

2m11, 2906.6

Université de Montréal

Contribution des résidus cystéine du segment S6 aux propriétés de conduction, de cinétique et d'oxydo-réduction du canal KCa humain de conductance intermédiaire.

par

Fadi Hobeila

Département de physique

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.sc.)

en physique.

Décembre, 2000

© Fadi Hobeila, 2000



QC  
3  
U54  
2001  
N.015

Université de Montréal

Contribution des résidus cystéine du segment S6 aux propriétés de conduction, de cinétique et d'oxydo-réduction du canal KCa humain de conductance intermédiaire.

par

Fadi Hobeila

Département de physique

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.sc.)

en physique.

Décembre, 2000

© Fadi Hobeila, 2000

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Contribution des résidus cystéine du segment S6 aux propriétés de conduction, de cinétique et d'oxydo-réduction du canal KCa humain de conductance intermédiaire.

présenté par :

Fadi Hobeila

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Yves Lapointe, Président-rapporteur

Rémy Sauvé, Directeur de recherche

Marcel-Daniel Payet, membre du jury

Mémoire accepté le : \_\_\_\_\_



Cette étude porte sur le canal potassique humain de conductance intermédiaire activé par le calcium hKCa. Ce canal est présent dans les cellules endothéliales qui sont maintenant reconnus pour leur sécrétion d'agents vasodilatateurs dont le plus important est le monoxyde d'azote (NO). Le canal hKCa est pressenti comme un régulateur de la production de NO par une action de *feedback* positif stimulant la synthèse de NO. Cette synthèse est grandement diminuée en présence de radicaux libres. Nous voulons vérifier si le canal hKCa est sensible aux radicaux libres et le cas échéant, où se trouve le point d'action des radicaux sur le canal.

Notre étude a porté sur un canal hKCa cloné à partir de cellules endothéliales du cordon ombilical ECV304. Ce canal est composé de 427 acides aminés et six segments transmembranaires. Nous utiliserons un agent modificateur de thiol, le DTNB, comme agent oxydant. Le DTNB est un agent oxydant qui s'attaque spécifiquement aux cystéines. Les cystéines sont de bonnes cibles pour la régulation d'un canal par les radicaux libres car le groupement sulfhydryle SH des cystéines est facilement oxydable. Comme la séquence primaire du canal hKCa comprend neuf cystéines, nous sommes intéressés aux rôles que jouent ces cystéines dans le mécanisme d'inhibition de ce canal par le DTNB. Nous avons plus particulièrement étudié les quatre cystéines du segment transmembranaire S6 qui sont les candidates les plus probables pour expliquer l'inhibition du canal par le DTNB. Des mutations ponctuelles cystéine-> sérine ou cystéine-> glycine ont été insérées individuellement au canal hKCa en position 267, 269, 276 et 277. Nous avons utilisé la technique électrophysiologique du *patch-clamp* en configuration *inside-out* afin d'étudier le comportement unitaire du canal ainsi que les propriétés de conduction, la cinétique et la sensibilité au DTNB des canaux mutés et de type sauvage.

Nos résultats montrent que la mutation C269S provoque une augmentation de 30% de la conductance du canal hKCa alors que la mutation C277S provoque une diminution de conductance de l'ordre de 20%. Cette dernière mutation est aussi responsable de la déstabilisation de l'état ouvert du canal vérifiable par une augmentation du taux de fermeture du canal hKCa-C277S. Notre étude montre que les C276 et 277 sont critiques pour la stabilisation et la bonne fonction du canal. Nos résultats démontrent que les C269, 276 et 277 ne sont pas responsable individuellement de l'inhibition du canal par le DTNB. Le canal possédant la mutation C267S est aussi inhibé par le DTNB mais recouvre une grande partie de son activité initiale sans avoir recours à des agents réducteurs. Il semble donc que l'inhibition du canal ne soit pas due à une réaction oxydative mais à un blocage du pore par le DTNB. Il est possible que l'inhibition du canal par le DTNB soit le fruit d'un mécanisme complexe impliquant plusieurs cystéines mais, il me semble plus plausible que la C267 soit la seule cystéine responsable de l'inhibition du canal par le DTNB.

## Table des Matières

<b>Table des Figures .....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 BK.....	3
1.2 SKCa.....	5
1.3 IKCa.....	10
<b>2. Matériels et méthodes.....</b>	<b>22</b>
2.1 Biologie Moléculaire.....	22
2.2 Ovocytes.....	23
2.3 Electrophysiologie.....	24
2.4 Solutions.....	24
2.5 Analyses.....	25
<b>3. Résultats.....</b>	<b>28</b>
3.1 Caractérisation des propriétés de conduction.....	28
3.1.1 hIKCa de type sauvage.....	28
3.1.2 hIKCa-C267S.....	31
3.1.3 hIKCa-C269S.....	34
3.1.4 hIKCa-C276S.....	36
3.1.5 hIKCa-C276G.....	36
3.1.6 hIKCa-C277S.....	38
3.2 Cinétiques.....	40
3.2.1 hIKCa de type sauvage.....	42
3.2.2 hIKCa-C267S.....	42
3.2.3 hIKCa-C269S.....	42
3.2.4 hIKCa-C276G.....	42
3.2.5 hIKCa-C277S.....	43

3.3 Pharmacologie.....	44
3.3.1 hIKCa de type sauvage. ....	44
3.3.2 hIKCa-C267S.....	48
3.3.3 hIKCa-C269S.....	48
3.3.4 hIKCa-C276G.....	48
3.3.5 hIKCa-C277S.....	48
Table 1. Synthèse des résultats .....	50
<b>4. Discussion.....</b>	<b>51</b>
4.1 hIKCa de type sauvage.....	51
4.1.1 Caractérisation.....	51
4.1.2 hIKCa de type sauvage et les agents modificateurs de thiol.....	53
4.1.3 Modèle 3D.....	54
4.2 hIKCa mutants .....	57
Caractérisation des propriétés de conduction.....	58
4.2.1 hIKCa-C267S.....	58
4.2.2 hIKCa-C269S.....	59
4.2.3 hIKCa-C276G.....	60
4.2.4 hIKCa-C276S.....	61
4.2.5 hIKCa-C277S.....	61
4.3 Cinétique des canaux hIKCa.....	63
4.4 hIKCa-mutants et agents modificateurs de thiol.....	65
<b>5. Connaître la suite... ..</b>	<b>72</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>75</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>ix</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>xii</b>

## Table des Figures

Figure 1. Topologie proposée du canal hIKCa .....	12
Figure 2. Modèle proposé des interactions calmoduline-hIKCa.....	15
Figure 3. Caractérisation du canal hIKCa de type sauvage .....	29
Figure 4. Caractérisation du canal hIKCa-C267S.....	33
Figure 5. Caractérisation du canal hIKCa-C269S.....	35
Figure 6. Caractérisation du canal hIKCa-C276G .....	37
Figure 7. Caractérisation du canal hIKCa-C277S.....	39
Figure 8. Analyse cinétique des canaux hIKCa WT et mutés.....	41
Figure 9. Réactions par échange de thiols de DTNB et MTSES .....	46
Figure 10. Pharmacologie du canal hIKCa de type sauvage.....	47
Figure 11. Pharmacologie des canaux hIKCa mutés. ....	49
Figure 12. Représentation 3D du pore du canal hIKCa. ....	56
Figure 13. DTNB et MTSES à l'intérieur du pore du canal hIKCa.....	70
Figure 14. Structure 3D du DTNB et du MTSES .....	71
Figure 15. Effet du $[Ca^{2+}]_i$ et du clotrimazole sur le canal hIKCa.....	x
Figure 16. Inhibition du canal hIKCa par le DTNB .....	xi
 Table 1. Synthèse des résultats .....	 50

## Liste des abréviations

4-PDS : 4,4'-dithiopyridine

BK : canal potassique de grande conductance activé par le calcium

CaM : calmoduline

DTNB : 5,5'-dithio *bis*(2-nitrobenzoic acid)

DTT : dithiothreitol

IKCa : canal potassique de conductance intermédiaire activé par le calcium

IRK : canal potassique à rectification entrante

NO : oxyde nitrique

KcsA : canal potassique de la bactérie *Streptomyces lividans*

K<sub>v</sub> : canal potassique dépendant du voltage

MTSES : méthaneethiosulfonate éthylsulfonate

pA : picoampère, unité de courant électrique

pS : picosiemens, unité de conductance électrique ( Ampère/Volt )

ROMK : canal potassique

ROS : espèce oxygénée réactive (*reactive oxygene species*)

sAHP : hyperpolarisation lente (*slow afterhyperpolarization*)

ShK : toxine de l'anémone de mer *Stichodactyla heliantus*

SK, SKCa : canal potassique de petite conductance activé par le calcium

V : volt, unité de potentiel électrique

## 1. Introduction

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires qui permettent le passage d'ions de part et d'autre des membranes de la cellule. Les canaux ioniques sont classifiés selon leurs différentes caractéristiques, les plus importantes étant : la sélectivité à une espèce d'ion (canal conduisant le potassium ou le calcium par exemple), la quantité d'ions pouvant traverser le canal (conductance) et leur sensibilité à certains stimuli (enzymes, composés chimiques, potentiel membranaire, etc). L'étude des canaux ioniques a grandement fait avancer nos connaissances de la physiologie du corps humain. Notre étude portera sur un canal potassique humain de conductance intermédiaire activé par le calcium ou hIKCa. Ce canal nous intéresse car on le retrouve dans les cellules endothéliales et il est sensible aux phénomènes d'oxydo-réduction.

Les canaux potassiques activés par le calcium de conductance intermédiaire, ou hIKCa, sont impliqués dans plusieurs processus comme la sécrétion et la prolifération [59,60]. Les tissus endothéliaux, par exemple, sont maintenant connus pour sécréter des agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs. Le plus important de ces vasodilatateurs est probablement le monoxyde d'azote (NO). La production de NO est dépendante de la concentration de calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Il a été démontré que la production et la sécrétion d'agents vasodilatateurs est activée lors de l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  [1,9,47]. Le calcium active, par le biais de la calmoduline (CaM), l'enzyme NO-synthétase qui métabolise l'arginine<sup>-</sup> en NO<sup>+</sup> et citruline<sup>-</sup> [53]. Cette augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules endothéliales est causée par un relargage de calcium venant des pools intracellulaires et d'une entrée capacitative de calcium venant de l'extérieur de la cellule [1,16,48]. Cette entrée capacitative de Ca<sup>2+</sup> semble dépendre du potentiel

membranaire, une hyperpolarisation de la membrane entraînant une augmentation ou une stabilisation de l'entrée de calcium. Le potentiel membranaire est majoritairement maintenu par les canaux potassiques et particulièrement par le canal IRK1. Il est donc fortement plausible que les canaux potassiques soient responsables de l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire [1,27,73]. Ainsi le canal IKCa, de par sa dépendance en  $\text{Ca}^{2+}$  et son indépendance au potentiel membranaire, est un sérieux candidat à cette régulation du potentiel. Lorsque  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  augmente, le canal hIKCa voit son activité augmenter ce qui induit une hyperpolarisation de la membrane. Plus l'activité du canal hIKCa est grande, plus la membrane se polarise, ce qui implique une entrée accrue de calcium extracellulaire dans la cellule, et donc une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . C'est donc un cycle de *feedback* positif qui avantage la production de l'agent vasodilatateur NO, car la production de NO dépend de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Comme le canal hIKCa est sensible aux agents oxydants, il est possible que les ROS puissent inhiber le canal et ainsi freiner le *feedback* positif qui favorise la production de NO. Une réduction de la production de NO par la régulation du canal hIKCa par les ROS pourrait être une cause d'hypertension.

Les canaux potassiques activés par le calcium se répartissent en trois grandes familles : la famille des canaux de petite conductance SK (10-20 pS), la famille des canaux de conductance intermédiaire IK (20-70 pS) et la famille des canaux de grande conductance BK (100+ pS).



## 1.1 BK

Parmi les nombreuses familles de canaux potassiques activés par le calcium (KCa), celle qui a été la plus étudiée est sûrement celle des BK (Big K<sup>+</sup> channel) aussi connu sous le nom de Maxi-K<sup>+</sup>. Ces canaux sont sélectifs au potassium et leur conductance varie entre 100 et 250 pS. Ils sont activés aux potentiels dépolarisants et par augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ( [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ). Ces deux caractéristiques font de ces canaux des candidats idéaux pour la régulation de *feedback* des canaux calciques dépendant du voltage. Les canaux BK et les canaux calciques dépendants du voltage coexistent dans différents types cellulaires comme les neurones [69,83] et les muscles lisses [55].

Les BK sont des complexes protéiques formés de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  est la protéine qui constitue le pore et la sous-unité  $\beta$  est une protéine régulatrice de l'activité du canal. La sous-unité  $\alpha$  est encodée par un seul gène (*Slo*) et fut clonée et exprimée pour la première fois à partir de la souche *dSlo* de la drosophile en 1991 [5]. Les différences fonctionnelles de la sous-unité  $\alpha$  sont le fruit de l'épissage alternatif [2,72]. La séquence primaire de BK est très conservée chez les différents mammifères. Il existe une grande homologie entre la séquence des segments transmembranaires S1 à S6 des canaux BKs et les six segments transmembranaires des canaux de la famille des canaux potassiques dépendants du voltage (K<sub>v</sub>) [36,75]. Le segment transmembranaire S4 des canaux BK possède plusieurs résidus chargés positivement qui sont homologues à ceux retrouvés dans le senseur de voltage des K<sub>v</sub>, aussi situé dans le segment transmembranaire S4. Là s'arrête l'homologie entre la famille des BK et les autres familles de canaux potassiques. Selon les profils

d'hydrophobicité, les canaux BK posséderaient 11 régions hydrophobes capables de traverser la membrane, de ces onze segments possibles on pense que les sept premiers sont effectivement transmembranaires (segment S0 à S6) [52]. L'extrémité amino-terminale du segment S0 est extracellulaire alors que la région carboxy-terminale du canal est intracellulaire [52]. C'est dans l'extrémité carboxy-terminale qu'on retrouverait les quatre derniers segments hydrophobes (S7-S10) qui seraient probablement cytosoliques eux aussi. Il faut noter que ces quatre derniers segments et les régions adjacentes forment 70% de la sous-unité  $\alpha$ .

Le canal formé par cette sous-unité est activé par la  $[Ca^{2+}]_i$ , mais la séquence primaire du canal ne présente pas de motif consensus pouvant lier le calcium comme un *EF Hand* par exemple. On y retrouve, par contre, un nouveau motif très sélectif au calcium. Ce motif est présent dans une région formée par 28 acides aminés entre les segments S9 et S10. Cette région contient plusieurs résidus chargés négativement, principalement des aspartates, qui forment un domaine appelé *calcium bowl* et qui ne diffère que par un seul résidu chez toutes les espèces de BK. Par contre, cette région ne semble pas pouvoir expliquer à elle seule la sensibilité des canaux BK à la  $[Ca^{2+}]_i$ , une autre région liant le calcium est possiblement présente [74].

Les canaux BK sont donc activés par le calcium et par une dépolarisation de la membrane. Il semble que les étapes de liaison du calcium au canal soient indépendantes des changements de conformations dépendants du voltage lors de l'activation du canal. Lorsque la  $[Ca^{2+}]_i$  augmente, la relation « probabilité d'ouverture ( $P_o$ )-potentiel membranaire » subit un déplacement vers des potentiels plus dépolarisants,

l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  provoque donc un changement de conformation de la protéine qui abaisse le seuil d'activation du canal par le potentiel membranaire [17].

D'autres facteurs peuvent influencer l'activité et le comportement du canal comme des sites de phosphorylation, une régulation par des mécanismes d'oxydo-réduction et la sous-unité  $\beta$ . La séquence primaire de la sous-unité  $\alpha$  présente plusieurs sites de phosphorylation qui pourraient jouer un rôle dans la modulation du comportement du canal par des protéines kinases [65]. De plus, le canal est sensible aux processus d'oxydo-réduction. Les agents réducteurs, augmentent l'activité du canal alors que les agents oxydants réduisent son activité [19,80].

L'activité du canal BK est aussi modulée par la sous-unité  $\beta$ . La sous-unité  $\beta$  du BK serait une protéine membranaire selon la topologie proposée (cette protéine n'a pas été cristallisée à ce jour) qui posséderait deux segments transmembranaires et ses extrémités amino- et carboxy-terminales résideraient dans la cellule. La coexpression des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  semble affecter la sensibilité du canal au calcium en déplaçant la région d'activation du canal vers des potentiels plus négatifs [37]. La présence de la sous-unité  $\beta$  semble favoriser la liaison de la charybdotoxine (une toxine de scorpion, bloqueur de plusieurs canaux  $K^+$ ) au canal [28]. Toutefois, il semble que la sous-unité  $\beta$  ne soit pas une composante nécessaire des canaux BK [13,51,65] malgré que la majorité des canaux BK des muscles lisses coronariens soient couplés à la sous-unité  $\beta$  [77].

## 1.2 SKCa

Les canaux de la famille SK, aussi nommés SKCa, sont des canaux potassiques de petite conductance activés par le calcium intracellulaire. La famille des SK comprend trois isomères connus : SK1, SK2 et SK3. Ces canaux jouent un rôle important dans les

cellules excitables. Les SK sont activés par une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ . On retrouve des augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$  lors de potentiels d'action chez les cellules excitables. L'activation des SK due à cette augmentation provoque une hyperpolarisation de la membrane qui inhibe l'apparition d'un nouveau potentiel d'action. L'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  générée par le potentiel d'action se résorbe lentement ce qui permet aux canaux SK de créer une hyperpolarisation de longue durée de la membrane (sAHP, *Slow AfterHyperpolarisation*). Cette hyperpolarisation lente limite la fréquence des potentiels d'action répétitifs en augmentant le temps entre chaque potentiel d'action. Cette hyperpolarisation est nécessaire au bon fonctionnement de la neurotransmission car elle empêche l'activation continue des cellules excitables.

Les processus de sAHP sont classés en deux groupes selon qu'ils seraient sensibles (inhibés) ou non à l'apamine, une toxine du venin d'abeille. La majorité des exemples d'hyperpolarisation lente chez les cellules excitables sont du type sensible à l'apamine mais des exceptions à cette règle existent comme dans le cas des motoneurones vagues [70] et des neurones d'hippocampe de rats [44]. En général, l'hyperpolarisation lente sensible à l'apamine est activée rapidement par un seul potentiel d'action et se résorbe selon une constante de temps de 150 ms [61,71] alors que l'hyperpolarisation lente insensible à l'apamine est caractérisée par une activation lente (0.5 à 1 seconde pour atteindre l'hyperpolarisation maximale) et se résorbe selon une constante de temps de 1.5 secondes [44,70]. Les raisons expliquant les différences de cinétiques observées ne sont pas encore connues.

