de Markov qui décrit le processus de diffusion d'un ion par une succession de transitions entre différentes configurations des ions dans les sites de liaison.



**Figure 25. Mécanisme cinétique de conduction d'un ion  $K^+$  à travers un canal potassique.**

La dynamique de conduction des ions à travers le canal, peut être décrite par une succession de configurations représentant les états d'occupation des sites de liaison qui débute par l'occupation du site S5 et finit par l'occupation du site S0 pour les ions provenant du milieu intracellulaire (flux sortant). Inversement pour les ions provenant du milieu extracellulaire le cycle débute par l'occupation du site S0 et finit par l'occupation du site S5 pour pénétrer dans la cellule (flux entrant). Cette figure est inspiré de la publication de (Banderali, U. *et al.*, 2004).

La Figure 25, définit les configurations possibles d'occupation des sites de liaison (S0 à S5) par plusieurs ions ainsi que les chemins qui les relient les configurations les unes aux autres. Un taux de transition définit le passage d'une configuration à une autre. Le modèle cinétique de la Figure 25 présente l'essentiel du mécanisme de diffusion des ions  $K^+$  dans un canal potassique tel qu'il a été décrit dans les travaux de Bernèche et Roux (2003), pour le canal KcsA pour des concentrations ioniques compatibles avec les concentrations expérimentales (une solution de 140mM de KCl). C'est également ce modèle qui a déjà été utilisé par notre laboratoire dans la publication du Dr. U. Banderali

*et al.* (2004), pour décrire la cinétique du canal  $K_{Ca3.1}$ . Selon ce modèle, le courant sortant correspond à la séquence de configuration des ions  $[S3,S1] \leftrightarrow [S5,S3,S1] \leftrightarrow [S4,S2,S0] \leftrightarrow [S4,S2]$  puis retour à la configuration  $[S3,S1]$ . Un  $K^+$  peut tenter de sortir du canal pour autant qu'il atteigne un des sites de liaison situés à une des extrémités du canal (S0 ou S5). La diffusion d'un  $K^+$ , provenant du milieu intracellulaire jusqu'au centre du canal (S5), correspond respectivement aux états  $[S3,S1]$  et  $[S5,S3,S1]$ . Pour les configurations  $[S5,S4,S2]$  et  $[S5,S4,S2,S0]$ , le modèle considère également la possibilité de l'occupation du site S5 quand le site S4 est occupé. Un facteur d'interaction noté  $f$  (avec  $f < 0$ ) a pour ce cas été introduit, pour tenir compte du changement dans les taux d'entrée et de sortie  $k_i$  et  $k_e$  due à la présence d'un  $K^+$  en S4.

Dans l'hypothèse de l'état stationnaire, le flux dans le canal de type sauvage, calculé entre les configurations  $[S4,S2]$  et  $[S3,S1]$ , est donné par la relation suivante.

$$J = k_2 P[S4,S2] - k_1 P[S3,S1] \quad (16) \quad J \text{ est le flux net d'ion}$$

Où  $P[S4,S2]$  et  $P[S3,S1]$  sont respectivement les probabilités que le système soit dans la configuration  $[S4,S2]$  ou dans la configuration  $[S3,S1]$ . La constante  $k_1$  définit le taux de transition entre la configuration  $[S4,S2]$  et  $[S3,S1]$ . Inversement  $k_2$  est le taux de transition entre la configuration  $[S3,S1]$  et  $[S4,S2]$ . Les expressions du flux  $J$  calculées pour chaque état de configuration des ions présenté à la Figure 25, donne un système à 6 équations. Les conditions de microréversibilité réduisent les dimensions du système d'équation et imposent les conditions liant les différents taux de transition. Le principe de microréversibilité impose que le produit des taux décrivant un chemin fermé, comme par exemple  $[S5,S3,S1] \leftrightarrow [S5,S4,S2]$  et  $[S3,S1] \leftrightarrow [S4,S2]$ , soit égal au produit des taux de transition du chemin dans le sens inverse (en absence de gradient de concentration et de potentiel membranaire). La condition de microréversibilité entre les états de configuration  $[S3,S1]$  et  $[S5,S3,S1]$  s'écrit selon l'équation suivante.

**Condition de microréversibilité pour le système à la Figure 25**

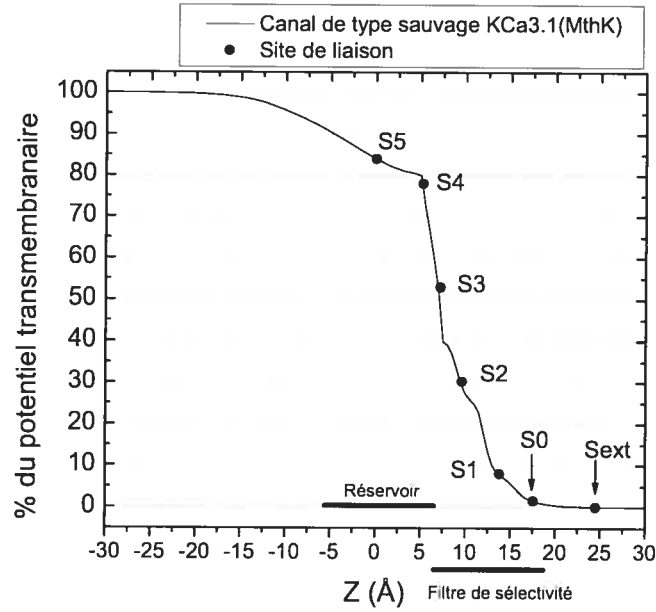
$$\frac{k_e k_1 k_0 k_6}{k_i k_3 k_x k_2} = e^{-(V-V_N)/k_B T} \quad (17)$$

$V_N$  est le potentiel d'équilibre de l'ion.  
 $V$  est le potentiel membranaire  
 $k_B$  la constante de Boltzmann  
 $T$  la température  
 $k_X$  sont les taux de transition définie à la Figure 25

Comme nous l'avons vu dans la relation (13), les taux de transition dépendent de la différence de potentiel entre les deux configurations qu'ils relient.

### ***C.3. Dépendance en voltage des taux de transition***

Le profil du potentiel membranaire est intégré au modèle cinétique. La Figure 26 présente la variation du potentiel électrique le long de l'axe de diffusion des ions ( $Z$ ) calculée dans le modèle du canal  $K_{Ca3.1}$ (MthK). La différence de potentiel entre la cavité ( $z = 0 \text{ \AA}$ ) et le milieu cytosolique ( $z = -30 \text{ \AA}$ ) est inférieure à 16% du potentiel membranaire alors que près de 80% de la chute de potentiel est localisé au niveau du filtre de sélectivité. La variation du potentiel entre les différents sites de liaison des ions  $K^+$  présents dans le filtre de sélectivité [S2-S1], [S3-S2] et [S4-S3] est de l'ordre de 23 % du potentiel transmembranaire total. Les plus faibles variations du potentiel sont entre les sites S0 et S1 avec une variation de 5% et entre les sites de liaison S0 et Sext où aucune variation du potentiel n'est prédite. La variation du potentiel entre le site liaison présent dans le filtre de sélectivité S4, et le site de liaison présent au centre du réservoir (S5) est de 10 %. Nous n'avons pas observé de variation significative du potentiel transmembranaire pour les mutants cystéine du canal  $K_{Ca3.1}$  par rapport au profil du canal de type sauvage avec et sans les agents MTS insérés sur les cystéines.



**Figure 26. Variation du potentiel membranaire au travers du pore du canal potassique  $K_{Ca}3.1(MthK)$ .**

Le potentiel transmembranaire a été calculé avec le module PBEQ du logiciel CHARMM où toutes les charges des atomes et des ions ont été fixées à 0. Figure inspirée de la publication du Dr. U. Banderali *et al.* (2004).

Nous utiliserons donc ces valeurs pour tous les modèles du canal  $K_{Ca}3.1(MthK)$  mutant. Le système d'équation suivant décrit la dépendance en voltage des taux de transition présentés à la Figure 25.

$$\begin{aligned}
 k_1 &= k_1(0) e^{-0.23qV/k_B T} & k_6 &= k_6(0) e^{-(\alpha/2-0.23)qV/k_B T} \\
 k_2 &= k_2(0) e^{0.23qV/k_B T} & k_i &= k_i(0) e^{0.5(1-\alpha)qV/k_B T} \\
 k_3 &= k_3(0) e^{-0.23qV/k_B T} & k_e &= k_e(0) e^{-0.5(1-\alpha)qV/k_B T} \\
 k_4 &= k_4(0) e^{0.23qV/k_B T} & k_o &= k_o(0) \\
 k_5 &= k_5(0) e^{(\alpha/2-0.23)qV/k_B T} & k_x &= k_x(0)
 \end{aligned} \tag{18}$$

Le potentiel membranaire ressenti par un ion en S3 est de l'ordre de  $0,53V$  (où  $V$  est le potentiel membranaire) et de  $0,08V$  en S1 (Figure 26). Le potentiel ressenti par la configuration [S3,S1] est de  $0,61V$ . De la même manière on déduit de la Figure 26 que le

potentiel ressenti par la configuration [S4,S2] est de  $1,08V$ . La différence de potentiel entre ces deux configurations est de  $0,47V$ . On suppose également que la variation du potentiel est symétrique. Les taux de transition  $k_1$  et  $k_2$  contiennent alors une variation de 23 % du potentiel membranaire total. Il en est de même pour les taux de transition  $k_2$  et  $k_3$ .  $\alpha$  représente la fraction du potentiel membranaire entre le site de liaison S5 et le milieu extracellulaire. Il est introduit pour tenir compte du mouvement des ions entre le site de liaison S5 et S0 (Figure 25) dans les taux de transition  $k_5$  et  $k_6$ . Il est également introduit dans les taux de transition  $k_i$  et  $k_e$  pour tenir compte du mouvement des ions dans le site de liaison S5 depuis le milieu intracellulaire. Les taux de transition  $k(0)$  sont calculés pour une différence du potentiel membranaire nulle avec  $\alpha=0,84$ .

#### C.4. Dépendance en énergie des taux de transition

L'expression générale des taux de transitions donnée par l'équation (13) relie également le taux de transition avec l'énergie des configurations. Pour les taux de transition  $k_e$  et  $k_i$  la dépendance en énergie est donnée par (Agmon, N. *et al.*, 1983; Berneche, S. *et al.*, 2003) et s'écrit selon l'équation suivante (Stephan, W. *et al.*, 1983).

$$k_e(0) = k_e^0 e^{-\frac{W[S5,S3,S1]-W[S3,S1]}{2k_B T}} \quad (19) \quad \begin{array}{l} k_B \\ T \\ q \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{la constante de} \\ \text{Boltzmann} \\ \text{la température} \\ \text{la charge de l'ion} \end{array}$$

$$k_i(0) = S k_i^0 e^{-\frac{W[S3,S1]-W[S5,S3,S1]}{2k_B T}} \quad (20)$$

où  $S$  une constante qui rend compte du nombre d'ions présents à l'entrée du pore par mole d'ions en solution. Ici les taux de transition  $k_e^0$  et  $k_i^0$  représentent le nombre de fois que l'ion se présente à la barrière.  $W[S5,S3,S1]$  correspond à l'énergie libre du canal lorsque les ions sont dans la configuration [S5,S3,S1] et  $W[S3,S1]$  à l'énergie libre du canal lorsque les ions sont dans la configuration [S3,S1]. La différence d'énergie  $W[S5,S3,S1]-W[S3,S1]$  définit alors l'énergie libre de solvation nécessaire pour transférer un ion provenant du milieu intracellulaire vers le site de liaison S5 quand les ions dans le filtre de sélectivité sont dans la configuration [S3,S1]. Cependant, les taux d'entrée dans le canal du milieu intracellulaire vers le site de liaison S5 et du milieu

extracellulaire vers le site S0, sont respectivement liés à la concentration du milieu intracellulaire  $C_i$  et extracellulaire  $C_o$  de sorte que les taux  $k_i$  et  $k_o$  (Figure 25) correspondent à un nombre de transition par seconde par mol alors que  $k_e$  est un nombre de transition par seconde. Ainsi  $C_i k_i$  correspond au taux d'entrée pour qu'un ion provenant du milieu intracellulaire soit présent en S5 et  $k_o C_o$  le taux d'entrée d'un ion extracellulaire en S0. Les expressions (19) et (20) correspondent au formalisme développé par Stephan *et al.* (1983). Pour le site de liaison S0 nous avons :

$$k_x(0) = k_x^0 e^{-(W[S4,S2]-W[S4,S2,S0])/2k_B T} \quad (21)$$

$$k_o(0) = S k_o^0 e^{-(W[S4,S2,S0]-W[S4,S2])/2k_B T} \quad (22)$$

Ici la différence d'énergie entre les configurations [S4,S2] et [S4,S2,S0] définit l'énergie nécessaire pour transférer un ion provenant du milieu extracellulaire (correspondant à un ion à l'infini) au site de liaison S0 localisé à l'entrée extracellulaire du canal. Pour un ion, cette différence d'énergie est dominée par la force électrostatique et peut être interprétée comme la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation d'un ion. Pour simplifier les expressions des équations nous exprimons la différence d'énergie en terme d'une différence d'énergie libre de solvation  $\Delta G_{elec}^{wt}(z_{S5})$ .

$$\Delta \Delta G_{elec}^{wt}(z_{S5}) = W_{wt}[S3,S1] - W_{wt}[S5,S3,S1] \quad (23)$$

$$\Delta \Delta G_{elec}^{wt}(z_{S0}) = W_{wt}[S3,S1] - W_{wt}[S3,S1,S0] \quad (24)$$

La différence d'énergie libre  $\Delta \Delta G_{elec}^{wt}$  calculée entre les différentes configurations sera développée plus en avant dans ce chapitre.

### C.5. Calcul des taux de transition $k^0$

Des relations (21) et (22) nous en déduisons l'expression des taux de transitions  $k_e^0$  et  $k_i^0$ .

$$k_e^0 = k_e(0) e^{-\Delta\Delta G_{elec}^{wt}(z_{SS})/2k_B T} \quad (25)$$

$$Sk_i^0 = k_i(0) e^{\Delta\Delta G_{elec}^{wt}(z_{SS})/2k_B T} \quad (26)$$

Les valeurs de  $k_e(0)$  et  $k_i(0)$  sont calculées en ajustant les paramètres  $k_e(0)$ ,  $k_i(0)$ ,  $k_o(0)$ ,  $k_x(0)$ ,  $k_1(0)$ ,  $k_2(0)$ ,  $k_3(0)$ ,  $k_4(0)$ ,  $k_5(0)$  et  $k_6(0)$  pour reproduire la courbe expérimentale courant-voltage du canal sauvage à partir de l'équation (16). En connaissant les valeurs de  $k_e(0)$  et  $k_i(0)$  de même que  $\Delta\Delta G_{elec}^{wt}$  nous pouvons dès lors obtenir une estimation des taux de transition intrinsèques  $k_e^0$  et  $Sk_i^0$ . Ces valeurs seront utilisées pour calculer les taux  $k_e^{MTS}(0)$  et  $k_i^{MTS}(0)$  en conditions où le profil d'énergie aura été modifié par la présence du MTS. En effet, les probabilités des différents états du système contiennent à eux seules toutes les variables physiques qui caractérisent la diffusion dans le canal potassique. Elles s'expriment en fonction des tous les autres paramètres du système ; les taux de transition, la variation du potentiel transmembranaire, les énergies des configurations et les concentrations ioniques  $C_o$  et  $C_i$ . Leurs expressions seront déduites du système d'équations. Nous avons utilisé Mathematica pour résoudre ce système d'équations.

### C.6. Détermination de l'influence des agents MTS sur le courant ionique

En présence d'un mutant cystéine du canal K<sub>Ca</sub>3.1 sur lequel des agents MTS ont été insérés, les taux de transfert  $k_e^{MTS}$  et  $k_i^{MTS}$  s'écrivent selon les équations suivantes.

$$k_e^{MTS} = k_e^0 e^{-\Delta\Delta G_{elec}^{MTS}(z_{SS})/2k_B T} \quad (27) \quad k_B \text{ la constante de Boltzmann}$$

$$k_i^{MTS} = k_i(0) e^{\Delta\Delta G_{elec}^{MTS}(z_{SS})/2k_B T} \quad (28) \quad T \text{ la température}$$

où les taux de transferts  $k_e^0$  et  $k_i^0$  ont été développés en utilisant les expressions données aux équations (25) et (26). Comme le suggèrent les équations (27) et (28), la détermination des taux de transition  $k_e^{MTS}$  et  $k_i^{MTS}$  impose de connaître la valeur des taux de transition dans le canal K<sub>Ca</sub>3.1 de type sauvage et la différence d'énergie libre de



solvation pour les configurations [S3,S1] et [S5,S3,S1] en présence des MTS. Le calcul de ces variables va être développé dans les paragraphes suivants.

## D. Calcul de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation

Dans les paragraphes précédents, nous avons démontré l'utilité du calcul du profil d'énergie libre de solvation d'un ion  $K^+$  pour en déduire la conduction ionique. Ce profil d'énergie correspond à l'énergie que doit fournir l'ion pour traverser le canal. Dans cette partie, nous allons rappeler la définition de l'énergie libre et détailler la méthode de calcul choisie.

### D.1. Calcul de l'énergie libre

L'énergie libre est une variable thermodynamique. Elle est exprimée par la fonction de Helmholtz ( $A$ ) ou avec la fonction de Gibbs ( $G$ ). L'énergie libre de Helmholtz est appropriée pour des systèmes constants en nombre de particules (NVT), en température et en volume alors que l'énergie libre de Gibbs est appropriée pour un système constant en particules, température et pression (NPT). Dans notre cas, c'est l'expression de Gibbs qui s'applique.

$$G(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) = k_B T \ln \left( \iint d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N e^{-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)/k_B T} \rho(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) \right) \quad (29)$$

$\mathbf{p}$  quantité de mouvement  
d'un atome  
 $\mathbf{r}$  position d'un atome  
 $H$  énergie interne  
 $N$  indice des atomes  
 $\rho$  dégénérescence des états

Le calcul de la valeur absolue de l'énergie libre est difficile (voire impossible), car cela suppose de connaître l'expression de l'énergie interne  $H$  du système à l'équilibre. Même en utilisant les simulations dynamiques, il est difficile de connaître l'énergie d'équilibre correspondant au minimum d'énergie absolue dans un profil énergétique comprenant de nombreux minima locaux. Ceci est particulièrement vrai pour de grosses molécules où le nombre d'atomes augmente le nombre de variables. Il est par contre

possible de calculer une différence d'énergie libre entre deux systèmes proches. Nous définissons  $H_X$  comme l'énergie interne du système d'atomes  $X$  et  $H_Y$  l'énergie interne du système d'atomes  $Y$ . Si le système  $X$  et le système  $Y$  ne diffèrent que par l'introduction d'une petite perturbation<sup>42</sup>, nous pouvons alors supposer que la différence d'énergie entre les deux systèmes n'est due qu'à cette perturbation. Nous calculons donc toujours des différences d'énergie qui peuvent s'écrire selon l'équation suivante.

$$\Delta G(x \rightarrow y) = G(y) - G(x) = -k_B T \ln \left\langle e^{-(H_X - H_Y)/k_B T} \right\rangle_{(x)} \quad (30)$$

De la même manière, pour calculer la contribution électrostatique à l'énergie libre d'un soluté, le paramètre de couplage  $\lambda$  est introduit sur la charge des atomes. Nous calculons la différence d'énergie induite par une variation de la charge du soluté passant de 0 (avec  $\lambda=0$ ) à  $q$  (avec  $\lambda=1$ ) par une incrémentation de 0,1 du paramètre  $\lambda$ . Une dynamique moléculaire de 15 ps est réalisée entre chaque incrémentation du paramètre  $\lambda$ . Cette méthode classique de calcul de l'énergie libre sera utilisée dans la seconde publication pour calculer la contribution électrostatique à l'énergie libre des pseudo-résidus.

## ***D.2. Énergie libre de solvation***

L'énergie de solvation correspond au travail thermodynamique réversible pour transférer un soluté du vide vers l'intérieur d'une phase aqueuse infinie. Cette énergie est utilisée pour repousser les molécules du solvant et créer une cavité pouvant recevoir la molécule étudiée (ou un ion). Une fois la molécule dans le solvant, sa présence va générer des interactions avec le solvant qui va se réorganiser autour de la molécule pour minimiser les énergies d'interaction. Ce sont ces différentes composantes de l'énergie libre de solvation que décrit l'équation suivante.

---

<sup>42</sup> Attention  $x$  et  $y$  n'ont pas forcément la dimension d'une distance. Cela peut être n'importe quelle des variables du système que l'on étudie (comme la charge d'un atome par exemple).

$$\Delta G = \Delta G_{cavité} + \Delta G_{VDW} + \Delta G_{élec} \quad (31)$$

Le premier terme  $\Delta G_{cavité}$ , correspond à la contribution stérique pour créer une cavité dans le solvant. Dans le cas de l'eau, c'est l'énergie nécessaire pour écarter les molécules d'eau afin d'obtenir un espace vide correspondant au volume de la molécule que l'on introduit. Une fois la molécule dans la cavité, l'interaction de dispersion de van der Waals  $\Delta G_{VDW}$  est une interaction favorable à la solvation. Cette interaction a un coût énergétique qui est contenu dans le terme. Finalement, les atomes du solvant et du soluté possèdent des charges partielles qui vont interagir et imposer une réorganisation du solvant autour de la molécule. Cette réorganisation du solvant dépend de l'interaction électrostatique et va donc également donner lieu à un coût énergétique qui est contenu dans le terme  $\Delta G_{élec}$ . Dans le cas de l'eau, il y aura une réorganisation des liaisons oxygène-hydrogène des molécules d'eau entre elles et avec le soluté. La réorganisation des molécules du solvant et donc l'énergie libre de solvation dépend aussi bien de la forme et de la charge du soluté que des propriétés du solvant qui l'entoure.

Différentes méthodes numériques permettent de calculer une différence d'énergie libre pour un système de particules. Les deux méthodes les plus connues et couramment utilisées sont le calcul de la différence d'énergie libre par intégration thermodynamique et par perturbation thermodynamique. Ces méthodes nécessitent de nombreuses simulations numériques, en présence d'un système complet d'atomes où le solvant et les lipides sont représentés de manière explicite. Dans notre cas, c'est-à-dire pour un canal inséré dans une membrane lipidique, cela représente un nombre important d'atomes (supérieur à 10 000 atomes). Un nombre important d'atomes peut être un handicap insurmontable eu égard au temps de calcul nécessaire. Les paragraphes suivants développent cet aspect et introduisent une autre méthode de calcul de l'énergie libre de solvation basée sur une représentation continue du solvant et des lipides.

### D.3. Rappel sur le principe de la dynamique moléculaire

Lorsque l'on ignore les effets quantiques, chaque atome d'une molécule est considéré comme une masse ponctuelle dont le mouvement est déterminé par l'ensemble des forces exercées par tous les autres atomes en fonction du temps. Les intervalles de temps (ou pas d'intégration notés  $\Delta t$ ) de chaque cycle de dynamique sont suffisamment courts, environ 0,2 fs pour que l'on puisse considérer les forces inter atomiques constantes. Les simulations de dynamique moléculaire introduisent donc la dimension du temps dans l'étude des molécules. Cette évolution temporelle (trajectoire) d'une molécule est décrite par les équations de mouvement de Newton.

$$m_i \mathbf{a}_{i,t} = -\nabla U(\mathbf{r}_{1,t}, \mathbf{r}_{2,t}, \dots, \mathbf{r}_{N,t}) \quad (32)$$

$\mathbf{a}_i$  est le vecteur accélération de la particule  $i$   
 $\mathbf{r}_{i,t}$  est le vecteur position de la particule  $i$   
à l'instant  $t$ .  
 $U$  la fonction énergie potentielle  
 $m_i$  la masse de la particule  $i$   
 $N$  le nombre d'atome du système

où la fonction d'énergie potentielle  $U$  dépend de la position de chacun des atomes et contient toutes les interactions pertinentes du système étudié. La position de la particule  $i$  à l'instant  $t+\Delta t$  est déduite de l'accélération  $\mathbf{a}_i$  et de la position de la particule  $i$  à l'instant  $t+\Delta t$  et  $t-\Delta t$ . Cette équation, appelée algorithme de Verlet, est obtenue en faisant la somme de deux développements limités de Taylor à l'ordre 2 de la position, de la particule  $i$  au temps  $t+\Delta t$  et au temps  $t-\Delta t$ .

$$\begin{aligned} \mathbf{r}_{i,t+\Delta t} &= \mathbf{r}_{i,t} + \mathbf{v}_{i,t}\Delta t + \frac{\mathbf{F}_{i,t}\Delta t^2}{2m_i} \\ \mathbf{r}_{i,t-\Delta t} &= \mathbf{r}_{i,t} - \mathbf{v}_{i,t}\Delta t + \frac{\mathbf{F}_{i,t}\Delta t^2}{2m_i} \end{aligned} \quad (33)$$

$\mathbf{r}_i$  est le vecteur position de la  
particule  $i$  à l'instant  $t$   
 $\mathbf{v}_i$  est le vecteur vitesse de la  
particule  $i$  à l'instant  $t$   
 $\mathbf{F}_{i,t}$  la force exercée sur l'atome  $i$  à  
l'instant  $t$   
 $m_i$  la masse de la particule  $i$   
 $\Delta t$  le pas d'intégration (le plus  
petit intervalle de temps)

De l'addition de ces deux équations, on en déduit la position de la particule à l'instant  $t+\Delta t$ .

$$\mathbf{r}_{i,t+\Delta t} = 2\mathbf{r}_{i,t} - \mathbf{r}_{i,t-\Delta t} + \frac{\mathbf{F}_{i,t}\Delta t^2}{m_i} \quad (34)$$

L'inconvénient de cette méthode est le nombre important de degrés de liberté qui augmentent très vite avec le nombre de particules. Le calcul de la force  $\mathbf{F}$  implique un très grand nombre d'interactions inter atomiques. Plus le nombre d'atomes est important et plus la simulation va être longue à calculer. Dans le cadre d'une simulation d'un canal ionique, ces techniques nécessitent un temps important de calcul quand les molécules d'eau ainsi que les lipides sont explicitement représentés. De plus, la diffusion d'un seul ion à travers un canal potassique demande des dynamiques moléculaires d'au moins 5 à 10 ns. Ce qui peut représenter plusieurs jours de calcul, même avec des ordinateurs rapides. Il est également difficile à partir des trajectoires simulées des atomes, d'en déduire les principes fondamentaux qui caractérisent le système d'atomes ou le processus de diffusion. Ils nous a donc fallu limiter le nombre de degré de liberté sans altérer les variables microscopiques (*i.e.* la position des atomes) à partir desquelles il nous sera possible d'extraire des variables macroscopiques mesurables. Une méthode de calcul de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation basée sur le modèle continu de Born et prenant en compte la forme de la surface de la protéine a été tout d'abord développée par les Drs. Wastson et Warwicker en 1983. La contribution du laboratoire du Dr. Benoît Roux a été de définir les rayons de Born avec une fonction de distribution radiale (Nina, M. *et al.*, 1997; Nina, M. *et al.*, 1999). Cette méthode représente le solvant et la membrane par des constantes diélectriques ce qui lui permet d'être plus rapide devant les méthodes qui tiennent compte de manière explicite les atomes du solvant et de la membrane. Nous réduisons ainsi le nombre d'atomes présents dans notre système. De plus, puisque nous étudions la solvation d'un ion  $\text{K}^+$ , il est possible de déduire la contribution électrostatique à l'énergie de solvation en résolvant l'équation de Poisson-Boltzmann plutôt qu'en réalisant de longues dynamiques moléculaires. C'est cette méthode que nous avons utilisée pour calculer le profil de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation d'un ion qui pénètre dans un canal potassique. Dans les

paragraphe qui suivent nous allons détailler cette théorie en commençant par le modèle de Born tel qu'il a été développé par Max Born en 1920.

#### ***D.4. Le modèle continu de Born***

Selon le modèle de Born (Born, M. Z., 1920), la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation d'un ion entouré d'eau est égale à :

$$\Delta G_{elec} = \frac{1}{2} \frac{q^2}{R_{ion}} \left( \frac{1}{\epsilon_w} - 1 \right) \quad (35)$$

$\epsilon_w$  est la constante diélectrique de l'eau  
 $q$  est la charge de l'ion  
 $R_{ion}$  est le rayon de Born de l'ion

où  $q$  est la charge de l'ion,  $R_{ion}$  son rayon de Born et  $\epsilon_w$  la constante diélectrique (une constante macroscopique) de l'eau liquide. Cette expression correspond à un travail électrostatique réversible nécessaire pour charger un ion dans un milieu diélectrique. Une simple application du modèle de Born indique que la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation pour un ion est de l'ordre de 100 kcal/mol en accord avec les résultats expérimentaux. Le succès du modèle de Born démontre ainsi que **l'énergie libre de solvation d'un ion dans l'eau est largement dominée par la contribution électrostatique** provenant de la polarisation du puissant solvant diélectrique qu'est l'eau. Le modèle de Born a ensuite été étendu par Kirkwood (Kirkwood, J. G., 1934) et Onsager (Onsager, L., 1936) pour l'appliquer à une distribution de charge arbitraire à l'intérieur d'une cavité sphérique.

#### ***D.5. Une vision microscopique du modèle de Born***

Nous souhaitons étendre le modèle de Born pour des molécules ayant de nombreux atomes, comme les protéines. À cette fin nous allons maintenant nous intéresser au sens de la constante diélectrique et à sa signification à une échelle microscopique.

La constante diélectrique est introduite pour tenir compte de l'atténuation exercée par le solvant au potentiel électrique associé à une charge. L'eau est un solvant avec un

dipôle très puissant. Les charges partielles distribuées sur les atomes d'hydrogène et l'atome d'oxygène orientent la molécule d'eau en fonction des autres charges présentes dans son environnement immédiat incluant les atomes des autres molécules d'eau. Les valeurs du rayon de Born ne dépendent donc pas uniquement des propriétés de l'ion lui-même mais également du solvant. La contribution électrostatique de l'énergie libre de solvation peut être calculée comme le travail réversif nécessaire pour charger un ion plongé dans le solvant selon l'intégration thermodynamique de Kirkwood (Kirkwood, J. G., 1934).

$$\Delta G_{\text{elec}} = \int_0^q dq' \left\langle \frac{\partial U}{\partial q} \right\rangle_{(q')} \quad (36)$$

**Pour un ion**  
 $q$  la charge de l'ion  
 $U$  énergie potentielle du système

$U$  est l'énergie potentielle contenue par les molécules du solvant qui entourent l'ion. Au niveau microscopique, la détermination du potentiel  $U$  suppose de connaître la position de toutes les charges du solvant. Nous réécrivons l'équation (36) en développant l'expression du potentiel  $U$  et en nous intéressant maintenant, non pas à la contribution électrostatique à l'énergie libre d'un ion, mais d'un soluté contenant plusieurs atomes indexés par le paramètre  $i$ . La détermination du rayon de Born des atomes pour un soluté va être influencée par leur charge partielle ainsi que par la présence de tous les autres atomes du soluté qui vont contribuer à modifier la distribution et la conformation des atomes du solvant.

$$\Delta G_{\text{elec}} = \int_0^1 d\lambda \left\langle \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} \right\rangle_{(\lambda)} \quad (37)$$

**Pour un soluté**  
 $q_i$  charge de l'atome  $i$  (molécule)  
 $q_j$  charge de l'atome  $j$  (solvant)  
 $\mathbf{r}_i$  position de l'atome  $i$   
 $\mathbf{r}_j$  position de l'atome  $j$

Dans l'équation (37), l'énergie libre correspond toujours à une différence d'énergie entre deux états, lorsque le soluté est complètement chargé ( $\lambda=1$ ) et lorsque le soluté n'est pas chargé ( $\lambda=0$ ). Avec le paramètre  $\lambda$ , l'expression de l'énergie potentielle de l'équation (36) s'écrit alors comme  $U(\lambda) = \lambda U_1 + (1-\lambda) U_0$ . Puisque les positions des atomes du solvant

( $\mathbf{r}_j$ ) peuvent varier, on préférera réécrire l'équation (37) en utilisant la fonction de distribution moyenne des charges du solvant  $\langle \rho_{elec}(\mathbf{r}) \rangle_{(\lambda)}$ .

$$\langle \rho_{elec}(\mathbf{r}) \rangle_{(\lambda)} = \left\langle \sum_j q_j \delta(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}) \right\rangle \quad (38)$$

Nous réécrivons l'équation (37) avec l'expression de la fonction de distribution moyenne des charges.

$$\Delta G_{elec} = \int_0^1 d\lambda \sum_i q_i \int d\mathbf{r} \frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}|} \langle \rho_{elec}(\mathbf{r}) \rangle_{(\lambda)} \quad (39)$$

$\rho_{elec}(\mathbf{r})$  densité électronique  
 $q_i$  la charge de l'ion  $i$   
 $\mathbf{r}$  position des atomes du solvant  
 $\mathbf{r}_i$  position de l'atome  $i$  du soluté

Il est possible d'exprimer la différence d'énergie libre avec le champ de réaction  $\Psi_{rf}$ . Ce terme correspond à l'énergie potentielle électrostatique appliquée sur l'atome  $i$  par tous les autres atomes du système,  $j$ . La relation suivante donne l'expression du champ de réaction moyen.

$$\langle \Psi_{rf}^i \rangle_{(\lambda)} = 4\pi \int_0^\infty r^2 dr \frac{1}{r} \langle \rho_{elec}(\mathbf{r}) \rangle_{(\lambda)} \quad (40)$$

On réécrit la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation en fonction du champ de réaction.

$$\Delta G_{elec} = \int_0^1 d\lambda \sum_i q_i \langle \Psi_{rf}^i \rangle_{(\lambda)} \quad (41)$$

**Pour un soluté**  
 $q_i$  la charge de l'atome  $i$

En réalité la fonction de distribution de charges du solvant est localisée autour d'une région microscopique et limitée dans l'espace. Dans le cas d'un ion, il a été démontré (Roux, B. *et al.*, 2000) que la distribution moyenne des charges du solvant est une fonction « très piquée » et centrée pour une distance  $r=R_{ion}$ . Pour les autres valeurs de  $r$ , la fonction de distribution des charges est proche de zéro. Ce rayon définit la distance séparant le centre de l'ion jusqu'à ce que l'on rencontre les premières charges du solvant. Nous faisons l'hypothèse qu'il en est de même pour les atomes constituant les protéines. Il est alors possible d'étendre la définition du rayon de Born utilisée pour les ions, aux



protéines, en définissant pour chacun de leurs atomes un « R équivalent ». Le rayon de Born permet de passer d'une vision microscopique à une valeur macroscopique puisqu'elle permet de définir la barrière diélectrique entre le solvant et l'intérieur de l'atome. Le rayon de Born appliqué à tous les atomes d'une protéine définit la surface délimitant la constante diélectrique appliquée aux atomes chargés à l'intérieur de la protéine et la constante diélectrique représentant le solvant. L'hypothèse d'une fonction de distribution centrée en  $R_i$  nous permet de simplifier l'expression (40) du champ de réaction.

$$\langle \Psi_{\text{rf}}^i \rangle_{(\lambda)} \approx \frac{1}{R_i} \int_0^{\infty} 4\pi r^2 dr \langle \rho_{\text{elec}}(r) \rangle_{(\lambda)} \quad (42)$$

**Pour un atome**  
 $\epsilon_w$  la constante diélectrique dans l'eau  
 $R_i$  rayon ionique de l'atome  $i$

On peut alors donner une approximation de l'équation (41). L'intégrale peut être résolue pour une surface fermée. Or selon le théorème de Gauss, la densité de charge  $\langle \rho_{\text{elec}}(\mathbf{r}) \rangle_{(\lambda)}$ , d'une charge  $\lambda q$  contenue dans une surface fermée entourée par un solvant avec une constante diélectrique  $\epsilon_w$ , est égale à  $\lambda q / \epsilon_w$ . L'intégrale de l'équation (42) est alors égale à  $\lambda q_i (1/\epsilon_w - 1)$  et on peut réécrire l'expression du champ de réaction ainsi que celle de l'énergie libre.

$$\langle \Psi_{\text{rf}}^i \rangle_{(\lambda)} \approx \frac{\lambda q_i}{R_i} \left( \frac{1}{\epsilon_w} - 1 \right) \quad (43)$$

**Champ de réaction**

$$\Delta G_{\text{elec}} = \frac{1}{2} \sum_i \frac{q_i^2}{R_i} \left( \frac{1}{\epsilon_w} - 1 \right) \quad (44)$$

**Contribution électrostatique à l'énergie libre**

Le rayon de Born d'un atome est une constante semi-empirique qui (à travers les molécules du solvant) dépend aussi bien de la charge de l'atome, de sa position dans la structure du soluté que de la structure du solvant. La valeur du rayon ionique de Born ne peut être transférée d'un environnement à l'autre. Il n'y a pas d'équivalence directe avec le rayon ionique de Pauli qui est déduit de l'analyse de cristaux de sels.

Il est possible d'appliquer cette méthode pour calculer la contribution électrostatique à l'énergie libre d'une protéine. Pour cela le rayon de Born doit avoir été calculé pour tous les atomes des résidus. Ces calculs ont été réalisés par l'équipe de Benoît Roux (Nina, M., Beglov, D., et Roux, B., 1997). Cette méthode fut appliquée avec succès pour étudier les propriétés de conduction du canal KcsA<sup>43</sup>. Nous avons utilisé cette même méthode pour calculer les rayons de Born des pseudo-résidus Cys-MTS et évaluer sa contribution électrostatique à énergie libre.

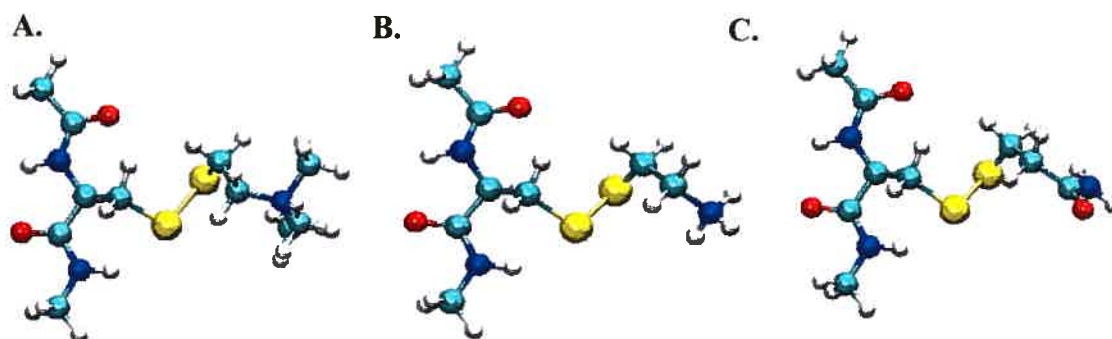
Dans les paragraphes suivants, nous allons présenter comment déterminer le rayon de Born pour chaque atome des pseudo-résidus dans des simulations où l'eau est représentée de manière explicite. Une fois les rayons de Born déterminés, nous comparons la valeur de l'énergie libre de solvation de chacun des pseudo-résidus obtenue par le modèle de Born avec une autre méthode où l'eau est explicitement représentée.

#### ***D.6. Calcul du rayon de Born appliqué aux atomes des complexes Cys-SET, Cys-SEA et Cys-SACE***

La méthode précédente impose de définir les rayons ioniques de Born pour tous les atomes des pseudos résidus Cys-SET, Cys-SEA et le Cys-SACE. Pour cela nous reprenons le protocole développé par le laboratoire de Benoît Roux (Nina, M., Beglov, D., et Roux, B., 1997; Nina, M., Wonpil, I, et Roux, B., 1999) tel qu'il a été utilisé pour définir les rayons ioniques de Born des atomes des acides aminés. Les pseudo-résidus sont insérés sur un tripeptide Ala-(Cys-X)-Ala. Le tripeptide (N)-acétyl-(Cys-SET)-(N')-méthylamide ( $\text{CH}_3\text{-CO-NH-C}(\text{C}_2\text{H}_4\text{S}_2\text{R})\text{-CO-NH-CH}_3$ ), sous sa forme non-zwitterionique, a été choisi pour représenter un modèle de squelette de protéine.

---

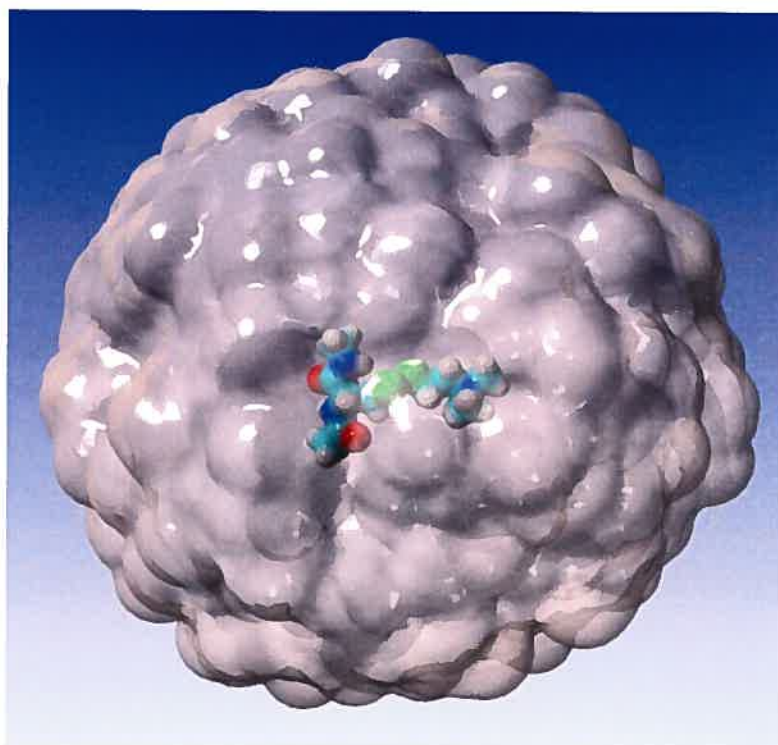
<sup>43</sup> De plus amples détails sur le modèle de Born et son application pour l'étude de la conduction des canaux ioniques sont disponibles dans la publication de Benoît Roux (Roux, B. *et al.*, 2004).



**Figure 27. Représentation atomique des pseudo résidus MTSET, MTSEA, MTSACE.**

Chaque pseudo résidu est présent au centre du peptide ALA-Cys-X-ALA. Les atomes d'oxygène sont colorés en rouge, les atomes de soufre en jaune, les atomes d'hydrogène en blanc et les atomes de carbone en bleu clair et d'azote en bleu foncé.

Comme nous l'avons vu précédemment, c'est la distribution radiale moyenne des charges des atomes du solvant autour de l'atome que l'on étudie qui permet de définir le rayon de Born. La distribution radiale moyenne des charges du solvant est obtenue lors d'une dynamique moléculaire de Langevin de 800 ps appliquée à un des tripeptides présentés sur la Figure 27. Le tripeptide est entouré d'une goutte d'eau constituée d'au moins 300 molécules d'eau. L'effet des molécules d'eau éloignées est inclus par un potentiel de frontière (*spherical solvent boundary potential*) SSBP (Beglov, D. *et al.*, 1994). L'enregistrement des trajectoires des atomes des molécules d'eau permet alors de calculer la distance entre le centre de l'atome, dont on calcule le rayon de Born, et le centre des atomes des molécules d'eau qui portent les charges partielles O(-0.834) et H(0.417). Nous déduisons la distribution moyenne des charges en réitérant ce processus pour chaque configuration du solvant autour des atomes du pseudo-résidu contenu dans le fichier de trajectoire. La valeur initiale du rayon de Born correspond à la distance pour laquelle la distribution radiale moyenne des charges n'est plus égale à zéro.



**Figure 28. Représentation d'une goutte d'eau (1000 molécules d'eau) contenant le pseudo-résidu Cys-SET.**

Le peptide ALA-CysSET-ALA (un acide aminé artificiel) est au centre d'une goutte d'eau, contenant plus de 1000 molécules d'eau. Les atomes d'oxygène sont colorés en rouge, les atomes de soufre en vert, les atomes d'hydrogène en blanc et les atomes de carbone en bleu clair et les atomes d'azote en bleu foncé.

Une fois tous les rayons de Born des pseudo-résidus calculés, nous calculons leur contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation en utilisant le modèle continu de Born. Ces valeurs sont comparées aux valeurs de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation calculées lors d'une dynamique moléculaire, par la méthode des perturbations dont le principe a été décrit dans le paragraphe « Calcul de l'énergie libre ».

La valeur du rayon de Born est une variable semi-empirique que nous ajustons pour obtenir les valeurs obtenues par la technique des perturbations. Les valeurs initiales des rayons de Born restent néanmoins très proches des valeurs calibrées avec un écart maximum de 5%. Cette partie des travaux sera discutée dans la seconde publication de

cette thèse. L'annexe IV présente les valeurs des rayons de Born calculés pour tous les atomes des pseudo-résidus.

### ***D.7. Calcul de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation en utilisant le modèle continu de Born***

Les rayons de Born ont été définis pour tous les atomes des acides aminés et nous les avons calculés pour chacun des pseudo-résidus ; Cys-SET, Cys-SEA et Cys-SACE. Comme nous l'avons établi à l'équation (43), la contribution à l'énergie libre de solvation  $\Delta\Delta G_{elec}$  d'un système d'atomes, dépend directement de la différence du champ de réaction calculé en absence ( $\epsilon = 1$ ) et en présence du solvant ( $\epsilon = 80$ ). Le champ de réaction du solvant est obtenu en soustrayant le potentiel coulombien calculé dans le vide ( $\Delta G_{\epsilon=1}$ ) au potentiel calculé dans un milieu diélectrique représentant l'eau ( $\Delta G_{\epsilon=80}$ ).

$$\Delta\Delta G_{elec} = \Delta G_{\epsilon=80} - \Delta G_{\epsilon=1} \quad (45)$$

Les différentes contributions électrostatiques à l'énergie libre  $\Delta G$  sont calculées pour un système d'atomes selon l'équation suivante.

$$\Delta\Delta G_{elec} = \frac{1}{2} \sum_i q_i \phi_\epsilon(\mathbf{r}_i) \quad (46)$$

$q_i$  la charge de l'atome  $i$   
 $\epsilon$  la constante diélectrique du milieu  
 $\phi(\mathbf{r}_i)$  potentiel électrostatique à la position  $\mathbf{r}_i$  de l'atome  $i$ .

$\phi(\mathbf{r}_i)$  est le potentiel électrostatique calculé à la position  $\mathbf{r}_i$  obtenu en résolvant l'équation de Poisson-Boltzmann (PB) numériquement.

$$\nabla[\epsilon(r)\nabla\phi(r)] - \bar{\kappa}^2(r)\phi(r) = -4\pi\rho_{sys}(r) \quad (47)$$

**Équation de Poisson-Boltzmann**  
 $\epsilon(r)$  la constante diélectrique en  $r$   
 $\phi(r)$  potentiel électrostatique en  $r$   
 $\kappa(r)$  valeur de la constante de Debye-Hückel en  $r$   
 $\rho_{sys}(r)$  la distribution de charges en  $r$

Les charges partielles associées aux atomes de la protéine, ainsi que celles de l'ion, sont distribuées à chaque point d'une grille tridimensionnelle enveloppant complètement le

système d'atomes. La valeur du potentiel électrostatique est calculée en chacun des points de cette grille en résolvant numériquement l'équation (47) en utilisant le module PBEQ (Im, W. *et al.*, 1998; Roux, B., Bernèche, S., et Im, W, 2000) du programme de dynamique moléculaire CHARMM (Brooks, B. R. et al, 1983). La méthode des différences finies, utilisée pour résoudre numériquement l'équation de Poisson-Boltzmann, est détaillée dans l'annexe II (Warwicker, J. *et al.*, 1982). La constante diélectrique de l'eau a été fixée à 80 et celle de la protéine est égale à 1 pour rester cohérente avec la valeur de l'énergie libre calculée par la méthode des perturbations.

#### ***D.8. Calcul du profil de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation sur l'axe de diffusion d'un canal potassique***

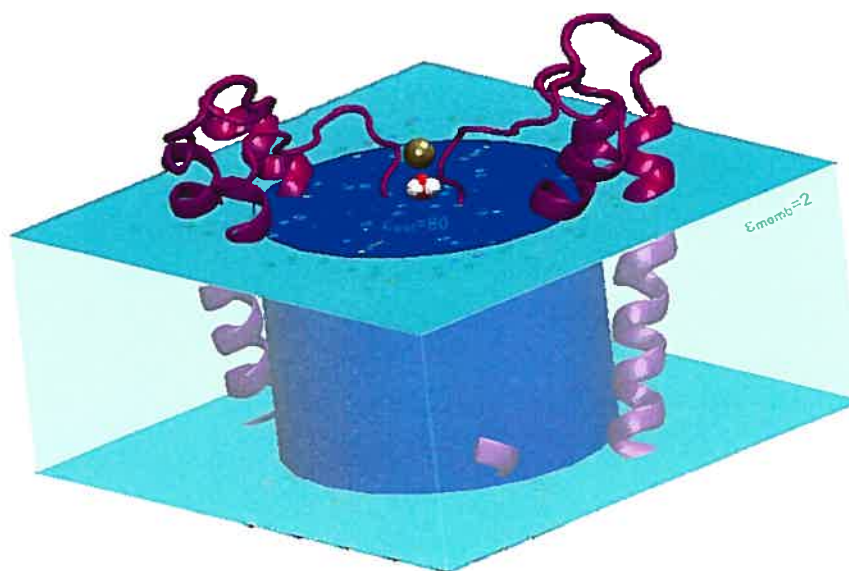
Dans la deuxième publication et dans le chapitre « Résultats III », nous allons calculer la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation d'un ion  $K^+$  lorsqu'il parcourt l'axe de conduction d'un canal potassique depuis le milieu intracellulaire jusqu'à la position  $z$  (notée  $\Delta\Delta G_{elec,i}(z)$ ), selon l'équation suivante.

$$\Delta\Delta G_{elec}(z) = \Delta G_{c,i}(z) - \Delta G_c - \Delta G_i \quad (48)$$

$\Delta G_{c,i}(z)$  correspond à la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation calculée pour le canal et l'ion lorsque celui-ci occupe la position  $z$ .  $\Delta G_c$  est la différence d'énergie libre de solvation du canal sans l'ion et  $\Delta G_i$  est la différence d'énergie libre de solvation de l'ion dans la solution intracellulaire.  $\Delta\Delta G_{elec,i}(z)$  définit l'énergie libre nécessaire pour faire passer un ion du solvant à la position  $z$ .

La Figure 29 présente le modèle  $K_{Ca}3.1$ (MthK) inséré dans un environnement diélectrique représentant le solvant et les lipides. La partie hydrophobe de la membrane est représentée par un parallépipède (en vert sur la Figure 29) de 25 Å d'épaisseur centré en  $z=0$  avec une constante diélectrique égale à  $\epsilon_m=2$ . Le pore du canal est défini par un cylindre d'eau avec une constante diélectrique égale à  $\epsilon_w=80$ , d'une hauteur de 25 Å centré sur l'axe de diffusion des ions (l'axe  $Z$ ). Le rayon du cylindre d'eau n'est pas important tant que la protéine détermine l'interface diélectrique (Figure 30). Il a été fixé à

16 Å pour les modèles du canal  $K_{Ca}3.1$ (MthK) et  $K_{Ca}3.1$ (KcsA/EPR) et à 12 Å pour le modèle  $K_{Ca}3.1$ (Kv1.2). Le solvant présent dans le milieu extracellulaire ( $z > +12.5$  Å) et le milieu intracellulaire ( $z < -12.5$  Å) est également représenté par une constante diélectrique égale à  $\epsilon_w = 80$ .

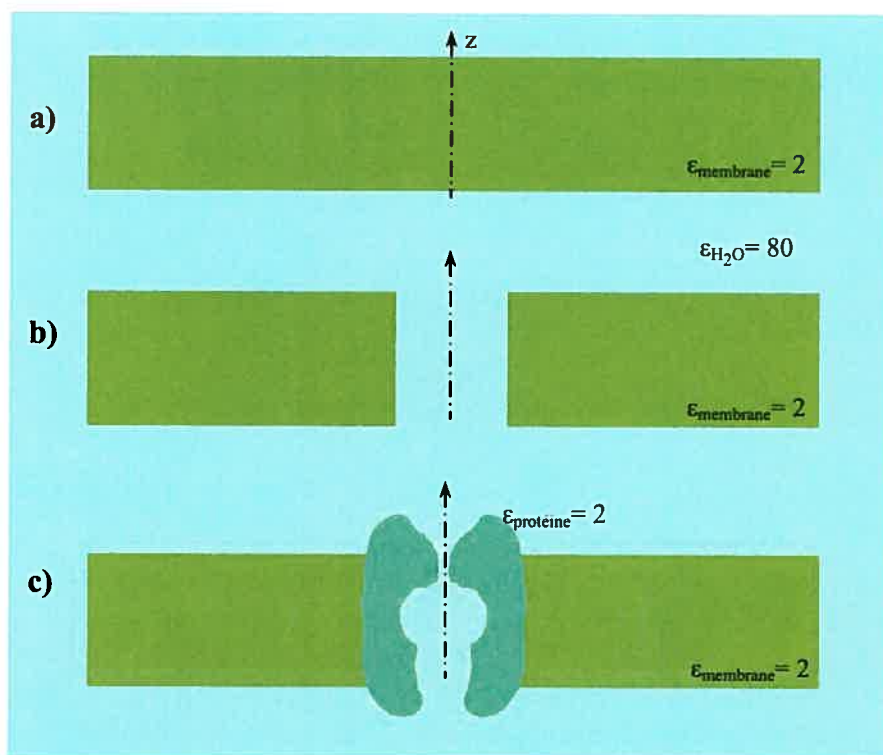


**Figure 29. Représentation en trois dimensions d'un modèle de canal  $K_{Ca}3.1$  incorporé dans une membrane**

Le canal est inséré dans une membrane de 25 Å d'épaisseur représentée par une constante diélectrique de 2. Un cylindre de 16 Å de rayon est incorporé le long de l'axe Z avec une constante diélectrique de 80. En dehors de la membrane le solvant est représenté par une constante diélectrique de 80. Les atomes d'oxygène sont colorés en rouge, les atomes d'hydrogène en blanc et l'ion  $K^+$  localisé dans le site de liaison S1 est coloré en brun. Pour la clarté de la figure, seulement deux monomères du canal sont représentés.

La constante diélectrique à l'intérieur de la protéine est égale à 2. La frontière définissant l'intérieur et l'extérieur de la protéine est définie par sa surface moléculaire<sup>44</sup> définie avec une sphère de 1,4 Å. Il est important de noter que c'est d'abord le parallépipède représentant la membrane, qui est inséré, puis le cylindre d'eau et enfin la protéine. La méthode d'insertion de la protéine dans une membrane diélectrique est présentée à la

Figure 30. Nous présenterons les profils d'énergie libre dans la deuxième publication ainsi que dans le chapitre qui la suit.



**Figure 30. Incorporation du canal dans une membrane diélectrique (représentation en 2 dimensions)**

a) Une membrane de 25 Å d'épaisseur et parallèle au plan (XY) est définie par une constante diélectrique égale à 2. Le solvant de chaque côté de la membrane est défini par une constante diélectrique égale à 80. b) Un cylindre d'eau de 25 Å de longueur, défini par une constante diélectrique égale à 80 est inséré dans la membrane et centré autour de l'axe Z. Le rayon du cylindre n'est pas important tant que la protéine détermine l'interface diélectrique. c) La protéine est incorporée dans la membrane autour de l'axe Z. Une constante diélectrique égale à 2 est définie à l'intérieur de la protéine.

<sup>44</sup> La surface moléculaire est la surface définie par une sphère que l'on fait « rouler » sur la surface accessible de la protéine.



## VI. RÉSULTATS II : DEUXIÈME PUBLICATION (MTS)

### MOLECULAR MODELLING OF THE SCAM EXPERIMENTS WITH APPLICATION TO THE KCSA CHANNEL

Manuel Simoes, Benoît Roux<sup>&</sup> and Rémy Sauvé\*

Publication pour soumission au *Biophysical Journal*

Département de physiologie,  
Groupe d'étude des protéines membranaires  
Faculté de médecine, Université de Montréal  
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7  
& University of Chicago

---

---

\* Corresponding author: Dr. Rémy Sauvé

Département de physiologie  
Université de Montréal  
C.P. 6128, Succursale Centre-ville  
Montréal, Qc.  
Canada H3C 3J7

Phone: (514) 343-5813

Fax: (514) 343-7146

## A. Summary

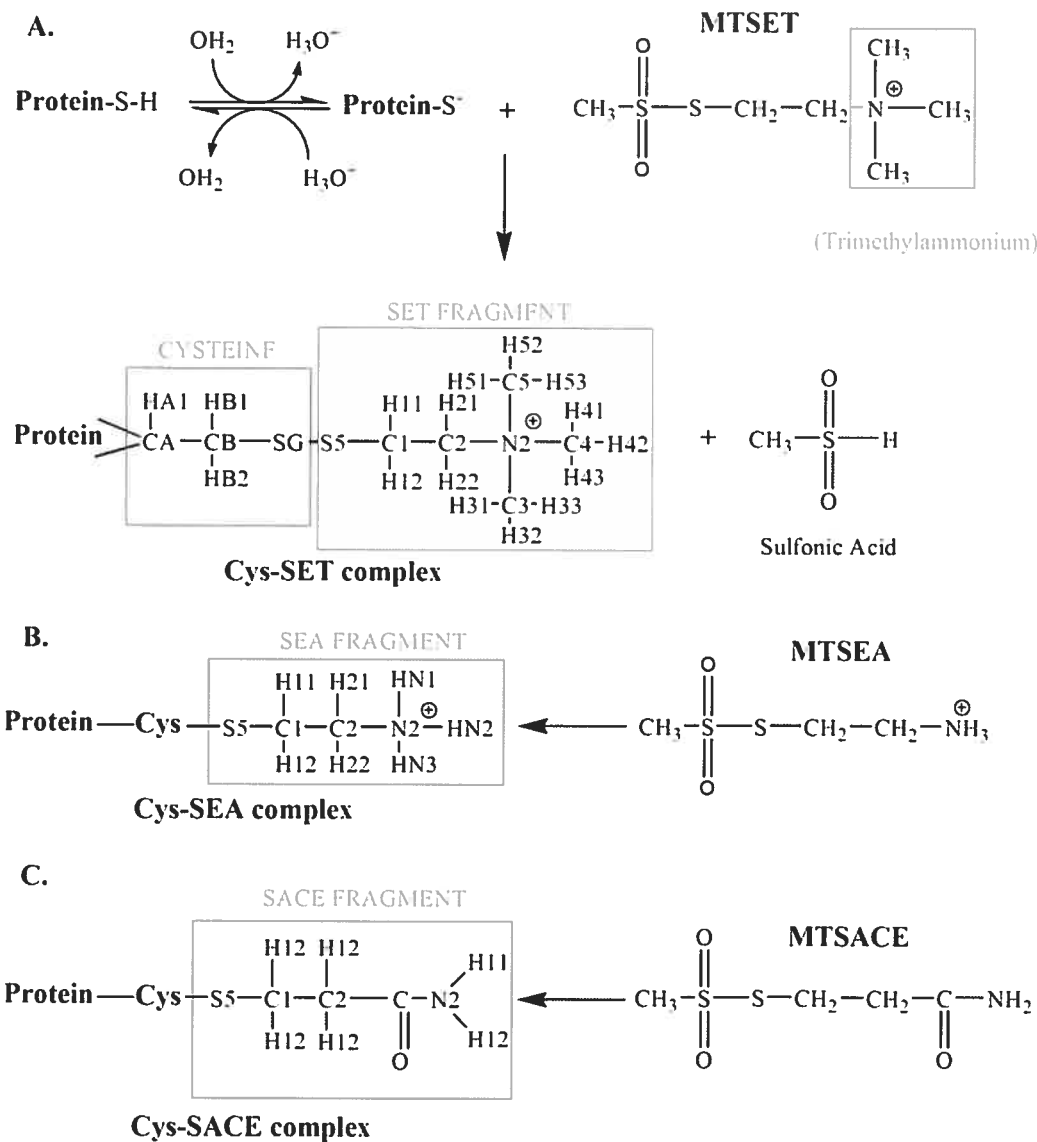
The Substituted Cysteine Accessibility Method (SCAM) has been extensively used to obtain topological information on the structure of membrane proteins. In this work we propose a molecular description of the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE complexes formed by the reaction of a MTSET, MTSEA or MTSACE reagent with a cysteine residue. To provide the framework for electrostatic calculations based on an electrostatic continuum approach, a Born radius was computed for each of the atoms of the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residues and used to define the dielectric boundary between solute and solvent. Our calculations first show that the electrostatic contribution to the Cys-SET and Cys-SEA solvation free energy is within the range expected for charged amino acids such as Arg and Lys. Simulations of SCAM experiments on the KcsA channel revealed in addition that the binding of a single MTSET or MTSEA to the Y82C mutant should be sufficient to cause a 50% inhibition of the inward unitary currents. Similar simulations carried for T85C mutant led in contrast to an absence of significant current inhibition. These results are in agreement with the reported experimental SCAM data obtained on the Y82C channel, supporting the proposed computational procedure to predict the outcomes of SCAM experiments.

**Key Words:** thiol reagent, site-directed mutagenesis, potassium channel

**Abbreviations:** MTS: methanethiosulfonate, MTSEA: 2-Aminoethyl methanethiosulfonate, MTSES: (2-sulfonatoethyl) methanethiosulfonate, MTSET: [2-(Trimethylammonium)ethyl] methanethiosulfonate, MTSACE: [2-aminocarbonylethyl] methanethiosulfonate.

## B. Introduction

The Substituted Cysteine Accessibility Method (SCAM) has been extensively used to study the structural features and conformational changes in ion channels and co-ion transport proteins (<sup>1,2</sup>). In essence, SCAM experiments consist in mutating, one at a time, selected amino acids of a protein to a Cys and measuring the susceptibility of the substituted Cys to reaction with small, charged, thiol-reactive reagents such as methanethiosulfonates (MTS). In SCAM experiments involving ion-channels, the chemical modification of a cysteine engineered at a location important to either ion flow or channel activation is likely to produce measurable changes in the channel conduction and gating properties detectable through electrophysiological measurements. These effects can in turn be interpreted in terms of a structural model of the channel and/or provide information on the structural changes occurring during channel activation (<sup>3</sup>). As the binding rate of a MTS molecule to a targeted cysteine is much faster with ionized S<sup>-</sup> than un-ionized SH groups (**Figure R2.1**), the formation of a disulfide bond between a MTS molecule and a cysteine residue is predicted to be limited to SH groups at least partly exposed to a water accessible environment. This property and the fact that most SCAM studies on ion channels have been performed using charged reagents such as MTSET (+), MTSEA (+) or MTSES (-) render the SCAM approach particularly well suited to provide information on the nature of the amino acids lining a channel ion pore. For instance, in conditions where the binding of a MTS reagent resulted in a total current block, it is typical to conclude that the MTS molecule prevented ion flow through electrostatic interactions and/or steric hindrance (<sup>4</sup>). The translation of SCAM results into structural data is far less straightforward when the current is partly altered but not completely inhibited. To relate SCAM results to a structural model it is then essential to establish how the presence of a charged reagent such as MTSET can affect the channel structure and conductance properties.



**Figure R2.1 Formation of the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residue.**

Chemical reaction schemes illustrating the formation of the positively charged Cys-SET (A.) and Cys-SEA (B.) and neutral Cys-SACE (C.) pseudo-residues plus sulfonic acid. The atoms constituting the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residues are labeled according to their patch CHARMM definition. The atom names are the the "chemical type" names, but not the atom position names. The text refers to atom names that are not shown in the figures.

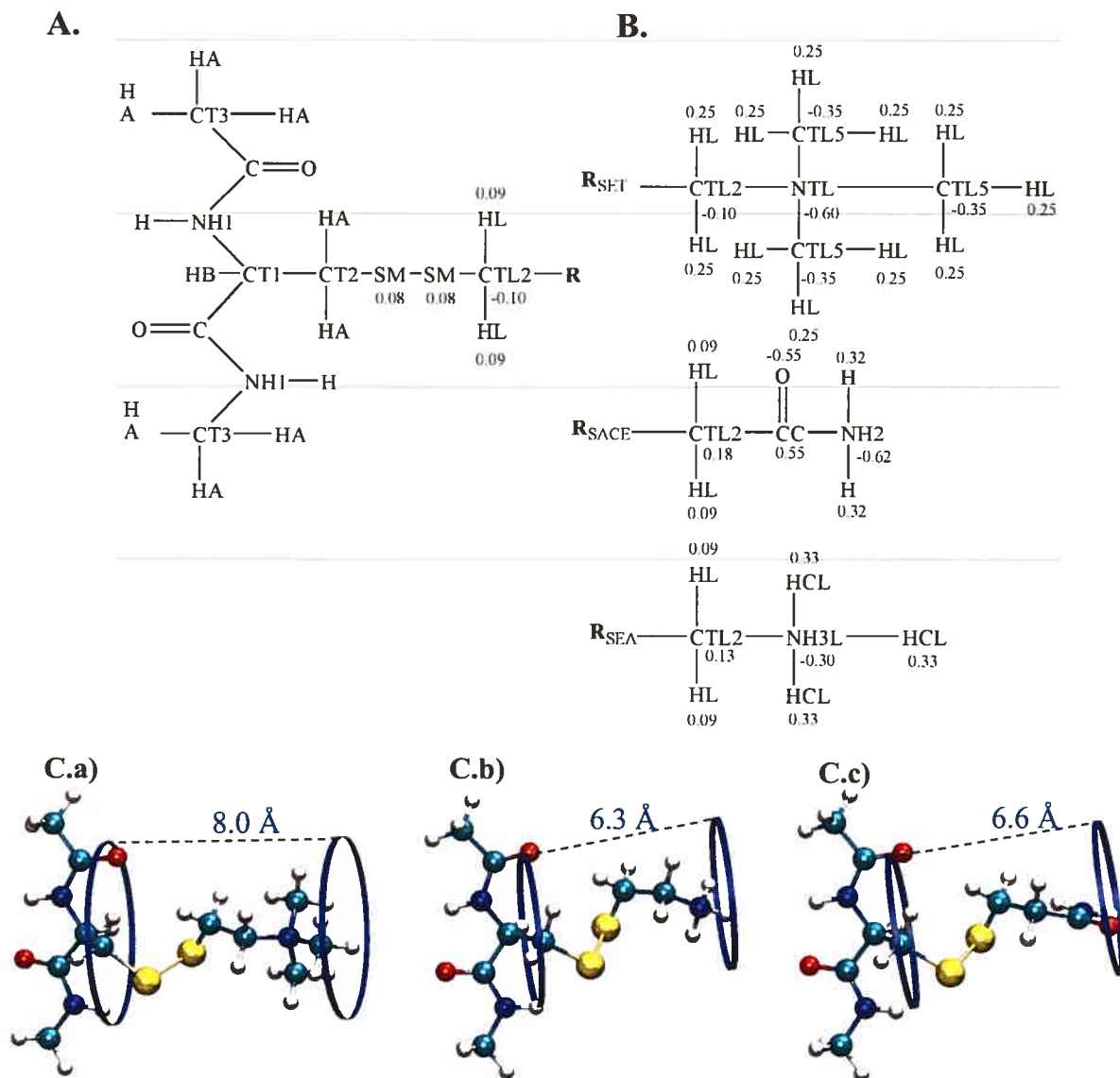
In this article we present the first atomic description of the molecular complexes produced by the reaction of the MTSET (Cys-SET), MTSEA (Cys-SEA) or the MTSACE

(Cys-SACE) reagents with a cysteine. A Born radius was also estimated for each of the atoms of the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE complexes, as a mean to calculate for each of these pseudo-residues, the electrostatic contribution to the solvation free energy and the effects of Cys-charged MTS complexes on ion flux as well. We show that this computational procedure satisfactory accounts for the effects of MTSET on the KcsA channel with MTSET predicted to cause a total current block of the Y82C channel mutant as observed experimentally (<sup>5</sup>). The electrostatic nature of the interaction between the positively charged MTSET reagent and ion flux was confirmed with simulations involving the neutral MTSACE reagent with the Y82C mutant. It is concluded that the proposed computational methodology constitutes a valuable tool to predict the outcomes of SCAM experiments on ion channels.