La conductance des SK sensibles à l'apamine en condition de solutions de potassium symétriques varie de 4 à 14 pS selon le type cellulaire : muscle squelettique de rat, lymphocytes T et cellules chromaffines adrénales de rat [6,26,58]. Les SK

insensibles à l'apamine ont une conductance de 18 pS dans les cultures de cellules neuronales d'hippocampe de rat [45]. Cette hétérogénéité de conductance chez ces deux groupes de SK natifs n'est pas retrouvée chez les SK clonés, les canaux clonés sensibles ou non à l'apamine ont tous une conductance de 10 pS [43]. Toutes ces conductances réfèrent aux courants entrants car les SK clonés ou natifs possèdent tous une rectification entrante marquée, c'est-à-dire que le courant mesuré à un potentiel membranaire négatif donné (ex : -100 mV) est plus grand que celui mesuré à un potentiel positif équivalent (ex : 100 mV) [43,45]. Le mécanisme responsable de cette rectification n'est pas encore connu mais elle pourrait être provoquée par la présence de magnésium intracellulaire [45] ou de calcium dans le milieu intracellulaire [43]. L'activation demi-maximale ( $K_{0.5}$ ) des SK clonés sensible ou non à l'apamine survient lorsque la  $[Ca^{2+}]_i$  est de 600-700 nM [43].

Kohler *et al.* ont récemment clonés trois membres de la famille des SK : hSK1, rSK2 et rSK3 [43]. Les canaux de la famille SK possèdent tous six domaines transmembranaires et des segments amino- et carboxy-terminaux intracellulaires. Malgré cette topologie qui est semblable au canaux potassiques dépendants du voltage ( $K_v$ ), les séquences primaires des canaux SK et  $K_v$  diffèrent suffisamment de sorte que les canaux SK constituent une famille de canaux distincte des  $K_v$  dans la super-famille des canaux potassiques. Les canaux SK ne possèdent pas de dépendance au voltage malgré la présence dans le segment S4 de plusieurs résidus positivement chargés (K et R) ce qui n'est pas sans nous rappeler le senseur de potentiel des canaux  $K_v$  [35]. Etant donné l'homologie de structure entre les canaux SK et les canaux  $K_v$ , il est fort probable que les canaux SK fonctionnels soient composés de quatre sous-unités semblables.

Tous les SK exhibent la même relation dose-réponse au calcium. Cela suggère que le ou les éléments structurels du *gating* dépendant du calcium sont les mêmes pour les trois isoformes des canaux SK : SK1, 2 et 3. Soulignons que les canaux SK ne possèdent pas de motifs liant le  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des domaines formant le canal comme par exemple les motifs *EF hand*, *C2 domain* ou *calcium bowl*. Par contre, l'affinité des SK pour le  $\text{Ca}^{2+}$  se rapproche de celle des protéines qui possèdent un motif *EF Hand* de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ , comme c'est le cas de la calmoduline (CaM), une protéine ubiquitaire, fortement exprimée dans les cellules et qui possède quatre motifs *EF Hand*.

La CaM est un médiateur ubiquitaire de processus dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$ . C'est une protéine de 148 acides aminés qui possède deux domaines globulaires, amino- et carboxy-terminaux. Chacun de ces domaines comporte deux motifs *EF Hand*. Les motifs *EF Hand* 1 et 2 font parti de l'extrémité N-terminale alors que les motifs *EF Hand* 3 et 4 font parti de l'extrémité C-terminale de la CaM. La CaM lie le  $\text{Ca}^{2+}$  grâce à ses quatre motifs *EF Hand*. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  se lient préférentiellement aux motifs *EF Hand* 4, 3, 2 et 1 (par ordre d'affinité), l'affinité du motif 1 pour le  $\text{Ca}^{2+}$  étant plus petite que celle du motif 4. Il semble aussi que la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à la CaM soit un processus coopératif, chaque molécule de  $\text{Ca}^{2+}$  liée à un motif *EF Hand* rend la liaison de  $\text{Ca}^{2+}$  aux autres motifs *EF Hand* plus aisée. De plus, la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à la CaM provoque un changement de sa conformation, elle se replie sur elle-même ce qui a pour effet de rapprocher les domaines globulaires entre eux.

Récemment il fut démontré que la CaM se liait de manière constitutive et  $\text{Ca}^{2+}$ -indépendante aux canaux SK2 et SK3 [81]. La CaM se lie à une région de l'extrémité C-terminale des canaux SK, deux régions de la CaM sont essentielles à la liaison avec le canal SK2 : la première région est située au niveau des acides aminés 78-85, soit au

milieu de la CaM, et la seconde région au niveau des acides aminés 143-148, soit dans le domaine C-terminal [42]. La délétion d'une de ces deux régions empêche la liaison du complexe CaM-SK. Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que les acides aminés R464 et K467 du canal SK2 étaient essentiels à la liaison du complexe CaM-SK [42]. Ces deux acides aminés chargés positivement sont conservés dans la famille des SK. La sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  des canaux SK serait due à une liaison constitutive avec la CaM. De plus, Keen *et al.* [42] ont aussi démontré que les motifs *EF Hand* de la CaM ne devaient pas être nécessairement fonctionnels pour qu'il y ait liaison entre la CaM et SK, et que les motifs *EF Hand* 3 et 4 ne sont pas nécessaires pour retrouver une sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  semblable à celle du complexe CaM-SK de type sauvage. Selon cette étude, un seul des deux premiers motifs *EF Hand* fonctionnels de la CaM est suffisant et nécessaire pour observer une certaine sensibilité du canal au  $\text{Ca}^{2+}$ . Donc, le *gating* du canal SK2 par le  $\text{Ca}^{2+}$  est médié par la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  aux motifs *EF Hands* 1 et 2 de l'extrémité N-terminale de la CaM et un seul de ces deux motifs est nécessaire pour avoir une certaine sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$ . Comme les trois isomères de la famille SK ont des séquences d'acides aminés très conservées, on peut penser que la liaison de la CaM se fait de la même manière pour tous les isomères de cette famille.

Nous savons que les isomères des canaux SK natifs peuvent être classifiés selon leur sensibilité à l'apamine et il en va de même pour les isomères clonés. Ainsi, le canal SK2 possède une constante d'affinité ( $K_d$ ) de 60 pM à l'apamine, ce qui en fait un canal hautement sensible à cette toxine. Le canal SK3 possède un  $K_d \sim 1\text{nM}$  alors que le canal SK1 n'est pas inhibé par une concentration de 100 nM d'apamine [43]. Le patron d'expression de l'ARNm de SK1 [43] correspond aux types cellulaires dont

l'hyperpolarisation lente est insensible à l'apamine (par exemple : neurones pyramidaux d'hippocampe de rat, [44]). Les patrons d'expression de SK2 et SK3 [43] correspondent assez bien aux sites de liaison de l'apamine radioactif ( $I^{125}$ -apamine) dans le cerveau de rat [54]. Deux résidus dans la région du pore sont responsables de la sensibilité de SK2 à l'apamine : l'acide aspartique en position 341 (Asp 341) et l'asparagine en position 368 (Asn 368). On peut rendre le canal SK1 sensible à l'apamine par mutagenèse en substituant ces deux résidus aux positions correspondante dans la séquence de SK1 [32].

La famille des canaux SK est officiellement composée de trois isomères mais le canal qui nous intéresse tout particulièrement a déjà fait brièvement partie de la famille des SK sous le nom hSK4 [40], et il est maintenant mieux connu sous le nom de hIKCa.

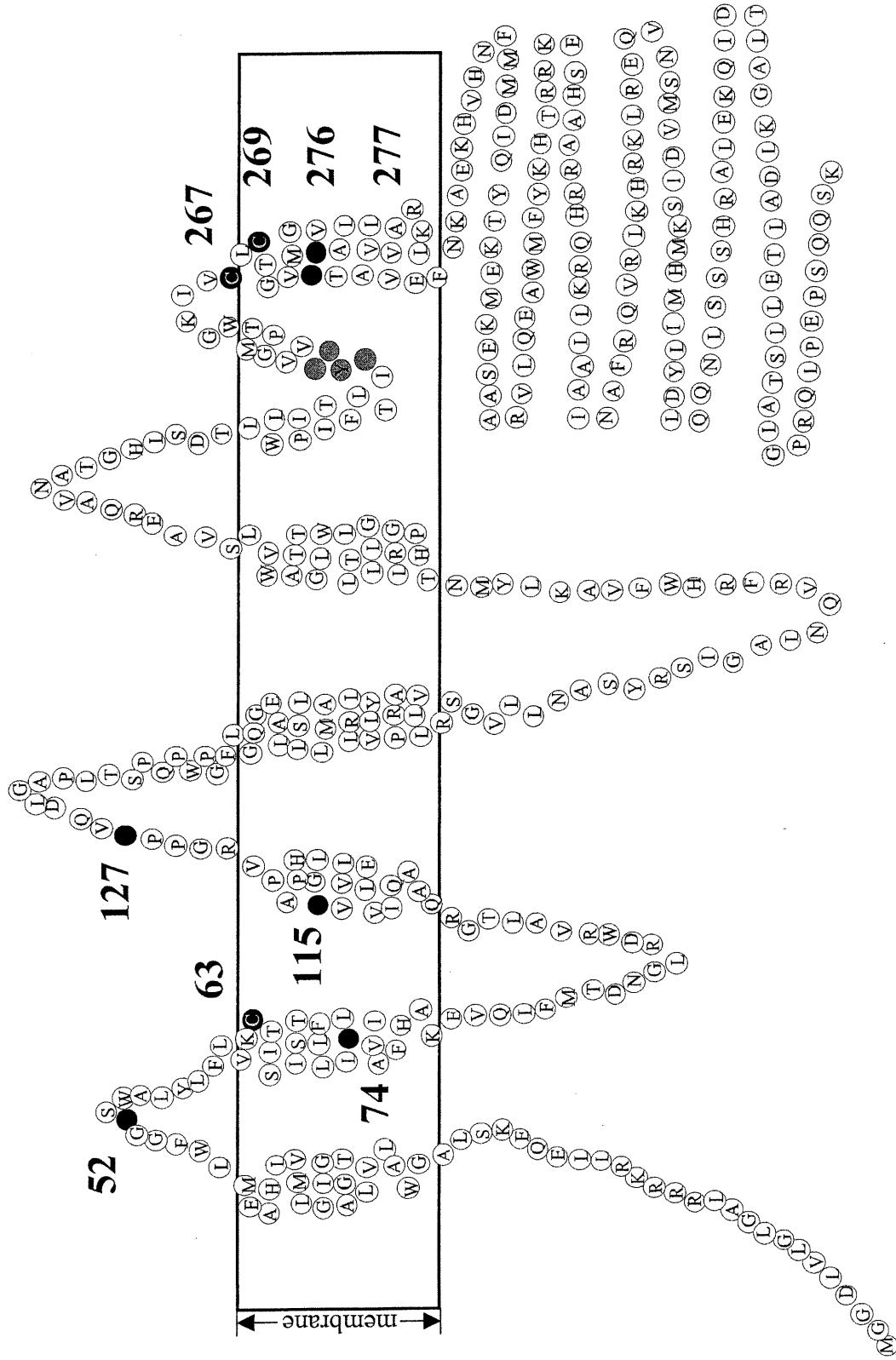
### 1.3 IKCa

Des canaux  $K^+$  de conductance intermédiaire activés par le  $Ca^{2+}$  (hIKCa) ont récemment été clonés chez l'humain par différents groupes de chercheurs. Ces clones proviennent du pancréas, hIK1 [33], du placenta, hSK4 [39,40] et de cellules endothéliales du cordon ombilical ECV304 (Dr Hélène Klein, laboratoire du Dr Rémy Sauvé, 1999) et possèdent tous la même séquence primaire d'acides aminés. Ces canaux semblent être absents des tissus excitables et muscles lisse vasculaires contractiles [56] mais sont présents dans les cellules sanguines, les lymphocytes T où ils jouent un rôle dans la prolifération cellulaire [38], différentes cellules endothéliales et épithéliales [39] et plusieurs cellules tumorales [62]. Le canal hIKCa est une protéine membranaire de 427 acides aminés possédant 6 segment transmembranaires et une région pore formée par une boucle membranaire entre les segments S5 et S6. Selon la topologie proposée (Figure 1, p. 12), le canal serait un tétramère, c'est-à-dire qu'il serait formé par



l'assemblage de quatre protéines identiques. Il possède une conductance pour les courants entrants d'environ 45 pS et pour les courants sortants d'environ 20 pS, le canal hIKCa affiche donc une rectification entrante très marquée qui ne semble pas être provoquée par le magnésium ou des polyamines [14,33]. A noter que c'est un canal indépendant du voltage, le potentiel membranaire n'affecte pas le comportement du canal.

# Topologie proposée du canal hIKCa



**FIGURE 1:** Le canal hIKCa possède six segments transmembranaires et une région pore contenant la séquence GYGD (en gris) du filtre de sélectivité. Les numéros correspondent aux positions des cystéines du canal (en noir).

Le canal hIKCa est fortement sélectif au potassium et sa perméabilité au  $\text{Na}^+$  est très faible, sinon quasi-nulle. Il est fortement bloqué par la charybdotoxine [10,33,39], un agent bloquant des canaux BK et *Shaker*, et aussi par le clotrimazole [33,39] un agent bloquant spécifique des canaux hIKCa [8,67]. Par contre, le canal n'est pas affecté par l'ibérottoxine [10,33,39], inhibiteur classique des BK [12], ni par l'apamine [33,39,40], un agent bloquant des canaux SK2 et SK3.

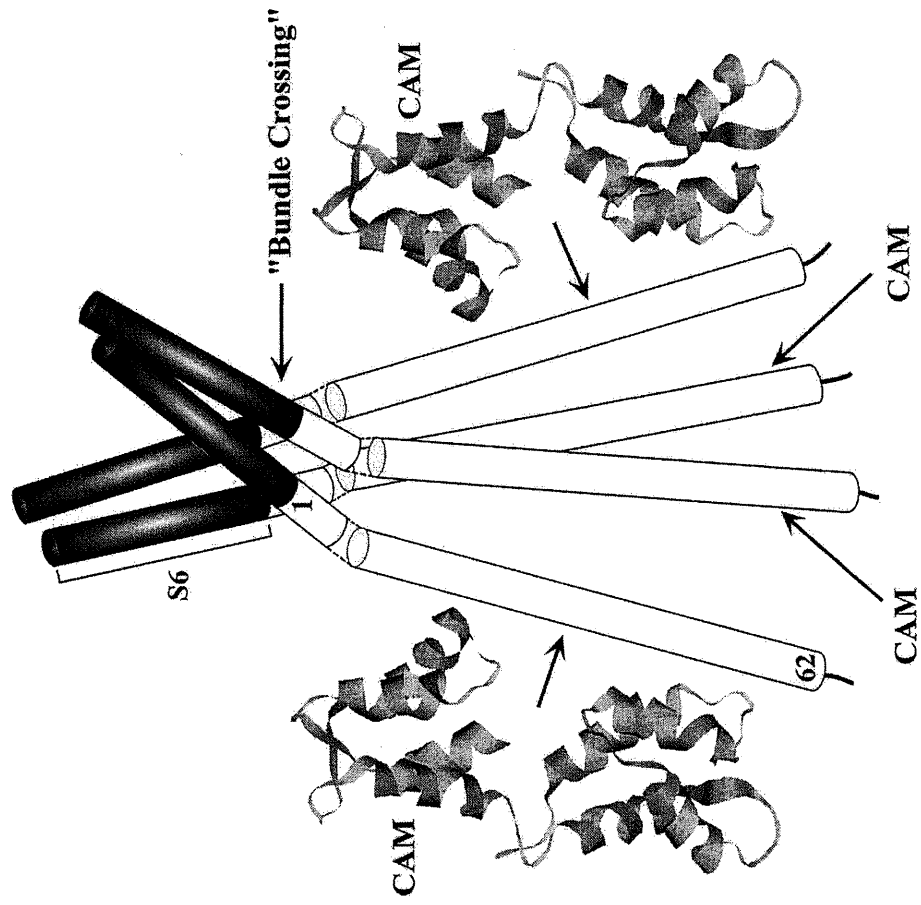
Le canal hIKCa est beaucoup plus près de la famille des SK (hSK1, rSK2, rSK3) que des BK. En effet, la séquence primaire du canal hIKCa présente une identité de 42-44% avec la famille des SK et caractérisée par un taux de similitude de 50 à 55%. La sensibilité au calcium ( $K_{0.5}$ ) du canal hIKCa est semblable à celle des SK malgré le fait que ces derniers soient moins actifs à très basses concentrations de calcium ( $0.1\mu\text{M}$ ) (pente plus abrupte chez le SK) (20,22,24-10). L'étude de la séquence primaire du canal hIKCa ne révèle aucune région intrinsèque au canal pouvant lui conférer une sensibilité au calcium. L'homologie entre les séquences primaires des canaux IK et SK est maximale dans le pore et la partie proximale de la queue C-terminale de ces deux canaux [24]. De ces indices, nous pouvons extrapoler que la sensibilité au calcium du hIKCa lui est conférée grâce à une liaison avec la CaM, comme c'est le cas pour les canaux SK.

De fait, Fanger *et al.* (1999) ont démontré que la CaM se lie au canal hIKCa de manière indépendante de la concentration de calcium [24]. Selon cette étude, les 98 premiers acides aminés de l'extrémité C-terminale du canal hIKCa (l'extrémité C-terminale est définie comme étant les acides aminés 286 à 427) contiennent des sous-domaines critiques pour la liaison de la CaM. Ainsi, les fragments 286-347 ou 286-383 de l'extrémité C-terminale suffisent pour avoir une liaison indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  avec la CaM alors que d'autres fragments ne semblent pas lier la CaM (fragments 286-335 et

378-427) ou ne liaient la CaM qu'en présence de 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (fragments 330-383, 322-362, 286-357 et 286-367). En utilisant des cellules COS 7 transfectées avec hIKCa, Fanger *et al.* ont montré que lorsque l'on précipite la protéine hIKCa de pleine longueur, on retrouve la CaM dans l'éluat ce qui implique que la CaM est spécifiquement coprecipitée avec le canal hIKCa. Ils suggèrent donc que la CaM soit étroitement liée au hIKCa en conditions basales dans les cellules. De leur étude, ils tirent aussi la conclusion que pour qu'il y ait ouverture du canal, les changements de conformations dus au calcium doivent avoir lieu sur les quatre CaM liées au canal (une CaM par monomère). Ainsi, chaque monomère du canal devrait être activé par le changement de conformation de sa CaM pour que le canal s'ouvre. Le signal venant de la CaM pourrait être transmis le long de la queue C-terminale du canal vers le *teepee inversé*, formé par le croisement des segments S6 des monomères (Figure 2, p.15).

La notion de *teepee inversé* a été introduite par R. MacKinnon et son groupe lorsqu'ils ont cristallisé le canal potassique KcsA provenant de la bactérie *Streptomyces lividans* [20]. Grâce à la cristallisation et à des études cartographiques de la face extracellulaire du pore à l'aide de la toxine de scorpion Agitoxin2 (technique appelée *toxin-mapping*), MacKinnon *et al.* (1998) ont démontré que la structure du pore de KcsA est très similaire à celle du canal *Shaker* malgré l'hétérogénéité des acides aminés composant ces deux canaux [49]. Le *toxin-mapping* a aussi été utilisé pour déduire les dimensions du vestibule externe des canaux  $\text{K}_v1.3$  [3,4,41] et *Shaker* [25,29,63,76] et les dimensions des vestibules de ces deux canaux concordent avec les dimensions déduites de la structure cristalline de KcsA.

# Modèle proposé des interactions calmoduline-hIKCa



**FIGURE 2:** Modèle proposé par Fanger et al. des interaction calmoduline-hIKCa. Nous pouvons voir le *bundle crossing* ou *teepee inversé*. Figure tirée de Fanger CM, et al., 1999. J. Biol. Chem. 274:5746-54.

Une étude de *toxin-mapping* a été effectuée par Rauer *et al.* [64] sur le hIKCa où ils ont utilisé la toxine ShK provenant de l'anémone de mer *Stichodactyla heliantus*. Ce peptide de 35 acides aminés possède une structure 3D connue et bloque fortement les canaux  $K_v1.3$  et hIKCa [64]. Le vestibule externe de hIKCa a été cartographié grâce à la toxine ShK, ce qui a permis d'établir que le diamètre du récepteur de la toxine était d'environ 31 Å et que le filtre de sélectivité du canal se situait à 12~13 Å de profondeur par rapport à la limite du récepteur. Ces données indiquent que la toxine ShK se lie à hIKCa dans une région correspondant au vestibule externe de  $K_v1.3$  et que ShK bloque le canal selon une géométrie comparable pour les deux canaux. L'architecture du vestibule externe de hIKCa apparaît comme étant similaire à celle du canal  $K_v1.3$  donc, à celle des canaux *Shaker* et KcsA. Ces similitudes topologiques supportent le développement d'un modèle par homologie, du pore du canal hIKCa en se basant sur la structure cristalline connue du canal KcsA.

Le vestibule interne du canal hIKCa partage aussi une certaine homologie avec le canal *Shaker*, car le canal hIKCa endogène des cellules HeLa est bloqué par une solution comprenant la *balle peptidique* responsable de l'inactivation du canal *Shaker* [66]. Ce blocage apparaît à des  $[Ca^{2+}]_i$  élevées (100  $\mu M$   $Ca^{2+}$ ) et à des potentiels membranaires dépolarisants. Outre les canaux *Shaker* [31], les canaux BK sont aussi bloqués par la *balle peptidique* et ce, en fonction du potentiel membranaire [78]. Ces résultats impliquent donc que le canal hIKCa possède un récepteur de la *balle peptidique* situé dans le vestibule interne du pore qui pourrait posséder des homologies avec les canaux *Shaker* et les canaux BK.

Le canal hIKCa est donc un proche parent de la famille des SK et partage l'architecture de son pore avec les canaux  $K_v1.3$ , *Shaker* et KcsA; il possède aussi des

caractéristiques qui lui sont uniques, la plus importante étant la présence dans le segment transmembranaire S6 de quatre cystéines (C267, C269, C276, C277) dans une région qui s'étend sur 10 acides aminés. Les quatre cystéines en S6 sont intéressantes à plusieurs points de vue : premièrement, leur proximité pourrait permettre la création de ponts disulfures entre eux ou entre les monomères du canal, elles pourraient donc jouer un rôle structurel important; deuxièmement, leur emplacement près de la région du pore pourrait les rendre accessibles à des mécanismes de régulation par oxydo-réduction et finalement, des exemples existent dans la littérature de cystéines situées dans le segment S6 qui sont critiques pour une ou l'autre des fonctions d'un canal.

Ainsi, Liu et Joho (1998) ont démontré que la cystéine C393 du canal  $K_v2.1$ , qui est conservée à travers la famille des canaux  $K^+$  voltage-dépendant, joue un rôle dans la sélectivité et la perméabilité au  $K^+$  de ce canal. Cette C393 est aussi un important stabilisateur de l'état ouvert du canal  $K_v2.1$  [46]. De plus, il a été démontré par Ogielska et Aldrich (1998) que la mutation ponctuelle A463C située dans le segment S6 du canal *Shaker* rend ce dernier perméable au  $Na^+$  [57]. Le résidu A463 du canal *Shaker* est voisin de la C462 qui correspond à la C393 du canal  $K_v2.1$  conservée à travers la famille des  $K_v$ . Le canal *Shaker* est le canal homologue à la famille des canaux  $K_v1$  des mammifères présent chez la drosophile. De plus, une mutation ponctuelle C462A effectuée dans le canal *Shaker* est suffisante pour provoquer une accélération de l'inactivation de type-C du canal [7]. Ces études démontrent que le segment transmembranaire S6 joue un rôle fonctionnel très important. Il faut noter que les canaux voltage-dépendant *Shaker* ( $K_v1.1$ ) et *Shab* ( $K_v2.1$ ), dont on parle, sont des tétramères et que chaque monomère est constitué de six segments transmembranaires, tout comme le canal hKCa. Cette parenté de structure rend plausible l'hypothèse qu'une ou plusieurs

des cystéines du segment transmembranaire S6 du canal hKCa jouent un rôle structural, fonctionnel ou de régulation du canal. De plus, deux des quatre cystéines du segment S6 du canal hKCa sont conservées à travers la famille des SK, soit les cystéines 267 et 277. Ces deux cystéines sont probablement appelées à jouer un rôle déterminant dans le bon fonctionnement du canal hKCa.

Des expériences d'application d'agents modificateurs de thiol (AMT) au canal hKCa natif des cellules BAE montrent que le canal est inhibé lors de l'application d'AMT, ceci prouve qu'une régulation par oxydo-réduction de l'activité du canal hKCa est possible [11]. En faisant des expériences de patch-clamp en inside-out, Cai et Sauvé (1997) ont démontré que l'application cytosolique de DTNB et de thimérosal, tous deux des agents oxydants hydrophiles, réduit l'activité du canal sans en diminuer la conductance unitaire. Cette inhibition est réversible par l'application, à la face cytoplasmique du canal, d'agents réducteurs comme le DTT et le GSH (5mM) ce qui permet de retrouver partiellement l'activité initiale du canal dans 53% et 50% des cas respectivement, un simple retour en solution contrôle n'est pas suffisant pour retrouver l'activité initiale. Il a aussi été démontré dans le cadre de cet article que l'inhibition due au 4-PDS (4,4'-dithiopyridine), un agent oxydant lipophile, était moins puissante que celle observée après application de DTNB. Après 6 minutes d'application de 4-PDS à la face cytoplasmique du canal, l'activité due au canal hKCa était toujours présente. En comparaison, pour une même concentration, soit 1 mM, le DTNB inhibe complètement la canal en moins de 1 minute. De plus, le remplacement de la solution cytoplasmique (avec 4-PDS) par une solution contrôle sans agent oxydant ou réducteur suffisait pour retrouver une activité partielle du canal. Cette réactivation pouvait être accentuée grâce à l'utilisation de GSH. Lors d'applications externes de DTNB ou de thimérosal, aucune



modification notable de l'activité du canal hKCa ne fut observée ce qui pousse les auteurs à avancer que la cible du DTNB doit être cytosolique ou accessible par une voie cytosolique. Les agents réducteurs ne semblent pas interagir avec le canal lorsqu'il n'a pas été traité avec des agents oxydants. Ainsi, l'application interne de DTT ou de GSH après l'excision du patch ne semble pas avoir d'effet sur le fonctionnement du canal sauf lorsque le canal montrait du *rundown* (perte d'activité dans le temps), il était possible de lui redonner son activité initiale par application interne de DTT ou de GSH. Ce *rundown* n'apparaissait que lorsque le patch était excisé et jamais en *cell-attach*, ce phénomène peut être expliqué par une différence entre les potentiels oxydatifs de la solution du bain et du milieu cytosolique de la cellule, le milieu intracellulaire de la cellule étant plus réducteur que la solution présente dans le bain. Ce phénomène tend à accréditer l'hypothèse que le canal hKCa serait soumis à une régulation par processus d'oxydo-réduction.

Les cystéines sont de bonnes cibles pour la régulation d'un canal par les ROS car le groupement sulfhydryle SH des cystéines est facilement oxydable. Comme la séquence primaire du canal hKCa comprend neuf cystéines, nous nous sommes intéressés aux rôles que jouent ces cystéines dans le mécanisme d'inhibition de ce canal par le DTNB.

Les expériences menées par Cai et Sauvé (1997) ont démontré que des agents oxydants appliqués à la face externe de la membrane ne produisent aucun effet sur l'activité du canal alors qu'une application interne de ces agents inhibe le canal [11]. Ces résultats tendent à écarter toute contribution des C52 et C127 à l'inhibition des canaux hKCa, car ces cystéines seraient localisées du côté extracellulaire entre les segments S1-S2 et S2-S3 respectivement, selon la topologie proposée (voir Figure 1, p.12). Ces expériences démontrent que les cystéines qui jouent un rôle dans l'inhibition du canal

doivent être cytosoliques. Nous ajoutons à cette hypothèse que les cystéines doivent être accessibles par une voie hydrophile car aucune cystéine n'est présente du côté cytoplasmique selon la topologie du canal proposée. Les quatre cystéines du segment transmembranaire S6 sont donc de bons candidats pour expliquer cette inhibition car elles sont probablement accessibles de l'intérieur du pore.

Une étude fut donc entreprise afin 1) d'évaluer la contribution des cystéines 267, 269, 276 et 277 aux propriétés de conduction et d'activation du canal hIKCa et 2) de définir leur implication dans le contrôle des canaux hIKCa par processus d'oxydo-réduction. L'approche expérimentale choisie consiste à créer des canaux hIKCa mutants en utilisant la technique de mutagenèse dirigée. Des mutations ponctuelles Cystéine → Sérine ou Cystéine → Glycine ont été faites aux positions 267, 269, 276 et 277 individuellement. Chacun de ces canaux mutants a été caractérisé et comparé au canal hIKCa de type sauvage, en ce qui a trait à la courbe courant-voltage, la sensibilité au calcium, la cinétique et la réponse aux agents modificateurs de thiol (AMT). Le DTNB fut utilisé comme AMT principal, ce composé est relativement hydrophile et pénètre peu dans la membrane. La stratégie utilisée est l'inverse de la méthode dite du *cystein scan* ou *cystein mapping*.

Lors du *cystein scan*, on substitue une cystéine à la place du résidu choisi et on utilise un AMT pour « voir » la cystéine nouvellement implantée [23,68]. On essaye ainsi de donner un nouveau comportement à la protéine tout en sachant que ce nouveau comportement est induit par la mutation. La fonction du canal changée, on peut ainsi savoir si cette mutation est accessible de manière interne ou externe, par une voie hydrophile ou non grâce aux AMTs hydrophiles et lipophiles. Notre manière de faire est l'inverse de cette technique. Nous savons que le hIKCa -WT (*wild-type* ou type sauvage)

est sensible au DTNB, mais nous ne connaissons pas son site d'interaction. Nous mutons une à une les cystéines de la région S6-pore, qui sont les principaux suspects, et espérons enlever la sensibilité au DTNB. Si un des mutants s'avère insensible au DTNB, nous savons dès lors que le DTNB agit à cet emplacement. Par contre, si les mutations gardent leur sensibilité au DTNB plusieurs hypothèses sont possibles: le site d'action est quelque part ailleurs sur la protéine, l'inhibition est due à un mécanisme plus complexe ou l'interaction a lieu sur une sous-unité inconnue du canal.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Biologie Moléculaire

Le canal hKCa exprimé de façon endogène dans les cellules HeLa et ECV340 (cellules de veines ombilicales humaines) fut cloné par le Dr Hélène Klein du laboratoire du Dr Rémy Sauvé (Groupe de Recherche en Transport Membranaire, Université de Montréal) en utilisant la technique de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Les deux oligonucléotides codant, qui ont été choisis à partir de la séquence du canal hKCa4 (GenBank AF0033021), (paires de bases 109-138 et 1392-1421) ont permis l'amplification d'un fragment contenant la séquence codante de 1281 paires de bases du canal hKCa humain. Cette séquence s'est avérée être identique aux séquences de hKCa4, hK1 (GenBank AF022150) et hSK4 (GenBank AF000972). La protéine résultante comprend 427 acides aminés.

La procédure dite du *site d'élimination unique* (U.S.E.) fut utilisée comme technique de mutagenèse dirigée pour produire les différents mutants de cette étude. Cette procédure fut menée à bien en utilisant un kit de mutagenèse dirigée (Pharmacia Biotech) en suivant les instructions du manufacturier. Le kit utilise un système à deux amorces d'ADN pour générer des mutations sur des sites spécifiques. La première amorce introduit la mutation désirée dans une séquence connue du plasmide d'ADN, alors que la deuxième amorce confère, à l'ADN muté, une résistance à l'ampicilline (un antibiotique couramment utilisé). Le tout est sous-cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pDR-1. Les plasmides sont transfectés dans les cellules *mutS* qui sont mises en culture dans un milieu contenant 100 µg/ml d'ampicilline. De cette culture on prépare

l'ADN qui est finalement extrait et sous-cloné dans le vecteur pMT21. L'ADNc est prêt à être injecté dans les noyaux d'ovocytes de *Xenopus Laevis*.

L'ADNc codant pour les canaux mutés a été séquencé par la méthode de *dideoxynucleotide chain termination* en utilisant le kit T7 Sequenase (USB, Cleveland, OH) avec des oligonucléotides synthétiques pour amorces.

## 2.2 Ovocytes

Des ovocytes matures (étape V ou VI) sont extraits de grenouilles *Xenopus Laevis* anesthésiées par l'acide éthyl ester 3-aminobenzoïque. L'enveloppe folliculaire est enlevée en incubant les ovocytes pendant 45 minutes dans une solution Barth sans  $\text{Ca}^{2+}$  contenant de la collagénase (1,6 mg/ml, Sigma, St-Louis, MO). La solution Barth est équilibrée à pH 7,6 et est composé de (en mM) : 88 NaCl, 3 KCl, 0,82  $\text{MgSO}_4$ , 0,41  $\text{CaCl}_2$ , 0,33  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  et 5 HEPES. Les ovocytes défolliculés sont conservés à 18°C dans une solution Barth enrichie avec du sérum de cheval 5%, 2,5 mM de pyruvate de sodium, 100 U/ml de pénicilline et 0,1 mg/ml de streptomycine. Les ovocytes ont été étudiés durant une période de 3 à 5 jours suivant la co-injection d'ADNc codant pour le canal hKCa et de 2.76 ng d'ADNc codant pour la *green fluorescent protein* (GFP). GFP est utilisé comme marqueur pour vérifier si l'injection nucléaire de l'ADN a fonctionné. Des quantités différentes d'ADNc-hKCa ont été injectées pour palier la différence d'expression des canaux de types sauvages et mutants. Ainsi, les ovocytes exprimant le canal hKCa de type sauvage (hKCa -WT ) ont reçu des injections nucléaires de 0,18 ng d'ADNc codant pour hKCa -WT alors que les ovocytes exprimants individuellement les différents mutants (C267S, C269S, C276S, C276G, C277S) ont reçu des injections de 1.84 ng d'ADNc correspondant au canal mutant étudié.

Avant de mener les expériences d'électrophysiologie (patch-clamp), les ovocytes sont baignés quelques minutes dans une solution hypertonique contenant (en mM) : 250 KCl, 1 MgSO<sub>4</sub>, 1 EGTA, 50 sucrose et 10 HEPES. La solution hypertonique est équilibrée à pH 7,4 avec du KOH. La membrane vitelline est enlevée avec des forceps. Les ovocytes sont transférés dans une petite chambre de perfusion pour les enregistrements en patch-clamp.

### 2.3 Electrophysiologie

Les enregistrements de canaux unitaires sont réalisés en utilisant la technique du patch-clamp dans la configuration *inside-out* avec un amplificateur EPC-7 (List Medical, Allemagne). Les pipettes de patch étaient fabriquées à partir de capillaires de pyrex (Corning 7040) étirés à l'aide d'une étireuse à pipette Model 750 (David Kopf, Tujunga, CA). La résistance des électrodes de patch se situait entre 4 et 10 MΩ. Les courants furent enregistrés par une enregistreuse numérique VR-10B (Instrutech, Port Washington, NY) et stockés sur bandes magnétiques (VHS). Le potentiel membranaire est exprimé comme  $-V_p$ , où  $V_p$  est le potentiel appliqué à la pipette. Pour les analyses subséquentes, les signaux sont numérisés à 3 ou 5 kHz et filtrés à 500 Hz et 1 kHz, respectivement, par deux filtres Bessel passe-bas de quatre pôles (VVS 300B, Frequency Devices, Haverhill, MA) reliés en série. La numérisation est effectuée par le programme Axotape (Axon Instruments, Union City, CA).

### 2.4 Solutions

Les différentes solutions utilisées pour mener à bien cette étude ont été préparées sur le même modèle. La solution de base est la solution « 200 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> » comprenant (en mM): 200 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,8 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Toutes les solutions sont équilibrées à pH=7,3

en utilisant une solution de KOH. Nous utilisons des sels de sulfate et non de chlore afin d'éviter la détection de canaux chlore exprimés de façon endogène par les ovocytes, ce qui brouillerait les données. La solution de la pipette de patch est la solution « 200  $K_2SO_4$  ». Les solutions cis contenant des concentrations finales de  $Ca^{2+}$  libre de l'ordre du micro et du sous-micromolaire ont été obtenus par l'addition de  $Ca^{2+}$  et de 1 mM EGTA. Toutes les concentrations de  $Ca^{2+}$  des solutions ont été mesurées par fluorescence en utilisant la technique du Fura-2. La solution « 50  $K_2SO_4$  », utilisée pour vérifier la sélectivité du canal au  $K^+$ , possède la même composition que la solution de base à l'exception d'une substitution isomolaire du  $K_2SO_4$  par du  $Na_2SO_4$ . On y retrouve donc (en mM) 50  $K_2SO_4$ , 150  $Na_2SO_4$ , 1,8  $MgCl_2$  et 10 HEPES. Les différents composés chimiques utilisés dans cette étude (MTSES, DTNB, DTT et clotrimazole) ont tous été achetés chez Sigma (St-Louis, MO). Nous avons utilisé le DTNB ( 5,5'-dithio bis(2-nitrobenzoic acid) ) comme principal agent modificateur de thiol (AMT) alors que le MTSES (méthanethiosulfonate éthylsulfonate) fut employé à titre d'AMT hydrophile [30]. Le DTT (dithiothreitol) fut utilisé comme agent réducteur. Le clotrimazole est un agent fongicide connu pour bloquer les canaux de la famille des hKCa [8].