## C. Theory and methods

### *C.1. Creation of the Cys-SET, Cys-SACE and Cys-SEA complexes*

CHARMM (<sup>6</sup>) patches, termed Cys-SET, Cys-SACE and Cys-SEA, were designed using the all-hydrogen PARM27 potential function parameter set (<sup>7</sup>) to define the atom complexes formed by the reaction of a MTSET, MTSEA or MTSACE reagent with a cysteine residue. The patches create a covalent link between the sulfur atom of the cysteine and the sulfur atom of the SET, SEA or SACE fragments (**Figure R2.1**). The side chain of the Cys-SET pseudo-residue consists in a positively charged tetramethylammonium group connected to a cysteine by a neutral methyl thiol group. The atom definition and partial charge associated to each of the atoms of the cysteine and disulfure bond were derived using the PARM22 all-atom parameter set defined for the cysteine residue (**Figure R2.2 A.B.**). The charge distribution used for the (trimethylammonium)-ethyl atom group was obtained from the structure of the tetramethylammonium ethyl (CHARMM residue name NC5), a molecule already defined in the PARM27 all-atom parameter set which is analogue to the SET fragment.



**Figure R2.2 Schematic and molecular representation of the Cys-SET, Cys-SEA and the Cys-SACE pseudo-residues**

**A.** Schematic diagram of the tripeptide *N*-acetyl-*X*-*N'*-methylamide,  $\text{CH}_3\text{-CO-NH-CH}(\text{C}_2\text{S}_2\text{H}_4\text{R})\text{-CO-NH-CH}_3$ , which was used as model structure to represent a protein backbone with atoms labeled according to the all-hydrogen PARMM22 parameters set. R corresponds to the side chain of the Cys-SET, Cys-SACE or Cys-SEA pseudo-residues. **B.** Partial charge distribution for the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE complexes. **C.** CPK representations of the tripeptide *N*-acetyl-*X*-*N'*-methylamide with the Cys-SET, Cys-SEA or the Cys-SACE complex in **C. a**, **C. b** and **C. c** respectively. Sulfur, hydrogen, oxygen, carbon and nitrogen atoms are colored in yellow, white, red, gray and blue respectively. The dimensions of Cys-SET, Cys-SACE and Cys-SEA pseudo-residues with side chains can be accommodated into a cylinder of 2 Å radius and 8.0 Å in length for Cys-SET, 1.5 Å radius and 6.3 Å in length for Cys-SEA and 6.6 for Cys-SACE.

The applicability of this charge distribution to the Cys-SET complex was tested for the C2 (**Figure R2.1**) atom included in the tetramethylammonium ethyl group using Gauss03. The isolated model compound was optimized at the HF/6-31G(d) level. The result obtained with Gauss03 confirmed the validity of the charge distribution based on the PARM27 all-atom parameter set. The torsion angles and distances between each atom of the trimethylammonium ethyl atoms group were derived from data coming from two X-ray crystal structures containing the Cys-SET complex (**Table R2.1**).

CHARMM parameter	Cys-SET
<b>Bond</b>	<b>Å</b>
SG-S5	2.2100
S5-C1	1.4749
C1-C2	1.5660
C2-N2	1.5211
N2-C3	1.4494
<b>Angle</b>	<b>degree</b>
SG-S5-C1 ( $\chi_4$ )	109.6
S5-C1-C2 ( $\chi_5$ )	119.6
C1-C2-N2 ( $\chi_6$ )	105.6
2C-N2-C3 ( $\chi_7$ )	108.0
<b>Dihedral</b>	<b>degree</b>
CB-SG-S5-C1	0.0
SG-S5-C1-C2	0.0
S5-C1-C2-N2	180.0
C1-C2-N2-C3	0.0

**Table R2.1 Structural parameter set for the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residues.**

The bond distance, angles and the optimized torsion angles of the SET fragment atoms group were derived from data coming from a X-ray crystal structure (PDB:1QWZ structure file).

The crystal structure of the Sortase B protein (SrtB) from *S. Aureus* complexed with MTSET was solved at a 1.75 Å resolution (PDB:1QWZ) whereas the structure of

SrtBAN30 complexed with the two active site inhibitors MTSET and E-64, was determined at a resolution of 2.50 Å (PDB:1QXA) <sup>(8)</sup>. Both structures yielded approximately the same inter-atomic distances, bond angles and dihedral angles for the trimethylammonium group of the Cys-SET complex. The two structures differ however on the value of the bond angle CB-SG-S5 (**Figure R2.1 B.**) between the CB carbon atom and the atoms of the disulfur bridge, with 100° for the Sortase B structure compared to 150° for the SrtBAN30 complex. The former estimate is closer to the default value of 103.30° included in the PARM22 parameter set for these atoms. The observed variation between the two CB-SG-S5 angles could be due to the difference in X-ray resolution between the two structures and/or the close contact between Gly3 and the disulfur bridge in the Sortase B structure. When there were no equivalent parameters in the PARM27 parameter set, the inter-atomic distances, bond angles and dihedral angles for each atom of the Cys-SET complex were extracted from the PDB:1QWZ structure file.

An identical procedure was followed to create the Cys-SEA and Cys-SACE complexes resulting from the binding of a MTSEA or MTSACE reagent to a cysteine residue. The group of atoms which included S5 and C1 (**Figure R2.1**) of the Cys-SET CHARMM parameter set is identical for all MTS reagent and was therefore used to describe the Cys-SEA and the Cys-SACE pseudo-residues. The Cys-SEA pseudo-residue is positively charged with an aminoethyl group (CHARMM residue name ETAM) substituting for the trimethylammonium group of Cys-SET (**Figure R2.1 B.**). The charge distribution associated to the atoms of aminoethyl group was obtained from the structure of ethanolamine, an analogue molecule already defined in the PARM27 all-atom parameter set. In contrast to the other, the Cys-SACE pseudo-residue is neutral but polar with a 2-aminocarbonylethyl group which is analog to the asparagines sidechain in CHARMM (**Figure R2.1 C.**). The inter atomic parameters were extracted from the PDB:1QWZ structure file when there were no equivalent parameters in the PARM27 all-atom parameter set.



### ***C.2. Insertion of the SET Patch on the protein***

The initial atomic coordinates of the SET fragment were taken when possible from the atomic coordinates of the atoms which formed the residue to be substituted. Following the application onto the targeted cysteine of the first CHARMM Cys-SET patch, a minimization procedure of the Cys-SET complex was performed (all other atoms except the hydrogen atoms were fixed) in which 300 adopted-basis Newton Raphson (ABNR) (<sup>9</sup>) minimization steps were computed before a final energy calculation. This procedure was repeated several times with the rotation angle around the CB-SG axis varying from 0° to 360° in 5° step. The conformation leading to the lowest energy was retained. This computational procedure was chosen to avoid the Cys-SET complex to be trapped in unrealistic configurations while exploring a maximum number of possible configurations. To generate structures of the KcsA channel containing multiple MTSET molecules, the additional Cys-SET were inserted to be symmetrical relative to the initial Cys-SET, which was then relaxed with a 5 ps Langevin dynamic where all the atoms of the pseudo-residue were free to move and 200 step of energy minimization (ABNR). The minimization procedure was performed with the dielectric constant (EPS) set to 11 (see discussion below). The non bonded were truncated at 15 Å.

### ***C.3. Solvation Free Energy of Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE***

The solvation free energy of the Cys-SET, CYS-SEA and CYS-SACE complexes was computed using the free energy perturbation technique (<sup>10,11</sup>) implemented in the PERT module of CHARMM (<sup>12</sup>). The non-zwitterionic tripeptide (N)-acetyl-(Cys-SET)-(N')-methylamide ( $\text{CH}_3\text{-CO-NH-CH}(\text{C}_2\text{S}_2\text{H}_4\text{R})\text{-CO-NH-CH}_3$ ), was chosen as representative model of the protein backbone, with R taken as the SET, SACE or SEA atom groups respectively (**Figure R2.2 A.**). The tripeptide was hydrated in a sphere containing at least 300 TIP3P water molecules (<sup>13</sup>). A spherical solvent boundary potential (SSBP) including a reaction field contribution calculated from the Kirkwood multipolar expansion (<sup>14</sup>) was

used to approximate the influence of the surrounding bulk water (<sup>15</sup>). The free energy of charging a molecule was calculated using the coupling parameter  $\lambda$  varying from 0.05 to 0.95 in step of 0.10. A 15 ps Langevin dynamic was performed for each value of  $\lambda$  as to sample the system configuration space. The differences in electrostatic solvation free energy were combined using the weighted histogram analysis method (WHAM) (<sup>16</sup>). The number of water molecules was sufficient to provide more than three hydration shells of explicit water around the Cys-SET, Cys-SACE or Cys-SEA pseudo-residues. For each system, the solvent molecules and the protein side chain were initially relaxed through a 200 step (ABNR) energy minimization with the backbone geometry maintained in an extended conformation followed by a 50 ps of Langevin dynamic performed at a constant temperature of 300 K for equilibration. A friction constant equivalent to a relaxation time of 5 ps<sup>-1</sup> applied to the oxygen atoms of the water molecules. The geometry of the water molecules remained fixed using SHAKE (<sup>17</sup>), and the integration step was set at 0.002 ps. The uncertainty of the free energy perturbation results was estimated at 0.5 kcal/mol (<sup>18</sup>).

#### ***C.4. Radial distribution functions for Cys-SET, Cys-SACE and Cys-SEA***

A 800 ps Langevin dynamics simulation was performed to compute the average radial solvent charge distribution function for each individual atom of the pseudo-residue SET, SACE or SEA fragment (except for hydrogen atom) using a sphere of at least 300 TIP3P water molecules. The initial value of all the Born radii was taken as the distance where the average radial solvent charge distribution function is equal to zero before the first peak (**Figure R2.5**). The atomic radii were then refined to quantitatively reproduce the results from free energy simulation with explicit water. Electrostatic contributions to solvation free energy obtained from the continuum model were independent of the hydrogen radii as hydrogen atoms were completely enclosed in the atomic sphere of the other atoms (<sup>18</sup>).

### ***C.5. Macroscopic continuum electrostatic calculation of the Cys-SET, Cys-SACE and Cys-SEA complexes***

The solvent reaction field was obtained by subtracting the Coulomb potential computed in vacuum ( $\Delta G_{\varepsilon=1}$ ) from the total electrostatic potential computed in a medium representative of water ( $\Delta G_{\varepsilon=80}$ ).

$$\Delta\Delta G_{elec} = \Delta G_{\varepsilon=80} - \Delta G_{\varepsilon=1} \quad (1)$$

The electrostatic contribution to the free energy  $\Delta G_{elec}$  of an ion of charge  $q_{ion}$  at a given position  $r$  was calculated as

$$\Delta G_{elec} = \frac{1}{2} q_{ion} \phi(r) \quad (2)$$

where  $\phi(r)$  is the electrostatic potential at  $r$  obtained by solving the Poisson-Boltzmann (PB) equation numerically according to

$$\nabla \left[ \varepsilon(r) \nabla \phi(r) \right] - \kappa^{-2}(r) \phi(r) = -4\pi \rho_{sys}(r) \quad (3)$$

with  $\varepsilon(r)$  the space dependent dielectric constant,  $\kappa$  the Debye length and  $\rho_{sys}$  the space charge distribution function. The solute with associated atomic charges was mapped onto a three-dimensional cubic grid. The total electrostatic potential was calculated at each point of the grid by solving equation (3) using finite-difference methods with the PBEQ module (<sup>19,20</sup>) of the biomolecular simulation program CHARMM (<sup>6</sup>). The numerical calculations were carried out using a standard relaxation algorithm (<sup>21</sup>). The dielectric boundary between the solute and the solvent was constructed on the basis of the set of atomic Born radii derived from the average radial charge distribution functions of the explicit solvent around the solute molecules. The dielectric constant of the surrounding continuum was set to 80. For consistency with the free energy perturbation with explicit solvent, the dielectric constant in the interior of the solute was set to 1.

### ***C.6. Modeling of the KcsA channel***

The atomic coordinates of the KcsA channel were taken from the crystal structure of the potassium KcsA channel solved at 2.0 Å resolution (PDB:1K4C) <sup>(22)</sup>. This structure measured in 100mM KCl conditions revealed four K<sup>+</sup> ion binding sites in the selectivity filter (S1 to S4), two additional sites S0 and S<sub>ext</sub> located in the channel extracellular vestibule and a last binding site (S<sub>cav</sub>) in the channel central cavity. The present work will focus on the propriety of S<sub>ext</sub> as this site is representative of the K<sup>+</sup> concentration prevailing in the channel external vestibule. A system with K<sup>+</sup> ions in S1, S3, S<sub>cav</sub> and a water molecule in S2 was considered. Polar hydrogen atoms were added according to the HBUILD script in CHARMM except for the Glu71 which was protonated <sup>(23)</sup>.

### ***C.7. Electrostatic free energy contribution calculation at S<sub>ext</sub>***

The center of the KcsA channel pore was oriented along Z-axis and the entire channel structure was inserted in a 25 Å thick (from z=-12.5 Å to z=+12.5 Å) membrane represented by a structureless continuum medium with a dielectric constant of 2. In this configuration, z=0 corresponds to the ion binding site in the channel central cavity. It was also assumed that the protein interior had a dielectric constant of 2. A 8.0 Å diameter cylindrical aqueous pore with a dielectric constant of 80 was cut-out from the planar slab before overlaying the channel structure. The ionic concentration of the solution was set to 200 mM. The energy profile was calculated for two different ion configurations in the selectivity filter. In the first configuration, the ion occupancy state of the selectivity filter consists in two K<sup>+</sup> ions in S1 and S3 separated by a water molecule in S2. In the second configuration the two K<sup>+</sup> ions are located in S2 and S4 with two water molecules in S1 and S3 respectively. A spherical probe of 1.4 Å radius was used to create the molecular (contact+reentrant) surface at the protein-solvent dielectric boundary. The electrostatic

contribution to the free energy coming from the transfer of a  $K^+$  ion from the bulk solution to a position  $z$  was calculated as:

$$\Delta\Delta G_{elec,i(z)} = \Delta G_{i(z)-c} - \Delta G_c - \Delta G_{i(z)} \quad (4)$$

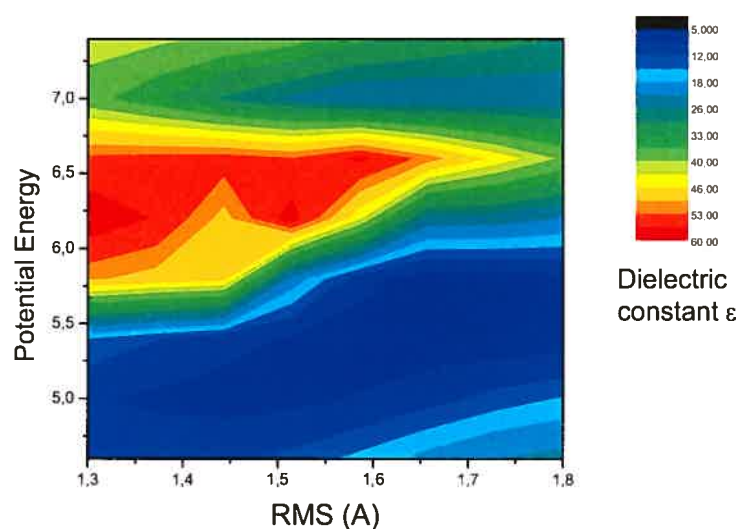
where  $\Delta G_{i(z)-c}$  is the electrostatic energy of the channel with a  $K^+$  ion at the position  $z$  ( $x=y=0$ ),  $\Delta G_c$  the electrostatic energy of the channel with no ion at  $z$ , and  $\Delta G_{i(z)}$  the electrostatic energy of the  $K^+$  ion in the bulk solution. Continuum electrostatic calculations were performed as described above using a two step procedure, first with a spacing of 1.0 Å (180 points, with periodic boundary conditions in the membrane plane), followed by calculations focused around the main region with a grid spacing of 0.5 Å. The potassium ion probe was moved along the  $Z$  axis and for each  $z$  displacement ( $\Delta z$ ) a 100 step minimization (ABNR) was performed where all the atoms of the Cys-SET complex were free to move taking as starting configuration the Cys-SET constructed before the addition of the potassium ion probe. The same procedure was used for the Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residues.

## D. Results

### D.1. Artificial amino acid definition

Ours calculations show that the dimensions for Cys-SET, Cys-SACE and Cys-SEA pseudo-residues from the C alpha atom to the center of the most distance heavy atom of the side chain can be accommodated into a cylinder of 2 Å radius and 8.0 Å in length for Cys-SET, 1.5 Å radius and 6.3 Å in length for Cys-SEA and 1.5 Å radius with 6.6 Å in length for Cys-SACE (**Figure R2.2 B.**). To validate the internal parameters used to describe the Cys-SET complex and test the protocol for inserting a SET molecule onto a cysteine residue, we compared the structure predicted on the basis of our computational approach to the X-ray data obtained for the Cys-SET complex in the *Sortase B* proteins. Our calculations were based on the 1QXA and 1QWZ PDB structure files in which all the atoms of the SET group and water molecules were deleted before applying the

CHARMM patch. In this case the SET fragment was initially patched in an extended conformation. Our computational procedure for the insertion of a SET fragment includes an energy minimization and Langevin dynamic procedure which requires to set a value for the dielectric constant (EPS). To determine to what extent the structural conformations of the Cys-SET complex depends upon our choice of EPS, the conformation of the Cys-SET pseudo-residue was calculated for dielectric constant  $\epsilon_0$  ranging from 1 to 82 after insertion according to the protocol described previously. **Figure R2.3** presents a contour plot of Cys-SET potential energy computed for  $1 \leq \epsilon_0 \leq 82$  as function of the RMS deviation between the heavy atoms of the predicted Cys-SET structure and the structural data obtained by X-ray diffraction (PDB:1QWA).

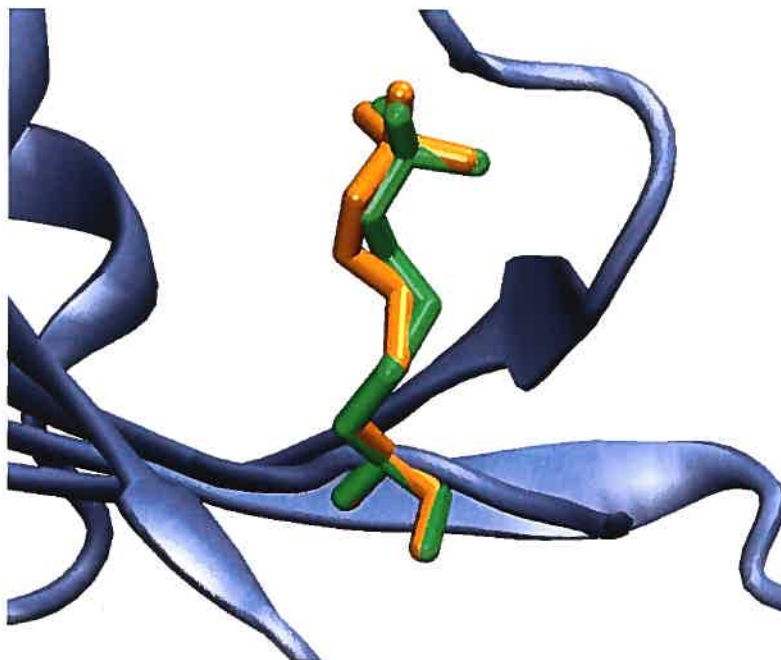


**Figure R2.3 Contour plot of the Cys-SET potential energy as a function of the RMS deviation from the X-ray coordinates obtained for the Cys-SET of the *Sortase B*.**

Potential energy and atomic coordinates were computed for  $1 \leq \epsilon_0 \leq 80$  (with  $\text{fbeta}$  set to 26). For RMS value within the resolution of the X-ray data (1.75 Å) the configurations which yielded energies below 5.5 kcal/mol (horizontal gray line) were obtained with  $5 \leq \epsilon_0 \leq 25$ .

As seen for RMS value within the resolution of the X-ray data (1.75 Å) the configurations which yielded the lowest energies and were obtained with  $5 \leq \epsilon \leq 25$ . As

standard protocol for Cys-SET insertion we used  $\epsilon$  equal 11 (**Figure R2.4**). We concluded on the basis on these results, that the internal parameters describing the Cys-SET complex and the proposed protocol for inserting an SET on a cysteine can mimic the binding of a MTSET molecule onto a cysteine residue.



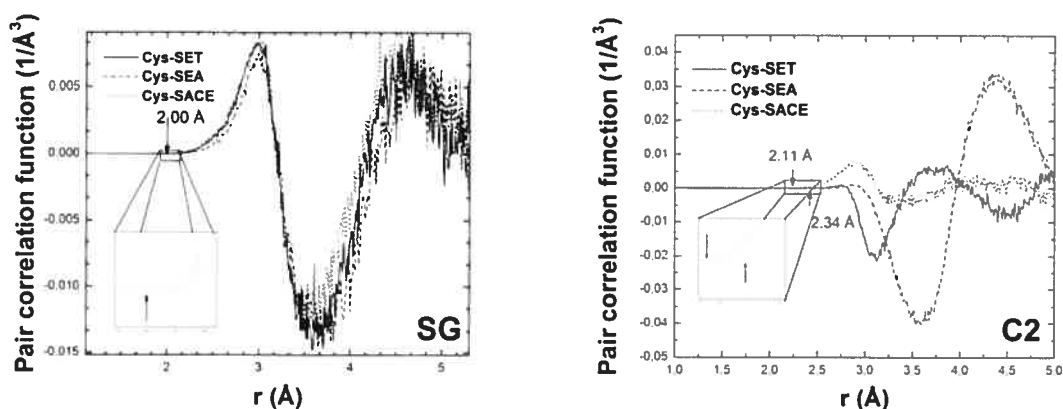
**Figure R2.4 Superposition of the computed Cys-SET pseudo-residue to the Cys-SET complex from the *Sortase B*. X-ray crystallography.**

Ruban representation (gray) of the MTSET binding side in Sortase B with the Cys-SET group colored in green. The predicted Cys-SET structure (in brown) was computed with  $\epsilon_0=11$ . The RMS deviation between the two structures was estimated at 0.6 Å.

### ***D.2. Atomic Born Radii associated to the atoms of the Cys-SET Complex***

The values reported for the optimized atomic Born radii calculated for all the atom styles of the standard amino acids indicate that the water structure near identical groups is very similar (<sup>18</sup>). The same list of Born radii was used therefore to described the atom groups already documented for amino acids that are present in the Cys-SET, Cys-SACE and Cys-SEA pseudo-residues. For instance the **Figure R2.5 A** presents the average charge distribution function for the SG atom of the Cys-SET, Cys-SACE and Cys-SEA complexes.

As seen, the resulting function is identical to the one reported for the sulfur atom of the Cys and Met amino-acid. An identical procedure was applied for the atom types CB and for the backbone atoms. For atom groups not documented for the standard amino acids the Born radii (C1 to C5, N2 for SET, C1, C2 and N2 for SEA and C1, C2, C, O, N2 for SACE) were computed as described in Material and Method (see **Figure R2.5 B**).



**Figure R2.5 Born radius determination.**

Average radial charge distribution related to the spatial organisation of water molecules was computed for the SG (a) and C2 (b) atoms of the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residue as described in Material and Methods.

The validity of the Born radii used to describe the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE complexes was also confirmed through the calculation of the solvation free energy for each of these pseudo-residues. The electrostatic contribution to the solvation free energy for the three complexes was computed according to an electrostatic continuum approach where the van der Waals atomic radius of each atom was substituted by an equivalent Born atomic radius which defined the dielectric boundary between the solute and the solvent<sup>(18)</sup>. As seen in **Table R2.2** the electrostatic contribution to the solvation free energy of the charged Cys-SET and Cys-SEA complexes calculated for a continuum medium well reproduced the results from free energy perturbation molecular dynamic simulations with values of the -61.5 kcal/mol and -75.3 kcal/mol respectively. In contrast to charged pseudo-residue, the neutral pseudo-residue Cys-SACE is characterised by a less negative solvation free energy value equal to -18.3 kcal/mol.



<b>A.</b>	<b>Cys-SET</b>	<b>Cys-SACE</b>
<b>WHAM (kcal/mol)</b>	-61.5	-18.0
<b>PB (kcal/mol)</b>	-61.6	-18.3
<b>Atom</b>	<b>Born Radius (Å)</b>	
SG, S5	2.00	
C1	2.06	
C2	2.34	2.11
C3	2.29	2.20
C4, C5	-	
O1	-	1.54
N2	2.82	2.32

<b>B.</b>	<b>Cys-SEA</b>
<b>WHAM (kcal/mol)</b>	-75.3
<b>PB (kcal/mol)</b>	-75.3
<b>Atom</b>	<b>Born Radius (Å)</b>
SG, S5	2.00
C1	2.06
C2	2.34
N2	2.18

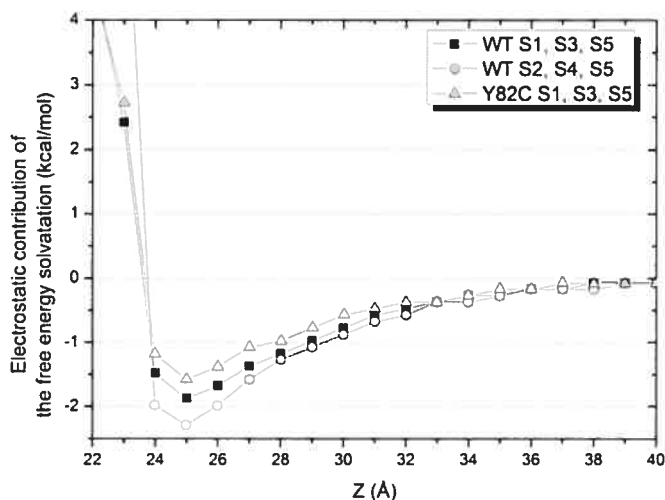
**Table R2.2 Atomic Born Radii of the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residues.**

Atomic Born radii were derived from solvent electrostatic charge distribution tested against free energy perturbation methods in an explicit solvent (see **Figure R2.5**). The charged Cys-SET (**A.**) and Cys-SEA (**B.**) pseudo-residues are within the range reported for the charged amino acids arginine and lysine with -66.0 kcal/mol and -72.9 kcal/mol respectively. The electrostatic free energy calculated for the Cys-SACE (**A.**) pseudo-residue (-18.0 kcal/mol) is in agreement with the values reported for neutral polar amino-acids such as the tryptophan. Finally calculations of the standard free energy by a perturbation technique (WHAM) or through the Poisson-Boltzmann (PB) equation led to the same results.

### ***D.3. Electrostatic free energy profile for an ion along the channel axis***

The electrostatic free energy of an ion located in the external vestibule of the KcsA channel was calculated before and after the addition of MTS pseudo-residues. The free energy profile was computed for  $z \in \{z_0, 30\}$  where  $z_0$  corresponds to the minimum distance where a potassium ion can be considered as being in a fully hydrated state.

**Figure R2.6** shows the resulting profiles computed for the KcsA wild type and the for the Y82C mutant assuming a filter potassium ion occupancy state S2, S4, S5 or S1, S3, S5 respectively.



**Figure R2.6 Electrostatic contribution to the solvation free energy for a potassium ion.**

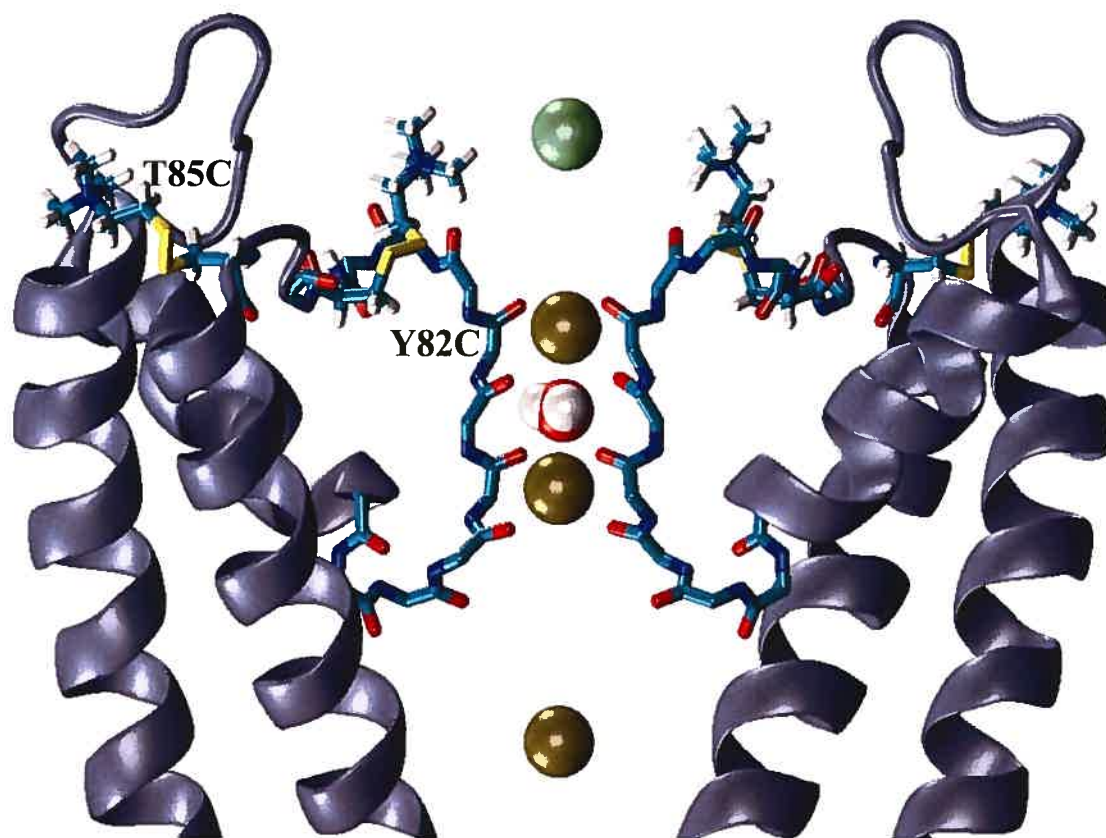
Electrostatic contribution to the solvation free energy computed along the pore central axis for a potassium ion with  $z$  ranging from the bulk extracellular medium ( $z=+40$  Å) to the entrance of the KcsA channel ( $z=23.5$  Å). The free energy profiles were computed for the wild type KcsA assuming three  $K^+$  ions at positions S1, S3, S5 or S2, S4, S5 respectively and for the Y82C KcsA mutant with  $K^+$  ions at positions S1, S3, S5. Each profile is characterized by a site  $S_{\text{ext}}$  of minimum energy centered at  $z = 25$  Å.

As seen, each profile is characterised by a minimum free energy value at  $z \cong 25$  Å which corresponds to the  $S_{\text{ext}}$  potassium ion binding site. In fact, the ion at  $S_{\text{ext}}$  is expected to be hydrated in agreement with the high resolution crystallography data obtained for the KcsA channel (<sup>22</sup>). Despite the limited presence of water molecules at this site (at least 4 water molecules), the continuum electrostatic approximation is likely to remain valid for free energy calculations, as this computational procedure was shown to remain accurate for an ion in a finite spherical droplet of 8 water molecules only (<sup>24</sup>). The continuum Born model assumptions collapse however at S0 which corresponds to the external entry site of the selectivity filter ( $z=21.5$  Å), proper calculations requiring in this case that the water

molecules be explicitly taken into account. The profiles in **Figure R2.6** also indicate that the presence of an external  $K^+$  binding site at  $S_{\text{ext}}$  is independent of the filter ion occupancy state, with a stronger binding for the S2, S4, S5 compared to the S1, S3, S5 configuration as expected. Finally our calculations predict a difference of approximately 0.5 kcal/mol at  $S_{\text{ext}}$  between the wild type channel and the Y82C channel mutant. This result has to be interpreted in lights of the limited precision (at least 0.5 kcal/mol) of our calculation procedure.