## 2.5 Analyses

Les amplitudes des sauts de courant (ouverture-fermeture) ont été mesurées par ordinateur avec le programme Frame 8 en utilisant des histogrammes gaussiens à partir des enregistrements numérisés par le logiciel Axotape (Axon Instruments). Nous avons utilisé les mesures d'amplitude de courant pour produire des courbes courant-voltage. Toutes les courbes courant-voltage présentées dans cette étude ont été réalisées en utilisant des mesures d'amplitude effectuées sur des segments d'enregistrement de 20

secondes au minimum. Chaque point de la courbe représente la moyenne du courant sur le nombre d'expérience pour un potentiel membranaire donné. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard sur ce courant moyen. La conductance d'un canal est mesurée pour les courants entrant (potentiels positifs) et sortant (potentiels négatifs) de manière à évaluer le degré de rectification présent pour chaque canal. La conductance est estimée en calculant la pente de la courbe courant-voltage par régression linéaire et l'incertitude représente l'erreur standard sur la pente (conductance). La régression linéaire ne force jamais la pente à passer par l'origine. Précisons que la pente n'est pas calculée à partir des courants moyens mais à partir de l'agrégation des données brutes pour chaque canal. Donc, la pente n'est pas évaluée que sur une dizaine de points, mais sur tous les points recueillis expérimentalement donnant ainsi une pente typiquement évaluée sur une trentaine de points. Le degré de rectification est donné par le ratio des courants moyens évalués à  $\pm 100$  mV,  $\left( \frac{\bar{I}_{in}}{\bar{I}_{out}} \right)_{\pm 100 mV}$ , où  $\bar{I}_{in}$  représente le courant moyen pour un potentiel de +100 mV (courant entrant) et  $\bar{I}_{out}$ , le courant moyen à -100 mV (courant sortant).

Les analyses cinétiques, des taux de transitions, ont été effectuées en utilisant la suite de programmes QuB ([www.qub.buffalo.edu](http://www.qub.buffalo.edu), State University of New York in Buffalo). QuB est une suite de programmes spécialement conçue pour l'analyse de données de canaux unitaires. Deux modules de la suite ont été principalement utilisés : le module PRE (G. Zhu), destiné à une pré-analyse du signal (amplification et taux de numérisation), et le module MPL (*Maximum Point Likelihood*) (L. Milescu, F. Quin, F. Sachs et A. Auerbach), devant servir au calcul des taux de transitions. Ainsi MPL utilise



une méthode qui maximise la probabilité du segment idéalisé sur tous les points du segment étudié et non sur les intervalles seulement. L'avantage de cette technique est que peu d'événements sont manqués par le programme comparativement à une étude basée sur les intervalles. En contrepartie cette méthode demande un temps de calcul plus important. Pour un segment d'enregistrement donné, le module MPL permet de définir les paramètres de l'analyse comme le nombre d'état de conductance, les liens entre ces états, les amplitudes de ces états et les erreurs sur ces amplitudes. Le module MPL facilite la tâche de l'utilisateur en mettant à la disposition de celui-ci plusieurs techniques pour estimer les caractéristiques des états de conductance. L'utilisateur peut utiliser l'algorithme Baum-Welch [15] ou peut les déterminer manuellement. La possibilité de corriger manuellement les estimations de MPL est utile et aide à améliorer les tracés idéalisés générés par MPL. Avant de calculer la matrice de transition  $Q$ , MPL crée un tracé idéalisé du segment à partir des informations fournies par l'utilisateur (nombre d'états, amplitude, etc.). Ce tracé idéalisé n'est qu'un tracé du courant moyen le plus probable pour chaque point du segment. C'est à partir de ce tracé idéalisé que MPL calculera la matrice de transition  $Q$  qui donnera les taux de transition entre les différents états de conductance. Les taux de transition ont été mesurés à partir de segments d'enregistrement de patch-clamp (en canaux unitaires) dont la durée minimale était de 10 secondes.

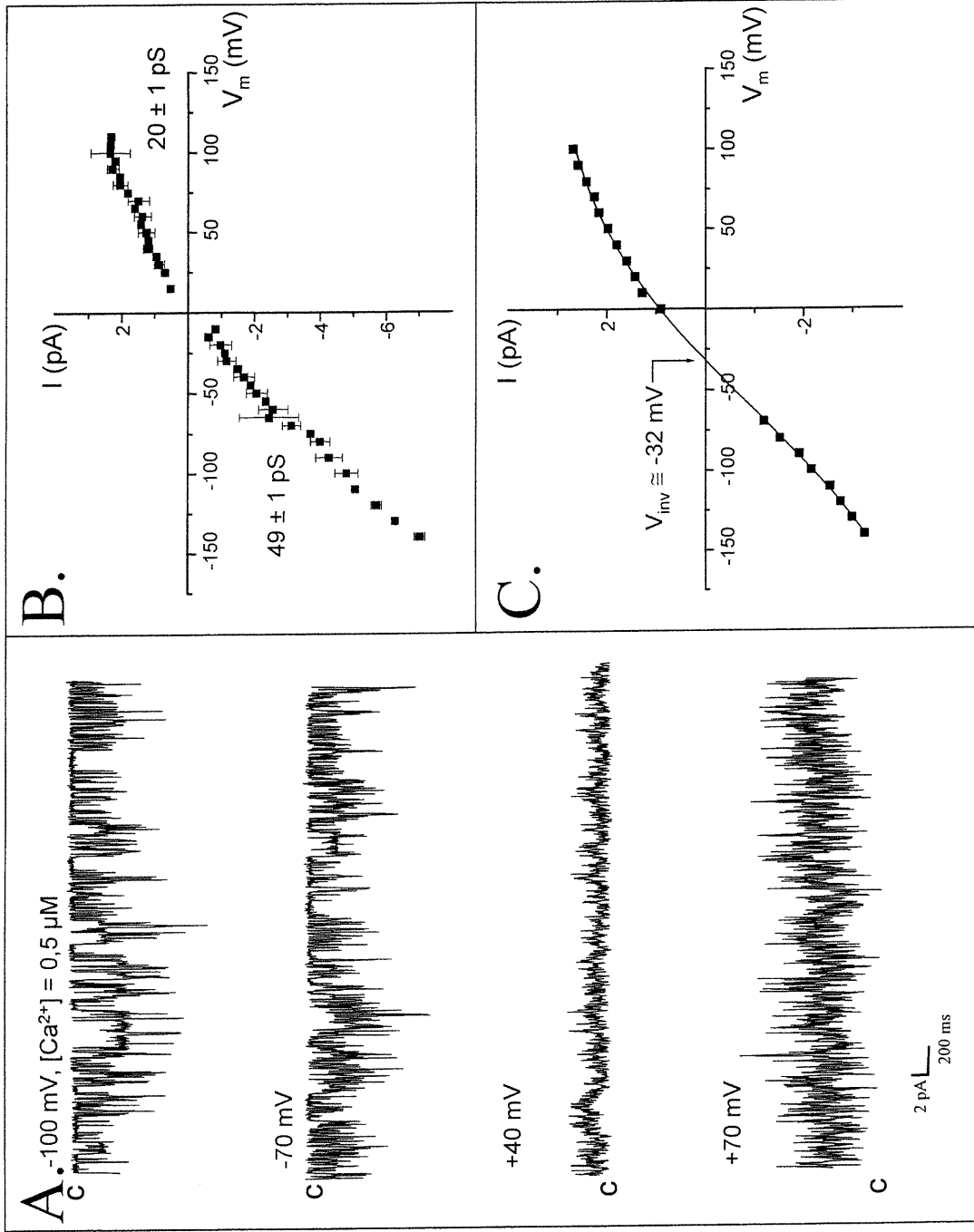
### 3. Résultats

#### 3.1 Caractérisation des propriétés de conduction

##### 3.1.1 hIKCa de type sauvage

Des expériences de patch-clamp en configuration inside-out ont permis la caractérisation du canal hIKCa-WT (type sauvage) exprimé dans des ovocytes de *Xenopus laevis*. Lors de ces expériences, la solution de la pipette de patch était la solution standard 200 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, alors que l'ovocyte baignait dans une solution 200 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à faible teneur en calcium libre (concentration micro ou sous-micromolaire). Des exemples de tracés typiques en canaux unitaires du canal hIKCa-WT sont donnés à la Figure 3-A (p.29). Ces tracés ont été filtrés à 500 Hz. Notez bien que la concentration de calcium libre dans la solution du bain pour ces tracés est de 0,5 μM. On remarque que le canal possède une faible probabilité d'ouverture et que cette probabilité d'ouverture est indépendante du potentiel membranaire. Le degré d'activité du canal dépend de la concentration de calcium baignant le côté cytosolique. La réduction de la concentration de calcium interne réduit l'activité du canal (Figure 15, en Annexe p.x) et l'absence de calcium libre interne abolit complètement l'activité du canal. L'activité du canal est retrouvée après réapplication de calcium.

# Caractérisation du canal hIKCa de type sauvage



**FIGURE 3:** A. Enregistrements du canal hIKCa de type sauvage, exprimé dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, obtenus par la technique du *patch-clamp* en configuration *inside-out*. Les solutions de la pipette et du bain contenaient 200 mM  $K_2SO_4$ , 1.8 mM  $MgCl_2$ , équilibrées à pH 7.3. La concentration de  $Ca^{2+}$  libre dans le bain est de 0,5  $\mu M$ . Les tracés ont été filtrés à 500 Hz. La lettre *c* indique le niveau de l'état fermé. B. La courbe courant-voltage du canal, mesurée en conditions symétriques, est caractérisée par une rectification entrante et des conductances des courants entrant et sortant de 49 pS et de 20 pS respectivement ( $n=3$ ). C. Courbe courant-voltage mesurée en milieux asymétriques: 200 mM  $K_2SO_4$  dans la solution interne et 50 mM  $K_2SO_4$ +150  $Na_2SO_4$  dans la solution externe ( $n=1$ ). Le potentiel d'inversion de la courbe est de -32 mV, donc le canal est sélectif au  $K^+$ .

Deux des caractéristiques utilisés pour identifier les canaux ioniques sont la conductance du canal et la forme de la courbe courant-voltage. La courbe courant-voltage du canal hIKCa-WT de la Figure 3-B indique que la conductance correspondant au courant entrant (potentiel membranaire négatif) est de  $49 \pm 1$  pS ( $n = 3$ ) alors que la conductance du courant sortant est de  $20 \pm 1$  pS ( $n = 3$ ). Une forte rectification entrante est présente, la proportion courant entrant : courant sortant à  $\pm 100$  mV,  $\left( \frac{\bar{I}_{in}}{\bar{I}_{out}} \right)_{\pm 100mV}$  est de  $2,1 \pm 0,2$  ( $n=3$ ).

Pour être bien certain que le canal que nous étudions est bien un canal potassique, nous avons effectué une expérience pour vérifier la sélectivité au potassium de notre hIKCa-WT. Nous avons utilisé la notion de potentiel d'inversion pour vérifier la sélectivité du canal. Le potentiel d'inversion (aussi appelé potentiel d'équilibre) est le potentiel membranaire pour lequel l'effet du potentiel électrique contrebalance l'effet du gradient de concentration. Dans ce cas, le flux net d'ions mesuré à travers la membrane devient nul. Ainsi le potentiel d'inversion ( $V_{inv}$ ) pour un canal potassique en présence d'un gradient de potassium de part et d'autre de la membrane ( $[K]_{ext}$  et  $[K]_{int}$ ) est décrit par l'équation de Nernst :

$$V_{inv} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[K^+]_{ext}}{[K^+]_{int}} \right)$$

où  $R$  = constante des gaz parfaits =  $8,314$  J/(K mol)

$T$  = température en Kelvin (K),  $295$  K ( $22^\circ\text{C}$ )

$F$  = constante de Faraday =  $96\,484,6$  C/mol

$z$  = valence de l'ion (pour  $K^+$ ,  $z = 1$ )

$[K^+]_{ext}$  = concentration de potassium dans le milieu externe

$[K^+]_{int}$  = concentration de potassium dans le milieu interne

Selon cette équation, une courbe courant-voltage enregistré en milieux symétriques (200 mM en cis et trans par exemple) aurait un potentiel d'inversion de 0 mV (Figure 3-B) alors qu'une courbe courant-voltage en milieux asymétriques verrait son potentiel d'inversion modifié. Nous avons donc effectué une courbe courant-voltage en milieux asymétriques (Figure 3-C, p.29, n = 1). La solution externe est une solution de 50 mM  $K_2SO_4$  et de 150 mM  $Na_2SO_4$  alors que la solution interne est la solution standard 200  $K_2SO_4$  possédant une concentration de calcium libre de 0,5  $\mu M$ . La courbe courant-voltage de la Figure 3-C nous donne un potentiel d'inversion de  $-32 \pm 3$  mV et des conductances de  $29 \pm 1$  pS et  $17 \pm 1$  pS pour les courants entrant et sortant respectivement. Les incertitudes sur les conductances représentent la précision sur l'évaluation de la pente de la courbe courant-voltage. Le potentiel d'inversion prédit par l'équation de Nernst est  $-35,2$  mV et se situe presque à l'intérieur de l'erreur expérimentale. Nous sommes en présence d'un canal potassique.

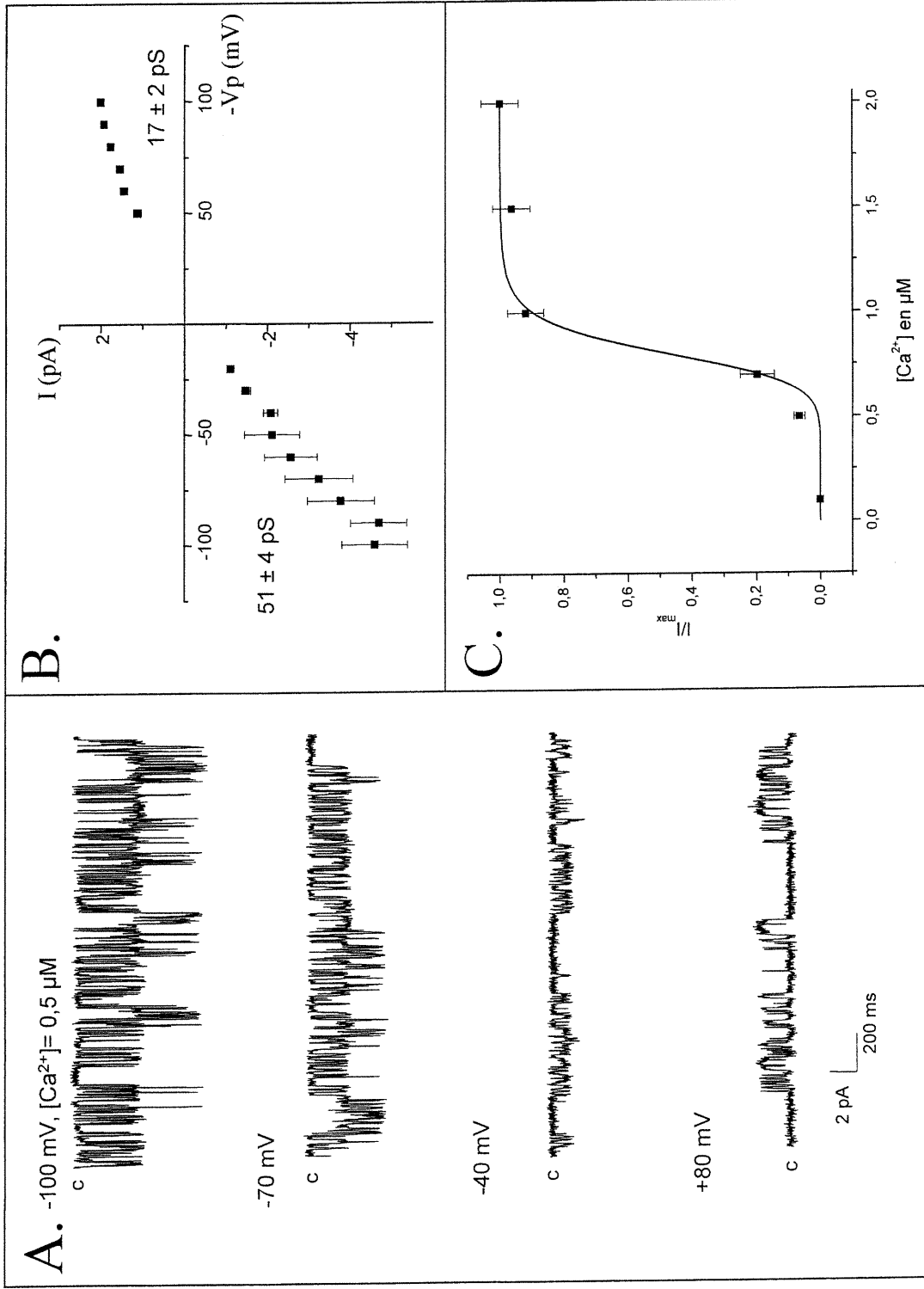
### 3.1.2 hIKCa-C267S

Le canal hIKCa-C267S est un canal ayant subi la substitution Cystéine  $\rightarrow$  Sérine en position 267. Cette mutation est située dans le segment S6 près de l'embouchure externe du canal. Des expériences de patch-clamp, en configuration inside-out, ont permis la caractérisation du canal hIKCa-C267S exprimé dans des ovocytes de *Xenopus laevis*. Ces expériences ont été effectuées en conditions symétriques « 200  $K_2SO_4$  » en présence de calcium libre à des concentrations micro ou sous-micromolaires. Des exemples de tracés typiques en canaux unitaires du canal hIKCa-C267S sont présentés à la Figure 4-A (p.33). Ces tracés ont été filtrés à 500 Hz et la concentration du calcium libre dans le bain est de 0,5  $\mu M$ . Ces tracés nous permettent de constater le maintien d'une rectification entrante. La courbe courant-voltage (milieux symétriques 200 mM

$K_2SO_4$ ) de la Figure 4-B nous indique des conductances de  $51 \pm 4$  pS ( $n = 3$ ) et de  $17 \pm 2$  pS ( $n = 3$ ) pour les courants entrant ( $V_m < 0$ ) et sortant ( $V_m > 0$ ) respectivement. Le rapport de la rectification entrante  $\left(\frac{\bar{I}_{in}}{\bar{I}_{out}}\right)_{\pm 100mV}$  est de  $2,3 \pm 0,5$  ( $n=3$ ).

La Figure 4-C représente la sensibilité au calcium du canal hKCa-C267S ( $n=1$ ). Le rapport  $I/I_{max}$  de l'axe des ordonnées représente le courant mesuré pour une concentration de calcium donnée ( $I$ ) normalisé par rapport au courant enregistré à la concentration calcique de  $2 \mu M$  ( $I_{max}$ ). Les différents courants ont été mesurés à un potentiel membranaire de  $-100$  mV. Nous avons utilisé une concentration de  $2 \mu M$  de calcium pour définir le courant maximal car le canal hKCa ne voit pas son activité croître en présence d'une concentration calcique plus élevée. Cette courbe nous montre que le canal est particulièrement sensible au calcium pour des concentration se situant entre  $0,5$  et  $1 \mu M$ . Le lissage de la courbe ( $R^2=0.99542$ ) par l'équation de Hill nous a permis d'estimer la valeur de  $EC50$  et de  $p$  (le nombre de molécule de calcium impliqué dans l'ouverture du canal),  $EC50 = 0.809 \pm 0.029 \mu M Ca^{2+}$  et  $p=10.14 \pm 2.11$ .

# Caractérisation du canal hKCa-C267S



**FIGURE 4 :** A. Enregistrements du canal hKCa-C267S, exprimé dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, obtenus par la technique du *patch-clamp* en configuration *inside-out*. Les solutions de la pipette et du bain contenaient 200 mM  $K_2SO_4$ , 1,8 mM  $MgCl_2$ , équilibrées à pH 7.3. La concentration de  $Ca^{2+}$  libre dans le bain est de 0,5  $\mu M$ . Les tracés ont été filtrés à 500 Hz. La lettre *c* indique le niveau de l'état fermé. B. La courbe courant-voltage du canal, mesurée en conditions symétriques, est caractérisée par une rectification entrante et des conductances des courants entrant et sortant de 51 pS et de 17 pS respectivement ( $n=3$ ). C. Courbe représentant la probabilité d'ouverture du canal en fonction de  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $V_m = -100 \text{ mV}$  ( $n=1$ ). La zone d'activation du canal par le calcium se situe entre 0,5 et 1  $\mu M$  de  $Ca^{2+}$ .  $EC_{50} = 0,809 \pm 0,029 \mu M$   $Ca^{2+}$ ,  $p = 10,14 \pm 2,11$ .

### 3.1.3 hIKCa-C269S

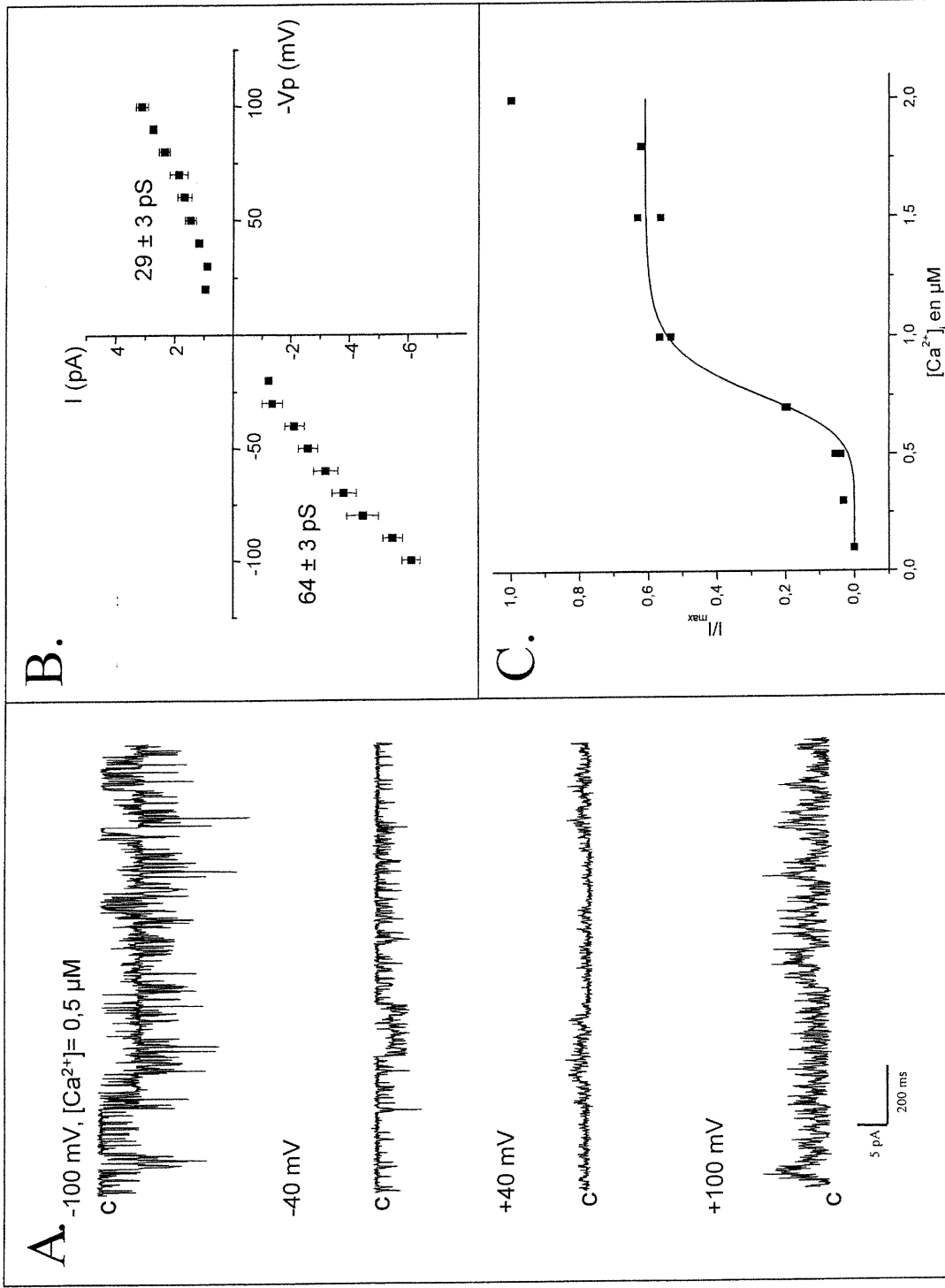
La mutation C269S n'empêche pas l'expression du canal hIKCa dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. La mutation C269S est située dans le segment transmembranaire S6, près du vestibule externe du canal selon la topologie proposée (Figure 1, p.12). Les expériences en patch-clamp furent menées selon les mêmes méthodes et conditions qui permirent la caractérisation des canaux hIKCa-WT et C267S. La Figure 5-A (p.35) nous présente des exemples de tracés typiques en canaux unitaires du canal hIKCa-C269S. Ces tracés ont été filtrés à 500 Hz et la concentration du calcium libre dans le bain est de 0,5  $\mu\text{M}$ . Nous constatons toujours la présence d'une rectification entrante. La Figure 5-B nous présente la courbe courant-voltage du canal hIKCa-C269S dont les conductances caractéristiques sont de  $64 \pm 3$  pS ( $n = 4$ ) et de  $29 \pm 3$  pS ( $n = 2$ ) pour les courants entrant ( $V_m < 0$ ) et sortant ( $V_m > 0$ ) respectivement. La rectification entrante est présente et très marquée comme l'indique le rapport de rectification

$\left( \frac{\bar{I}_{in}}{\bar{I}_{out}} \right)_{\pm 100mV}$  de  $2,0 \pm 0,5$  ( $n=2$ ). Comme c'est le cas pour le canal hIKCa-C267S, la zone

d'activation par le calcium du canal hIKCa-C269S se situe entre 0,5 et 1  $\mu\text{M}$  telle que présentée par la Figure 5-C ( $n=1$ ). Cette observation est corroborée par l'estimation de la valeur de EC50 donnée par le lissage de la courbe ( $R^2=0.99228$ ),  $EC50=0.771 \pm 0.017$   $\mu\text{M Ca}^{2+}$ . Le lissage nous donne aussi une estimation du facteur p,  $p=8.026 \pm 1.6$ . Les canaux mutés C267S et C269S possèdent une sensibilité au calcium équivalente.



# Caractérisation du canal hKCa-C269S



**FIGURE 5 :** A. Enregistrements du canal hKCa-C269S, exprimé dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, obtenus par la technique du *patch-clamp* en configuration *inside-out*. Les solutions de la pipette et du bain contenaient 200 mM  $K_2SO_4$ , 1,8 mM  $MgCl_2$ , équilibrées à pH 7,3. La concentration de  $Ca^{2+}$  libre dans le bain est de 0,5  $\mu M$ . Les tracés ont été filtrés à 500 Hz. La lettre *c* indique le niveau de l'état fermé. B. La courbe courant - voltage du canal, mesurée en conditions symétriques, est caractérisée par une rectification entrante et des conductances des courants entrant et sortant de 64 pS et de 29 pS respectivement ce qui représente des augmentations de conductances de 30% et 45% respectivement par rapport au canal hKCa de type sauvage. C. Probabilité d'ouverture du canal en fonction de la  $[Ca^{2+}]_i$ .  $V_m = -100$  mV. La zone d'activation du canal par le calcium se situe entre 0,5 et 1  $\mu M$  de  $Ca^{2+}$ .  $EC_{50} = 0,771 \pm 0,017 \mu M$   $Ca^{2+}$ ,  $p = 8,03 \pm 1,16$ .

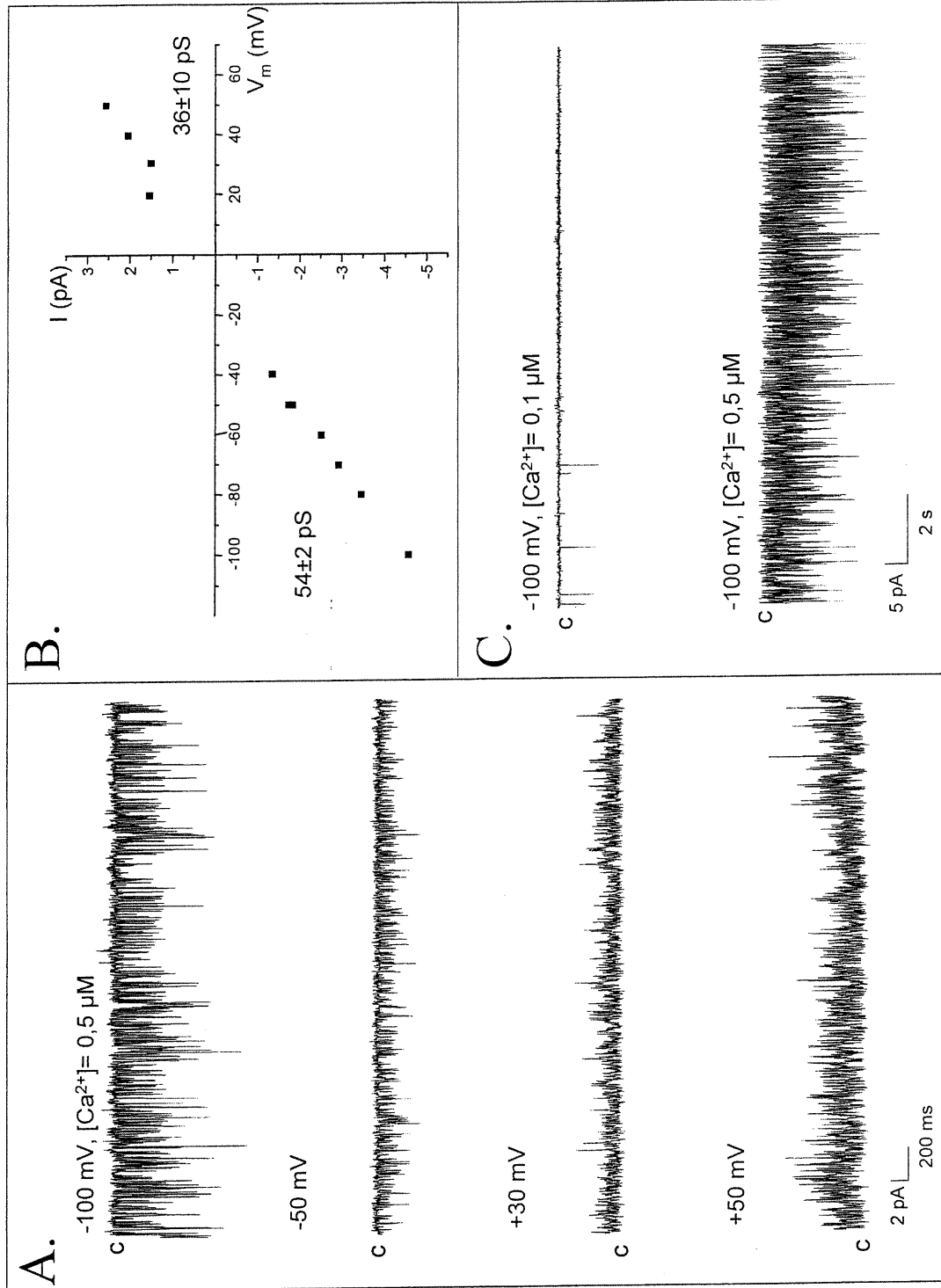
### 3.1.4 hIKCa-C276S

Malgré nos efforts, nous n'avons pas pu caractériser le canal hIKCa-C276S car il n'a jamais été observé électrophysiologiquement. L'injection nucléaire d'ADN codant pour ce canal, même en grande quantité, n'a jamais permis de mesurer l'activité du canal. Nous ne connaissons pas la raison de l'absence d'activité de ce canal muté, il est possible que la mutation C276S empêche l'expression à la membrane de ce canal ou que cette mutation ait rendu le canal hIKCa non-fonctionnel. Pour contourner le problème, nous avons effectué la mutation Cystéine → Glycine à la position 276 et nous avons obtenu un canal qui cette fois-ci était fonctionnel, hIKCa-C276G que nous avons caractérisé. Nous avons introduit une glycine à la position 276, car la G276 est conservée à travers les canaux de la famille des canaux SK qui partagent une grande homologie avec le canal hIKCa.

### 3.1.5 hIKCa-C276G

Des exemples de tracés typiques du canal hIKCa-C276G sont donnés à la Figure 6-A (p. 37). Ces tracés ont été filtrés à 1 kHz alors que la concentration du calcium libre dans le bain était de 0,5  $\mu\text{M}$ . Ce canal présente aussi une rectification entrante marquée et une faible probabilité d'ouverture. La courbe courant-voltage de la Figure 6-B présente une conductance de  $54 \pm 2$  pS ( $n = 1$ ) pour le courant entrant ( $V_m < 0$ ) et une conductance de  $36 \pm 10$  pS ( $n = 1$ ) pour le courant sortant ( $V_m > 0$ ). Le rapport de la rectification entrante  $\left( \frac{\text{Conduc tan } ce_m}{\text{Conduc tan } ce_{out}} \right)$  est de  $1,5 \pm 1$ . Les tracés de la Figure 6-C nous démontrent une grande sensibilité du canal hIKCa-C276G au calcium. L'activité du canal est presque nulle à 0,1  $\mu\text{M Ca}^{2+}$  alors que le canal devient très actif à 0,5  $\mu\text{M Ca}^{2+}$ .

# Caractérisation du canal hKCa-C276G

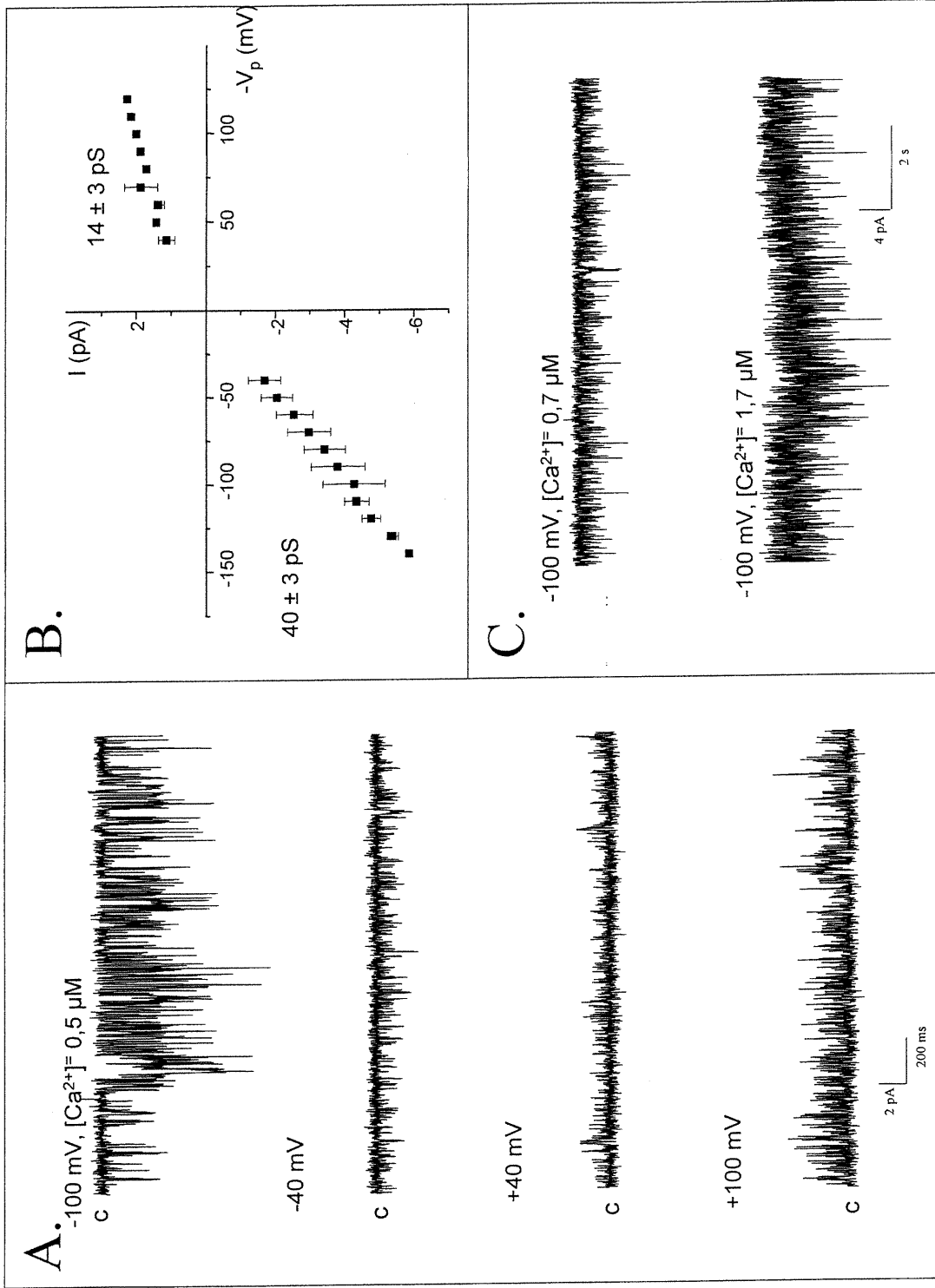


**FIGURE 6 :** A. Enregistrements du canal hKCa-C276G, exprimé dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, obtenus par la technique du *patch-clamp* en configuration *inside-out*. Les solutions de la pipette et du bain contenaient 200 mM  $K_2SO_4$ , 1,8 mM  $MgCl_2$ , équilibrées à pH 7.3. La concentration de  $Ca^{2+}$  libre dans le bain est de 0,5  $\mu M$ . Les tracés ont été filtrés à 1 kHz. La lettre *c* indique le niveau de l'état fermé. B. La courbe courant-voltage du canal, mesurée en conditions symétriques, est caractérisée par une rectification entrante et des conductances des courants entrant et sortant de 54 pS et de 36 pS respectivement. C. Enregistrements démontrant l'activation du canal par  $[Ca^{2+}]_i$ , le canal hKCa-C276G est inactif à  $[Ca^{2+}]_i = 0,1 \mu M$  mais présente une forte activité à 0,5  $\mu M$   $Ca^{2+}$ .