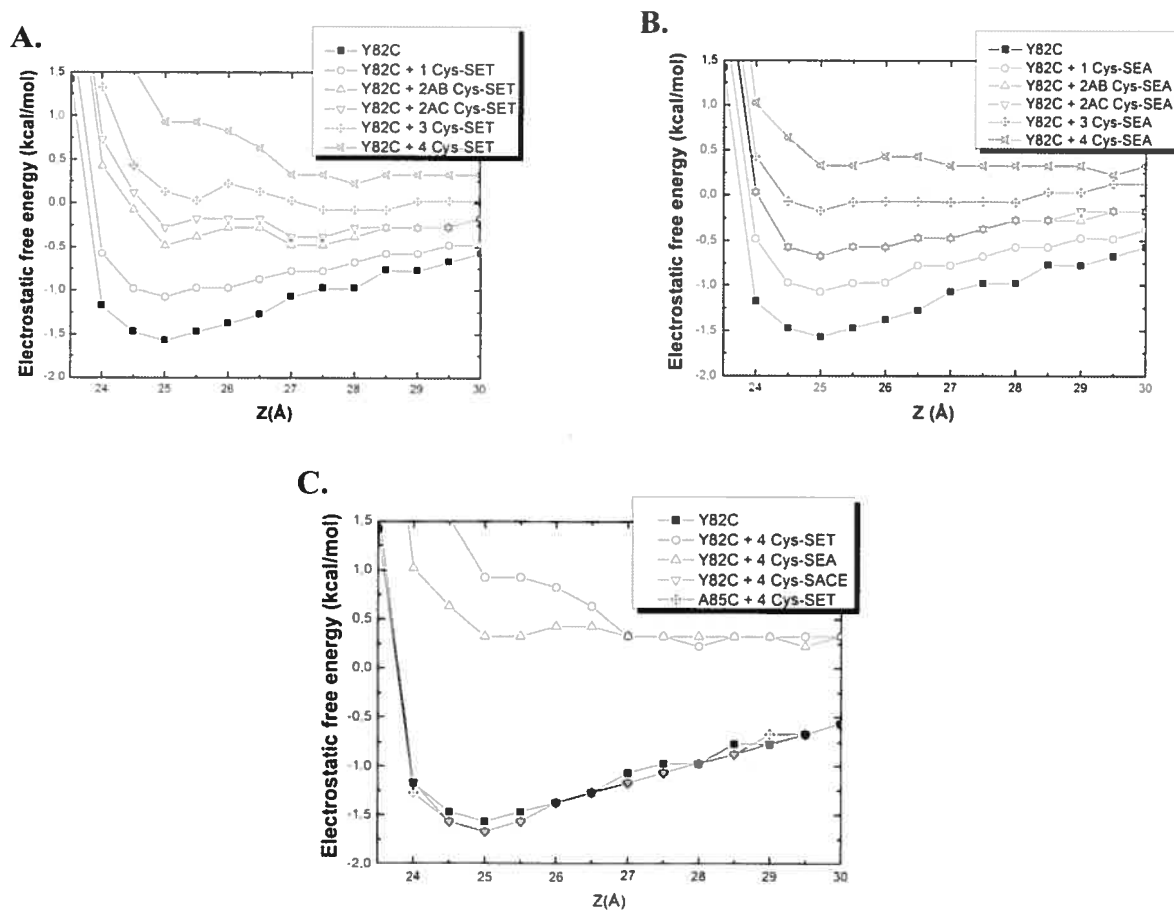
#### ***D.4. Predicted SCAM results for residues Y82 to L86***

Results have already been reported indicating that the external addition of MTSET to the KcsA Y82C mutant leads to a decrease in inwards currents (<sup>25</sup>). A series of calculations was thus undertaken to determine to what extent the explicit addition of a Cys-SET complex to a channel of known structure can account for SCAM results obtained experimentally. KcsA channel structures were thus generated in which the amino acid at positions 82 was mutated to cysteine. The targeted cysteine on each monomer was then substituted one at a time to a Cys-SET complex according to the procedure described in Materials and Methods (**Figure R2.7**). **Figure R2.8** presents the solvation free energy profiles constructed assuming the binding of 1 to 4 MTSET (A) or one to four MTSEA (B) molecules on the Y82C KcsA mutant. The configuration 2AB and 2AC refer to the binding of two MTS on monomers which are either adjacent to each other (AB) or facing diagonally (AC). These profiles show that the addition of two MTSET or MTSEA molecule is sufficient to increase to electrostatic free energy of a  $K^+$  ion at  $S_{\text{ext}}$  by approximately 1 kcal/mol relative to Y82C mutant. With four MTSET or MTSEA molecules, the increase in free energy corresponds to 2.49 kcal/mol and 1.89 kcal/mol respectively. Calculations carried out assuming a filter S2, S4, S5 ion occupancy state resulted in identical relative energy changes (data not show).



**Figure R2.7 Molecular representation of the Cys-SET complex on the Y82C KcsA mutant.**

Ruban representation of two monomers with the Cys-SET complex patched (show in the CPK representation) at position 82 and 85 respectively. Also shown in WDV representation are four  $K^+$  ions at positions  $S_{ext}$ , S1, S3 and S5 and one water molecule at position S2 in the selectivity filter. The potassium ion in the  $S_{ext}$  binding site is colored in green. Sulfur, hydrogen, oxygen, carbon and nitrogen atoms are colored in yellow, white, red, gray and blue respectively.



**Figure R2.8 Modification of the electrostatic solvation free energy profile due to the presence of Cys-SET complexes on cysteine engineered on KcsA channel**

Electrostatic contribution to the solvation free energy computed along the pore central axis for a potassium ion with  $z$  ranging from the bulk extra cellular medium ( $z=+30$  Å) to the entrance of the KcsA  $K^+$  channel ( $z=+23.5.0$  Å). In **A**, free energy profiles computed for one to four Cys-SET pseudo-residues located at position 82 assuming an ion occupancy state S1, S3, S5. In **B** free energy profiles computed for one to four Cys-SEA pseudo-residues located at position 82 assuming an ion occupancy state S1, S3, S5. In **C** comparison of the free energy profiles assuming four Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residues on the Y82C mutant. Also shown the profile obtained for the T85C mutant with four Cys-SET.

To translate the predicted variations in  $K^+$  ion concentration into actual changes in single channel conductance, we used the experimental data provided by LeMasurier *et al.*, (LeMasurier, M. *et al.*, 2001). For concentrations around 200 mM, the dose response curve

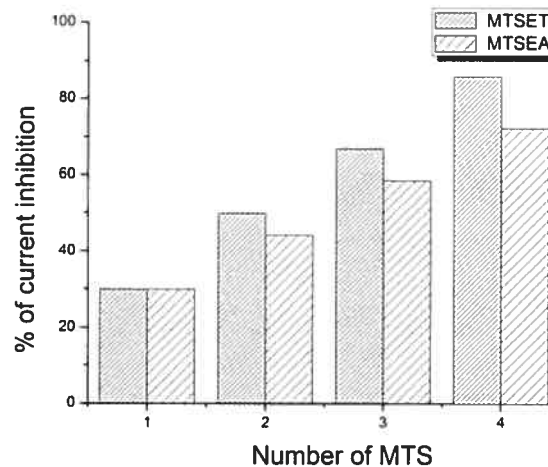
of the channel conductance as a function of the  $K^+$  ion concentration can be fitted to a two binding site equation of the form (equation (7))

$$\Lambda = \frac{\Lambda_{\max} C}{K_{K^+} + C} + \Lambda_2 C \quad (7)$$

with  $\Lambda_{\max} = 31$  pS,  $K_{K^+} = 4.6$  mM,  $\Lambda_2 = 0.268$  pS/mM and  $C(S_{\text{ext}})$  computed according to

$$C = C_{\text{Bulk}} e^{-\frac{\Delta\Delta G_{\text{mutant},i}(S_{\text{ext}}) - \Delta\Delta G_{\text{mutant}}(S_{\text{ext}})}{kT}} \quad (8)$$

where  $C_{\text{bulk}} = 100$  mM,  $\Delta\Delta G_{\text{mutant},i}(S_{\text{ext}})$  electrostatic free energy of the potassium ion in  $S_{\text{ext}}$  for a cysteine mutated channel after the binding of  $i$  MTS and  $\Delta\Delta G_{\text{mutant}}(S_{\text{ext}})$  electrostatic free energy of the potassium ion in  $S_{\text{ext}}$  for a cysteine mutated channel without MTS reagent. The percentage of current inhibition was calculated as the ratio  $100 \times (\Lambda(0 \text{ MTS}) - \Lambda(i \text{ MTS}) / \Lambda(0 \text{ MTS}))$  for  $i=1$  to 4.



**Figure R2.9 Predict effects of MTSET, MTSEA and MTSACE on KcsA channel mutants.**

Histogram representation of the MTS induced current inhibition predicted for the Y82C KcsA mutants. Calculations were performed assuming one to four MTS molecules bound to each channel. The current inhibition was calculated according to equations (7) and (8). A near total current inhibition was obtained with four the Cys-SET comparatively to a 75% inhibition with Cys-SEA. The electrostatic nature of the interactions was confirmed by the absence of significant inhibition with the Cys-SACE pseudo-residue.

**Figure R2.9** presents the percentage of current inhibition expected for one to four Cys-SET and one to four Cys-SEA patches inserted at position 82. The binding of a single MTSET or MTSEA molecule to a cysteine engineered at Y82 is sufficient to cause a 30% reduction of the channel unitary conductance. Notably, both MTSET and MTSEA led to the same percentage of inhibition. In conditions where four MTSET or MTSEA are bound to the Y82C mutant the percentage of unitary current inhibition increases to 86% and 72% respectively. Therefore, both MTSEA and MTSET constitute potent channel blocker for the Y82C mutant of KcsA. The predicted inhibitory effect would essentially arise from electrostatic interactions only (the contribution of a steric hindrance effect coming from van der Waals interactions being negligible). This conclusion is also in agreement with the fact that there was no predictable current inhibition when 4 Cys-SACE pseudo-residues were patched at position Y82. These predictions need, however, to be confirmed experimentally as electrophysiological data are not currently available for the Y82C mutant channel exposed to either MTSEA or MTSACE. Finally, SCAM simulation carried for the more distant T85 residue did not yield in any significant current inhibition.

## E. Discussion

This study provides the computational tools to carry out computer-based simulations of SCAM experiments by generating protein structures which explicitly take into account the binding of a MTS reagent onto an engineered cysteine residue. The Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE patch protocols were created within the CHARMM computational environment to perform calculations of electrostatic interactions and steric hindrance effects on protein structures modified by MTS molecules. The molecular representation of the Cys-SET complex was tested by comparing with the X-ray structures of *Sortase B* and *SrtBAN30* proteins. In addition, a set of atomic Born radii was generated for the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE complexes to use a continuum electrostatic approach to the calculations of the interactions involving the Cys-SET, Cys-SEA or Cys-SACE pseudo residues. The validity of this approach was confirmed by successfully

reproducing the observed current inhibition caused by MTSET acting on the Y82C KcsA channel mutant, with the additional predictions that MTSET should be ineffective on the T85C channel. The set of atomic Born radii for the MTS pseudo-residues simplifies the calculations of electrostatic interactions within a protein.

### *E.1. Modeling the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE pseudo-residues*

SCAM-based experiments have been widely used to get structural information on key residues or groups of residues in ion channels and ion co-transport systems. In most SCAM experiments involving ion channels, the action of the MTS reagents results in a partial inhibition of ion flow, presumably via electrostatic interactions and/or steric hindrance effects. These observations were usually interpreted as indicating that the MTS molecules project inside the channel pore, the degree of inhibition being related to the dimension of the MTS reagents and/or to the pore diameter at the MTS reaction site. The side chain of the Cys-SACE or Cys-SEA can fit into a cylinder  $\sim 6$  Å long (from the center of the C alpha atom to center of the most distance heavy atom of the side chain) by 3 Å in diameter, whereas the CYS-ACE can fit into a cylinder  $\sim 8$  Å long by 4 Å in diameter. The dimensions of the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE side chain are thus within a range susceptible to cause a total steric based obstruction of ion flow in most ion channels, with Cys-SET likely to be more potent than Cys-SACE and Cys-SEA. For instance the central cavity of the KcsA, MthK and Kv channels is known to be 10 Å wide and can thus accommodate at least one MTSET, MTSACE or MTSEA molecule to cause a total current block.

The electrostatic contribution to the solvation free energy for the charged Cys-SET and Cys-SEA pseudo-residues are within the range reported for the charged amino acids arginine and lysine (<sup>18</sup>) with -66.0 kcal/mol and -72.9 kcal/mol respectively. The formation of a Cys-SET complex appears therefore to be comparable to a substitution by an arginine residue as both molecules have close electrostatic solvation free energy value, the same positive charge coming from an ammonium group and an overall full extended length



of 8.0 Å as compared with 7.3 Å for arginine. The structure of the arginine residue remains however more planar than for the Cys-SET complex. A similar line of interpretation can be applied to the Cys-SEA complex and lysine with both residues differing in electrostatic free energy of solvation by 2 kcal/mol (-72.9 kcal/mol for lysine) with the same positive charge coming from an ammonium group and approximately the same length. Finally the electrostatic free energy calculated for the Cys-SACE pseudo-residue (-18.0 kcal/mol) is in agreement with the values reported for neutral polar amino-acids such as the tryptophan (-17.9 kcal/mol) (<sup>18</sup>).

### ***E.2. Modeling SCAM experiments***

When applied to channels of known structures, our computational results show that the proposed approach can successfully account for observable effects of MTS on channel conductance. For instance, our calculations indicate that the addition of a single MTSET molecule to the KcsA Y82C mutant is sufficient to cause a 30 % inhibition of the channel unitary conductance. Near total current inhibition is expected with the modification of the four Cys residues engineered at position 82 by Cys-SET. The prominent contribution of the electrostatic interactions to the action of Cys-SEA and Cys-SET on ion flow was suggested by the absence of predictable inhibitory effect when four neutral pseudo-residues Cys-SACE were substituted at position 82.

Similar calculations performed with four Cys-SET or Cys-SEA pseudo-residues at position 85 resulted in no significant current inhibition. The absence of current inhibition with the T85C mutant is consistent with the side chain of the Cys-SET or Cys-SEA pseudo-residues oriented in a direction opposite to the ion conduction axis while being partly hidden by the extracellular coil between the TM1 segment and the *pore helix*.

### ***E.3. Limitations of the present study***

The energy profiles presented in **Figure R2.6** show that the electrostatic contribution to the solvation free energy of a potassium ion in  $S_{\text{ext}}$  differs between the

KcsA wild type and Y82C mutant by 0.5 kcal/mol, with otherwise the same dependence as a function of the z coordinate. Within the precision of the calculations, we cannot conclude that such difference in energy should lead to a variation in unitary conductance, a behaviour not observed experimentally. The Y82C KcsA mutant has been reported however to have an altered opening probability and lower affinity to TEA block comparatively with the wild-type channel (<sup>27</sup>). These observations suggest structural changes in the channel external vestibule following the substitution of the Tyr at 82 by a Cys. Global structural rearrangements following the mutation of a single residue can not easily be modeled and our approach does not deal with this particular issue. As a result, we choose to compare the effects of MTS binding on the channel conductance relative to the cysteine engineered channel and not to wild type. In addition, possible changes in the protein structure that may have resulted from the creation of a Cys-SET, Cys-SACE or Cys-SEA complex are not considered, the underlying assumption being that the binding of the MTS reagents perturbs the local environment of the binding site only. It has also to be mentioned that the modeling does not address the issue of accessibility. Electrostatic interactions can be calculated for residues that are physically inaccessible to MTS modifications. Under these conditions, electrostatic-based perturbations of ion flow that might be predicted that cannot be observed experimentally. Molecular modeling thus offers the possibility to distinguish between two distinct experimental conditions namely: the MTS reagent reacted with the cysteine residue but failed to modify the ion conduction pathway or the MTS reagent did not access the cysteine residue despite its potency to affect ion flow.

## F. Conclusions

The computational tools described in this work should allow a better interpretation of SCAM type experiments by enabling the generation of model protein structures where the formation of Cys-SET, Cys-SEA and Cys-SACE complexes is explicitly taken into

account. These models in turn should lead to testable hypotheses the validity of which could be confirmed through a SCAM based approach.

**Note**

The internal parameters as well as the Born radii and the scripts used to patch the Cys-SET, Cys-SEA and Cys-ACE pseudo-residues on a KcsA channel can be downloaded from Benoît Roux internet laboratory site (<http://thallium.bsd.uchicago.edu/RouxLab/>) or from the Manuel Simoes site (<http://www.manuel.simoes.org>).

**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 7769) and from the Canadian Heart & Stroke Foundation.

## G. Reference List

1. Akabas, M. H., Stauffer, D. A., Xu, M. & Karlin, A. (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* **258**, 307-310.
2. Akabas, M. H., Kaufmann, C., Archdeacon, P. & Karlin, A. (1994). Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the alpha subunit. *Neuron* **13**, 919-927.
3. Akabas, M. H., Stauffer, D. A., Xu, M. & Karlin, A. (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* **258**, 307-310.
4. Holmgren, M., Liu, Y. & Yellen, G. (1996). On the Use of Thiol-modifying Agents to Determine Channel Topology. *Neuropharmacology* **35**, 797-804.
5. Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L. & Miller, C. (1999). Single streptomyces lividans K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J. Gen. Physiol* **114**, 551-560.
6. Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. & Karplus, M. (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy minimization and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **4**, 187-217.
7. A.D.Mackerell, Jr., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R.L., jr. & Karplus, M. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins., pp. 3586-3616
8. Zong, Y., Mazmanian, S. K., Schneewind, O. & Narayana, S. V. (2004). The Structure of Sortase B, a Cysteine Transpeptidase that Tethers Surface Protein to the Staphylococcus Aureus Cell Wall., pp. 105.
9. Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. & Karplus, M. (1983)., pp. 4.
10. Straatsma, T. P., Berendsen, H. J. C. & Postma, J. P. M. (1986). Free energy of hydrophobic hydration. A molecular dynamics study of noble gases in water., pp. 6720-6727.
11. Straatsma, T. P. & Berendsen, H. J. C. (1988). Free energy of ionic hydration: Analysis of a thermodynamic integration technique to evaluate free energy differences by molecular dynamics simulations., pp. 5876-5886.

12. Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. & Karplus, M. (1983). A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations.
13. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. (1983), pp. 926.
14. Kirkwood, J. G. (1934). Theory of solution of molecules containing widely separated charges with application to zwitterions., pp. 351.
15. Beglov, D. & Roux, B. (1994). Finite Representation of an Infinite Bulk System: Solvent Boundary Potential for Computer Simulations., pp. 9050-9063.
16. Kumar, S., Bouzida, D., Swendsen, R. H., Kollman, P. A. & Rosenberg, J. M. (1992). In *The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method*, pp. 1011-1021.
17. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. C. (1977).
18. Nina, M., Beglov, D. & Roux, B. (1997). Atomic Radii for Continuum Electrostatics Calculations based on Molecular Dynamics Free Energy Simulations. *J. Phys. Chem. B* **101**, 5239-5248.
19. Im, W., Beglov, D. & Roux, B. (1998). Continuum solvation model: Electrostatic forces from numerical solutions to the Poisson-Boltzmann equation., pp. 59-79.
20. Roux, B., Bernèche, S. & Wonpil, I. (2000). Ion Channels, Permeation, and Electrostatics: Insight into the Function of KcsA., pp. 13295-13306.
21. Warwicker, J. & Watson, H. C. (1982). Calculation of the electric potential in the active site cleft due to  $\alpha$ -helix dipoles. *J. Mol. Biol.* **157**, 671-679.
22. Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. & MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**, 43-48.
23. Roux, B. & Berneche, S. (2002). On the potential functions used in molecular dynamics simulations of ion channels. *Biophys. J.* **82**, 1681-1684.
24. Roux, B., Bernèche, S. & Wonpil, I. (2000). Ion Channels, Permeation, and Electrostatics: Insight into the Function of KcsA., pp. 13295-13306.

- 
25. Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L. & Miller, C. (1999). Single streptomyces lividans K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J. Gen. Physiol* **114**, 551-560.
  26. LeMasurier, M., Heginbotham, L. & Miller, C. (2001). KcsA: It's a Potassium Channel., pp. 303-314.
  27. Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L. & Miller, C. (1999). Single streptomyces lividans K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J. Gen. Physiol* **114**, 551-560.

## VII. RÉSULTAT III : APPLICATION AUX MODÈLES DU CANAL $K_{Ca3.1}$

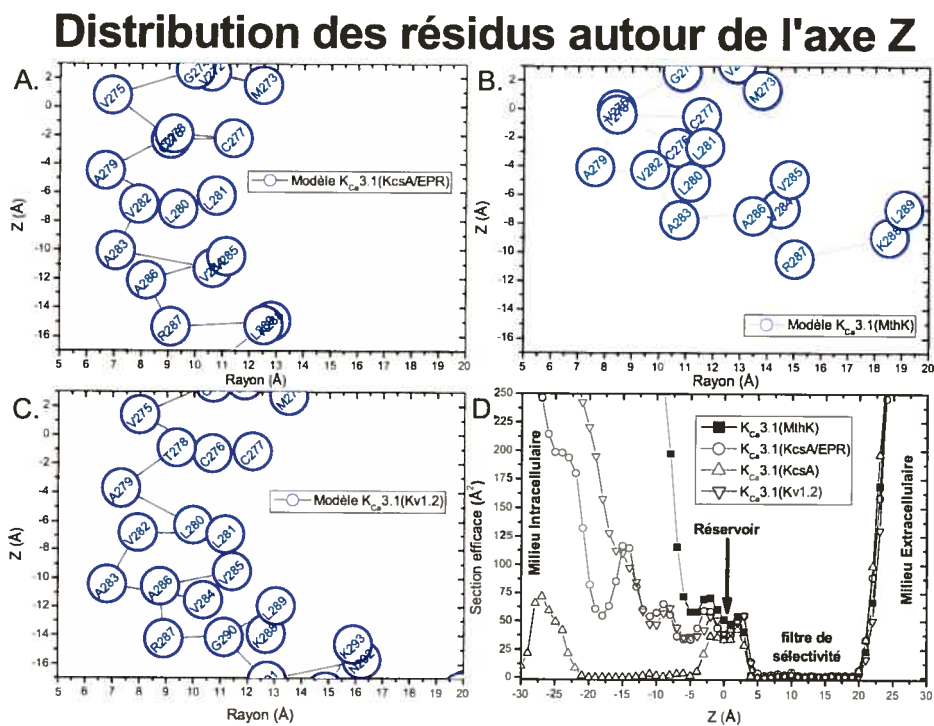
La publication précédente nous a permis de définir les atomes et les rayons de Born des pseudo-résidus Cys-SET, Cys-SEA et Cys-SACE pour le logiciel de dynamique moléculaire CHARMM. Dans le chapitre « Méthodologie 2<sup>e</sup> Partie » nous avons établi une méthodologie permettant d'évaluer la perturbation électrostatique, due à la présence des agents MTS, sur le courant ionique d'un canal potassique. Après avoir appliqué cette méthode sur une structure ayant fait l'objet d'une cristallographie, dans ce chapitre nous allons l'appliquer sur les modèles du canal  $K_{Ca3.1}$ .

### A. Modèles du canal $K_{Ca3.1}$

Nous avons modélisé 3 structures du canal  $K_{Ca3.1}$  dans l'état ouvert en utilisant comme références, les structures du canal KcsA dans sa configuration ouverte modélisée par E. Perozo (noté  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$ ), du canal Kv1.2 ( $K_{Ca3.1}(Kv1.2)$ ) et celle du canal MthK ( $K_{Ca3.1}(MthK)$ ). L'alignement des séquences primaires ainsi que la méthode de modélisation ont été présentés dans le chapitre « Méthodologie : 1<sup>ère</sup> partie » et dans la première publication. Pour chacun de ces modèles nous avons créé des mutants cystéine et inséré l'agent MTSET sur les cystéines. Dans les paragraphes suivants, nous allons comparer la distribution des résidus du segment S6 sur chacun des modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  dans sa configuration ouverte.

#### *A.1. Comparaison des structures des modèles du canal $K_{Ca3.1}$*

Puisque l'inhibition du courant ionique dépend de la distance entre l'ion et les agents MTS, nous sommes intéressés à connaître la disposition des résidus du segment S6 par rapport à l'axe du pore. La Figure 31 présente la distance entre l'atome  $C_{\alpha}$  des résidus du segment S6 et l'axe de diffusion des ions (axe Z), ainsi que la section efficace du pore de tous les modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  dans sa configuration ouverte. Les graphiques A., B., et C. de la Figure 31 permettent d'identifier les résidus du segment S6 qui font face au pore ainsi que ceux qui sont orientés vers le segment S5 ou la membrane.



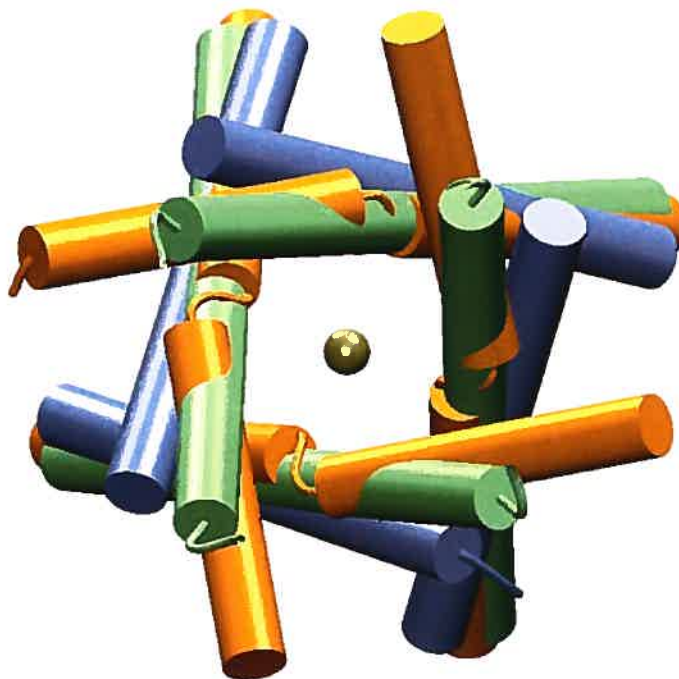
**Figure 31. Distribution des résidus autour de l'axe Z**

Distribution des atomes  $C_{\alpha}$  des résidus du segment S6 le long de l'axe Z (axe de diffusion). Le rayon correspond à la distance entre le carbone  $C_{\alpha}$  d'un résidu et l'axe Z. **A.** Résultats obtenus pour le modèle  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$ . **B.** Résultats obtenus pour le modèle  $K_{Ca}3.1(MthK)$ . **C.** Résultats obtenus pour le modèle  $K_{Ca}3.1(Kv1.2)$ . **D.** Représentation des sections efficaces des modèles  $K_{Ca}3.1(MthK)$ ,  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$ ,  $K_{Ca}3.1(KcsA)$  et  $K_{Ca}3.1(Kv1.2)$  le long de l'axe Z. La section efficace est calculée comme il est décrit dans le chapitre « Méthodologie 1ère partie ». Pour comparer les sections efficaces des modèles ouverts du canal  $K_{Ca}3.1$  nous avons calculé la section efficace du modèle fermé du canal  $K_{Ca}3.1(KcsA)$ .

La configuration du segment S6 pour les modèles  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$  et  $K_{Ca}3.1(Kv1.2)$  présente une ouverture du pore similaire, avec une distance des atomes  $C_{\alpha}$  variant entre 7 Å et 9 Å du résidu V275 au résidu R287 (à  $z = -15$  Å). Pour le modèle  $K_{Ca}3.1(MthK)$ , l'ouverture du canal s'élargit rapidement à partir du résidu A279 passant d'une distance, entre l'atome  $C_{\alpha}$  et l'axe Z, de 8 Å à 15 Å au niveau du résidu R287 (à  $z = -10$  Å). Néanmoins pour tous les modèles du canal  $K_{Ca}3.1$  les résidus V275, T278, A279, V282, A283, V286 et R287 tapissent la paroi du pore. Les résidus C276, C277, L280, L281,



V284 et V285 ne font pas face au pore pour tous les modèles. La section efficace de la Figure 31.D confirme qu'à partir de  $z = -5$  Å, au niveau du résidu A279, le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK) a une ouverture beaucoup plus large que les autres modèles. Au centre de la membrane, pour  $z=0$ , tous les canaux ont une cavité d'environ 10 Å de longueur.



**Figure 32. Superposition des segments S6 des modèles K<sub>Ca</sub>3.1(MthK), K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR) et K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2).**

Les segments S6 du modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK) sont colorés en bleu acier, ceux du modèle K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR) sont colorés en vert et ceux du modèle K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2) sont colorés en orange. L'ouverture est la plus grande pour le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK) alors que les modèles K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR) et K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2) partagent une ouverture similaire.

La Figure 32 met en évidence la différence d'ouverture intracellulaire entre les différents modèles du canal K<sub>Ca</sub>3.1. Les segments S6 du modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK), colorés en bleu acier, présentent une ouverture contenant les segments S6 des autres modèles du canal K<sub>Ca</sub>3.1.

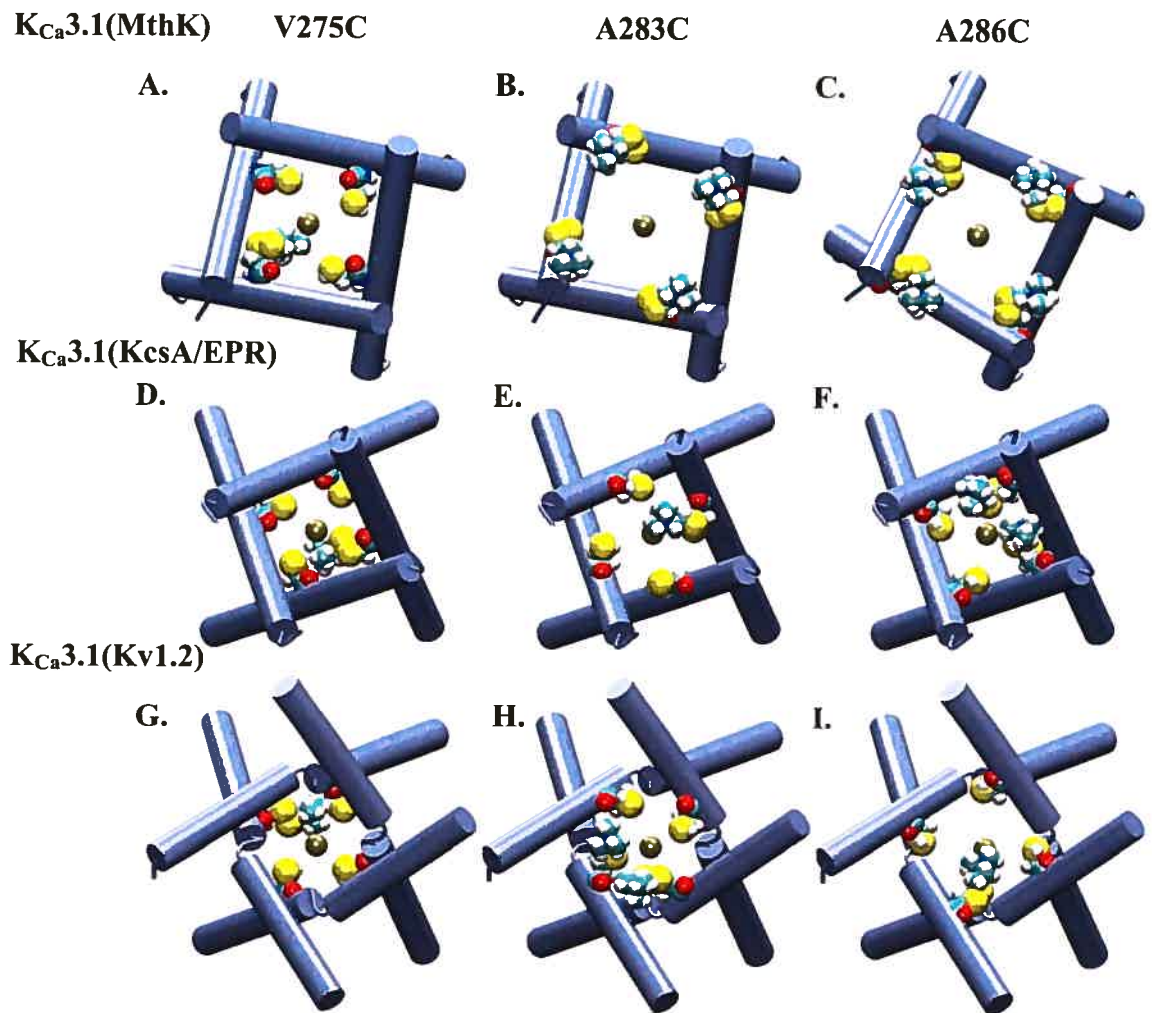
## B. Études des MTS insérés dans les modèles du canal K<sub>Ca</sub>3.1

Pour chacun des modèles du canal K<sub>Ca</sub>3.1, nous avons modélisé des mutants cystéine, correspondant aux mutants utilisés lors des expériences de SCAM. Nous avons inséré un nombre variable d'agents MTSET. Dans cette partie, nous allons analyser la configuration adoptée par les pseudo-résidus Cys-SET.

### *B.1. Nombre d'agents MTS sur les modèles*

Nous faisons l'hypothèse que si un ion K<sup>+</sup> peut diffuser dans le canal, c'est également le cas pour le MTSET et le MTSEA qui sont, tout comme l'ion, chargés positivement. Leur taille (une longueur de 10 Å pour 6 Å de rayon) leur permet d'explorer le pore des canaux potassiques dans leur configuration ouverte, sans toutefois traverser le filtre de sélectivité. Dans ce cas, s'il a déjà pu atteindre une des cystéines mutées, un autre agent MTSET/MTSEA pourra atteindre les cystéines libres des autres monomères et cela jusqu'à ce que toutes les cystéines soient occupées ou jusqu'à ce que les agents MTS déjà liés empêchent leur accès en bouchant le pore ou par un effet de charge. Pour les mutants où nous avons mesuré une inhibition totale durant les expériences de SCAM nous supposons que de 1 à 4 MTSET sont nécessaires. Pour les mutants où nous avons mesuré une inhibition partielle ou lorsque qu'aucun effet des agents MTS n'est mesuré sur la conductance du canal durant les expériences de SCAM, nous faisons l'hypothèse que toutes les cystéines mutées sont liées à un agent MTS.

Nous insérons le MTSET sur les cystéines des modèles mutants jusqu'à qu'il n'y ait plus de place dans le pore pour loger le radical d'un autre pseudo-résidu Cys-SET ou jusqu'à ce que le calcul du profil de la contribution électrostatique à l'énergie libre donne des énergies incompatibles avec une conduction ionique.

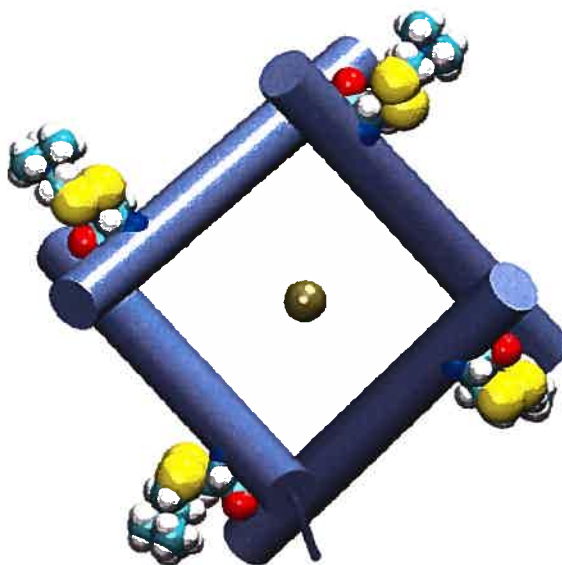


**Figure 33. Représentation des pseudo-résidus Cys-SET insérés sur les modèles  $K_{Ca}3.1(MthK)$ ,  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$  et  $K_{Ca}3.1(Kv1.2)$**

Représentation de l'orientation des pseudo-résidus Cys-SET insérés sur les mutants du modèle  $K_{Ca}3.1(MthK)$  (A., B. et C.),  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$  (D., E. et F.) et  $K_{Ca}3.1(Kv1.2)$  (G., H. et I.). Les cylindres correspondent aux segments S6 vus depuis le milieu intracellulaire. Un ion  $K^+$  est présent en représentation de VDW en  $z=-3$  Å. Nous insérons le pseudo-résidu Cys-SET sur les cystéines jusqu'à que le calcul du profil de la contribution électrostatique à l'énergie libre donne des énergies incompatibles avec une conduction ionique. A. D. G. Un seul MTSET inséré sur le résidu V275C présent dans la cavité suffit pour inhiber la conduction. B. Les MTSET insérés sur les résidus V283C sont orientés vers l'axe de diffusion, mais tapissent la paroi donnant suffisamment d'espace pour le passage d'un ion. Le profil d'énergie libre reste compatible avec une conduction ionique C. Les MTSET insérés sur les résidus V286C ne sont pas orientés vers le pore du canal, laissant suffisamment d'espace pour permettre la conduction. E. I. L'agent MTSET inséré sur les cystéines des mutants A283C et V286C des modèles  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$  et  $K_{Ca}3.1(Kv1.2)$  suffisent à obstruer le passage des ions. H. F. Il en est de même pour les mutants A286C et A283C des modèles  $K_{Ca}3.1(kv1.2)$  et  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$  avec 2 MTSET insérés.

### ***B.2. Orientation des MTS insérés dans le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK)***

Sur la base de l'observation des configurations adoptées par les pseudo-résidus Cys-SET insérés sur le segment S6 (Figure 33), nous pouvons distinguer trois types d'orientation différents du radical des pseudo-résidus Cys-SET sur le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(Mthk). Le premier type correspond aux radicaux du pseudo-résidu Cys-SET qui obstruent le pore comme pour le mutant V275C (Figure 33.A). Le second type s'applique aux pseudo-résidus qui tapissent la paroi du pore sans l'obstruer (Figure 33.B) et le dernier type de configuration correspond aux pseudo-résidus qui ne sont pas orientés vers le pore (Figure 34).

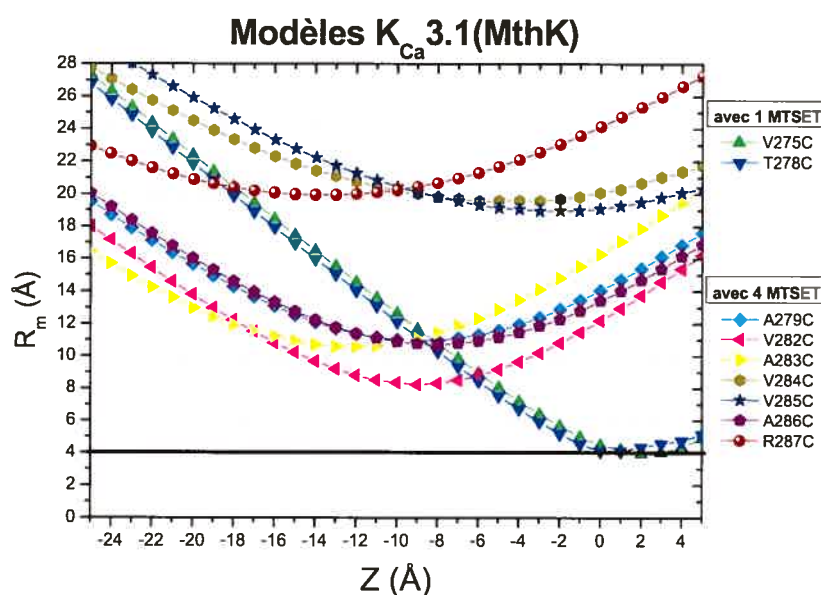


**Figure 34. Représentation des pseudo-résidus Cys-SET insérés sur le modèle mutant V284C K<sub>Ca</sub>3.1(MthK)**

Les cylindres correspondent aux segments S6 vus depuis le milieu intracellulaire. Un ion K<sup>+</sup> est présent en représentation de VDW en  $z=0$  Å. Les pseudo-résidus Cys-SET insérés sur les résidus V284C ne sont pas orientés vers le pore.

Il est également possible de distinguer ces trois types de configuration du pseudo-résidu Cys-SET en calculant la distance moyenne des pseudo-résidus avec l'axe de diffusion ionique. La variable  $R_m$  définit la distance moyenne entre les atomes d'azote

contenus au centre des têtes chargées positivement des pseudo-résidus Cys-SET et l'ion  $K^+$ . Elle est calculée pour chaque position  $z$  de l'ion  $K^+$  à la Figure 35. L'intérêt de la variable  $R_m$  n'est donc pas tant d'évaluer si nous sommes en présence d'une inhibition stérique mais plutôt d'identifier les pseudo-résidus pour lesquels les interactions électrostatiques entre la tête chargée du Cys-SET et l'ion  $K^+$  ne sont pas compatibles avec une conduction ionique. Dans le cas d'une étude d'interactions entre deux charges de même signe, l'interaction électrostatique est dominante. Ainsi un pseudo-résidu chargé et présent sur l'axe de conduction des ions  $K^+$  crée une barrière d'énergie électrostatique incompatible avec une conduction ionique.



**Figure 35. Variation de la distance entre l'atome d'azote du MTS et l'ion  $K^+$**

$R_m$  correspond à la valeur moyenne des distances entre l'atome d'azote des agents MTS (dans notre cas le MTSET) et l'ion  $K^+$ . Elle est calculée pour chaque position  $z$  de l'ion  $K^+$  lorsqu'il parcourt l'axe de diffusion.

La tête chargée du pseudo-résidu Cys-SET a un rayon de 2.1 Å calculé du centre de l'atome d'azote au centre des atomes d'hydrogène liés aux carbones qui entourent l'azote. Le rayon de van der Waals de l'ion  $K^+$  est de 1,5 Å. Nous faisons alors l'hypothèse que pour des distances de  $R_m$ , inférieures à 4 Å nous sommes en présence d'une obstruction

stérique du canal par les atomes du pseudo-résidu Cys-SET. Dans un tel cas, l'interaction électrostatique entre K<sup>+</sup> et le pseudo-résidu chargé positivement rend impossible toute conduction ionique.

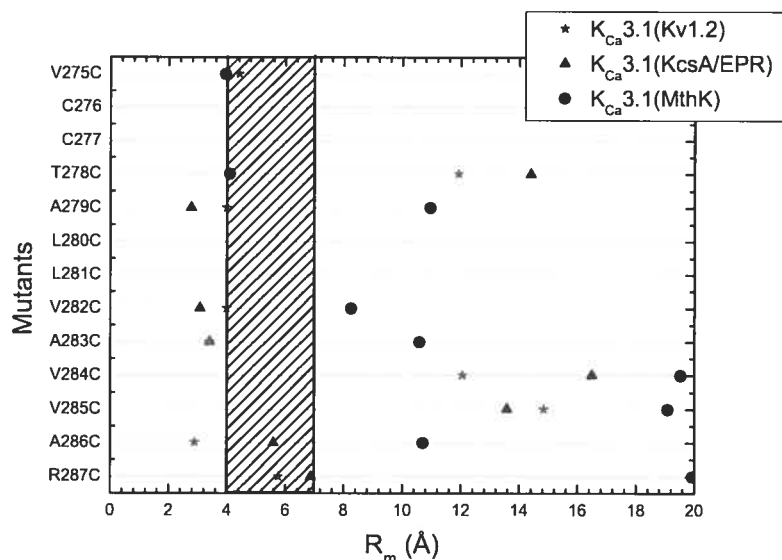
Les radicaux des pseudos-résidus V275C-SET et T278C-SET obstruent le pore pour une distance minimum  $R_m$  de 4 Å (Figure 35). Les pseudo-résidus Cys-SET insérés aux positions A279C, V282C, A283C et A286C sont présents dans le pore sans l'obstruer. Les têtes chargées des pseudo-résidus Cys-SET sont situées à une distance minimum comprise entre 8 Å et 12 Å par rapport au pore du canal. Les pseudo-résidus insérés sur les mutants V284C, V285C et R287C ne pointent pas vers le pore et ils sont localisés à plus de 20 Å de l'axe Z.

### ***B.3. Orientation des agents MTS insérés dans les modèles K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2) et K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR)***

La Figure 33 (D à I) présente les configurations adoptées par les pseudo-résidus Cys-SET sur les mutants V275C, A283C et V286C. Comme nous l'avons déjà remarqué aux paragraphes précédents, l'ouverture intracellulaire des modèles K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR) et K<sub>Ca</sub>3.1(kv1.2) est plus petite que dans le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK) (Figure 33 A, B et C). Cela localise les pseudo-résidus plus proches de l'axe de diffusion lorsqu'ils sont présents dans le pore et accentue l'effet de charge entre l'ion K<sup>+</sup> et le pseudo-résidu.

La Figure 36 présente la valeur minimum de la distance  $R_m$  pour les résidus ayant donné un résultat expérimental significatif. Comme nous l'avons déjà précisé précédemment, les têtes chargées des pseudo-résidus Cys-SET ayant une distance inférieure à 4 Å obstruent le pore et l'interaction électrostatique entre l'ion K<sup>+</sup> et le pseudo-résidu chargé positivement ne permet pas sa diffusion à travers le canal. De plus, en deçà de 3 Å la représentation du solvant par une constante diélectrique perd son sens. Cette limite théorique du modèle de Born sera discutée dans le chapitre suivant. Pour des valeurs de  $R_m$  comprises entre 4 Å et 7 Å, nous sommes presque en deçà de la limite de

validité du modèle de représentation continue du milieu diélectrique. Cette zone est représentée en hachuré sur la Figure 36.

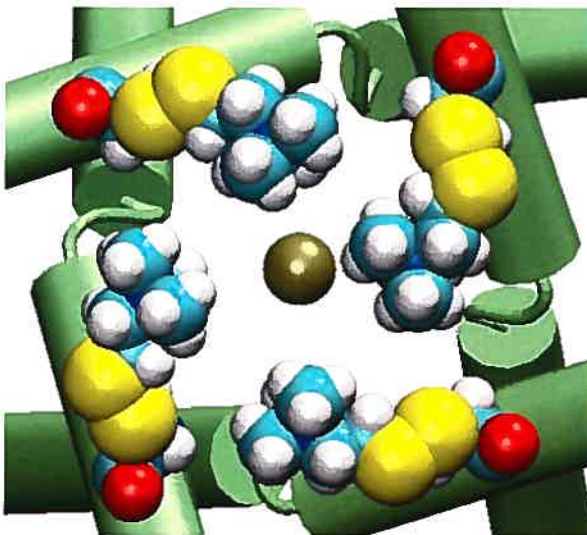


**Figure 36. Distance moyenne entre la tête chargée du pseudo Cys-SET et l'axe de diffusion.**

$R_m$  est la distance moyenne entre les têtes chargées des pseudo-résidus Cys-SET (l'atome d'azote, N) insérés sur les cystéines mutées et l'axe de diffusion des ions  $K^+$  ( $x=0$  et  $y=0$ ).

Les configurations adoptées par les Cys-SET présentés à la Figure 33 (H et F) et à la Figure 37 donnent une représentation typique d'une distance  $R_m$  comprise entre 4 Å et 7 Å. Même s'il n'y a pas d'obstruction stérique, à cette distance la charge positive du pseudo-résidu Cys-SET reste encore très proche de l'axe de diffusion de l'ion et son effet électrostatique sera évalué. Les modèles  $K_{Ca}3.1(Kv1.2)$  et  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$  donnent des résultats similaires quant à la distribution des têtes chargées des pseudo-résidus insérés sur le segment S6. Ils conduisent à une inhibition totale de la diffusion de l'ion pour les mutants cystéine V275C, A279C, V282C et A283C. Dans le modèle  $K_{Ca}3.1(Kv1.2)$ , le pseudo-résidu A286C-SET obstrue le pore du canal. Enfin, les rayons  $R_m$  des résidus T278C-SET, V284C-SET et V285C-SET se situent entre 12 Å et 16,5 Å.





**Figure 37. Représentation des résidus Cys-SET liés au mutant A287C du modèle K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2)**

Les segments sont représentés par les cylindres verts. L'ion et les atomes des pseudo-résidus Cys-SET sont imprimés sous leur représentation en mode VDW.

Le résidu R287C-SET est un peu particulier puisque la mutation cystéine supprime la charge positive portée par l'arginine. Le pseudo-résidu Cys-SET restitue la charge positive et son profil d'énergie libre de solvation d'un ion K<sup>+</sup> devrait être proche de celui du canal de type sauvage. Même si cette mutation est située près de l'axe nous représentons son profil d'énergie sur la Figure 43 et à la Figure 45.

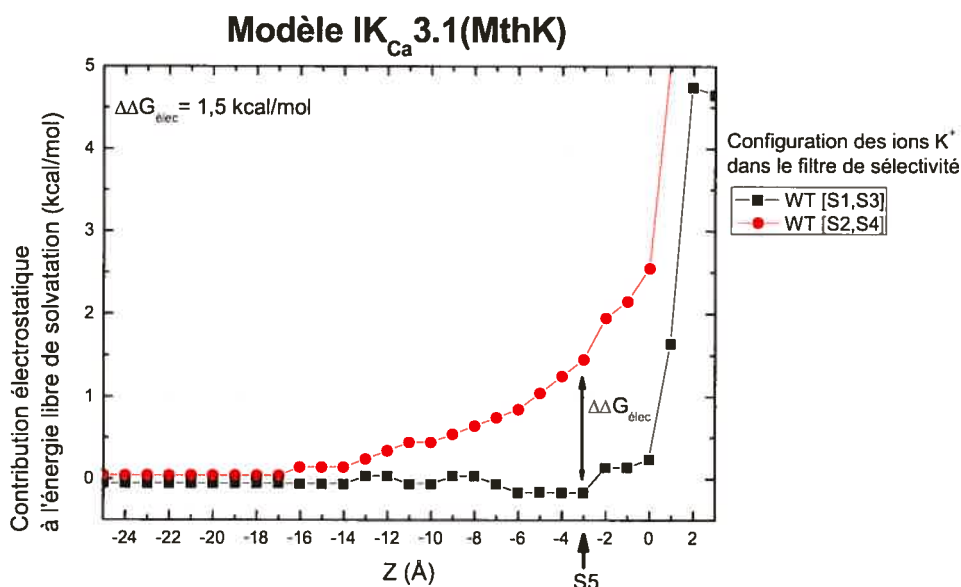
### **C. SCAM modélisé sur le segment S6 du modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK)**

Comme nous l'avons présenté dans les chapitres précédents, le calcul de l'énergie libre de solvation, associé à notre modèle cinétique de la conduction ionique nous permet de déterminer le courant traversant le canal. Dans cette partie, nous présentons pour le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK), les profils d'énergie libre de solvation d'un ion K<sup>+</sup> et les courbes courant-voltage qui en sont déduites.



### C.1. Profils de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation

La contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation d'un ion  $K^+$  le long de l'axe de diffusion ( $Z$ ) a été calculée comme nous l'avons présenté dans le chapitre « Méthodologie 2 ème Partie ». La Figure 38 présente les profils d'énergie libre calculés pour le canal de type sauvage du modèle  $K_{Ca}3.1$ (MthK) lorsque les ions présents dans le filtre de sélectivité sont présents dans les configurations [S1,S3] et [S2,S4]. Dans la configuration [S1,S3], le profil d'énergie libre ne présente pas de barrière d'énergie à la conduction des ions. Le minimum d'énergie est obtenu pour  $z = -3 \text{ \AA}$  ; cela définit la position du site de liaison S5.

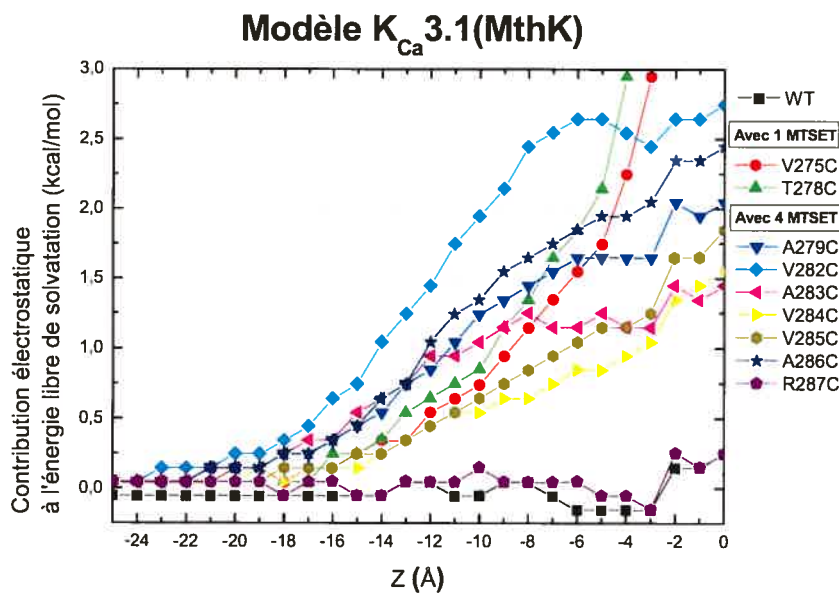


**Figure 38. Profils d'énergie libre pour transfert un ion  $K^+$  à partir du milieu intracellulaire dans le canal.**

Les courbes représentent la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation nécessaire pour transférer un ion  $K^+$  à partir du milieu intracellulaire vers l'intérieur du canal  $K_{Ca}3.1$ (MthK) de type sauvage. La courbe noire est calculée lorsque les ions dans le filtre de sélectivité sont dans la configuration [S1,S3] et la courbe rouge pour des ions dans la configuration [S2,S4]. La différence d'énergie en  $z = -3 \text{ \AA}$  entre les deux configurations des ions dans le filtre est de 1,5 kcal/mol.

Lorsque les ions dans le filtre de sélectivité sont dans la configuration [S2,S4], le profil d'énergie libre présente une barrière d'énergie à partir de  $z = -16$  Å. La différence d'énergie entre les configurations [S1,S3] et [S2,S4] est égale à 1,5 kcal/mol en  $z = -3$  Å. Le calcul du profil d'énergie libre de solvation pour les mutants cystéine du modèle  $K_{Ca}3.1(MthK)$  ne montre pas de variation significative avec le profil d'énergie libre du canal de type sauvage (données non présentées).

La Figure 39 présente les profils d'énergie libre pour les modèles du  $K_{Ca}3.1(MthK)$  muté dans lesquels nous avons inséré l'agent MTSET. La courbe noire présentée à la Figure 39 correspond au profil d'énergie libre de solvation de l'ion dans le canal de type sauvage. Les profils d'énergie des mutants cystéine A279C, A289C, V282C, A283C, V284C, V285C, A286C et R287C ont été calculés avec 4 pseudo-résidus Cys-SET liés au tétramère.



**Figure 39. Profils de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation d'un ion  $K^+$  dans le pore du modèle  $K_{Ca}3.1(MthK)$ .**

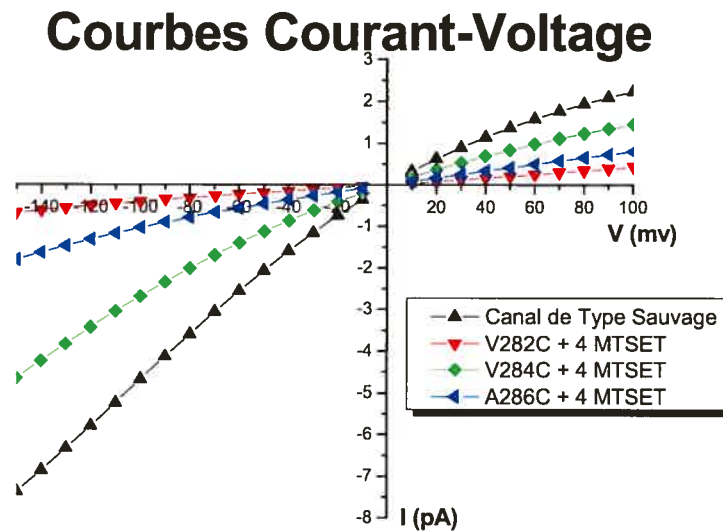
Les ions dans le filtre de sélectivité sont dans la configuration [S1,S3]. La courbe noire définit le profil d'énergie libre de solvation de l'ion dans le canal de type sauvage. Les autres courbes correspondent aux profils calculés pour les différents mutants cystéine sur lesquels 1 ou 4 MTSET ont été insérés.

Les profils d'énergie des mutants cystéine V275C et T278C ont été calculés avec 1 seul pseudo-résidu Cys-SET lié au tétramère. Les ions dans le filtre de sélectivité sont dans la configuration [S1,S3]. Dans la configuration [S2,S4], la valeur de l'énergie en S5 serait majorée de 1,5 kcal/mol (Figure 38) sans changer les rapports d'énergie entre les différents mutants.

Plus la barrière d'énergie est importante par rapport au profil d'énergie du canal de type sauvage, et plus la diffusion des ions sera difficile dans le canal. Les pseudo-résidus Cys-SET insérés sur les mutants V275C, T278C et V282C, pointent vers le pore et donnent les barrières d'énergie libre les plus fortes, ce qui va dans le sens des résultats expérimentaux puisque pour ces mutants nous mesurons une inhibition totale après introduction du MTSET. Les profils calculés pour les mutants V275C-SET et T278C-SET ne sont qu'indicatif puisqu'à partir de  $z = -5 \text{ \AA}$  la tête chargée des résidus Cys-SET est à moins de  $3 \text{ \AA}$  de l'ion  $K^+$  (Figure 35). Par contre, le résidu V282C-SET permet un calcul du profil tout au long de l'axe de diffusion. En  $z = -3 \text{ \AA}$ , la valeur de l'énergie libre de solvatation pour le mutant V282C-SET est égale à 2,5 kcal/mol. C'est la plus haute barrière d'énergie pour un mutant cystéine connu pour inhiber le canal lors des expériences de SCAM. Tous les autres pseudo-résidus présentent des barrières d'énergie plus faibles. Il nous faut calculer la conductance du canal déduite à partir des profils d'énergie pour distinguer les barrières d'énergie provoquant une inhibition totale de la conduction, de ceux donnant une inhibition partielle. Pour le mutant A279C avec 4 MTSET, nous observons une barrière d'énergie libre de plus de 1,5 kcal/mol supérieure à celle du canal de type sauvage. Cette barrière suggère d'ores et déjà un effet d'inhibition important sur la conductance du canal alors que nous ne retrouvons pas un tel comportement lors des expériences de SCAM. Nous traiterons ce point dans le chapitre « Discussion ».

### C.2. Calcul de la conduction dans le modèle du canal K<sub>Ca</sub>3.1(MthK)

Comme nous en avons discuté dans les chapitres précédents, la connaissance de la différence d'énergie libre quand l'ion est à l'infini (correspondant à la configuration [S1,S3]) et quand l'ion est au centre du canal (correspondant à la configuration [S1,S3,S5]) nous permet de calculer les taux de transition  $k_e$  et  $k_i$ . Nous en déduisons alors la courbe courant-voltage.

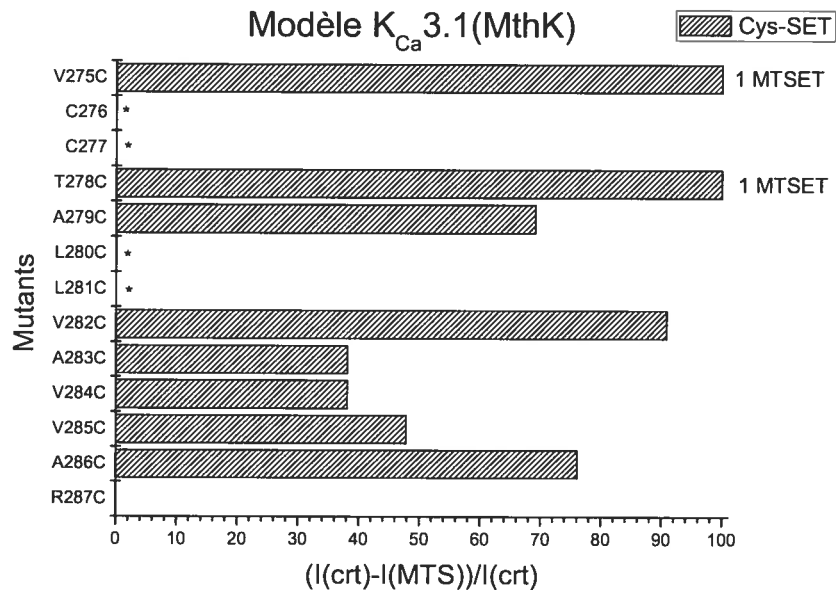


**Figure 40. Courbes Courant-Voltage du modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK)**

Courbes courant-voltage calculées pour le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK) de type sauvage, des mutants V282C-SET, V284C-SET et A286C-SET avec 4 MTSET. Pour une meilleure clarté, nous ne présentons que les courbes courant-voltage du canal de type sauvage et d'un mutant correspondant à chacun des trois groupes de répartition du pseudo-résidu Cys-SET tel que présenté à la Figure 35.

Ces valeurs sont directement extraites des profils d'énergie de la Figure 39 pour  $z=-25$  Å et  $z=-3$  Å. Nous calculons la courbe courant-voltage pour tous les profils d'énergie présentés. La courbe noire de la Figure 40 correspond à la courbe courant voltage calculée pour le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK) de type sauvage. Les autres courbes correspondent aux mutants V282C, V284C et A286C sur lesquels nous avons inséré 4 MTSET. Nous mesurons une inhibition quasi totale pour le mutant V282C et des inhibitions partielles

pour les mutants V284C et A286C. À partir des courbes courant-voltage, nous en déduisons le rapport d'inhibition du courant dû à la présence des MTSET liés aux cystéines. La figure suivante compare les valeurs des courants entrants pour un potentiel membranaire de -140 mV (conditions expérimentales) pour tous les mutants cystéine.



**Figure 41. Résultats du SCAM modélisé avec l'agent MTSET**

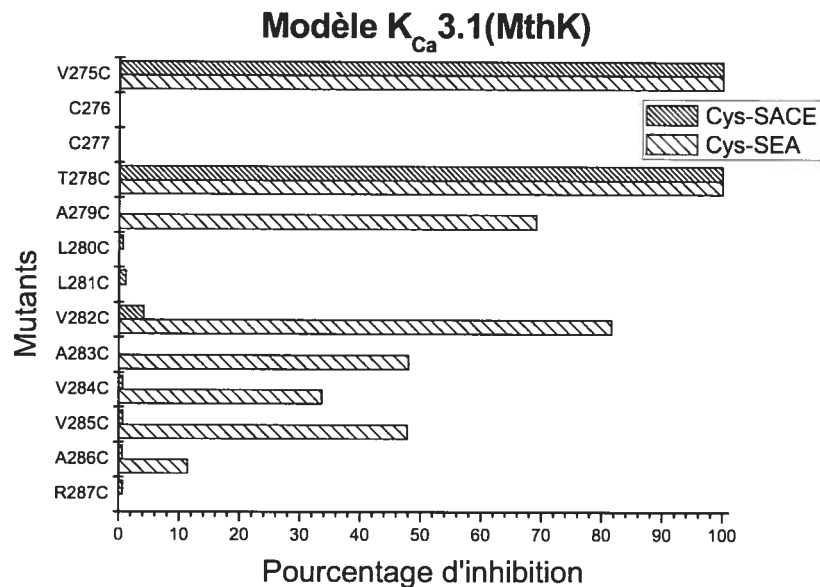
Pourcentage d'inhibition prédit après l'introduction du pseudo-résidu Cys-SET sur 4 monomères des modèles du canal K<sub>Ca</sub>3.1(MthK). Nous reprenons la représentation des résultats utilisée dans la première publication. Les mutants L280C et L281C ne donnent aucune expression fonctionnelle (\*). Les cystéines endogènes C276 et C277 correspondent au canal de type sauvage et n'ont été présentées que pour visualiser la structure en hélice  $\alpha$  des effets d'inhibition mesurés lors des expériences de SCAM pour les résidus V275 au résidu V282. Un seul résidu Cys-SET sur les mutants V275C et T278C est suffisant pour obtenir une inhibition totale du courant. Pour tous les autres mutants, 4 pseudo-résidus Cys-SET ont été insérés.

La Figure 41 présente les résultats du SCAM modélisé réalisés avec le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK), sous la même forme que ceux présentés dans la première publication pour les expériences de SCAM. Une comparaison entre les résultats théoriques du SCAM et les résultats expérimentaux de la première publication sera présentée dans le chapitre « Discussion ». On peut néanmoins observer que l'on obtient trois types différents de conduction ionique après l'insertion des agents MTSET sur chacune des cystéines mutées

du tétramère ; inhibition totale, inhibition partielle et aucun effet. Pour les mutants V275C et T278C, un seul pseudo-résidu Cys-SET suffit pour obstruer le pore du canal, alors qu'il faut la présence de 4 MTSET sur les cystéines du canal mutant V282C pour obtenir une inhibition supérieure à 90 %. Les mutants A279C, A283C, V284C, V285C et A286C conduisent à des inhibitions partielles en présence de 4 pseudo-résidus par canal. Le mutant R287C avec 4 pseudo-résidus Cys-SET donne la même conduction que le canal de type sauvage. Le calcul de la conductance avec 4 MTSET des mutants L280C et L281C donne également une inhibition partielle (résultats non présentés). Il a été impossible de mesurer la fonction de ces deux derniers mutants, ce qui implique que la mutation cystéine a altéré soit l'expression ou soit la fonction de la protéine. Les cystéines endogènes C276 et C277 du canal de type sauvage qui ont été préservées sur le graphique de la Figure 41 pour mettre en évidence la structure hélicoïdale des effets d'inhibition mesurés lors du SCAM modélisé du résidu V275C au résidu V282C. Le calcul de la conductance avec 4 MTSET sur les cystéines endogènes C276 et C277 donne une inhibition partielle (résultats non présentés) suggérant que si les MTSET pouvaient expérimentalement se lier aux cystéines endogènes nous mesurerions une inhibition partielle du courant. Ce n'est pas le cas ce qui est cohérent avec les modèles du canal K<sub>Ca</sub>3.1 qui n'orientent pas les cystéines vers le pore et semblent donc peu accessibles.

### ***C.3. Résultats du SCAM modélisé avec le MTSEA et le MTSACE***

Nous avons également calculé le rapport d'inhibition du courant ionique des modèles K<sub>Ca</sub>3.1(MthK) en utilisant les pseudo-résidus Cys-SEA et Cys-SACE.



**Figure 42. Résultats du SCAM modélisé avec les agents MTSEA et MTSACE**

Pourcentage d'inhibition dû à l'introduction du pseudo-résidu Cys-SEA ou Cys-SACE sur les 4 monomères des modèles du K<sub>Ca</sub>3.1(MthK) mutants.

Nous constatons que le MTSEA a des effets similaires à ceux du MTSET. Par contre, l'agent MTSACE inhiberait seulement les canaux mutants V275C et T278C parce qu'il est directement orienté vers le pore du canal. Nous avons des données expérimentales permettant de comparer les résultats du modèle numérique avec les agents MTSEA et MTSACE. Nous discuterons donc peu de ces résultats dans le chapitre « Discussions ».