### 3.1.6 hIKCa-C277S

La Figure 7-A (p.39) montre les tracés typiques du canal hIKCa-C277S exprimé dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. Ces tracés ont été filtrés à 1 kHz et la concentration de calcium libre dans le bain était de 0,5  $\mu\text{M}$ . La cinétique du canal hIKCa semble affectée par la mutation C277S. Le comportement du canal semble être plus rapide (*flickery*) en comparaison du canal de type sauvage. La courbe courant-voltage de la Figure 7-B nous indique des conductances de  $40 \pm 3$  pS ( $n = 3$ ) et de  $14 \pm 3$  pS ( $n = 2$ ) pour les courants entrant ( $V_m < 0$ ) et sortant respectivement. Une rectification entrante importante est toujours présente. Le rapport de la rectification entrante  $\left( \frac{\bar{I}_{in}}{\bar{I}_{out}} \right)_{\pm 100mV}$  est de  $2,1 \pm 0,5$  ( $n=2$ ). Nous pouvons vérifier que le canal HIKCa-C277S est activé par le calcium à la Figure 7-C.

# Caractérisation du canal hIKCa-C277S



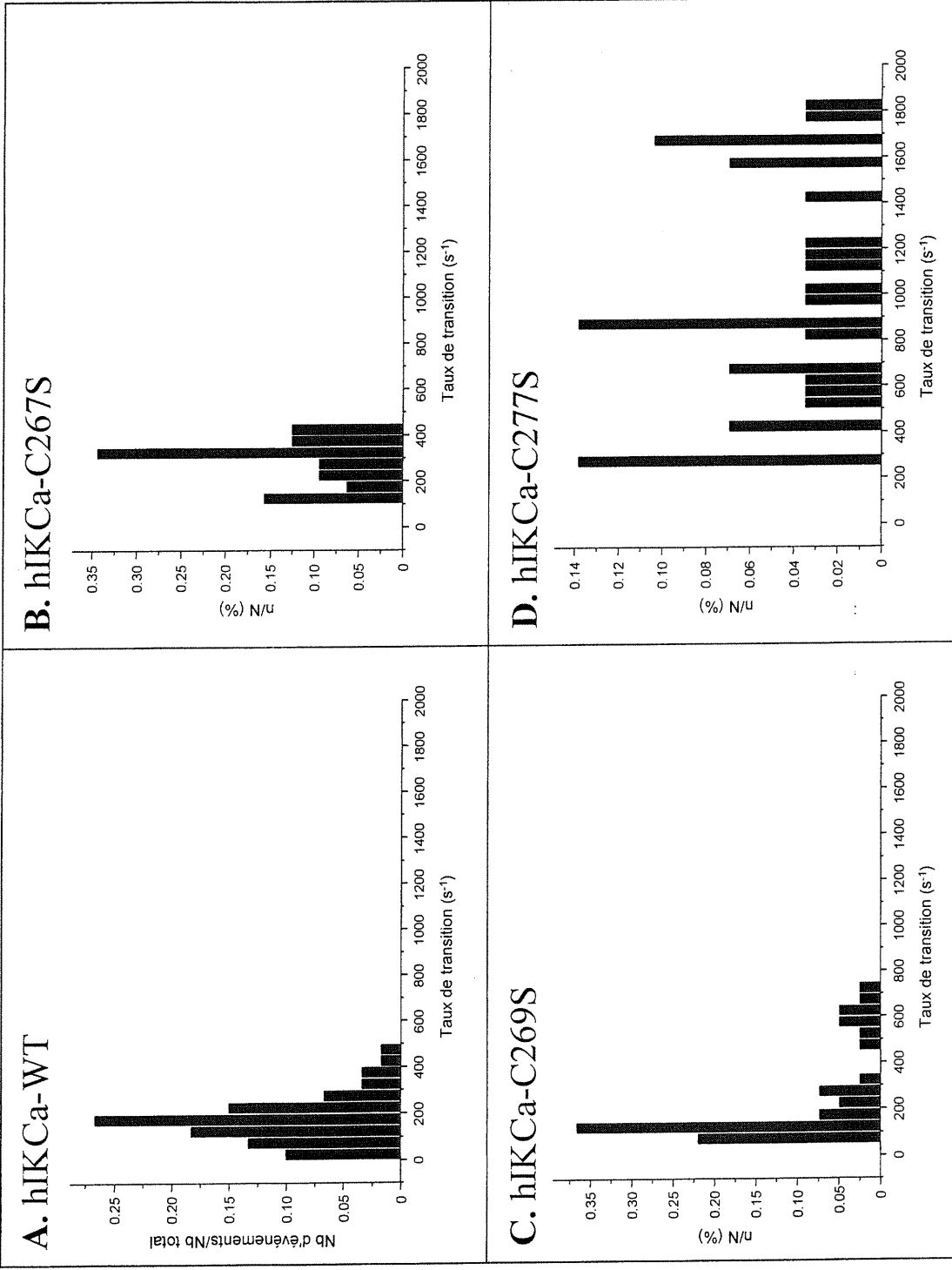
**FIGURE 7 :** A. Enregistrements du canal hIKCa-C277S, exprimé dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, obtenus par la technique du *patch-clamp* en configuration *inside-out*. Les solutions de la pipette et du bain contenaient 200 mM  $K_2SO_4$ , 1.8 mM  $MgCl_2$ , équilibrées à pH 7.3. La concentration de  $Ca^{2+}$  libre dans le bain est de 0,5  $\mu M$ . Les tracés ont été filtrés à 1 kHz. La lettre *c* indique le niveau de l'état fermé. B. La courbe courant-voltage du canal, mesurée en conditions symétriques, est caractérisée par une rectification entrante et des conductances des courants entrant et sortant de 40 pS et de 14 pS respectivement ce qui représente des diminutions de conductances de 18% et 30% respectivement par rapport au canal hIKCa de type sauvage. C. Enregistrements démontrant l'activation du canal par la  $[Ca^{2+}]_i$ , le canal hIKCa-C276G est très peu actif à  $[Ca^{2+}]_i = 0,7 \mu M$  mais présente une activité assez forte lorsque  $[Ca^{2+}]_i = 1,7 \mu M$ .

### 3.2 Cinétiques

Les observations qualitatives des tracés des canaux hIKCa-C276S et C277S, ont incité à effectuer une analyse cinétique des comportements des canaux de type sauvage et mutés. Le critère de comparaison utilisé est le taux de transition de l'état de conductance 2 à l'état de conductance 1. L'état de conductance 1 représente un courant nul, l'état où aucun canal n'est ouvert, alors que l'état 2 représente l'état où la conductance correspond à celle d'un seul canal ouvert. Ce taux 2 -> 1 représente le taux de fermeture du dernier canal ouvert. Le taux 2 -> 1 possède un avantage qui justifie son utilisation comme facteur de comparaison : le taux de fermeture ne dépend pas de la concentration de calcium, car le canal hIKCa est un canal activé par le calcium, seul le taux d'ouverture est sensible au calcium.

La Figure 8 (p.41) résume les résultats des analyses cinétiques de tous les canaux étudiés excepté le hIKCa-C276G (trop peu de données). Chaque histogramme a été produit en utilisant les résultats de plusieurs expériences (d'un même canal) après avoir vérifié que les taux de transition ne dépendaient ni du potentiel membranaire, ni de la concentration de calcium. Cela nous a permis d'avoir suffisamment de données pour créer des histogrammes significatifs. Le nombre  $n=x$  indique le nombre d'expérience ayant contribué des données pour un histogramme et non le nombre de fois que l'analyse a été faite. Les histogrammes mettent en relation le rapport  $\frac{\text{nombre\_d'événements}}{\text{nb\_d'événements\_total}}$  et les taux de transition. Les colonnes des histogrammes correspondent à des périodes de  $50 \text{ s}^{-1}$ . Lorsque cela était possible, les histogrammes ont été lissés en utilisant les distributions gaussiennes. L'utilisation de courbes gaussiennes se fait sous toute réserve car rien n'indique une distribution gaussienne des taux de transition.

# Analyse cinétique des canaux hIKCa WT et mutés.



**FIGURE 8 :** A. Histogramme des taux de fermeture du canal hIKCa-WT. L'analyse par distribution gaussienne de l'histogramme révèle un pic centré à  $156 \pm 8$  s<sup>-1</sup> dont la largeur à mi-hauteur est de  $145 \pm 20$  s<sup>-1</sup> (n=4). B. Le canal hIKCa-C267S possède un comportement cinétique assez semblable à celui du canal WT, à preuve l'histogramme rapporte un pic centré à  $340 \pm 280$  s<sup>-1</sup> (n=3). C. L'histogramme des taux de fermeture du canal hIKCa-C269S nous montre deux pics, le premier pic est centré à  $112 \pm 3$  s<sup>-1</sup> et sa largeur à mi-hauteur est de  $68 \pm 7$  s<sup>-1</sup>, alors que le deuxième pic est centré à  $599 \pm 44$  s<sup>-1</sup> et sa largeur à mi-hauteur est de  $172 \pm 88$  s<sup>-1</sup> (n=4). Le deuxième pic ne semble pas significatif. D. Les taux de fermeture du canal hIKCa-C277S sont majoritairement plus élevés que  $600$  s<sup>-1</sup> ce qui prouve que la cinétique de ce canal diffère de celle du canal WT (n=3). L'état ouvert du canal hIKCa-C277S est déstabilisé par la mutation.

### 3.2.1 hIKCa de type sauvage

Les taux de transition 2 → 1 caractéristiques du canal hIKCa-WT sont donnés à la Figure 8-A. L'analyse gaussienne rapporte un pic centré à  $156 \pm 8 \text{ s}^{-1}$  dont la largeur à mi-hauteur est de  $145 \pm 20 \text{ s}^{-1}$  (n=4).

### 3.2.2 hIKCa-C267S

L'analyse des taux de transition 2 → 1 pour le canal hIKCa-C267S est donné à la Figure 8-B. L'analyse gaussienne rapporte un pic centré à  $340 \pm 280 \text{ s}^{-1}$  (n=3) alors que la largeur à mi-hauteur n'a pu être estimée de manière significative. Vue la forme de l'histogramme, il est normal que l'analyse gaussienne ne soit pas très précise mais nous pouvons affirmer que le canal hIKCa-C267S possède une cinétique similaire au canal de type sauvage.

### 3.2.3 hIKCa-C269S

Les taux de transition 2 → 1 du canal hIKCa-C269S (Figure 8-C, p.41) sont presque identiques aux taux caractérisant le canal hIKCa-WT, malgré que l'analyse gaussienne rapporte deux pics. Le premier pic est centré à  $112 \pm 3 \text{ s}^{-1}$  et sa largeur à mi-hauteur est de  $68 \pm 7 \text{ s}^{-1}$ , alors que le deuxième pic est centré à  $599 \pm 44 \text{ s}^{-1}$  et sa largeur à mi-hauteur est de  $172 \pm 88 \text{ s}^{-1}$  (n=4).

### 3.2.4 hIKCa-C276G

Les tracés typiques du canal hIKCa-C276G (Figure 6-A, p.37) semble montrer un comportement plus rapide que le comportement des canaux hIKCa-WT, C267S et C269S, les fermetures du canal semblent être plus nombreuses chez le hIKCa-C276G que chez ces autres canaux. Certains enregistrements du canal hIKCa-C276G furent analysés et donnèrent des taux de transition 2 → 1 s'échelonnant de  $400 \text{ s}^{-1}$  à  $1099 \text{ s}^{-1}$ .



Les taux de transition mesurés ne purent être assemblés en histogrammes car leur nombre était petit et n'aurait pas produit un histogramme significatif ( $n=1$ ). Les résultats obtenus montrent un canal dont les taux de transition  $2 \rightarrow 1$  sont plus grands que chez les canaux hIKCa-WT, C267S et C269S.

### **3.2.5 hIKCa-C277S**

La figure 8-D nous représente l'analyse cinétique du canal hIKCa-C277S. Nous n'avons pas utilisé de courbe gaussienne pour extraire des données de cet histogramme car aucun patron ne semble ressortir de cet histogramme. Malgré cela, il est évident, d'un point de vue qualitatif, que la majorité des événements ont lieu à des taux de transition supérieurs à  $600 \text{ s}^{-1}$  ( $n=3$ ), ce qui est nettement supérieur aux taux de transition du canal hIKCa-WT.

### 3.3 Pharmacologie

#### 3.3.1 hIKCa de type sauvage.

Nous avons testé la sensibilité du canal hIKCa-WT à différents agents modificateurs de thiol (DTNB et MTSES) et sa sensibilité au clotrimazole, un bloqueur spécifique des canaux IKCa et du canal de Gardos [8,67]. Ces études pharmacologiques ont été produites avec la technique du patch-clamp en configuration inside-out. Le potentiel appliqué à la pipette de patch fut de 100 mV, ce qui correspond à un potentiel membranaire de -100 mV.

La pipette de patch contenait la solution standard 200 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alors que le bain était perfusé selon le protocole suivant :

- I. 3 minutes de perfusion d'une solution 200 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, [Ca<sup>2+</sup>] = 0,1 μM.
- II. 3 minutes de perfusion d'une solution 200 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, [Ca<sup>2+</sup>] = 2 μM
- III. 3 minutes de perfusion d'une solution 200 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, [Ca<sup>2+</sup>] = 2 μM + le composé à l'étude (DTNB, MTSES ou clotrimazole).
- IV. 3 minutes de perfusion d'une solution 200 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, [Ca<sup>2+</sup>] = 2 μM

Pour les agents modificateurs de thiol une cinquième étape est ajoutée :

- V. 3 minutes de perfusion d'une solution 200 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, [Ca<sup>2+</sup>] = 2 μM à laquelle fut ajoutée 5 mM de DTT.

Les premières étapes ont pour rôle de vérifier que nous sommes bien en présence d'un canal activé par le calcium. L'étape II nous garanti un effet visible du composé à l'étude car 2 μM de Ca<sup>2+</sup> provoque une activation de la majorité des canaux sous la pipette de patch, donc des courants très importants. L'étape IV va nous démontrer si

l'effet d'un composé est réversible en absence du composé à l'étude et l'étape V doit vérifier la réversibilité des processus d'oxydation sur le canal car le DTT est un agent réducteur connu.

La première étude porte sur l'action du DTNB. La Figure 10-A (p.47) montre que l'application cytosolique de 5 mM de DTNB inhibe fortement le canal hIKCa-WT (n=3). Le *washout* du DTNB par une perfusion de solution contrôle ne parvient pas à réactiver le canal (Figure 16, Annexe p.xi). Par contre, cette inhibition est réversible par application de 5 mM de DTT (observation non-illustrée). Exceptionnellement, le potentiel membranaire utilisé à la Figure 10-A est de -60 mV.

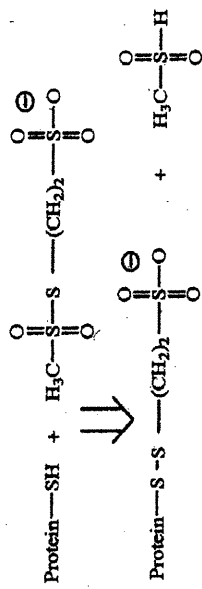
Le second agent modificateur de thiol utilisé est le MTSES (n=2). Nous pouvons conclure selon la Figure 10-B que l'application cytosolique de 5 mM de MTSES ne provoque pas d'effet visible sur l'activité du canal hIKCa-WT. Cette insensibilité du canal au MTSES pourrait être due à l'incapacité de ce composé à pénétrer le pore du canal et/ou d'avoir accès aux cystéines du segment S6.

L'application cytosolique de 10  $\mu$ M de clotrimazole bloque totalement le canal hIKCa-WT (Figure 10-C) alors que l'application subséquente de la solution contrôle 200  $\text{K}_2\text{SO}_4 - 2\mu\text{M Ca}^{2+}$  permet de récupérer l'activité (Figure 15, Annexe p.x) (n=2). Nous avons utilisé des ovocytes surexprimant le canal et produisant des courants macroscopiques de l'ordre du nanoampère afin de démontrer l'action inhibitrice du clotrimazole.

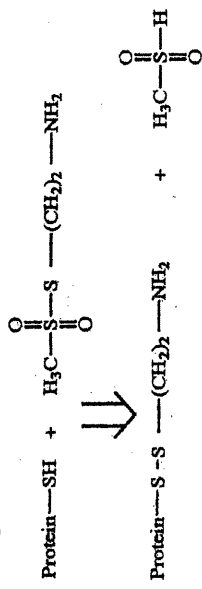
Nous avons voulu vérifier l'effet d'une application cytosolique d'un agent modificateur de thiol, le DTNB, sur les différents canaux hIKCa mutants. Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour le canal hIKCa de type sauvage.