#### **D. SCAM modélisé pour les modèles K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR) et K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2)**

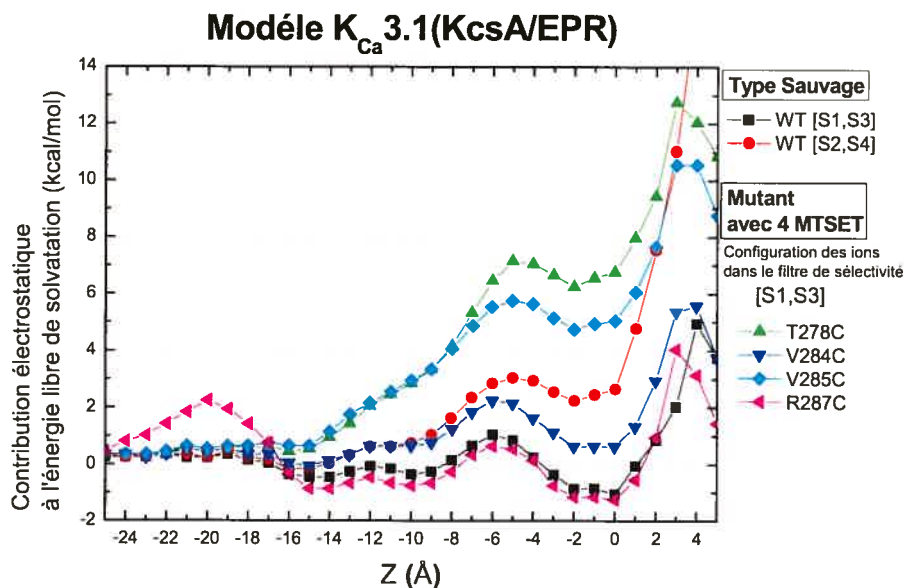
La Figure 36 nous a permis d'identifier les mutants V275C, A279C, V282C, A283C et A286C comme conduisant à une inhibition totale du courant lorsque nous insérons le MTSET sur les modèles K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR) et K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2). Nous calculons la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation pour transférer un ion K<sup>+</sup> du

milieu intracellulaire au centre du pore du canal pour les autres mutants cystéine des modèles K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR) et K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2).

### D.1. Détermination des inhibitions totales dans le modèle

#### K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR)

La Figure 43 présente les profils d'énergie libre calculés pour les modèles K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR). Tout d'abord nous observons, qu'à la différence du profil d'énergie libre de solvation d'un ion K<sup>+</sup> calculé pour le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(MthK) de type sauvage, le profil d'énergie libre du modèle K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR) de type sauvage présente des barrières d'énergie et plusieurs sites de liaison.



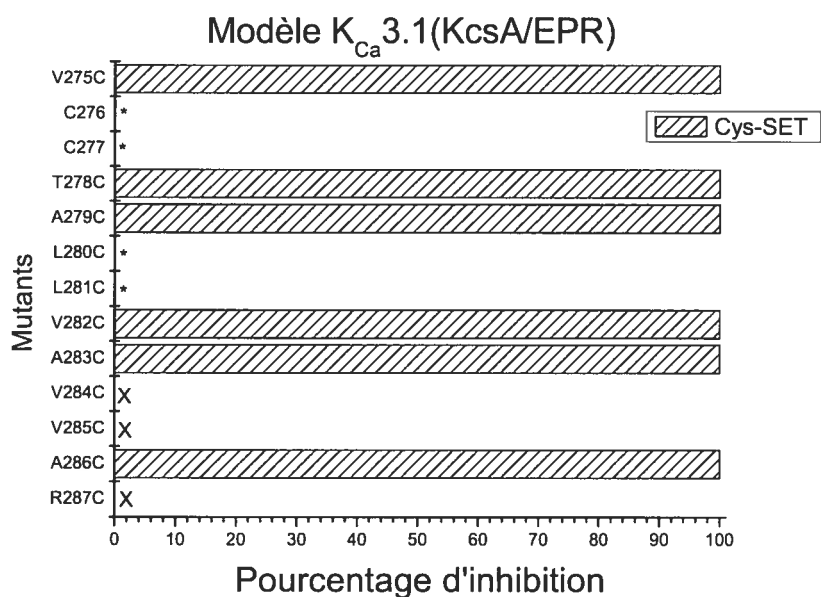
**Figure 43. Profils de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation dans le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR)**

La courbe noire correspond au profil d'énergie libre de solvation de l'ion dans le canal de type sauvage. Les autres courbes correspondent aux profils calculés pour les différents mutants cystéine sur lesquels 4 MTSET ont été insérés. Pour les modèles mutés, les ions dans le filtre de sélectivité sont dans la configuration [S1,S3].



Le site de liaison le plus stable est situé en S5 avec une énergie de -1,1 kcal/mol séparé d'un autre site de liaison par une barrière d'énergie de 1,3 kcal/mol. En  $z = 0$  Å la différence d'énergie libre entre les configurations [S1,S3] et [S2,S4] est de 3,7 kcal/mol. Le modèle cinétique de conduction d'un ion  $K^+$  à travers le canal, présenté à la Figure 25 du chapitre « Méthodologie 2<sup>e</sup> Partie », doit être redéfini lorsque le profil de l'énergie libre présente de nouveaux sites de liaison. Le mécanisme cinétique utilisé pour le modèle  $K_{Ca3.1}(MthK)$  ne nous permet donc pas de calculer les inhibitions partielles déduites à partir du profil d'énergie du modèle  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$ . Nous ne calculerons donc pas les courbes courant-voltage pour les profils d'énergie de solvation déterminés à l'intérieur du modèle  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$ .

Même si nous ne pouvons pas calculer les courbes courant-voltage des mutants cystéine liés aux MTSET, il nous est possible de comparer les barrières d'énergie. La forte différence d'énergie, en  $z = 0$  Å, entre les profils d'énergie libre de solvation calculés dans le modèle  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$  de type sauvage et le mutant T278C-SET est égale à 7,7 kcal/mol. Cette énergie est deux fois plus élevée que celle calculée entre les configurations [S1,S3] et [S2,S4]. Pour comparaison, le mutant V282C-SET du modèle  $K_{Ca3.1}(MthK)$  donne une inhibition de 90 % avec une différence d'énergie libre 66% plus élevée que celle calculée entre les configurations [S1,S3] et [S2,S4], soit 1,5 kcal/mol. La différence d'énergie entre le profil d'énergie libre calculé pour le canal de type sauvage et le mutant T278C-SET suggère une forte inhibition du courant. Le profil d'énergie calculé dans le mutant V285C-SET suit la même tendance avec une différence d'énergie de 6,1 kcal/mol. À l'inverse le profil d'énergie libre calculé dans le pore des mutants V284C et R287C donne une différence d'énergie égale à 1,6 kcal/mol en  $z = 0$  Å, avec le profil d'énergie libre du canal de type sauvage. Il est susceptible de provoquer une inhibition partielle du canal plutôt qu'une inhibition totale.



**Figure 44. Résultats du SCAM modélisé pour le modèle  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$  avec l'agent MTSET**

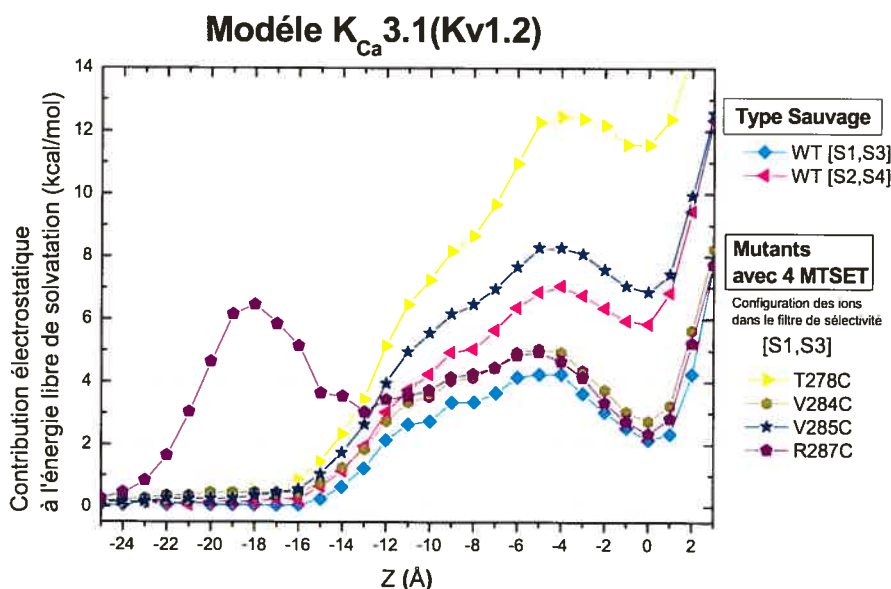
Pourcentage d'inhibition dû à l'introduction du pseudo-résidu Cys-SET sur les 4 monomères des modèles du  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$  mutants. Les mutants L280C et L281C ne donnent aucune expression fonctionnelle (\*). Les cystéines endogènes C276 et C277 correspondent au canal de type sauvage. Mutants pour lesquels nous n'avons pas évalué avec certitude le comportement de la conduction (X).

Pour les résultats du SCAM présentés à la Figure 44, en toute rigueur nous ne rapporterons que l'inhibition électrostatique due à la charge du mutant T278C-SET et les inhibitions stériques déjà identifiées. Nous mettons une croix (X) pour les mutants pour lesquels nous n'avons pas évalué avec certitude le comportement de la conduction.

### ***D.2. Détermination des inhibitions totales dans le modèle $K_{Ca}3.1(Kv1.2)$***

L'analyse faite sur les profils d'énergie libre du modèle  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$  s'applique également pour les profils d'énergie du modèle  $K_{Ca}3.1(Kv1.2)$  de la Figure 45. Le profil d'énergie libre dans la configuration [S1,S3] du canal de type sauvage présente une barrière d'énergie de 4,2 kcal/mol qui sépare le milieu intracellulaire du site de liaison S5 localisé en  $z=0$  dont une énergie libre est de 2,1 kcal/mol. L'énergie du site de

liaison est de 5,8 kcal/mol pour la configuration [S2,S4]. Une barrière d'énergie de 4,2 kcal/mol, soit 7,1 kT, semble incompatible avec une conduction ionique dans le pore d'un canal. Néanmoins si nous comparons les profils d'énergie du canal de type sauvage avec les profils d'énergie libre des mutants cystéine nous pouvons alors reprendre l'analyse faite pour le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR). On identifie également une inhibition de type électrostatique pour le mutant T278C-SET. Comme pour le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR), nous observons une forte barrière d'énergie pour le mutant V285C-SET et une plus faible barrière pour le mutant V284C-SET.



**Figure 45. Profils de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation dans le modèle K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2)**

Les ions dans le filtre de sélectivité sont dans la configuration [S1,S3]. Les courbes présentent la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation pour transférer un ion K<sup>+</sup> du solvant vers la cavité du canal (en z) pour le canal de type sauvage et pour les mutants cystéine avec 4 MTSET.

Proches de l'axe de diffusion des ions (Figure 36) et présentes dans le milieu intracellulaire (à environ z= -18 Å), les têtes chargées des pseudo-résidus Cys-SET insérées sur le canal mutant R287C sont responsables d'une barrière d'énergie d'environ 6,5 kcal/mol. La mutation du résidu arginine pour un pseudo résidu Cys-SET remplace

une charge positive dans une chaîne de 7 Å de long par une autre chaîne positive de 8 Å de long et orientée 3 Å plus proche de l'axe de diffusion (avec  $R_m \approx 6$  Å). La proximité de la tête chargée du pseudo-résidu avec l'axe de diffusion est responsable de la barrière d'énergie centrée en  $z = -18$  Å. Cette barrière crée également dans le profil d'énergie libre un nouveau site de liaison. La Figure 36 nous a également permis d'identifier les mutants V275C, A279C, V282C, A283C et A286C comme menant à une inhibition totale du courant lorsque nous insérons le MTSET. Le graphe représentant les résultats du SCAM du modèle K<sub>Ca</sub>3.1(KcsA/EPR), de la Figure 44, peut également s'appliquer au modèle K<sub>Ca</sub>3.1(Kv1.2).

Dans le chapitre suivant nous allons définir les limites de notre étude et comparer les taux d'inhibition calculés pour le modèle du canal K<sub>Ca</sub>3.1 par rapport aux mesures obtenues durant les expériences de SCAM.

## VIII. DISCUSSION

Nous avons créé plusieurs modèles atomiques du canal  $K_{Ca3.1}$  dans sa configuration ouverte. Pour chacun des modèles nous avons généré des mutants cystéine sur lesquels nous avons inséré les agent MTS. Quand cela a été possible nous avons calculé les profils d'énergie libre de solvation d'un ion  $K^+$  et les courbes courant-voltage des modèles du canal  $K_{Ca3.1}$ . Nous allons maintenant identifier le modèle du canal  $K_{Ca3.1}$  ouvert qui peut le mieux rendre compte des résultats des expériences de SCAM réalisées avec l'agent MTSET.

### A. Hypothèses et limites de la technique du SCAM

L'interprétation de nos résultats dépend des hypothèses que nous faisons sur la technique du SCAM.

#### *A.1. Mesure du courant unitaire et probabilité d'ouverture du canal*

Comme nous l'avons abordé dans la première publication, pour les mutants A283C, V285C et V286C nous avons mesuré une augmentation du courant global après l'introduction de l'agent MTSET dans la solution. Toutefois, les mesures du courant unitaire de ces mutants ont montré qu'il y avait une diminution de la conductance unitaire avec une augmentation importante de la probabilité d'ouverture. L'augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux compense pour la diminution du courant unitaire de sorte que le courant moyen se voit augmenté. C'est pourquoi, seule la mesure de l'amplitude du courant unitaire permet d'évaluer l'effet des agents MTS sur la conductance du canal. La mesure d'un courant unitaire donne des résultats plus significatifs que la mesure d'un courant global car elle est indépendante de la probabilité d'ouverture.

### ***A.2. Liaison silencieuse et les cystéines endogènes***

Certains résidus cystéine peuvent être accessibles et lier les agents MTSET sans que cela n'affecte le courant unitaire du canal. C'est ce que nous appelons une liaison silencieuse. Cette absence d'effet sur la conductance unitaire peut être interprétée comme l'absence de liaison covalente entre l'agent MTS et la cystéine. Mais elle peut également être interprétée comme une absence d'effet électrostatique du pseudo-résidu Cys-SET sur la conduction ionique. La seule mesure du courant unitaire ne peut pas permettre de discriminer entre ces deux hypothèses. Dans ce cas nous nous référerons à notre modèle atomique du canal pour déterminer si on aurait dû avoir un effet sur la conductance. Dans le cas d'une inhibition partielle calculée sur le modèle nous pourrions penser qu'il n'y a pas eu de liaison entre la cystéine et l'agent MTS. Par contre en absence d'effet sur le courant (calculé sur le modèle) nous ne pourrions pas discriminer entre une liaison silencieuse et une absence de liaison entre la cystéine muté et l'agent MTS. Une vérification expérimentale serait de muter le résidu concerné par un résidu chargé. Une fois muté, si le canal s'exprime et présente un comportement similaire au canal de type sauvage c'est que le résidu chargé n'a pas d'effet sur la conductance ce qui nous permettrait de conclure qu'il n'y a pas eu de liaison Cys-MTS.

Dans le cas des cystéines endogènes, nous avons inséré un nombre variable de MTSET sur les cystéines C276 et C277. Le calcul du rapport d'inhibition réalisé avec tous les modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  ne donne lieu à aucune liaison silencieuse (les données ne sont pas présentées). Ce qui nous laisse penser que si une des cystéines avait réagi avec le MTSET, cela aurait affecté la mesure de la conductance unitaire. Nous n'avons pas mesuré de variation significative du courant unitaire sur le canal de type sauvage après introduction et lavage du MTSET dans le milieu intracellulaire. Nous supposons qu'il n'y a pas eu de liaison entre l'une des cystéines endogènes et le MTSET.

### ***A.3. Hypothèses sur la structure des mutants cystéine***

La technique du SCAM fait l'hypothèse que la mutation cystéine ne modifie pas la structure du canal. Dans notre cas, un changement de structure pourrait modifier l'accessibilité d'une des cystéines endogènes du segment S6 et la rendre disponible pour une liaison avec un agent MTS. La mutation cystéine sur les résidus L280 et L281 altère l'expression et/ou la fonction du canal. Il est également plausible que la mutation puisse modifier significativement la structure du canal sans que cette altération ne soit directement observable par la mesure de la conduction unitaire. Dans un tel cas, l'inhibition mesurée après l'introduction de l'agent MTSET, peut refléter une structure différente de celle que nous étudions. Nous avons également observé que la probabilité d'ouverture des mutants V275C et V284C, est supérieure à celle du canal de type sauvage (résultats non présentés). Ce qui peut aussi être dû à une modification de la structure du canal muté.

Afin d'évaluer la pertinence de cette hypothèse, toutes différences dans les propriétés d'un canal mutant par rapport au canal de type sauvage (avant l'introduction d'un des agents MTS) doivent être prises en considération dans l'interprétation des résultats.

### ***A.4. Accessibilité des résidus cystéine à l'eau***

Le matériel et le protocole utilisés lors des mesures de courant unitaire reportées dans la première publication, ne nous permettent pas de comparer l'accessibilité des cystéines mutées. La cinétique menant à l'inhibition d'un canal, dépend de l'accessibilité du résidu cystéine depuis le milieu intracellulaire. L'accessibilité est alors définie comme le temps mis par l'agent MTS pour modifier la cystéine cible. Dans notre cas, la notion d'accessibilité d'un résidu dépend également de l'état d'ionisation de la cystéine. Comme nous l'avons vu dans le chapitre « Méthodologie ; 1ère Partie », pour qu'il y ait une liaison covalente entre la cystéine et l'agent MTSET, l'atome de soufre de la cystéine doit

être dans son état ionisé  $S^-$ . Lorsque la cystéine est dans l'état SH, elle ne peut pas se lier à un des agents MTS. L'état d'ionisation de la cystéine dépend de son environnement proche et de son accessibilité aux molécules d'eau. C'est pourquoi nous réduisons la notion d'accessibilité à la proximité des molécules d'eau. Si une cystéine réagit avec un agent MTS c'est qu'elle est accessible à l'eau.

Les résultats du SCAM reflètent donc essentiellement l'accessibilité à l'eau puisque c'est une condition nécessaire à la réaction entre la cystéine et le MTS.

### ***A.5. Comparaison avec des résultats existants***

Les travaux de V. Jogini et B. Roux (2005) présentent des profils d'énergie libre calculés dans plusieurs canaux potassiques dont les structures ont été cristallographiées comme les canaux MthK, Kv1.2, KvAP, KirBac1.1 et le Kv1.2 (Jogini, V. *et al.*, 2005). Il est difficile de faire correspondre un profil d'énergie d'un canal à un autre puisque la différence dans la séquence primaire affecte le profil d'énergie. De plus le modèle du canal Shaker dans la configuration ouverte a été modélisé à partir de la structure du canal KvAP. Néanmoins nous pouvons observer que le profil d'énergie libre calculé pour les modèles utilisant la structure du canal MthK présentent également un profil sans barrière d'énergie lorsqu'un ion potassium est transféré du solvant vers la cavité intracellulaire du canal.

## **B. Limite théorique de la modélisation du SCAM**

Comme nous l'avons indiqué dans le paragraphe précédent, nous travaillons sur un modèle rigide du canal, cela entraîne également des limites dans l'étude de la conductance.

### ***B.1. Hypothèse sur la structure du modèle atomique***

La première hypothèse est directement liée aux limites de la méthode de calcul de l'énergie libre de solvation. Lors du calcul du profil d'énergie libre le long de l'axe du



pore, seuls les atomes d'hydrogène et du pseudo-résidu Cys-SET subissent 200 pas d'optimisation par minimisation de l'énergie. La diffusion est calculée sur une structure « rigide ». La dynamique moléculaire n'a été utilisée que pour créer un modèle atomique du canal et pour définir les pseudo-résidus Cys-SET, Cys-SEA et Cys-SACE. Lors de la résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann, les atomes de la structure du canal ne sont utilisés que pour déterminer la distribution des charges autour du pore du canal.

La conséquence directe de cette limite est que nous travaillons à l'échelle de temps de la conduction ionique (de l'ordre de 5 ns). Durant cette période de temps, nous supposons que les atomes du canal fluctuent peu et la structure secondaire du canal demeure stable. Dans ce cas, nous ne pouvons donc comparer les prédictions du modèle qu'à des mesures de conductance unitaire. La probabilité d'ouverture du canal fait intervenir un changement de la structure secondaire qui correspond à une plus grande échelle de temps qui nous est inaccessible puisque nous travaillons sur une structure rigide.

### ***B.2. Limite de la représentation d'un milieu continu***

Même si le modèle continu de Born donne des résultats en accord avec la théorie pour un faible nombre de molécules d'eau, l'ion dont nous calculons l'énergie libre de solvation ne doit pas être à moins de 3 Å des atomes du canal. En deçà de cette limite la constante diélectrique attribuée au solvant perd son sens. Pour ces faibles distances, le calcul de l'énergie libre devient également très sensible aux faibles fluctuations atomiques. De plus, dans des espaces restreints comme le filtre de sélectivité des canaux potassiques, l'absence de molécules d'eau ainsi que la flexibilité de la structure ne permettent pas d'utiliser un modèle continu. Ainsi, plus les atomes des pseudo-résidus sont proches de l'ion  $K^+$  et plus la valeur de la contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation pour transférer un ion  $K^+$  du milieu intracellulaire au centre de la cavité, est sensible à la configuration du pseudo-résidu. Une faible variation dans la configuration des atomes du pseudo-résidu peut alors avoir une grande répercussion sur les valeurs calculées de l'énergie libre de solvation de l'ion.

C'est pourquoi nous nous tiendrons à une limite de 3 Å entre la surface de la protéine et le rayon de l'ion  $K^+$ .

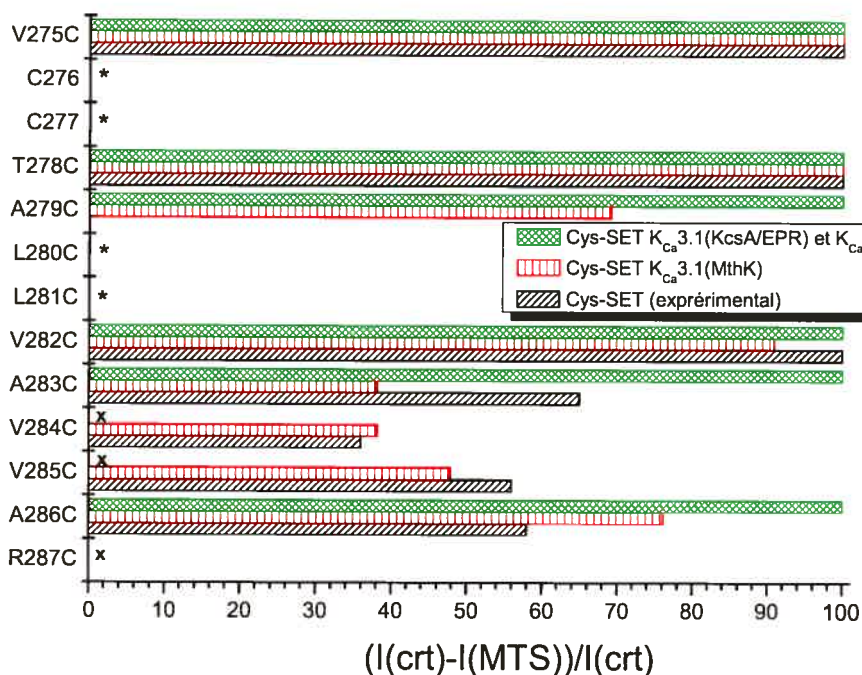
### ***B.3. Limite du mécanisme cinétique***

Comme nous l'avons vu pour les modèles  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$  et  $K_{Ca3.1}(Kv1.2)$ , le modèle cinétique de conduction d'un ion  $K^+$  à travers le canal (présenté à la Figure 25 du chapitre « Méthodologie 2<sup>e</sup> Partie ») doit être redéfini. En toute rigueur, plusieurs sites de liaison devraient être pris en considération et de nouveaux taux de transition doivent être redéfinis en fonction des chemins du nouveau mécanisme cinétique.

Néanmoins, nous pouvons extraire des informations de la structure atomique ainsi que des profils d'énergie. La position de la tête chargée (ou non) de l'agent MTS par rapport à l'axe de diffusion nous permet d'évaluer si nous sommes en présence d'une obstruction du pore du canal. Il est alors possible de rejeter un des modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  sur la base de ces obstruction. Nous pouvons également comparer les profils d'énergie libre des mutants cystéine sur lesquels des agents MTSET ont été insérés. Cela donne une idée du rapport des conductances des mutants cystéine les uns par rapport aux autres.

## **C. Choix du meilleur modèle de canal $K_{Ca3.1}$**

La Figure 46 reprend les résultats du SCAM obtenus par la méthode numérique appliquée aux modèles  $K_{Ca3.1}(MthK)$ ,  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$ ,  $K_{Ca3.1}(Kv1.2)$  et ceux mesurés lors des expériences de SCAM.



**Figure 46. Comparaison des résultats expérimentaux avec les valeurs calculées**

Pourcentage d'inhibition prédit après l'introduction du pseudo-résidu Cys-SET sur 4 monomères des modèles du canal  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$ ,  $K_{Ca}3.1(Kv1.2)$  et  $K_{Ca}3.1(MthK)$  comparé aux résultats expérimentaux. Les mutants L280C et L281C ne donnent aucune expression fonctionnelle (\*). Les cystéines endogènes C276 et C277 correspondent au canal de type sauvage.

Il est difficile de discriminer les modèles du canal  $K_{Ca}3.1$  sur la base des résultats des expériences de SCAM dans la région V275 à V282. Sur cette partie du segment S6, tous les modèles donnent des prédictions similaires, aussi bien pour la disposition des résidus par rapport à l'axe de diffusion que pour le calcul du taux d'inhibition après insertion du MTSET. Tous les modèles du canal ouvert  $K_{Ca}3.1$  conduisent à une inhibition totale due à une inhibition stérique pour le mutant V275C. Seul le mutant A279C du modèle  $K_{Ca}3.1(MthK)$  ne conduit pas à une inhibition totale avec une inhibition partielle de 70 % du courant ionique. Cette inhibition est due au potentiel électrostatique généré par la charge positive du pseudo-résidu Cys-SET, alors que l'inhibition totale obtenue pour le mutant A279C dans les modèles  $K_{Ca}3.1(KcsA/EPR)$  et

$K_{Ca3.1}(Kv1.2)$  est due à la présence du radical du pseudo-résidu Cys-SET dans l'axe du pore. Les mutants T278C et V282C conduisent à une inhibition totale qui n'est pas de la même nature pour le modèle  $K_{Ca3.1}(MthK)$  que pour les modèles  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$  et  $K_{Ca3.1}(Kv1.2)$ . Les mutants V282C-SET des modèles  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$  et  $K_{Ca3.1}(Kv1.2)$  ainsi que le mutant T278C-SET du modèle  $K_{Ca3.1}(MthK)$  conduisent à une inhibition stérique de la conduction ionique. Sur tous les modèles des canaux  $K_{Ca3.1}$  les cystéines endogènes C276 et C277 sont orientées vers le segment S5, ce qui les rend peu accessibles aux agents MTS. Ce résultat est en accord avec l'absence d'effet des agents MTS sur le canal de type sauvage. Les mutants L280C et L281C ne donnent pas de résultats expérimentaux clairs puisque qu'il ne nous a pas été possible de mesurer un courant. Les résultats expérimentaux ne permettent donc pas de rejeter un modèle plutôt qu'un autre. Cette cohérence des résultats pour les différents modèles du canal  $K_{Ca3.1}$ , coïncide avec la similarité de structure du segment S6 que possèdent tous les modèles du résidu V275 jusqu'au résidu V282. Cette région correspond à la cavité centrale du canal.

Au delà de ces résidus, les données expérimentales du SCAM présentent des inhibitions partielles du résidu A283 au résidu A286. Seul le modèle  $K_{Ca3.1}(MthK)$  conduit à des inhibitions partielles sur la même partie du segment S6. Les modèles  $K_{Ca3.1}(Kv1.2)$  et  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$  conduisent à une inhibition totale pour les résidus A283 et A286 due à l'obstruction du pore par le radical du pseudo-résidu Cys-SET. Les profils d'énergie libre calculés pour le mutant V285C-SET inséré dans les modèles  $K_{Ca3.1}(Kv1.2)$  et  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$  présentent de fortes barrières d'énergie suggérant une inhibition du canal. Même si le résidu V284C peut conduire à une inhibition partielle du courant pour les modèles  $K_{Ca3.1}(Kv1.2)$  et  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$ , sur cette partie du segment S6 seul le modèle  $K_{Ca3.1}(MthK)$  se rapproche au mieux des résultats expérimentaux avec des inhibitions partielles pour les résidus A283 - A286. Les modèles du canal  $K_{Ca3.1}$ , qu'il soit basé sur la structure du modèle du canal ouvert KcsA ou sur la structure du canal Kv1.2 ne permettent pas d'expliquer les inhibitions partielles obtenues lors des expériences de SCAM pour les canaux mutants A283, V285 et A286.

L'étroitesse de l'ouverture de leur pore (**Figure 32 et Figure 31**) par rapport à celui du modèle basé sur le canal MthK ne leur permet pas de placer une charge positive sans inhiber complètement la conduction ionique. Les carbones  $C_{\alpha}$  des résidus A282 – A286 sont à une distance comprise entre 10,5 Å et 15 Å de l'axe de diffusion des ions. Dans les modèles  $K_{Ca3.1}(Kv1.2)$  et  $K_{Ca3.1}(KcsA/EPR)$ , les carbones  $C_{\alpha}$  de ces mêmes résidus sont à une distance comprise entre 7 Å et 11,5 Å de l'axe de diffusion du canal. La grande ouverture du pore du modèle  $K_{Ca3.1}(MthK)$  crée une large cavité qui éloigne de l'axe de diffusion les charges placées sur les résidus du segment S6. La présence d'eau (représentée par une constante diélectrique de 80) dans la cavité contribue également à réduire l'effet des charges.

## **D. 5 Comparaison des résultats expérimentaux *versus* les résultats provenant des calculs numériques réalisés sur le modèle $K_{Ca3.1}(MthK)$**

Dans ce paragraphe, nous allons analyser la structure de notre modèle  $K_{Ca3.1}(MthK)$  par rapport au résultats du SCAM provenant des mesures expérimentales du courant.

### ***D.1. Résultats expérimentaux compatibles avec le modèle $K_{Ca3.1}(MthK)$***

Les résultats théoriques présentés à la Figure 46 pour le modèle  $K_{Ca3.1}(MthK)$ , suivent la même tendance que ceux obtenus lors des expériences de SCAM. Nous obtenons en effet des inhibitions totales pour les canaux mutants V275C et T278C. Une inhibition de 92% avec le mutant V282C et des inhibitions partielles pour les mutants A283C, V284C, V285C et A286C sont en accord avec les résultats expérimentaux. La meilleure prédiction est donnée pour le mutant V284C avec moins de 5 % de différence entre l'inhibition calculée théoriquement et celle qui a été mesurée expérimentalement. La plus grande déviation entre les résultats expérimentaux et la production du modèle est donnée pour le canal mutant A283C avec une différence d'inhibition proche de 30 %.

Le canal  $K_{Ca3.1}$  de type sauvage possède 4 cystéines endogènes sur le segment S6. Lorsque le canal est mis en contact avec le MTSET, nous ne mesurons aucune inhibition irréversible. Sur notre modèle  $K_{Ca3.1}$ (MthK) les cystéines endogènes C276 et C277 ne sont pas orientées vers le pore mais vers le segment S5 du canal. Elles sont également proches du centre de la membrane (pour le résidu 277C,  $Z_{C\alpha} = -3 \text{ \AA}$ ). Nous pouvons raisonnablement supposer que l'agent MTSET ne peut pas facilement les atteindre ou que les résidus C276 et C277 ne sont pas assez exposés à l'eau pour permettre la modification du groupement SH. Cette orientation est compatible avec les résultats expérimentaux qui ne donnent aucune inhibition irréversible pour le canal de type sauvage lorsqu'il est mis en contact avec le MTSET.

### ***D.2. Résultats expérimentaux incompatibles avec le modèle $K_{Ca3.1}$ (MthK)***

Le plus grand désaccord entre les résultats expérimentaux et les prédictions de notre modèle numérique s'observe pour le mutant A279C. Expérimentalement nous ne mesurons pas d'inhibition. Cela est en contradiction avec les résultats provenant des simulations numériques qui donnent une inhibition de plus de 70% du courant ionique. Ce résultat théorique s'explique par la proximité du résidu A279 par rapport à l'axe de diffusion ionique. Sur le modèle  $K_{Ca3.1}$ (MthK), l'atome  $C_{\alpha}$  est situé à 8 Å de l'axe de diffusion faisant de ce résidu le plus proche de l'axe Z. Ce résidu semble donc bénéficier d'une grande accessibilité puisqu'il tapisse la paroi du pore. Le fait que le modèle prédise une inhibition partielle, plutôt qu'une inhibition totale du courant, provient de l'orientation du radical du pseudo-résidu A279C-SET qui tapisse la paroi du canal sans pointer en direction de l'axe de conduction. Cette conformation éloigne l'atome d'azote du pseudo-résidu Cys-SET à 11 Å de l'axe du pore. Cette différence entre le SCAM expérimental et l'inhibition calculée est d'autant plus étonnante que les résidus qui précèdent le résidu A279 (du résidu V275 au résidu T278) et les résidus suivants (L282 à R287) donnent des résultats théoriques très cohérents avec les résultats expérimentaux. Pour rendre la structure du modèle  $K_{Ca3.1}$ (MthK) compatible avec l'absence d'effet de

l'agent MTSET sur le canal mutant A279C, il faudrait modifier l'orientation de ce résidu tout en obtenant les mêmes rapports d'inhibition pour les canaux mutants T278C et V282C. L'absence d'information sur l'effet de l'agent MTSET sur les canaux mutants L280C et L281C permet d'élargir la zone structurale à retravailler. Il est également possible qu'une mutation cystéine sur le résidu A279 modifie significativement la structure du canal. Cela est d'autant plus possible que les mutations cystéine des résidus suivants L280C et L281C, altèrent l'expression et/ou la fonction du canal. Cette partie de la protéine serait particulièrement sensible à une mutation cystéine.

Une expérience possible pour vérifier s'il y a bien une liaison entre le mutant A279C et les agents MTSEA et MTSET serait de créer un mutant qui substituerait l'alanine par un résidu chargé. Un mutant A279R ou A279K qui présenterait un courant similaire à celui du canal de type sauvage nous indiquerait que la charge positive sur le résidu A279 n'altère pas la conduction ionique. Une altération du courant du canal mutant A279R par rapport à celui du canal de type sauvage suggérerait par contre que la charge positive du résidu muté perturbe le courant. En absence de mesure électrophysiologique du canal muté, il ne nous est pas possible de faire la distinction entre une absence d'expression du canal à la surface de la membrane et un canal présent à la surface de la membrane, mais non fonctionnel. Cette dernière hypothèse semble d'autant plus probable que le résidu A279 est localisé très proche de l'axe de diffusion des ions  $K^+$  suggérant un effet d'inhibition important sur la conductance du canal.

La Figure 46 présente également le résultat pour le mutant R287C. Ce résultat expérimental n'est pas présenté dans notre première publication mais a été obtenu selon le même protocole et dans des conditions identiques à celles utilisées pour les autres mutants. Le mutant R287C présente une augmentation d'environ 20 % par rapport au canal de type sauvage. L'ajout du MTSET dans la solution rétablit la conduction du canal mutant à la valeur obtenue pour le canal de type sauvage (40 pS). La mutation R287C substitue un acide aminé chargé positivement par un résidu polaire mais neutre. L'insertion du MTSET sur le canal mutant R287C, rétablit la charge positive du résidu

muté. Le résidu chargé R287 serait suffisamment proche de l'axe de conduction pour moduler l'intensité du courant ionique unitaire. Ceci confirme également l'équivalence entre le résidu arginine et le pseudo-résidu Cys-SET. Le calcul de l'effet sur la conduction du MTSET placé sur le résidu R287C du canal  $K_{Ca3.1}$ (MthK) ne reproduit toutefois pas ces résultats expérimentaux. Le résidu est accessible mais l'insertion du MTSET sur le résidu R287C n'a pas affecté le courant ionique unitaire. Même si nous obtenons de faibles variations entre les profils d'énergie avant et après l'ajout du MTSET, les différences d'énergie ne sont pas significatives (inférieures à 0,3 kcal/mol).

Les résidus V284, V285 et R287 sont situés à plus de 19 Å de l'axe de diffusion des ions  $K^+$  (Figure 36). Par contre les mutants V284C et V285C présentent une inhibition partielle du courant sur le SCAM modélisé lorsque l'on insère les pseudo-résidus Cys-SET sur les 4 cystéines. Ce n'est pas le cas du mutant R287C. Une des raisons possibles est qu'à la différence des résidus V284 et V285 qui sont localisés (Figure 35) dans la membrane (avec une constante diélectrique de 2), le résidu R287 est situé dans la zone diélectrique du solvant (avec une constante diélectrique de 80), ce qui a pour effet d'atténuer rapidement le potentiel électrique de la charge avec la distance. Il serait possible de corriger la structure du modèle  $K_{Ca3.1}$ (MthK) pour la mettre en cohérence avec les résultats expérimentaux. Pour cela, le segment S6 (du résidu G274 au résidu L289) pourrait subir une rotation centrée sur le résidu G274 pour rapprocher le résidu R287 de la membrane afin qu'il puisse moduler le courant ionique.

### ***D.3. Relation entre la structure et la conductance du canal***

L'amplitude de l'inhibition du courant ionique est dominée par la distance calculée entre la charge du MTS inséré et l'axe de diffusion des ions. Plus la tête chargée du pseudo-résidu Cys-SET est proche du pore et plus l'effet de charge sera important sur la conduction ionique. Néanmoins, la distance entre la tête chargée du pseudo-résidu et l'ion n'est pas le seul paramètre contrôlant l'effet électrostatique ressenti par l'ion  $K^+$ . Les résidus V285C-SET et A283C-SET conduisent respectivement à une inhibition partielle



du courant ionique de 56 % et 65 %. La différence d'inhibition entre ces deux mutants est de 9 % alors que la tête chargée du pseudo-résidu V285C-SET est localisé à 19,2 Å de l'axe du pore et à 10,6 Å pour le pseudo-résidu A283C-SET. Inversement le mutant R287C-SET est localisé à approximativement la même distance par rapport à l'axe du pore que le pseudo-résidu V285C-SET, 19,2 Å (à  $Z = -14$  Å) à comparer avec 20,2 Å (à  $Z = -10$  Å). Cette fois, pour une différence de distance de 1 Å nous obtenons une différence d'inhibition de 38 %.

Ces résultats confirment que la forme de la protéine, le milieu diélectrique représentant le solvant et les lipides, modulent également le champ électrostatique ressenti par l'ion  $K^+$ . C'est ce qui justifie la méthode théorique utilisée.

## IX. CONCLUSION

Nous avons défini des pseudo-résidus représentant les agents MTSET, MTSEA et MTSACE une fois qu'ils ont réagi avec une cystéine. Nous avons calculé leur contribution électrostatique à l'énergie libre de solvation. Les pseudo-résidus Cys-SET ont pu être insérés dans trois modèles atomiques différents du canal potassium dépendant du calcium intracellulaire  $K_{Ca3.1}$  dans sa configuration ouverte. La résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann conjuguée à un modèle cinétique de la conduction des ions dans les canaux potassiques a été utilisée pour évaluer l'effet électrostatique d'un agent MTS lié à une cystéine sur le courant ionique. Cette méthode a été appliquée pour trois modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  dans sa configuration ouverte et les résultats numériques ont été comparés aux résultats expérimentaux de SCAM.

Nous avons répondu à la question : est-ce que les structures cristallographiques des canaux potassiques actuels peuvent expliquer les résultats expérimentaux de SCAM obtenus pour  $K_{Ca3.1}$  ?

Les modèles du canal  $K_{Ca3.1}$ , qu'ils soient basés sur la structure du modèle du canal ouvert KcsA ou sur la structure du canal Kv1.2 ne permettent pas d'expliquer les inhibitions partielles obtenues lors des expériences de SCAM. Seul le modèle du canal  $K_{Ca3.1}$  modélisé avec la structure de référence du canal MthK correspond aux résultats des expériences de SCAM réalisées sur le segment S6 du canal potassique  $K_{Ca3.1}$ .

De manière plus générale cette méthode permet de comparer la conductance unitaire mesurée par des expériences de SCAM avec des résultats calculés à partir d'un modèle atomique du canal ionique.

## X. BIBLIOGRAPHIE

- A.D.Mackerell, Jr., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R.L., jr., et Karplus, M., *All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins*. J.Comput.Chem.B. 102, 3586-3616. 1998.
- Agmon, N. et Hopfield, J. J., *Transient kinetics of chemical-reactions with bounded diffusion perpendicular to the reaction coordinate - intramolecular processes with slow conformation change*. J.Chem.Phys. 6947-6959. 1983.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., et Lipman, D. J. *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol 215[3], 403-410. Oct. 1990.
- Banderali, U., Klein, H., Garneau, L., Simoes, M., Parent, L., et Sauve, R. *New insights on the voltage dependence of the KCa3.1 channel block by internal TBA*. J Gen.Physiol 124[4], 333-348. Oct. 2004.
- Beglov, D. et Roux, B., *Finite Representation of an Infinite Bulk System: Solvent Boundary Potential for Computer Simulations*. J.Chem.Phys. 100, 9050-9063. 1994.
- Berneche, S. et Roux, B. *A microscopic view of ion conduction through the K<sup>+</sup> channel*. Proc Natl Acad.Sci.U.S.A 100[15], 8644-8648. July 2003.
- Born, M. Z., *Volumen und Hydratationswärme der Ionen*. Phys. 1, 45-48. 1920.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., et Karplus, M. *CHARMM: A program for macromolecular energy minimization and dynamics calculations*. J.Comput.Chem. 4, 187-217. 1983.
- Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P. M., et Weston, A. H. *EDHF: bringing the concepts together*. Trends Pharmacol.Sci. 23[8], 374-380. Aug. 2002.
- Cordero, J., Cuello, L., Zhao, Y., Jogini, V., Chakrapani, S., Roux, B., et Perozo, E., *Molecular Determinants of Gating at the Potassium Channel Selectivity Filter*. To be Published . 2006.
- Cristobal, S., Zemla, A., Fischer, D., Rychlewski, L., et Elofsson, A. *A study of quality measures for protein threading models*. BMC Bioinformatics 2, 5. 2001.

- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., et Michel, H., *Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of Rhodospseudomonas viridis at 3Å resolution*. Nature 318, 618-624. 1985.
- Doyle, D. A., Morais, Cabral J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., et MacKinnon, R. *The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity*. Science 280[5360], 69-77. Apr. 1998.
- Fischer, D., Barret, C., Bryson, K., Elofsson, A., Godzik, A., Jones, D., Karplus, K. J., Kelley, L. A., MacCallum, R. M., Pawowski, K., Rost, B., Rychlewski, L., et Sternberg, M. *CAFASP-1: critical assessment of fully automated structure prediction methods*. Proteins Suppl 3, 209-217. 1999.
- Grygorczyk, R. et Schwarz, W. *Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> permeability in human erythrocytes: modulation of single-channel events*. Eur.Biophys J 12[2], 57-65. 1985.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Adelman, J. P., Aiyar, J., Bayliss, D. A., Clapham, D. E., Covarriubias, M., Desir, G. V., Furuichi, K., Ganetzky, B., Garcia, M. L., Grissmer, S., Jan, L. Y., Karschin, A., Kim, D., Kuperschmidt, S., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Lesage, F., Lester, H. A., McKinnon, D., Nichols, C. G., O'Kelly, I., Robbins, J., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M., Seino, S., Stuehmer, W., Tamkun, M. M., Vandenberg, C. A., Wei, A., Wulff, H., et Wymore, R. S. *International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels*. Pharmacol.Rev 55[4], 583-586. Dec. 2003.
- Hamill, OP, Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., et Sigworth, FJ., *Improved patch clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch , 85-100. 1981.
- Hladky, SB et Haydon, DA., *Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A*. Biochim Biophys Acta 274, 294-312. 1972.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., et Katz, B., *Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo*. J.Physiol. 116, 424-448. 1952.
- Hodgkin, A. L. et Keynes, R. D., *The potassium permeability of a giant nerve fibre*. J.Physiol.(Lond.) 128, 61-88. 1955.
- Holmgren, M., Liu, Y., Xu, Y., et Yellen, G., *On the use of thiol-modifying agents to determine channel topology*. Neuropharmacology 35[7], 797-804. 1996.

- Im, W., Beglov, D., et Roux, B., *Continuum solvation model: Electrostatic forces from numerical solutions to the Poisson-Boltzmann equation*. *Comp.Phys.Comm.* 111, 59-79. 1998.
- Ishii, T. M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C. T., Adelman, J. P., et Maylie, J., *A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94, 11651-11656. 1997.
- Jensen, B. S., Strøbæk, D., Olesen, S.-P., et Christophersen, P., *The Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channel of Intermediate Conductance: A Molecular Target for Novel Treatments ?* *Current Drug Targets* 2, 401-422. 2001.
- Jogini, V. et Roux, B. *Electrostatics of the intracellular vestibule of K<sup>+</sup> channels*. *J Mol Biol* 354[2], 272-288. Nov. 2005.
- Karplus, K., Barrett, C., et Hughey, R., *Hidden Markov Models for detecting Remote Protein Homologies*. *bioinf.* 14, 846-856. 1998.
- Karplus, K., Karchin, R., Barrett, C., Tu, S., Cline, M., Diekhans, M., Casper, J., et Hughey, R., *What is the value added by human intervention in protein structure prediction ?* *Proteins: Structure Function and Genetics* 45(S5), 86-91. 2001.
- Kelley, L. A., MacCallum, R. M., et Sternberg, M. J. *Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM*. *J Mol Biol* 299[2], 499-520. June 2000.
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H. W., et Phillips, D. C., *A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis*. 181, 662-666. 1958.
- Khanna, R., Chang M.C., Joiner, W. J., Kaczmarek L.K., et Schlichter, L. C., *hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation*. *J.Biol.Chem.* 274, 14838-14849. 1999.
- Kirkwood, J. G., *Theory of solution of molecules containing widely separated charges with application to zwitterions*. *J.Chem.Phys.* 2, 351. 1934.
- Klein, H., Garneau, L., Coady, M., Lemay, G., Lapointe, J. Y., et Sauve, R. *Molecular characterization of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from HeLa cells*. *J Membr.Biol* 167[1], 43-52. Jan. 1999.

- Knauf, P. A., Riordan, J. R., Schuhman, B., Wood-Guth, I., et Passow, H., *Calcium-potassium-stimulated net potassium efflux from human erythrocyte ghosts*. J.Membr.Biol. 25(1-2), 1-22. Dec. 1975.
- Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J., et Adelman J.P., *Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain*. Science 273, 1709-1714. 1996.
- Kyte, J. et Doolittle, R., *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J.Mol.Biol. 157, 105-132. 1982.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., et Thornton, J. M., *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. J.Appl.Cryst. 26, 283-291. 1993.
- Lassen, U. V., Pape, L., et Vestergaard-Bogind, B., *Effect of calcium on the membrane potential of Amphiuma red cells*. J.Membr.Biol. 26(1), 51-70. Feb. 1976.
- Lassen, U. V., Pape, L., Vestergaard-Bogind, B., et Bengtson, O., *Calcium-related hyperpolarization of the Amphiuma red cell membrane following micropuncture*. J.Membr.Biol. 18(2), 125-144. 1974.
- LeMasurier, M., Heginbotham, L., et Miller, C., *KcsA: It's a Potassium Channel*. J.Gen.Physiol 118[3], 303-314. 2001.
- Lenaeus, M. J., Vamvouka, M., Focia, P. J., et Gross, A. *Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel*. Nat Struct.Mol Biol 12[5], 454-459. May 2005.
- Lew, V. L., Muallem, S., et Seymour, C. A., *Properties of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in one-step inside-out vesicles from human red cell membranes*. Nature 296, 742-744. 1982.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., III, de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., et Richardson, D. C. *Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation*. Proteins 50[3], 437-450. Feb. 2003.
- Mahaut-Smith, M. P. et Schlichter, L. C. *Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in lymphocytes*. Pflugers Arch 414 Suppl 1, S164-S165. 1989.
- Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G., et Thornton, J. M., *Stereochemical quality of protein structure coordinates*. Proteins 12, 345-364. 1992.
- Neher, E. et Sakmann, B., *Single-channel current recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. Nature 260, 794-802. 1976.

- Nina, M., Beglov, D., et Roux, B. *Atomic Radii for Continuum Electrostatics Calculations based on Molecular Dynamics Free Energy Simulations*. J.Phys.Chem. B 101, 5239-5248. 1997.
- Nina, M., Wonpil, I, et Roux, B., *Optimized atomic radii for protein continuum electrostatics solvation forces*. Biophysical Chemistry 78, 89-96. 1999.
- Noskov, S. Y., Berneche, S., et Roux, B. *Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands*. Nature 431[7010], 830-834. Oct. 2004.
- Onsager, L., *Electric Moment of Molecules in Liquids*. J.Am.Chem.Soc. 1468-1493. 1936.
- Parent, L., Sauvé, R., Bernèche, S., et Roux B., *A bas les barrières... d'énergie dans les canaux potassique !* Medecine/Sciences 18, 605-609. 2002.
- Perozo, E., Cortes, D. M., et Cuello L.G., *Structural rearrangements underlying K-channel activation gating*. Science 285, 73-78. 1999.
- Perutz, M. F., Bolton, W., Diamond, R., Muirhead, H., et Watson, H. C., *Structure of Hæmoglobin : An X-ray Examination of Reduced Horse Hæmoglobin*. Nature 203, 687-690. 1964.
- Rauer, Heiko, Lanigan, Mark D., Pennington, Michael W., Aiyar, Jayashree, Ghanshani, Sanjiv, Cahalan, Michael D., Norton, Raymond S., et Chandy, George., *Structure-guided Transformation of Charybdotoxin Yields an Analog That Selectively Targets Ca<sup>2+</sup>-activated over Voltage-gated K<sup>+</sup> Channels*. The journal of Biological Chemistry 275[2], 1201-1208. 2000.
- Ringer, S., *Regarding the action of hydrate of soda, hydrate of ammonia, and hydrate of potash on the ventricle of the frog's heart*. J.Physiol. 3[a], 195-202. 1882.
- Riordan, J. R. et Passow, H., *Effects of calcium and lead on potassium permeability of human erythrocyte ghosts*. Biochim.Biophys.Acta 249(2), 601-605. 1971.
- Rittenhouse, A. R., Vandorpe, D. H., Brugnara, C., et Alper, S. L., *The antifungal imidazole clotrimazole and its major in vivo metabolite are potent blockers of the calcium-activated channel in murine erythroleukemia cells*. J.Membr.Biol. 177-191. 1997.
- Roux, B., *Ion conduction and selectivity in k(+) channels*. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 34, 153-171. 2005.

- Roux, B., Allen, T., Berneche, S., et Im, W., *Theoretical and computational models of biological ion channels*. Quarterly Reviews of Biophysics 37, 15-103. 2004. Cambridge University Press.
- Roux, B., Bernèche, S., et Im, W., *Ion Channels, Permeation, and Electrostatics: Insight into the Function of KcsA*. Biochemistry 39(44), 13295-13306. July 2000.
- Roux, B. et MacKinnon, R. *The cavity and pore helices in the KcsA K<sup>+</sup> channel: electrostatic stabilization of monovalent cations*. Science 285[5424], 100-102. July 1999.
- Sali, A. et Blundell, T. L. *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J.Mol.Biol. 234, 779-815. 1993.
- Schafer, Gunter et Rieger, Ekkehard., *Interaction of Biguanides with Mitochondrial and Synthetic Membranes. Effects on Ion Conductance of Mitochondrial Membranes and Electrical Properties of Phospholipid Bilayers*. European Journal of Biochemistry 46[3], 613-623. 1974.
- Sippl, M. J., *Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins*. Proteins 17, 355-362. 1993.
- Stephan, W., Kleutsch, B., et Frehland, E. *Rate theory models for ion transport through rigid pores. III. Continuum vs discrete models in single file diffusion*. J Theor.Biol 105[2], 287-310. Nov. 1983.
- Vergara, C., Latorre, R., et Marrion, NV. Adelman JP., *Calcium-activated potassium channels*. Curr Opin Neurobiol. 8[3], 321-329. June 1998.
- Warwicker, J. et Watson, H. C. *Calculation of the electric potential in the active site cleft due to  $\alpha$ -helix dipoles*. J.Mol.Biol. 157, 671-679. 1982.
- Wilbrandt, W., Pflugers Arch. 243, 519-536. 1940.
- Wulff, H., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., et Chandy, K. G., *Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1*. J.Biol.Chem. 276, 32040-32045. 2001.
- Wulff, H., Miller, M. J., Hansel, W., Grissmer, S., Cahalan, M. D., et Chandy, K. G. *Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: a potential immunosuppressant*. Proc Natl Acad.Sci.U.S.A 97[14], 8151-8156. July 2000.



- 
- Yingst, D. R. et Hoffman, J. E., *Ca-induced K transport in human red blood cell ghosts containing arsenazo III. Transmembrane interactions of Na, K, and Ca and the relationship to the functioning Na-K pump.* J.Gen.Physiol. 83(1), 19-45. Jan. 1984.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., et MacKinnon, R. *Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution.* Nature 414[6859], 43-48. Nov. 2001.
- Zong, Y., Mazmanian, S. K., Schneewind, O., et Narayana, S. V., *The Structure of Sortase B, a Cysteine Transpeptidase that Tethers Surface Protein to the Staphylococcus Aureus Cell Wall.* Structure 12, 105. 2004.

## ANNEXE I : CONTRIBUTION DE L'AUTEUR ET DES COAUTEURS AUX PUBLICATIONS

### Première publication :

**Manuel Simoes** : Le signataire de l'article a réalisé les expériences de patch-clamp sur le canal  $K_{Ca3.1}$ . Il a appliqué la technique du SCAM aux mutants cystéine du segment S6 (du résidu V275 au résidu L288). Il a conçu les modèles du canal  $K_{Ca3.1}$  et analysé leurs structures en relation avec les résultats des expériences de patch-clamp. Le signataire de l'article a contribué à la réalisation de l'article en participant à la rédaction de certains passages.

**Line Garneau** : La co-signataire a contribué à la réalisation de ce travail de recherche pour les expériences de patch-clamp en utilisant la technique du SCAM, particulièrement pour les mesures de courant unitaire. De plus, la co-signataire a suivi la réalisation de l'article en révisant à plusieurs reprises le contenu final de l'article.

**Umberto Banderali** : Le co-signataire a contribué à la réalisation de ce travail de recherche pour les expériences de patch-clamp dans l'étude de l'accessibilité du TEA dans le canal  $K_{Ca3.1}$ .

**Fadi hobeila** : Le co-signataire a réalisé les expériences de patch-clamp permettant de mesurer la dépendance en ions  $Ca^{2+}$  du canal.

**Hélène Klein** : La co-signataire a contribué à la réalisation de ce travail de recherche en clonant le canal  $K_{Ca3.1}$  et ses mutants cystéine.

**Lucie Parent** : La co-signataire a suivi la réalisation de l'article en révisant à plusieurs reprises le contenu final de l'article.

**Rémy Sauvé** : Le co-signataire a été   l'origine de la conception et du protocole des expériences de patch-clamp. Il est responsable de l'analyse des résultats

ainsi que de la réadaction de l'article.

**Benoît Roux** : Le co-signataire a suivi la réalisation de l'article en révisant à plusieurs reprises le contenu final de l'article.

**Deuxième publication :**

**Manuel Simoes** : Le signataire de l'article a réalisé l'intégralité des travaux de la publication, il a également écrit le premier jet de l'article et a suivi sa réalisation en révisant à plusieurs reprises le contenu final.

**Benoît Roux** : le co-signataire a suivi la réalisation de l'article en révisant à plusieurs reprises le contenu final de l'article.

**Rémy Sauvé** : De plus, le co-signataire a participé à la rédaction de l'article à partir du premier jet.

## ANNEXE II : DIFFUSION

Avant de pouvoir s'intéresser aux mouvements des ions à travers les canaux. Nous allons commencer par le cas simple de la diffusion en solution aqueuse (comme l'eau). C'est ce que l'on désigne par la diffusion simple.

### A. Diffusion simple

Fick<sup>45</sup> en 1855, a décrit le mouvement d'un substrat S, à une dimension, en suspension dans un liquide (en absence de tout champ électrique) par analogie avec la théorie de Fourier sur la conduction de la chaleur. Sans expliquer pourquoi le substrat avait ce comportement, il a décrit son mouvement dans la relation maintenant appelée équation de la « diffusion simple » ou « première loi de Fick ». L'équation donne le sens et l'amplitude du mouvement d'un substrat S dans un liquide, en fonction de sa concentration et en absence de champ électrique.

#### Équation de la diffusion Simple ou 1ere loi de Fick

$$J_s = -D_s \frac{dC_s}{dx} \quad (49)$$

$J_s$  le flux; nombre d'ions passant à travers une surface par seconde.

$D_s$  est la constante de diffusion.

$C_s$  est la concentration du substrat S.

Le signe (-) découle du fait qu'un flux net positif a lieu dans le sens des concentrations décroissantes,  $dC$  négatif pour  $dx$  positif.

Le flux  $J_s$  est proportionnel au gradient de concentration, il n'y a donc pas de saturation, plus la variation de la concentration augmente et plus le flux net est grand. La constante de diffusion,  $D_s$ , doit être mesurée expérimentalement. C'est Einstein<sup>46</sup> qui justifiera en 1905, l'équation de Fick en décrivant le mouvement des particules comme une marche au hasard. En partant du comportement individuel et aléatoire de la direction du mouvement de la particule, Einstein déduisit un comportement collectif (*i.e.* à l'échelle

<sup>45</sup> Adolf Eugen Fick (1829-1901), physiologiste allemand

macroscopique) qui répond à la première loi de Fick. En résolvant l'équation de Fick, Einstein déduira le carré moyen de la distance parcourue par une particule pendant un temps  $t$  :

$$\langle d^2 \rangle = 2D_s t \quad (50)$$

Lorsque que l'on suppose le saut aléatoire d'une distance bien inférieur au carré moyen, et en absence de champ électrique, on en déduit la deuxième loi de Fick :

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} \approx D_s \frac{\partial^2 C_s}{\partial x^2} \quad (51)$$

Aux échelles de temps auxquels nous nous intéressons, comme la conduction d'ions dans un canal, la concentration du substrat est supposée être indépendante du temps à l'état stationnaire. Les variations de la concentration sont donc nulles. C'est l'hypothèse du régime stationnaire. De l'équation précédente et de l'équation (49), nous en déduisons la relation suivante.

$$-\frac{\partial J_s}{\partial x} \approx \frac{\partial C_s}{\partial t} = 0 \quad (52)$$

C'est l'hypothèse du régime stationnaire, cela implique qu'il n'y a pas de variation du flux le long de l'axe de diffusion d'un substrat. Dans la suite de notre exposé et dans toute cette thèse, nous resterons dans les conditions du régime stationnaire.

## B. Électrodifusion

Dans la diffusion simple, nous n'avons pas pris en compte ni la charge du substrat, ni la présence d'un champ électrique. Kohlrausch<sup>47</sup> a étudié (1870) la migration des ions en solution aqueuse entre deux électrodes planes soumises à un champ électrique. Il en déduisit une relation empirique de flux ionique. Le flux est proportionnel au champ électrique ( $dV/dx$ ), à la concentration  $C_s$  et à la constante de mobilité électrique,  $u_s$  :

<sup>46</sup> Albert Einstein (1879-1955), physicien allemand, puis suisse et finalement américain.

<sup>47</sup> Friedrich Wilhelm Georg Kohlrausch (Rinteln, 1840 – 1910, Marbur), physicien allemand

$$J_s = -u_s C_s \frac{dV}{dx} \quad (53)$$

$J_s$  le flux net de la substance  
 $u_s$  est la mobilité électrique de la substance S  
 $C_s$  est la concentration de la substance S  
 $V$  est le potentiel.

La mobilité électrique,  $u_s$ , est un facteur permettant de rendre compte de la facilité de migration qu'a une espèce ionique par rapport à une autre. Nernst<sup>48</sup> reconnut en 1888, le rapport qui lie la mobilité électrique et la constante de diffusion, maintenant appelée la relation de Nernst-Einstein :

$$D_s = \frac{k_B T}{z_s q} u_s \quad (54)$$

$D_s$  est la constante de diffusion de S.  
 $z_s$  est la valence .  
 $F$  est la constante de Faraday.  
 $RT$  est l'énergie thermique

Nernst et Planck<sup>49</sup> ont, en utilisant la relation liant les constantes  $D_s$  et  $u_s$ , combiné l'équation de Kohlrausch et la première loi de Fick pour donner l'équation d'électrodifusion de Nernst-Planck, valable pour une substance chargée, S, en solution :

$$J_s = -D_s \left[ \frac{dC_s}{dx} + \left( \frac{z_s q C_s}{k_B T} \right) \frac{d\psi}{dx} \right] \quad (55)$$

$J_s$  est le flux net.  
 $D_s$  est la constante de diffusion de S.  
 $C_s$  est la concentration de la substance S.  
 $q$  et  $z_s$  la charge et le nombre de valence.  
 $\psi$  est le potentiel en  $x$ .  
 $k_B T$  l'énergie thermique

Les conditions sur la concentration  $C_s$  et le potentiel  $\psi$  préciseront le domaine d'application de l'équation de Nernst-Planck. Dans ce chapitre, nous avons étudié le cas de diffusion d'un substrat dans un solvant puis celui d'un substrat chargé.

### C. Hypothèse de la conduction dans un canal

D'autres contraintes s'appliquent dans le cas de la diffusion d'un ion à travers un canal.

<sup>48</sup> Hermann Walther Nernst (Briessen, 1864 – 1941, Bad Muskau), chimiste allemand

<sup>49</sup> Max Planck (Kiel, 1858 – 1947, Göttingen), physicien allemand

### ***C.1. État stationnaire et l'hypothèse du potentiel moyen***

Expérimentalement la résolution de nos instruments de mesure du courant est de l'ordre de la microseconde ce qu'il faut mettre en relation avec le temps de diffusion d'un ion à travers la membrane, d'environ 100 ns, des mouvements microscopiques des atomes de l'ordre de 0,1 ps, et avec l'échelle de temps de la solvation qui est de l'ordre de 0,01 ps (Stratt 1995). Le flux et le courant sont donc des variables macroscopiques dont l'échelle de temps est la microseconde. Au vu de la rapidité de déplacement des charges et dipôles dans le canal, la mesure de la densité de charge et du potentiel, durant une telle période de temps, fournit des valeurs moyennes de ces quantités. C'est l'approximation du potentiel moyen. Au vu de l'échelle de temps de la mesure expérimentale du courant ionique, l'hypothèse semble très raisonnable.

### ***C.2. Dimension de la diffusion***

Dans les portions étroites du pore, les molécules d'eau doivent adopter une configuration linéaire due au confinement dans le pore. Les ions et les molécules d'eau ne peuvent se dépasser, ils se suivent à la file indienne (*single file*). Cette hypothèse nous permet de justifier la construction de modèles « réalistes » réduit à une dimension. Le transport s'effectue suivant un axe,  $x$ , pris perpendiculaire au plan de la membrane. Dans les portions étroites d'un pore le déplacement d'un ion devient dépendant des molécules d'eau et de la présence d'autres ions (ainsi que de l'influence de leur charge) présents dans la même portion. Cela pose le problème d'indépendance des ions dans le pore.

## ANNEXE III : RÉOLUTION DE L'ÉQUATION DE POISSON BOLTZMANN

Ici nous décrivons brièvement la technique de résolution numérique de l'équation de Poisson-Boltzmann par la méthode des différences finies. Cette méthode permet de calculer le potentiel électrique en tout point de l'espace autour ou à l'intérieur d'une protéine et cela en tenant compte de la présence d'un solvant contenue dans la constante diélectrique et la constante de Debye-Hückel. L'équation de Poisson-Boltzmann s'écrit comme :

$$\nabla \cdot \left[ \varepsilon(\mathbf{r}) \nabla \Phi(\mathbf{r}) - \bar{\kappa}^2(\mathbf{r}) \Phi(\mathbf{r}) \right] = -4\pi\rho(\mathbf{r}) \quad (56)$$

$\rho(\mathbf{r})$  la densité de charge en fonction de la position  $\mathbf{r}$

$\varepsilon(\mathbf{r})$  la valeur de la constante diélectrique en fonction de  $\mathbf{r}$

$\kappa(\mathbf{r})$  est la constante de Debye-Hückel en fonction de  $\mathbf{r}$

$\Phi(\mathbf{r})$  le potentiel électrique en  $\mathbf{r}$

Pour résoudre numériquement cette équation, le système d'atomes étudié est substitué par une grille tridimensionnelle qui tient compte de la forme de la protéine en répartissant la charge partielle de tous les atomes aux 8 plus proches points de la grille. Toutes les autres quantités physiques vont être réparties dans la grille. La Figure 19 présente un exemple d'une des boîtes contenues dans la grille. Elle est centrée au point 0 et chaque point est séparé par une distance  $h$ . La constante diélectrique est assignée entre deux points de la grille. Plusieurs méthodes sont possibles pour attribuer la constante diélectrique d'une protéine. La méthode la plus couramment utilisée est de fixer la constante diélectrique entre 1 et 5 à l'intérieur de la protéine et égale à 80 à l'extérieur. Il est également possible d'augmenter la constante diélectrique pour les résidus tapissant la surface de la protéine (10-30). Le rayon de van der Waals ou, lorsqu'elle est calculée, la surface moléculaire définit la frontière entre l'intérieur et l'extérieur de la protéine. Il en va de même pour la constante de Debye-Hückel qui représente l'influence qu'ont les ions, présents dans le



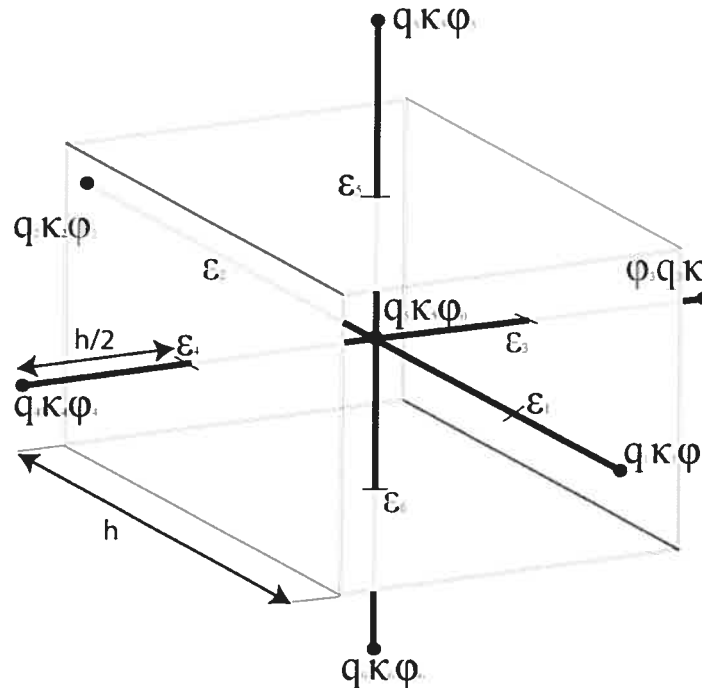
solvant, sur le champ électrique. La relation suivante permet d'évaluer la valeur de la constante de Debye-Hückel.

$$\kappa^{-2} = \sqrt{\frac{8\pi e^2 N_A I}{1000 k_B T}} \quad (57)$$

$N_A$  le nombre d'Avogadro  
 $e$  la charge d'un électron  
 $I$  force ionique de la solution  
 $k_B$  la constante de Boltzmann  
 $T$  température en kelvin

Dans cette boîte centrée au pour 0 de la Figure 47 l'équation de Poisson-Boltzmann s'écrit.

$$-4\pi \iiint \rho(r) dr + \iiint \nabla \cdot (\epsilon(r) \nabla \phi(r)) - \iiint \kappa^{-2}(r) \phi(r) dr = 0 \quad (58)$$



**Figure 47. Une boîte contenue dans la grille**

Pour la démonstration nous avons représenté une des boîtes contenues dans la grille. La boîte est centrée au point 0 et chacun de ses côtés a une longueur h.