Figure 9

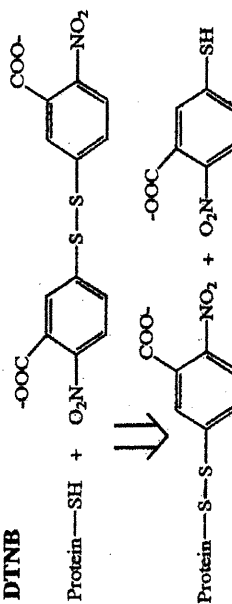
## MTSES



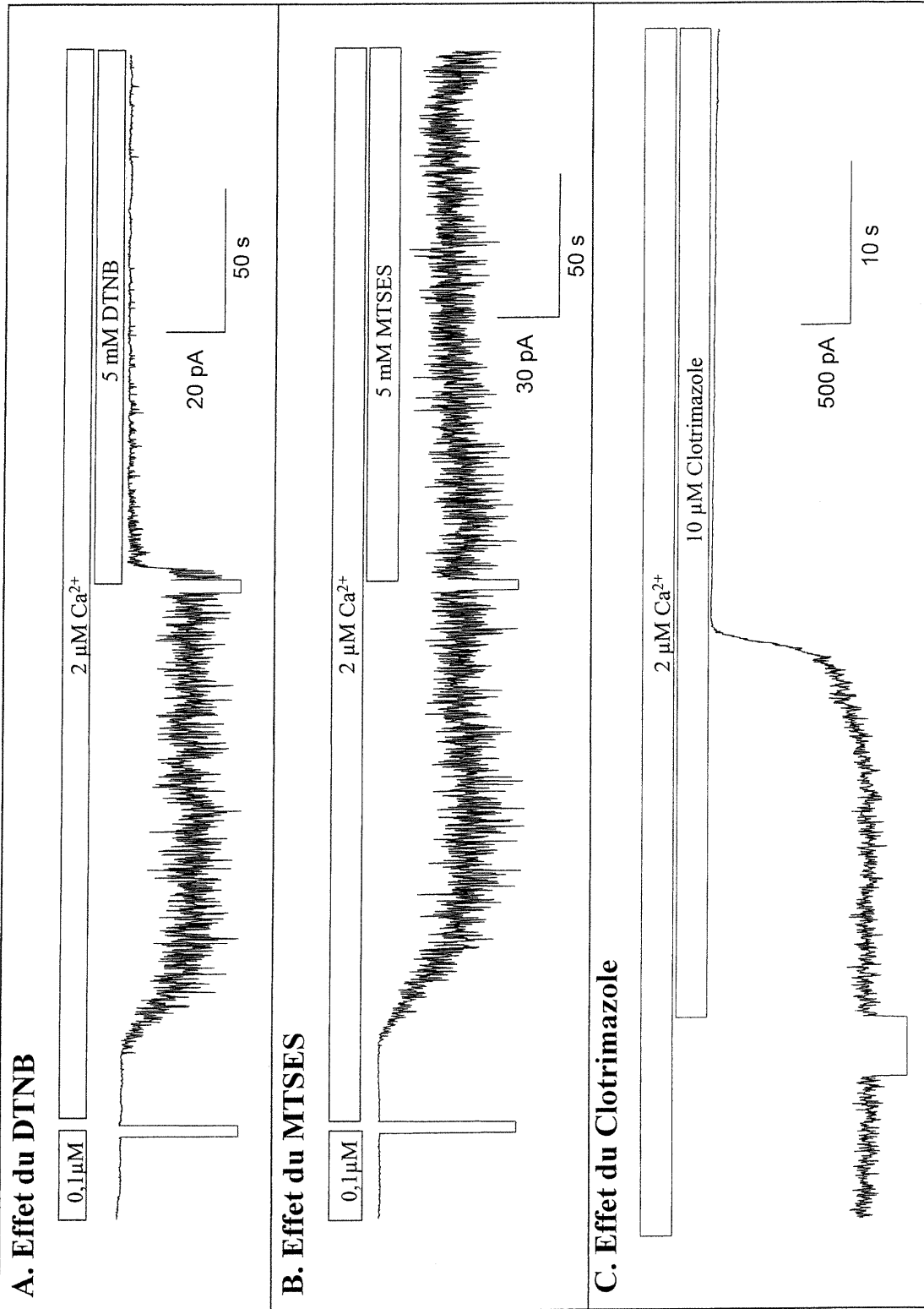
## MTSEA



## DTNB



# Pharmacologie du canal hIKCa de type sauvage



**FIGURE 10** : A. Inhibition du canal hIKCa de type sauvage par application cytosolique de  $5 \text{ mM}$  de DTNB, un agent modificateur de thiol (AMT) spécifique aux cystéines ( $n=3$ ). Enregistrement effectué par patch-clamp en configuration *inside-out* ( $V_m = -100 \text{ mV}$ ), la solution standard «  $200 \text{ K}_2\text{SO}_4$  » est utilisée dans la pipette et dans le bain. La concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans le bain est de  $2 \mu\text{M}$ . B. L'application cytosolique de  $5 \text{ mM}$  de MTSES (AMT hydrophile) ne provoque pas d'effets sur le courant du canal hIKCa ( $n=2$ ). C. Le canal hIKCa de type sauvage est bloqué par  $10 \mu\text{M}$  de clotrimazole ( $n=2$ ), un bloqueur connu de la famille des canaux IKCa.

### 3.3.2 hIKCa-C267S

L'application cytosolique de 5 mM de DTNB inhibe presque totalement les courants dus au canal hIKCa-C267S (Figure 11-C, p 49) (n=2). La perfusion suivante en solution contrôle permet de restaurer en grande partie l'activité initiale du canal. L'application subséquente de 5 mM de DTT n'a pas provoqué de hausse d'activité (résultat non-illustré) même après trois minute de perfusion. L'inhibition du canal ne semble donc pas être le fruit d'une réaction oxydative (covalente) par le DTNB.

### 3.3.3 hIKCa-C269S

La Figure 11-B (p.49) nous montre que le canal hIKCa-C269S est totalement inhibé par l'application cytosolique de 5 mM de DTNB (n=2). Pour que le canal recouvre son activité initiale, il faut lui appliquer 5 mM de DTT, la perfusion du bain avec une solution « 200 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> » ne permet pas la réactivation du canal (résultat non illustré).

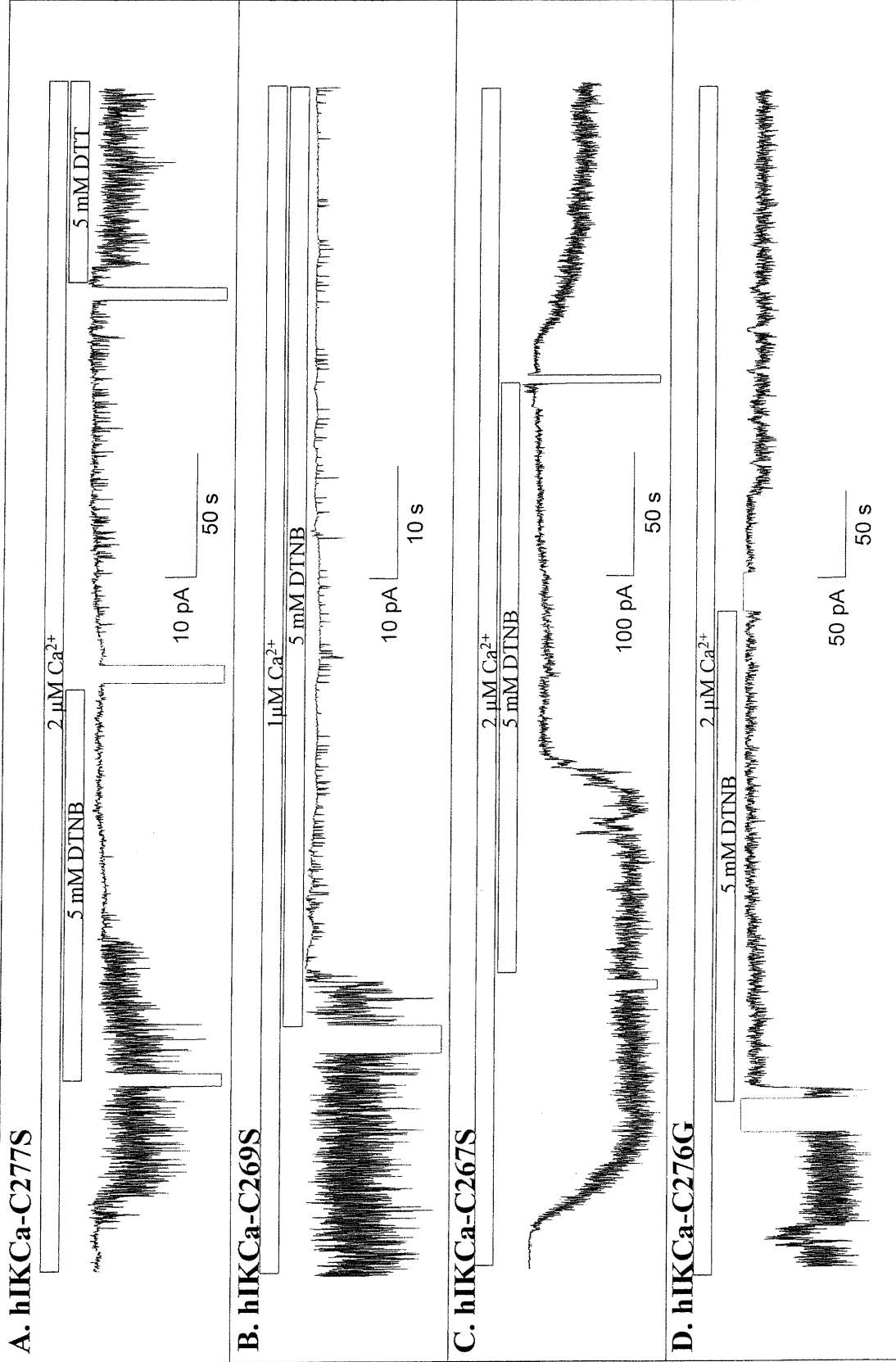
### 3.3.4 hIKCa-C276G

Comme pour le canal hIKCa-C267S, l'application cytosolique de 5 mM de DTNB inhibe presque complètement les courants dus au canal hIKCa-C276G (Figure 11-D, p.49) (n=2). On recouvre aussi une faible activité lors de la perfusion en solution contrôle suivant l'application de DTNB.

### 3.3.5 hIKCa-C277S

L'application cytosolique de 5 mM de DTNB inhibe complètement les courants dus au canal hIKCa-C277S (Figure 11-A, p.49) (n=2). Le retour en solution contrôle avec 2  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> ne semble pas réactiver de façon significative le canal. Par contre, l'application subséquente de 5 mM de DTT permet de retrouver la majeure partie du courant.

# Pharmacologie des canaux hIKCa mutés



**FIGURE 11 :** A. L'inhibition du canal hIKCa-C277S induite par l'application interne de 5 mM de DTNB est réversible par 5 mM de DTT (n=1). Cette observation suggère que la C277 n'est pas impliquée dans la régulation du canal par oxydo-réduction ou implique la contribution de plusieurs cystéines. B. L'application interne de 5 mM de DTNB a inhibé complètement le canal hIKCa-C269S (n=2). Cette inhibition est réversible par l'application de 5 mM de DTT (résultat non-illustré) C. Le canal hIKCa-C267S est presque totalement inhibé par l'application de 5 mM de DTNB (n=2), mais la perfusion subséquente en solution contrôlée montre une réactivation importante du canal, ainsi la C267 pourrait jouer un rôle dans l'inhibition par le DTNB du canal hIKCa. D. L'application de 5 mM de DTNB inhibe le canal hIKCa-C276S (n=2) et une légère réactivation semble présente lors du retour en solution contrôlée (2  $\mu\text{M Ca}^{2+}$ ).

Pour conclure cette section, voici un tableau reprenant les résultats rapportés plus haut.

**Table 1. Synthèse des résultats**

	Conductance $I_{\text{entrant}}$ (pS)	Conductance $I_{\text{sortant}}$ (pS)	Inhibition par le DTNB	Taux de transition ( $s^{-1}$ )
<b>hIKCa-WT</b>	49±1 n=3	20±1 n=3	Oui n=3	156 ± 8 n=4
<b>hIKCa-C267S</b>	51±4 n=3	17±2 n=3	Oui, réactivation en solution contrôle n=2	337 ± 277 n=3
<b>hIKCa-C269S</b>	64±3 n=4	29±3 n=2	Oui n=2	112 ± 3 599 ± 44 n=4
<b>hIKCa-C276G</b>	54±2 n=1	36±10 n=1	Oui n=2	>600 n=1
<b>hIKCa-C277S</b>	40±3 n=3	14±3 n=2	Oui n=2	400 à 1099 n=3



## 4. Discussion

### 4.1 hIKCa de type sauvage

#### 4.1.1 Caractérisation

Nous avons commencé notre étude par la caractérisation du canal hIKCa de type sauvage car il nous fallait, avant tout, être certain d'étudier le bon canal. Le potentiel d'inversion, mesuré pour un gradient interne/externe de 200/50 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a été estimé à  $-32 \pm 3$  mV, une valeur près de la prédiction de l'équation de Nernst soit  $-35,2$  mV. Ce potentiel d'inversion expérimental démontre donc que le canal hIKCa est sélectivement perméable aux ions K<sup>+</sup>. Notre clone du canal hIKCa est vraiment un canal potassique.

La conductance d'un canal et la forme de sa courbe courant-voltage sont des caractéristiques robustes nous permettant de bien identifier les canaux et de les comparer. Les conductances de  $49 \pm 1$  pS et  $20 \pm 1$  pS (n=3) associées respectivement aux courants entrant et sortant du canal hIKCa-WT mesurés dans cette étude (Figure 3-B, p.29) placent notre canal dans la catégorie des canaux de conductances intermédiaires (20 à 70 pS). De plus, ces conductances sont en accord avec les résultats déjà publiés dans la littérature [33,39]. Il faut mentionner que nous utilisons une concentration de 400 mM K<sup>+</sup> (200 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) alors que dans la littérature l'usage est d'avoir une concentration plus physiologique de l'ordre de 150 à 200 mM K<sup>+</sup>. L'utilisation d'une concentration de potassium plus élevée facilite l'étude du canal en accroissant sa conductance et en rendant possible la prise de données à de faibles potentiels.

La courbe courant-voltage du canal hIKCa-WT présente une forte rectification du courant entrant (2,1 fois plus de courant entrant que de courant sortant). Plusieurs canaux potassiques montrent aussi des caractéristiques courant-voltage avec rectification

entrante (i.e. IRK1, ROMK1). Dans le cas du canal IRK1, la rectification entrante est due aux ions magnésium intracellulaires, aux spermines et autres polyamines [22,50,79,82]. Les ions magnésium semblent agir par un mécanisme de bloc rapide. A des concentrations intermédiaires de  $Mg^{2+}$  intracellulaire, la conductance unitaire du canal IRK1 est réduite, alors qu'à des concentrations plus fortes (1 mM de  $Mg^{2+}$ ), le  $Mg^{2+}$  bloque totalement le canal. En absence de magnésium, la rectification entrante du canal IRK1 est perdue. Le mécanisme de rectification du canal hIKCa-WT semble être différent de celui du canal IRK1 car une courbe courant-voltage du hIKCa-WT produite avec des solutions sans magnésium (1mM EDTA, 0 mM  $Mg^{2+}$ ) présente encore une forte rectification entrante (résultat non-illustré). Ce résultat fut aussi corroboré par Christophersen [14] qui a suggéré que la rectification du canal hIKCa dans les globules rouges était due à blocage dépendant du voltage, de la bouche externe du pore par les ions potassium. D'après ce résultat on tire la conclusion que le magnésium n'est pas responsable de la rectification entrante du canal hIKCa-WT et que le mécanisme de rectification de ce canal est différent de celui du canal IRK1. L'origine de la rectification entrante du canal hIKCa-WT est toujours inconnue.

La dernière étape qui nous a permis de vérifier que le canal étudié était bien le canal hIKCa fut de vérifier sa sensibilité au clotrimazole. Le clotrimazole est un bloqueur du canal de Gardos [8] et un bloqueur spécifique des canaux de la famille des hIKCa. La Figure 10-C (p.47) nous montre bien que le clotrimazole (10  $\mu$ M) bloque puissamment la canal à l'étude. Nous pouvons donc affirmer, grâce à ces résultats, que le canal à l'étude est bien le canal hIKCa tel que décrit dans la littérature sous les noms de hIK1, hSK4 ou hIKCa1 [33,39,40].

#### 4.1.2 hIKCa de type sauvage et les agents modificateurs de thiol

Cai et Sauvé (1997) ont démontré que les courants dus au hIKCa dans les cellules BAE (Bovine Aortic Endothelial cells) pouvaient être inhibés par l'application interne de DTNB [11]. La Figure 10-A de notre étude démontre bien que l'application interne de DTNB (5 mM) provoque l'inhibition du canal hIKCa exprimé par des ovocytes de *Xenopus laevis*. Ce dernier résultat établit que cette inhibition par la modification des groupements SH n'est pas tributaire du système d'expression et vérifie les résultats de Cai et Sauvé.

La nécessité d'une application interne de DTNB ou de thimérosal pour qu'il y ait inhibition, a fait conclure à Cai et Sauvé que les groupements SH jouant un rôle dans l'inhibition des canaux hIKCa étaient localisés du côté intracellulaire de la membrane, éliminant ainsi tout apport des cystéines 52 et 127 qui seraient localisées du côté extracellulaire du canal entre les segments transmembranaires S1-S2 et S2-S3 respectivement (voir Figure 1. p.12). L'application interne de 5 mM de MTSES, qui est un agent modificateur de thiol imperméable aux membranes [30], nous montre une absence de réaction de la part du canal hIKCa (Figure 10-B, p.47). Aucun changement dans l'activité du canal, que ce soit inhibition ou activation, ne fut observé. Cette absence de réaction nous indique qu'aucune cystéine cytosolique n'est présente dans le canal hIKCa ce qui serait en accord avec la topologie proposée à la Figure 1 (p.12). Comme le DTNB peut être un peu perméable à la membrane [11], que le thimérosal est hautement hydrophile [21,34] et que le 4-PDS (agent modificateur de thiol plus liposoluble que le DTNB) n'est pas en mesure d'inhiber totalement le canal hIKCa [11], il est peu probable que les cystéines 63, 74 et 115 du canal hIKCa jouent un rôle dans l'inhibition du canal par des agents modificateurs de thiol, ces cystéines étant très

possiblement localisées dans les segments transmembranaires S1 et S2 du canal. Seules les quatre cystéines du segment S6 semblent toujours être des cibles potentielles pour l'action du DTNB, car elles ne sont pas cytosoliques et elles pourraient être accessibles par l'intérieur du pore du canal. Cette hypothèse implique que le MTSES ne pourrait pas avoir accès aux cystéines du segment S6 par le pore alors que celles-ci seraient accessibles au DTNB. Des représentations tridimensionnelles du pore du canal hIKCa, du DTNB et du MTSES ont été créés afin de remettre en contexte nos résultats et de guider nos hypothèses.