Le premier membre de l'équation est donné par la loi de Gauss et est égal à la somme des charges contenues dans le cube, c'est-à-dire  $q_0$ .

$$-4\pi \iiint \rho(r) dr = 4\pi q_0 \quad (59)$$

Le deuxième terme de l'équation (58) peut être développé avec le théorème de Gauss.

$$\begin{aligned} \iiint \vec{\nabla}(\varepsilon(r)\vec{\nabla}\phi(r))dr &= \oiint \varepsilon(r)\vec{\nabla}\phi(r) \cdot d\vec{r} \\ \oiint \varepsilon(r)\vec{\nabla}\phi(r) \cdot d\vec{r} &= \sum_i \varepsilon_i (\phi_i - \phi_0)h \end{aligned} \quad (60)$$

$\Phi_0$  est le potentiel au point 0 et  $\Phi_i$  le potentiel défini au point  $i$  de la grille. Le dernier terme de l'équation (58) peut être développé comme suit :

$$\iiint \kappa^{-2}(r)\phi(r)dr \approx h^3 \kappa_0^{-2} \phi_0 \quad (61)$$

$\kappa_0$  est la constante de Debye-Hückel défini au point 0 par l'équation (57). On peut alors réécrire l'équation de Poisson-Boltzmann.

$$4\pi q_0 + h \sum_i \varepsilon_i (\phi_i - \phi_0) - h^3 \kappa_0^{-2} = 0 \quad (62)$$

À partir de cette équation, nous en déduisons la relation nous donnant le potentiel au centre du cube (0,0,0)

$$\phi_0 = \frac{\sum_i \varepsilon_i \phi_i + 4\pi q_0}{\sum_i \varepsilon_i + \kappa^{-2} h^2} \quad (63)$$

On calcul les valeurs de champs potentiels avec une valeur initiale de  $\Phi_i$  pour chaque centre des cubes constituant la grille. On réitère le processus jusqu'à ce que la différence entre deux valeurs du potentiel  $\Phi_0$  soit inférieur ou égale à 0,0001.

### La technique du *Multidriding*

La technique du *Multidriding* permet de faire converger plus rapidement le calcul du potentiel électrostatique  $\Phi_i$ . La protéine est initialement contenue dans une grille possédant un nombre réduit de boîte (par exemple une grille 3x3x3 ; soit 9 boîtes). Les charges sont réparties au centre de chaque boîte et le potentiel  $\Phi_i$  y est calculé. L'opération est répétée sur une grille plus dense jusqu'à ce que arrive à la dimension voulu de la grille. À chaque étape les potentiels  $\Phi_i$  sont reportés par interpolation linéaire sur la nouvelle grille.

**Condition aux bornes**

Les boîtes de la grille présentant une face vers l'extérieur, conservent la valeur initiale du potentiel durant tous le processus. Leur valeur initiale est soit fixé à 0 ou calculé à l'aide de l'expression de Debye-Hückel.

## ANNEXE IV : LOGICIELS ET MATÉRIELS UTILISÉS

Liste des logiciels et des serveurs utilisés pour les travaux de cette thèse et leur présentation.

### Alignement et création de modèle

Modeller	<a href="http://salilab.org/modeller/modeller.html">http://salilab.org/modeller/modeller.html</a> (logiciel gratuit*)
SAM-T02	<a href="http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/HMM-apps/T02-query.html">http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/HMM-apps/T02-query.html</a>
Phyre	<a href="http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/">http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/</a> (serveur web à accès libre)
scwrl3	<a href="http://dunbrack.fccc.edu/SCWRL3.php">http://dunbrack.fccc.edu/SCWRL3.php</a> (logiciel gratuit*)

### Analyse de données et présentation des graphiques

Origin v7.5	<a href="http://www.originlab.com/">http://www.originlab.com/</a> (logiciel payant)
Antheprot	<a href="http://antheprot-pbil.ibcp.fr/">http://antheprot-pbil.ibcp.fr/</a> (logiciel gratuit)

### Travail graphique

Macromedia FreeHand MX	<a href="http://www.macromedia.com/">http://www.macromedia.com/</a> (logiciel payant)
Jasc Paint Shop Pro 8	<a href="http://www.corel.com/">http://www.corel.com/</a> (logiciel payant)

### Validation d'un modèle de structure de protéine

Prosa 2003	<a href="http://www.proceryon.com/solutions/prosa.html">http://www.proceryon.com/solutions/prosa.html</a> (logiciel gratuit*)
PROQ	<a href="http://www.sbc.su.se/~bjorn/ProQ/">http://www.sbc.su.se/~bjorn/ProQ/</a> (serveur web à accès libre)
Procheck	<a href="http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html">http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html</a> * (logiciel gratuit*)

---

\* gratuit pour usage non commercial

### Visualisation des protéines (fichier PDB)

VMD	<a href="http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/">http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/</a> (logiciel libre et gratuit)
SPDBV	<a href="http://www.expasy.org/spdbv/">http://www.expasy.org/spdbv/</a> (logiciel gratuit)
YASARA	<a href="http://www.yasara.org/">http://www.yasara.org/</a> (logiciel gratuit*)

### Programmes de simulation moléculaire et d'analyse des protéines

CHARMM	<a href="http://www.charmm.org/">http://www.charmm.org/</a> (logiciel payant)
GAUSSIAN 03	<a href="http://www.gaussian.com/">http://www.gaussian.com/</a> (logiciel payant)
HYPERCHEM 7.5	<a href="http://www.hyper.com/">http://www.hyper.com/</a> (logiciel payant)

### Matériel utilisé durant la thèse :

#### *Laboratoire Rémy Sauvé (Université de Montréal)*

Ordinateur de type PC contenant un biprocesseur intel Pentium 3 cadencé à 800 MHz avec 512 Mo de mémoire vive. Le système d'exploitation utilisé est celui de Linux RedHat.

Ordinateur SGI contenant un microprocesseur R16000A cadencé à 800 MHz avec 1 Go de mémoire vive. Le système d'exploitation est UNIX (IRIX 6.5).

#### *Laboratoire Benoît Roux (Weill Medical College of Cornell University)*

Disponibilité de plusieurs réseaux constitués au maximum de plus de 100 microprocesseurs intel cadencés à 1 GHz. Le système d'exploitation utilisé est celui de Linux RedHat.

#### *Université de Montréal*

La plupart des simulations ont été réalisées à l'université dans l'[Environnement Scientifique Intégré](#) géré par la [Direction Générale des technologies de l'information et de la communication](#). Je remercie le Dr. Bernard Lorazo, administrateur du réseau ESIRCH pour sa disponibilité et son aide lorsqu'il y avait des problèmes techniques.

---

\* gratuit pour usage non commercial

Disponibilité d'un réseau constitué au maximum de 20 microprocesseurs SGI R12000 cadencé 4000 MHz avec 4 Go par processeur. Le système d'exploitation utilisé est celui d'UNIX (IRIX 6.5).

Un seul profil d'énergie libre tel que présenté à la Figure 39 nécessite 13 heures de calcul à un seul microprocesseur du réseau ESIRCH. Pour un seul modèle de canal, le calcul des profils d'énergie de ses 13 mutants (de la VAL275 au résidu ARG287) dans lequel nous insérons un nombre variable de pseudo-résidus Cys-SET représente plus de 858 heures de calcul CPU. Le nombre d'heures de calcul de cette thèse a dépassé les 8000 heures de calcul CPU.

## ANNEXE V : RÉSULTATS BRUTS

### D. Rayons de Born après optimisation

Ces valeurs sont considérées comme les valeurs finales des rayons de Born des atomes formant les complexes Cys-SET, Cys-SEA et Cys-SACE.

$\Delta\Delta G_{\text{elec}}$	Cys-SET	Cys-SEA	Cys-SACE
<b>WHAM (kcal/mol)</b>	-61.5	-75.31	-17.97
<b>Continuum Model (kcal/mol)</b>	-61.59	-75.25	-18.28
<b>Différence (kcal/mol)</b>	0.09	0.06	0.31
<b>%</b>	0.1	0.1	2.0
<b>Atom</b>	<b>Born Radius (Å)</b>	<b>Born Radius (Å)</b>	<b>Born Radius (Å)</b>
SG, S5		2.00	
C1		2.06	
C2		2.34	2.11
C3		-	2.20
C4, C5	2.29	-	-
O1	-	-	1.54
OS1, OS2, OS3	-	-	-
S	-	-	-
N2	2.82	2.18	2.32

Tableau III. Rayon de Born des pseudo-résidus Cys-SET, Cys-SEA et Cys-SACE

## E. Fichiers de paramètres

## For the \*.TOP file

```

#####
! Patch for changing any residue on a cysteine residue
! Patch permettant de muter un a.a. en résidu cystéine
#####
PRES CYSP      0.00 ! Based on Cysteine residue (RESI CYS)
GROUP          ! M. Simoes, B. Roux, R. Sauvé (2005)
ATOM N  NH1   -0.47 ! |
ATOM HN  H     0.31 ! HN-N
ATOM CA  CT1   0.07 ! | HB1
ATOM HA  HB     0.09 ! | |
GROUP          ! -CA--CB--SG
ATOM CB  CT2  -0.11 ! | | \
ATOM HB1 HA    0.09 ! | HB2 HG1
ATOM HB2 HA    0.09 !
ATOM SG  S    -0.23 !
ATOM HG1 HS    0.16
BOND CB CA SG CB CB HB1
BOND CB HB2 SG HG1
DONOR HG1 SG
IC N  C  *CA CB      1.4533 105.8900 121.7900 111.9800 1.5584
IC N  CA  CB  SG      1.4533 111.5600 180.0000 113.8700 1.8359
IC SG  CA  *CB HB1    1.8359 113.8700 119.9100 107.2400 1.1134
IC SG  CA  *CB HB2    1.8359 113.8700 -125.3200 109.8200 1.1124
IC CA  CB  SG  HG1    1.5584 113.8700 176.9600 97.1500 1.3341

#####
! This patch transforms a cysteine residue to Cys-SET complex
! The SET fragments come from the MTSET molecule
#####
! Patch the cysteine-MTSET complex on a cysteine residue
PRES SET      1.00 ! MTSET : [2-(Trimethylammonium)ethyl]
DELETE ATOM HG1 ! methanethiosulfonate
                ! M. Simoes, B. Roux and R. Sauvé
                ! calc F.E. solvation = -61,5 kcal/mol
                ! Based on tetramethylammonium ethyl analog
                ! (RESI:NC5)
GROUP          !
ATOM CB  CT2   -0.10 !
ATOM SG  SM    -0.08 !
ATOM HB1 HA     0.09 !
ATOM HB2 HA     0.09 !
GROUP          !
ATOM S5  SM    -0.08 !
ATOM C1  CTL2  -0.10 !

```



ATOM H11	HL	0.09 !								
ATOM H12	HL	0.09 !								
GROUP		!								
ATOM N2	NTL	-0.60 !	HB1							(+)
ATOM C3	CTL5	-0.35 !		H11	H21		H31			
ATOM C2	CTL2	-0.10 !	-CB--							
ATOM C4	CTL5	-0.35 !								
ATOM C5	CTL5	-0.35 !	HB2							
ATOM H31	HL	0.25 !		H12	H22		H33			
ATOM H32	HL	0.25 !								
ATOM H33	HL	0.25 !								
ATOM H21	HL	0.25 !								
ATOM H22	HL	0.25 !								
ATOM H41	HL	0.25 !								
ATOM H42	HL	0.25 !								
ATOM H43	HL	0.25 !								
ATOM H51	HL	0.25 !								
ATOM H52	HL	0.25 !								
ATOM H53	HL	0.25 !								
BOND C3	N2	N2	C2	C2	C1	C1	S5	N2	C4	
BOND N2	C5	C3	H31	C3	H32	C3	H33	C2	H21	
BOND C2	H22	C1	H11	C1	H12	C4	H41	C4	H42	
BOND C4	H43	C5	H51	C5	H52	C5	H53	S5	SG	
ANGLE CB	SG S5	SG	S5 C1							
ANGLE S5	C1 H11	S5	C1 H12							
ANGLE S5	C1 C2	C1	C2 N2							
ANGLE C1	C2 H21	C1	C2 H22							
ANGLE H11	C1 C2	H12	C1 C2	H11	C1	H12				
ANGLE C2	N2 C5	C2	N2 C4	C2	N2	C3				
ANGLE H21	C2 N2	H22	C2 N2	H21	C2	H22				
ANGLE N2	C5 H51	N2	C5 H52	N2	C5	H53				
ANGLE N2	C3 H31	N2	C3 H32	N2	C3	H33				
ANGLE N2	C4 H41	N2	C4 H42	N2	C4	H43				
ANGLE H31	C3 H32	H32	C3 H33	H31	C3	H33				
ANGLE H41	C4 H42	H42	C4 H43	H41	C4	H43				
ANGLE H51	C5 H52	H52	C5 H53	H51	C5	H53				
DIHE CA	CB SG S5	HB1	CB SG S5	HB2	CB	SG S5				
DIHE CB	SG S5 C1									
DIHE SG	S5 C1 C2	SG	S5 C1 H11	SG	S5	C1 H12				
DIHE S5	C1 C2 H21	S5	C1 C2 H22	S5	C1	C2 N2				
DIHE H11	C1 C2 H21	H11	C1 C2 H22	H11	C1	C2 N2				
DIHE H12	C1 C2 H21	H12	C1 C2 H22	H12	C1	C2 N2				
DIHE C1	C2 N2 C3	C1	C2 N2 C5	C1	C2	N2 C4				
DIHE H21	C2 N2 C3	H21	C2 N2 C5	H21	C2	N2 C4				
DIHE H22	C2 N2 C3	H22	C2 N2 C5	H22	C2	N2 C4				
DIHE C2	N2 C5 H51	C2	N2 C5 H52	C2	N2	C5 H53				
DIHE C2	N2 C3 H31	C2	N2 C3 H32	C2	N2	C3 H33				
DIHE C2	N2 C4 H41	C2	N2 C4 H42	C2	N2	C4 H43				
DIHE H51	C5 N2 C3	H52	C5 N2 C3	H53	C5	N2 C3				
DIHE H51	C5 N2 C4	H52	C5 N2 C4	H53	C5	N2 C4				
DIHE H31	C3 N2 C5	H32	C3 N2 C5	H33	C3	N2 C5				

DIHE H31 C3 N2 C4 H32 C3 N2 C4 H33 C3 N2 C4  
 ! From Crystal Structure Of Sortase B From S. Aureus Complexed  
 ! With Mtset (PDB:1QWZ)

IC CA	CB	SG	S5		1.5314	115.91	57.39	100.35	2.2100
IC CB	SG	S5	C1		1.8177	100.35	94.59	109.55	1.4749
IC SG	S5	C1	C2		2.2100	109.55	57.41	119.58	1.5660
IC C2	S5	*C1	H11		1.5660	119.58	120.00	111.00	1.0800
IC C2	S5	*C1	H12		1.5660	119.58	-120.00	111.00	1.0800
IC S5	C1	C2	N2		1.4749	119.58	105.59	105.62	1.5211
IC N2	C1	*C2	H21		1.5211	105.62	120.00	110.10	1.0800
IC N2	C1	*C2	H22		1.5211	105.62	-120.00	110.10	1.0800
IC C1	C2	N2	C3		1.5660	105.62	-175.26	108.00	1.4494
IC C3	C2	*N2	C4		1.4494	108.00	118.21	113.36	1.5098
IC C3	C2	*N2	C5		1.4494	108.00	-115.48	113.42	1.4977
IC C2	N2	C3	H31		1.5211	108.00	180.00	109.50	1.0800
IC H31	N2	*C3	H32		1.0800	109.50	120.00	109.50	1.0800
IC H31	N2	*C3	H33		1.0800	109.50	-120.00	109.50	1.0800
IC C2	N2	C4	H41		1.5211	113.36	180.00	109.50	1.0800
IC H41	N2	*C4	H42		1.0800	109.50	120.00	109.50	1.0800
IC H41	N2	*C4	H43		1.0800	109.50	-120.00	109.50	1.0800
IC C2	N2	C5	H51		1.5211	113.42	180.00	109.50	1.0800
IC H51	N2	*C5	H52		1.0800	109.50	120.00	109.50	1.0800
IC H51	N2	*C5	H53		1.0800	109.50	-120.00	109.50	1.0800

! Based on tetramethylammonium ethyl analog (RESI NC5)

! ab-initio HF/6-31G\* structure

!IC C4	N2	C2	C1		1.4967	107.80	180.00	115.98	1.5217
!IC C1	C2	N2	C5		1.5217	115.98	-61.05	111.12	1.4950
!IC C1	C2	N2	C3		1.5217	115.98	61.05	111.12	1.4950
!IC C4	N2	C2	H21		1.4967	107.80	57.27	105.76	1.0809
!IC C4	N2	C2	H22		1.4967	107.80	-57.27	105.76	1.0809
!IC C2	N2	C5	H51		1.5176	111.12	-174.50	108.75	1.0795
!IC C2	N2	C5	H52		1.5176	111.12	65.81	109.69	1.0773
!IC C2	N2	C5	H53		1.5176	111.12	-54.79	109.07	1.0797
!IC C2	N2	C3	H31		1.5176	111.12	174.50	108.75	1.0795
!IC C2	N2	C3	H32		1.5176	111.12	-65.81	109.69	1.0773
!IC C2	N2	C3	H33		1.5176	111.12	54.79	109.07	1.0797
!IC C2	N2	C4	H41		1.5176	107.80	180.00	109.11	1.0793
!IC C2	N2	C4	H42		1.5176	107.80	60.03	109.12	1.0793
!IC C2	N2	C4	H43		1.5176	107.80	-60.03	109.12	1.0793
!IC N2	C2	C1	H11		1.5176	115.98	120.00	107.05	1.0836
!IC N2	C2	C1	H12		1.5176	115.98	-120.00	112.91	1.0820

#####

! This patch transforms a cysteine residue to Cys-SEA complex

! The SEA fragments come from the MTSEA molecule

#####

! Patch the cysteine-MTSEA complex on a cystein residue

PRES SEA +1.00 ! MTSEA : (2-Aminoethyl)methane  
 ! thiosulfonate Hydrobromide)  
 ! M. Simoes, B. Roux and R. Sauvé

```

! calc F.E. solvation = -75,3 kcal/mol
! Based on ethanolamine (RESI ETAM)
GROUP
ATOM N2 NH3L -0.30 !
ATOM HN1 HCL 0.33 !
ATOM HN2 HCL 0.33 ! (+) HN1---N2---HN3
ATOM HN3 HCL 0.33 !
ATOM C2 CTL2 0.13 !
ATOM H21 HAL2 0.09 ! H22---C2---H21
ATOM H22 HAL2 0.09 !
GROUP ! H12---C1---H11
ATOM CB CT2 -0.10 !
ATOM HB1 HA 0.09 ! S5
ATOM HB2 HA 0.09 !
ATOM SG SM -0.08 ! SG
GROUP !
ATOM S5 SM -0.08 ! HB1---CB---HB2
ATOM C1 CTL2 -0.10 !
ATOM H11 HL 0.09 !
ATOM H12 HL 0.09 !
DELETE ATOM HG1
BOND N2 HN1 N2 HN2 N2 HN3 N2 C2
BOND C2 H21 C2 H22 C2 C1
BOND C1 H11 C1 H12
BOND C1 S5 S5 SG
ANGLE CB SG S5 SG S5 C1
ANGLE S5 C1 H11 S5 C1 H12
ANGLE S5 C1 C2 C1 C2 N2
ANGLE C1 C2 H21 C1 C2 H22
ANGLE H11 C1 C2 H12 C1 C2 H11 C1 H12
ANGLE C2 N2 HN1 C2 N2 HN2 C2 N2 HN3
ANGLE H21 C2 N2 H22 C2 N2 H21 C2 H22
ANGLE HN1 N2 HN2 HN1 N2 HN3 HN2 N2 HN3
DIHE CA CB SG S5
DIHE HB1 CB SG S5 HB2 CB SG S5
DIHE CB SG S5 C1
DIHE SG S5 C1 C2 SG S5 C1 H11 SG S5 C1 H12
DIHE S5 C1 C2 H21 S5 C1 C2 H22 S5 C1 C2 N2
DIHE H11 C1 C2 H21 H11 C1 C2 H22 H11 C1 C2 N2
DIHE H12 C1 C2 H21 H12 C1 C2 H22 H12 C1 C2 N2
DIHE C1 C2 N2 HN1 C1 C2 N2 HN2 C1 C2 N2 HN3
DIHE H21 C2 N2 HN1 H21 C2 N2 HN2 H21 C2 N2 HN3
DIHE H22 C2 N2 HN1 H22 C2 N2 HN2 H22 C2 N2 HN3
! From Crystal Structure Of Sortase B From S. Aureus Complexed
! With Mtset (PDB:1QWZ)
IC CA CB SG S5 1.5314 115.91 57.39 100.35 2.2100
IC CB SG S5 C1 1.8177 100.35 94.59 109.55 1.4749
IC SG S5 C1 C2 2.2100 109.55 57.41 119.58 1.5660
IC C2 S5 *C1 H11 1.5660 119.58 120.00 111.00 1.0800
IC C2 S5 *C1 H12 1.5660 119.58 -120.00 111.00 1.0800
IC S5 C1 C2 N2 1.4749 119.58 105.59 105.62 1.5211
IC N2 C1 *C2 H21 1.5211 105.62 120.00 110.10 1.0800

```

```
IC N2 C1 *C2 H22 1.5211 105.62 -120.00 110.10 1.0800
```

```
! Based on ethanolamine (RESI ETAM)
```

```
! HF/6-31G* OPTIMIZED STRUCTURE:
```

```
!IC N2 C2 C1 S5 1.5084 107.86 48.44 104.92 1.3987
!IC C2 C1 S5 SG 1.5191 104.92 173.19 111.99 0.9495
!IC HN1 N2 C2 C1 1.0145 108.35 -49.03 107.86 1.5191
!IC HN2 N2 C2 C1 1.0107 112.05 69.23 107.86 1.5191
!IC HN3 N2 C2 C1 1.0102 112.39 -169.37 107.86 1.5191
!IC N2 C1 *C2 H21 0.0000 000.00 120.00 000.00 0.0000
!IC N2 C1 *C2 H22 0.0000 000.00 -120.00 000.00 0.0000
!IC S5 C2 *C1 H11 0.0000 000.00 120.00 000.00 0.0000
!IC S5 C2 *C1 H12 0.0000 000.00 -120.00 000.00 0.0000
```

```
#####
```

```
! This patch transforms a cysteine residue to Cys-SACE
! complex
```

```
! The SACE fragments come from the MTSACE molecule
```

```
#####
```

```
! Patch the cysteine-MTSACE complex on a cystein residue
```

```
PRES SACE +0.00! MTSACE :[2-(Aminocarbonyl)ethyl]
! Methanethiosulfonate
! M. Simoes, B. Roux and R. Sauvé (2006)
! calc F.E. solvation = -18,0 kcal/mol
! Based on amidated C-terminus (PRES CT2)
GROUP !
ATOM CB CT2 -0.10 !
ATOM SG SM -0.08 !
ATOM HB1 HA 0.09 !
ATOM HB2 HA 0.09 !
GROUP !
ATOM S5 SM -0.08 !
ATOM C1 CTL2 -0.10 !
ATOM H11 HL 0.09 !
ATOM H12 HL 0.09 !
GROUP !
ATOM C2 CTL2 -0.18 !
ATOM H21 HL 0.09 !
ATOM H22 HL 0.09 !
GROUP !
ATOM C3 CC 0.55 !
ATOM O1 O -0.55 !
GROUP !
ATOM NT NH2 -0.62 !
ATOM HT1 H 0.32 !
ATOM HT2 H 0.30 !
DELETE ATOM HG1 !
BOND C3 NT NT HT1 NT HT2
BOND C3 C2 C2 H21 C2 H22 C2 C1
BOND C1 H11 C1 H12 C1 S5
BOND S5 SG
DOUBLE O1 C3
```

```

|
| HB1-CB-HB2
|
| SG
|
| S5
|
| H11-C1-H12
|
| H21-C2-H22
|
| O1=C3
|
| NT
|
| / \
| HT1 HT2

```

```

ANGLE CB  SG S5  SG  S5 C1
ANGLE S5  C1 H11  S5  C1 H12  S5  C1 C2
ANGLE C1  C2 C3   C1  C2 H21  C1  C2 H22
ANGLE H11 C1 C2   H12 C1 C2   H11 C1 H12
ANGLE H21 C2 C3   H22 C2 C3   H21 C2 H22
ANGLE C2  C3 O1   C2  C3 NT
ANGLE C3  NT HT1  C3  NT HT2  HT1 NT HT2
DIHE CA  CB SG S5  HB1 CB SG S5  HB2 CB SG S5
DIHE CB  SG S5 C1  HB1 CB CA HA  HB2 CB CA HA
DIHE SG  S5 C1 C2  SG  S5 C1 H11  SG  S5 C1 H12
DIHE S5  C1 C2 H21  S5  C1 C2 H22  S5  C1 C2 C3
DIHE H11 C1 C2 H21  H11 C1 C2 H22  H11 C1 C2 C3
DIHE H12 C1 C2 H21  H12 C1 C2 H22  H12 C1 C2 C3
DIHE C1  C2 C3 NT  C1  C2 C3 O1
DIHE H21 C2 C3 NT  H21 C2 C3 O1
DIHE H22 C2 C3 NT  H22 C2 C3 O1
DIHE C2  C3 NT HT1  C2  C3 NT HT2
IMPR C3 NT C2 O1   C3 C2 NT O1
IMPR NT C3 HT1 HT2  NT C3 HT2 HT1
DONOR HT1 NT
DONOR HT2 NT
! From Crystal Structure Of Sortase B From S. Aureus Complexed
! With Mtset (PDB:1QWZ)
IC CA  CB  SG  S5  1.5314  115.91  57.39  100.35  2.2100
IC CB  SG  S5  C1  1.8177  100.35  94.59  109.55  1.4749
IC SG  S5  C1  C2  2.2100  109.55  57.41  119.58  1.5660
IC C2  S5  *C1 H11  1.5660  119.58  120.00  111.00  1.0800
IC C2  S5  *C1 H12  1.5660  119.58  -120.00  111.00  1.0800
! Based on amidated C-terminus (PRES CT2)
IC NT  C2  *C3  O1  0.0000  0.0000  180.0000  0.0000  0.0000
IC C2  C3  NT  HT1  0.0000  0.0000  180.0000  0.0000  0.0000
IC HT1 C3  *NT  HT2  0.0000  0.0000  180.0000  0.0000  0.0000

```

## For the \*.PAR file

```

!#####
! MTS Parameters - Bonds -
!#####
BONDS
!
!V(bond) = Kb(b - b0)**2
!
!Kb: kcal/mole/A**2
!b0: A
!
!atom type Kb      b0
!
SM  CTL2  214.000    1.4800 ! Donnée par les cristallos
! Based on 1QXA and 1QWZ cristallos

```

```

!SM  CT2  214.000    1.8160 ! ALLOW  SUL ION
! improved CSSC dihedral in DMDS  5/15/92 (FL)

#####
! MTS parameter - Bonds Angle -
#####
ANGLES
!
!V(angle) = Ktheta(Theta - Theta0)**2
!
!V(Urey-Bradley) = Kub(S - S0)**2
!
!Ktheta: kcal/mole/rad**2
!Theta0: degrees
!Kub: kcal/mole/A**2 (Urey-Bradley)
!S0: A
!
!atom types  Ktheta  Theta0  Kub  S0
!
! For the Cystein-MTS Complex
!-----
SM  CTL2 HL  38.000  111.0000
! Based on SM  CT2 HA  38.000  111.0000 ! ALLOW ALI SUL ION
SM  SM  CTL2  72.500  103.3000
! Based on SM  SM  CT2  72.500  103.3000 ! ALLOW ALI SUL ION
! new S-S atom type 8/24/90
SM  CTL2 CTL2  58.000  119.5800
! Based on S  CT2 CT2  58.000  114.5000 ! ALLOW ALI SUL ION
! expt. MeEtS,  3/26/92 (FL)
! With the angle value extracted from the cristallography PDB:1QWZ

#####
! MTS Parameters - Dihedral angle -
#####
DIHEDRALS
!
!V(dihedral) = Kchi(1 + cos(n(chi) - delta))
!
!Kchi: kcal/mole
!n: multiplicity
!delta: degrees
!atom types  Kchi  n  delta
!
!For the Cystein-MTS Complex
!-----
CT2 SM  SM  CTL2  1.0000 1  0.00
CT2 SM  SM  CTL2  4.1000 2  0.00
CT2 SM  SM  CTL2  0.9000 3  0.00
! Based on Taken From mp 6-311G** dimethyldisulfide, 3/26/92 (FL)
!CT2 SM  SM  CT2  1.0000 1  0.00

```

---

```
!CT2 SM SM CT2 4.1000 2 0.00
!CT2 SM SM CT2 0.9000 3 0.00

SM SM CTL2 HL 0.1580 3 0.00
! Based on Taken From expt. dimethyldisulfide, 3/26/92 (FL)
!SM SM CT2 HA 0.1580 3 0.00 ! ALLOW ALI SUL ION

SM SM CTL2 CTL2 0.3100 3 0.00
! Based on S-S for cys-cys SM SM CT2 CT2 dummy parameter for now ...
! and corrected but still dummy parameter
!SM SM CT2 CT2 0.3100 3 0.00 ! ALLOW SUL ALI

SM CTL2 CTL2 HL 0.0100 3 0.00
! Based on SM CT2 CT2 HA 0.0100 3 0.00
!ALLOW ALI SUL ION!DTN 8/24/90

!For the Cystein-MTSET and the Cystein-MTSEA Complex
!-----
NTL CTL2 CTL2 SM 3.3 1 180.00 !Provenant de la choline, 12/92
NTL CTL2 CTL2 SM -0.4 3 180.00 !Provenant de la choline, 12/92

END
```









## ANNEXE VII : AUTORISATION DES CO-AUTEURS ET DE L'ÉDITEUR

The Rockefeller  
University Press

1114 First Avenue, 4th Floor  
New York, New York 10021  
(212) 327-8025  
Fax (212) 327-8589

March 29, 2006

Mr. Manuel Simoes  
Universite de Montreal  
Departement de physiologie  
C.P. 6128, succursale Centre-ville  
Montreal, Quebec, H3C 3J7  
Canada

Dear Mr. Simoes:

We will grant you permission for the print and electronic reproduction of *The Journal of General Physiology*, July 2002; Vol: 120(1), pgs 99-116 as referred to in your fax dated March 22, 2006.

Permission is granted for one time use only. Please write to us each time for permission concerning future editions and translations, as **we do not grant blanket permissions**.

Since you are one of the authors, a credit line is our only requirement.

Please give suitable acknowledgment to the source in the following manner: Reproduced from **The Journal of General Physiology**, year, vol., pp. by copyright permission of The Rockefeller University Press.

Sincerely yours,

THE JOURNAL OF  
GENERAL PHYSIOLOGY

  
Laraine Karl  
Permissions Coordinator

## ACCORD DES COAUTEURS

**ÉTUDIANT :**
**Prénom et Nom :** Manuel Simoes

**Programme :** Doctorat de Physique option Biophysique et Physiologie moléculaire

**DESCRIPTION DE L'ARTICLE**
**Titre :** Cysteine mutagenesis and computer modelization of the S6 region of an intermediate conductance IKCa channel

**Auteurs :** Manuel Simoes, Line Garneau, Hélène Klein, Umberto Banderali, Fadi Hobeila, Benoît Roux, Lucie Parent et Rémy Sauvé

**Revue :** *The Journal of General Physiology* (2002) 120 pp. 99-116

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Manuel Simoes inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Étude de la relation structure-fonction du segment s6 du canal potassique  $k_{cs}3.1$ . »

Line Garneau

Coauteur

4/4/06.

Date

Hélène Klein

Coauteur

avril 2006

Date

Umberto Banderali

Coauteur

4 avril 2006

Date

Fadi Hobeila

Coauteur

5/04/06

Date

Benoît Roux

Coauteur

avril 2006

Date

Lucie Parent

Coauteur

4 AVRIL 2006

Date

Rémy Sauvé

Coauteur

4/04/2006

Date

## ACCORD DES COAUTEURS

**ÉTUDIANT :****Prénom et Nom :** Manuel Simoes**Programme :** Doctorat de Physique option Biophysique et Physiologie moléculaire**DESCRIPTION DE L'ARTICLE****Titre :** Molecular modelling of the scam experiments with application to the kcsa channel**Auteurs :** Manuel Simoes, Benoît Roux et Rémy Sauvé**Revue :** Soumission prévu pour le mois d'avril 2006 dans la publication *The Biophysical Journal*

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Manuel Simoes inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Étude de la relation structure-fonction du segment s6 du canal potassique  $k_{cs}3.1$ . »

Benoît Roux

Coauteur

4 avril 2006  
Date

Rémy Sauvé

Coauteur

4/04/2006  
Date