#### 4.1.3 Modèle 3D

L'utilisation de modèles en trois dimensions du canal hIKCa peut nous aider à visualiser l'emplacement des différentes cystéines à l'étude. Le modèle utilisé fut créé par Manuel Simoes (étudiant au doctorat) dans le laboratoire du Dr Rémy Sauvé en calquant la séquence primaire de la région du pore et des segments S5 et S6 du canal hIKCa sur la structure connue par cristallographie du canal KcsA. Ce modèle semble valide dans la mesure où l'étude cartographique du vestibule externe du pore du canal hIKCa menée par Rauer *et al.* à l'aide de toxines [64] démontre que ce canal possède un vestibule dont les dimensions correspondent aux dimensions du vestibule des canaux *Shaker* et KcsA et que la toxine ShK bloque ces canaux selon une géométrie comparable. Ce modèle n'est pas nécessairement exact car ils n'a pas encore fait l'objet de simulations numériques pour vérifier sa véracité et que, malgré des similitudes au niveau du pore, les canaux KcsA (deux segments transmembranaires) et hIKCa (six segments transmembranaires) sont très différents. Néanmoins, ce modèle est un outil précieux servant à mieux orienter nos hypothèses de travail. Selon le modèle présenté à la Figure 12 (p.56), les cystéines 269, 276 et 277 feraient face à la membrane plasmique

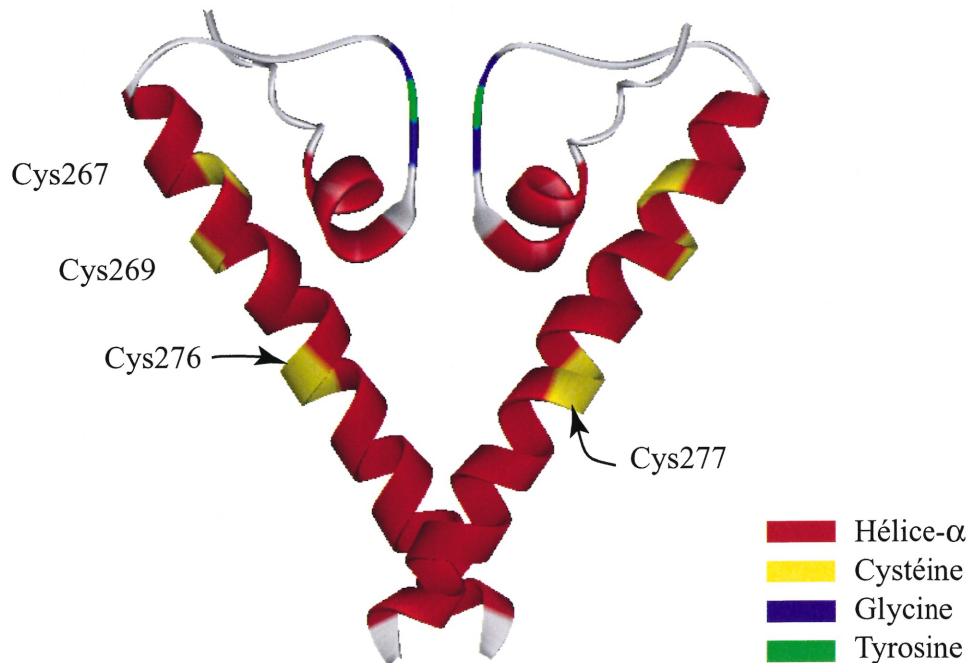
alors que la C267 serait orientée vers la lumière du pore. Afin de faciliter la visualisation des figures, les modèles ne comprennent que les régions qui nous intéressent soit le segment S6, la boucle P et le filtre de sélectivité pour chacune des sous-unités du canal. Pour la même raison, les chaînes latérales des acides aminés de la protéine ont aussi été omises.

# Représentation 3D du pore du canal hKCa

A.



B.



**FIGURE 12** : Seul le segment transmembranaire S6, la boucle P et le filtre de sélectivité (GYG) sont représentés pour chaque sous-unité du canal hKCa. Afin de faciliter la visualisation, les chaînes latérales des acides aminés ne sont pas montrées. **A.** Vue plongeante du pore du canal hKCa. **B.** Vue transversale du pore du canal hKCa. Selon ce modèle, seule la C267 est orientée vers la lumière du pore.

## 4.2 hIKCa mutants

A la lumière de ces résultats, les quatre cystéines du segment transmembranaire S6 du canal hIKCa semblent être les seules à encore pouvoir expliquer l'inhibition du canal par les agents modificateurs de thiol et plus particulièrement par le DTNB. Cinq canaux hIKCa mutants ont été synthétisés afin d'étudier l'apport individuel de chaque cystéine du segment transmembranaire S6 au(x) mécanisme(s) d'inhibition du canal par le DTNB et l'apport de chacune de ces quatre cystéines aux différentes caractéristiques du canal hIKCa. Pour chaque canal mutant nous avons ponctuellement substitué la cystéine originelle par une sérine en utilisant la technique de la mutagenèse dirigée. Les canaux obtenus sont hIKCa-C267S, hIKCa-C269S, hIKCa-C276S et hIKCa-C277S. Le canal hIKCa-C276G fut aussi synthétisé, la cystéine étant substituée cette fois-ci par une glycine. Nous avons choisi de substituer la cystéine par une sérine, car la sérine est un acide aminé très similaire à la cystéine. Structurellement, la sérine est une cystéine dont on aurait échangé l'atome de soufre de la chaîne latérale par un atome d'oxygène. De plus, la sérine possède aussi la capacité de former des ponts  $H^+$  tout comme la cystéine. Par le choix de la sérine comme acide aminé de substitution, nous pensons avoir minimisé les effets *secondaires* dus à la mutation. Par contre la sérine est un acide aminé plus polaire que la cystéine ce qui pourrait introduire certains effets inattendus et fausser notre *a priori* que la sérine se comporte comme une cystéine exceptée pour les phénomènes qui se rapportent au groupement sulfhydryle, comme la sensibilité aux ROS et le création de ponts disulfures. La méthode de mutation ponctuelle possède aussi une limite importante, à savoir que cette méthode est particulièrement efficace si seulement un acide aminé est responsable du phénomène à l'étude. En premier lieu, on étudia les

caractéristiques électrophysiologiques des canaux hIKCa mutants, puis la cinétique de fermeture de ces canaux et du canal de type sauvage et enfin la pharmacologie des canaux mutants.

## **Caractérisation des propriétés de conduction**

### **4.2.1 hIKCa-C267S**

En se basant sur les tracés d'enregistrement en patch clamp de la Figure 4-A (p.33), on s'aperçoit que le canal mutant hIKCa-C267S est un canal qui présente une probabilité d'ouverture assez faible et des transitions assez rapides de l'état ouvert à l'état fermé, rares sont les ouvertures prolongées du canal. Le canal ne semble pas dépendre du potentiel membranaire. La comparaison entre les tracés d'enregistrement du canal hIKCa-C267S et les tracés d'enregistrement du canal hIKCa-WT (Figure 3-A, p.29) ne montre pas de différences significatives de comportement entre les deux canaux. La conductance entrante du canal hIKCa-C267S telle que calculée selon la courbe courant-voltage de la Figure 4-B (p.33) est de  $51 \pm 4$  pS et n'est pas statistiquement différente de la conductance entrante du canal hIKCa-WT qui est de  $49 \pm 1$  pS. Le canal hIKCa-C267S présente lui aussi une rectification entrante marquée, la conductance sortante de ce canal étant de  $17 \pm 2$  pS. La Figure 4-C nous donne la relation entre l'activité du canal et la concentration intracellulaire de calcium et cette courbe nous indique que la zone d'activation du canal hIKCa-C267S par le calcium se situe entre 0,5 et 1  $\mu\text{M}$  de calcium et la courbe est caractérisée par  $\text{EC}_{50}=0.809\pm 0.029$   $\mu\text{M Ca}^{2+}$ . L'estimation du nombre de molécules de calcium impliqué dans l'activation du canal fut estimée comme étant  $p=10.14\pm 2.11$ . Les résultats rapportés ici démontrent que le canal hIKCa-C267S possède un comportement électrophysiologique semblable à



celui du canal hIKCa-WT. La cystéine en position 267 du canal hIKCa ne semble pas jouer de rôle détectable dans la conductance, la rectification de la courbe courant-voltage et la sensibilité au calcium du canal.

#### 4.2.2 hIKCa-C269S

La substitution de la cystéine en position 269 par une sérine dans le canal hIKCa donne un canal fonctionnel dont nous avons étudié les caractéristiques. Les tracés d'enregistrements de la Figure 5-A (p.35) nous montrent que l'activité du canal hIKCa-C269S ne dépend pas du potentiel membranaire et donc, le comportement du canal hIKCa-C269S ressemble à celui du canal hIKCa-WT (Figure 3-A, p.29), sauts de courant assez rapides, absences de longues ouvertures du canal. Tout comme les canaux hIKCa-C267S et WT, la zone d'activation du canal hIKCa-C269S par le calcium est comprise entre 0,5  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$  de calcium intracellulaire ce qui est corroboré par  $\text{EC}_{50}=8.026\pm 1.16 \mu\text{M Ca}^{2+}$  (Figure 5-C, p.35). L'estimation du nombre de molécules de calcium impliqué dans l'activation du canal fut estimée comme étant  $p=8.03\pm 1.16$ . Cette estimation, tout comme celle pour le C267S, nous semble excessive étant donné qu'il a été démontré qu'il ne suffisait que d'une molécule de calcium liée à chaque CaM pour conférer une certaine sensibilité au canaux SKCa [81]. Comme le SKCa lie quatre CaM et que le hIKCa est proche parent des SK, nous nous attendons à ce que la valeur de  $p$  oscille autour de quatre molécules de calcium. La cystéine en position 269 du canal hIKCa n'influence ni la cinétique du canal, ni sa sensibilité au calcium intracellulaire. Par contre, le canal hIKCa-C269S exhibe une conductance entrante de  $64 \pm 3 \text{ pS}$  et une conductance sortante de  $29 \pm 3 \text{ pS}$  (Figure 5-B, p.35) comparativement au canal hIKCa-WT qui est caractérisé par des conductances de  $49 \pm 1 \text{ pS}$  et de  $20 \pm 1 \text{ pS}$ . La mutation C269S est donc responsable d'une augmentation de 30% de la conductance entrante et

de 45 % de la conductance sortante du canal hIKCa-C269S par rapport aux conductances du canal WT. Il est difficile d'expliquer cette hausse de la conductance due à la mutation C269S. La cystéine C269 est située dans la partie supérieure du segment S6, assez près de l'interface membrane/milieu externe. Elle semble être positionnée vis-à-vis de la boucle P du canal mais localisée derrière l'hélice  $\alpha$  (Figure 12, p.56). Il est possible que la mutation conduise à certains changements dans la géométrie du vestibule externe du canal et/ou du filtre de sélectivité ce qui aurait comme effet probable de modifier la sélectivité du canal. La sélectivité du canal n'ayant pas été étudiée dans le cadre de ce mémoire, il serait pertinent que cela soit fait ultérieurement.

#### **4.2.3 hIKCa-C276G**

Le canal hIKCa-C276G a subi la mutation de la cystéine en position 276 en glycine, car la glycine est conservée à cette position à travers la famille des SKCa qui est une famille homologue à la famille des hIKCa. La Figure 6-A (p.37) nous montre que l'activité du canal ne dépend pas du potentiel membranaire, car l'activité du canal semble être la même à tous les potentiels présentés. Le canal hIKCa-C276G est un canal activé par le calcium intracellulaire comme le démontre la Figure 6-C. Ce canal possède une grande sensibilité au calcium car il est fortement activé par 0,5  $\mu$ M de calcium. Le canal hIKCa-C276G possède une conductance entrante de  $54 \pm 2$  pS et une conductance sortante de  $36 \pm 10$  pS (Figure 6-B). La valeur de la conductance entrante du canal hIKCa-C276G est en accord avec la valeur de la conductance du canal hIKCa-WT, qui est de  $49 \pm 1$  pS, mais la valeur de la conductance sortante du canal C276G est 80% plus élevée que celle du canal de type sauvage. La courbe courant-voltage du canal hIKCa-C276G n'ayant été mesurée qu'une seule fois, ces résultats doivent être commentés. La

conductance entrante de ce canal, telle que mesurée, est fort probablement exacte car les tracés enregistrés à des potentiels membranaires négatifs sont reproductibles, alors que les amplitudes mesurées aux potentiels membranaires positifs sont plus approximatifs car les tracés sont beaucoup moins constants et plus difficilement analysable. Donc, la conductance entrante est probablement exacte alors que la valeur de la conductance sortante demeure incertaine.

#### **4.2.4 hIKCa-C276S**

La mutation cystéine -> sérine a aussi été effectuée à la position 276 du canal hIKCa, mais le canal mutant n'a pu être caractérisé car il n'a jamais été observé en patch-clamp. Cette absence d'activité pourrait être expliquée par le fait que la mutation ait rendu le canal non-fonctionnel, ou que la mutation ait empêché l'expression du canal à la membrane. Ces deux hypothèses sont valides et aucune expérience n'a été menée pour découvrir la raison de l'absence d'observation du canal hIKCa-C276S.

#### **4.2.5 hIKCa-C277S**

La mutation C277S affecte aussi la conductance unitaire du canal. Ainsi la conductance entrante de  $40 \pm 3$  pS du canal hIKCa-C277S est 18% moins élevée que la conductance entrante du canal hIKCa-WT alors que la conductance sortante du canal hIKCa-C277S de  $14 \pm 3$  pS est 30% moins élevée que celle du canal WT. Cette diminution de conductance, par rapport au canal hIKCa-WT, pourrait être expliquée par un resserrement de la lumière ou de l'ouverture du pore du côté intracellulaire causé par la mutation C277S. Selon le modèle KcsA, la C277 serait orientée vers la membrane (Figure 12, p.56), l'introduction d'un acide aminé plus polaire, la sérine, pourrait provoquer une répulsion entre la membrane non-polaire et la sérine, et donc le segment S6, ce qui pourrait avoir comme effet de resserrer l'ouverture intracellulaire du pore du

canal hIKCa-C277S. Ce resserrement pourrait aussi être l'œuvre de la perte d'un pont disulfure entre la cystéine 277 et une autre cystéine. Comme le canal hIKCa-C277S est le seul à démontrer une conductance plus faible que le canal de type sauvage, il me semble que la C277 ne crée pas de ponts disulfures avec ses voisines du segment S6. Si tel était le cas, d'autres canaux mutants montreraient une conductance faible. Les seules cystéines qui pourraient créer des ponts disulfures avec la C277 seraient les C74 ou C115 qui sont localisées dans les segments S2 et S3 respectivement. Cette hypothèse serait facilement vérifiable par l'étude de canaux hIKCa-C74S et C115S. Une explication à la baisse de conductance du mutant C277S serait que l'ajout d'un acide aminé relativement polaire, ici la sérine, en position 277 soit responsable de la diminution de la conductance par le biais d'une déstabilisation de l'ion potassium dans la cavité aqueuse du pore. Cette dernière hypothèse n'est posée qu'à titre spéculatif car il serait possible d'argumenter qu'une trop grande stabilisation de l'ion dans la cavité occasionnerait aussi une diminution de la conductance. De plus, l'étendue des connaissances des facteurs régissant l'occupation de la cavité par un ion n'est pas encore assez grande pour vérifier ces hypothèses. Si ce mécanisme était responsable de la baisse de la conductance, la substitution d'une cystéine en sérine en position 276 pourrait avoir un effet similaire. Une étude électrophysiologique du canal hIKCa-C276S fut tentée sans succès car ce canal n'a jamais été aperçu lors des expériences de patch-clamp. La substitution d'une glycine, acide aminé non-polaire, à la place de la sérine à la position 276 n'a pas influencé de manière notable la conductance du canal, ce qui ne dément pas l'argument avancé voulant que la polarité de la sérine ait modifié la conductance du canal hIKCa-C277S.

### 4.3 Cinétique des canaux hIKCa

Certains canaux mutés semblent posséder des comportements cinétiques qui diffèrent de ceux du canal hIKCa-WT. Ainsi, le canal hIKCa-C276G est un canal qui fluctue rapidement (*flickers*), les ouvertures du canal sont brèves et rapides (Figure 6-A, p.37) mais semblent plus rapides que celles démontrées par les tracés du canal de type sauvage. Cette observation ne fut pas vérifiée par un test de la cinétique du canal mais les tracés du canal hIKCa-C276G durent être filtrés à 1 kHz alors que les tracés du canal hIKCa -WT ne nécessitent qu'un taux de filtration de 500 Hz pour l'obtention de tracés optimaux. Cette différence de méthodologie suggère des cinétiques différentes pour les canaux hIKCa-C276G et WT. La mutation C276G entraîne probablement une déstabilisation de l'état ouvert du canal. Le canal hIKCa -C277S aussi semble posséder une cinétique différente du canal hIKCa -WT. En effet, les tracés de la Figure 7-A (p.39) laissent entendre que le canal hIKCa -C277S se referme plus souvent comparativement au canal de type sauvage (Figure 3-A, p.29). Les tracés du canal hIKCa -C277S durent être filtrés à un taux de 1 kHz comme le furent les enregistrements du canal hIKCa-C276G. Toutes les tentatives de filtration à des taux inférieurs à 1 kHz entraînaient la saturation des amplitudes d'ouverture des canaux et le non-recensement de beaucoup d'événements (ouverture ou fermeture).

Sur la base de ces résultats, nous avons entrepris une analyse cinétique des différents canaux afin de vérifier les observations qualitatives de différentes cinétiques faites à partir des tracés d'enregistrements des canaux hIKCa-C277S et C276G. Nous avons mesuré et comparé les taux de fermeture des canaux mutants et de type sauvage. Comme expliqué précédemment, nous avons employé le taux de fermeture car il n'est

pas modifié par la concentration de calcium intracellulaire comme l'est le taux d'ouverture du canal. Les résultats de cette étude sont rassemblés à la Figure 8 (p.41). Les histogrammes de cette figure nous indiquent sans équivoque que seul le canal hIKCa-C277S possède une cinétique différente du canal de type-sauvage. Les canaux hIKCa-C267S et C269S possèdent des taux de transition comparables aux taux caractéristiques du canal de type sauvage. Selon nos résultats, la cinétique de fermeture du canal hIKCa-C277S est caractérisée par des taux de fermeture majoritairement supérieurs à  $600 \text{ s}^{-1}$  alors que l'analyse gaussienne de l'histogramme du canal hIKCa-WT rapporte un pic centré à  $156 \pm 8 \text{ s}^{-1}$ . Ceci démontre clairement que l'état ouvert du canal hIKCa-C277S n'est pas aussi stable que l'état ouvert du canal de type sauvage. La cystéine C277 jouerait donc un rôle de stabilisateur de l'état ouvert du canal hIKCa. Cette déstabilisation de l'état ouvert par la mutation C277S pourrait être expliquée par le fait que la sérine est un acide aminé plus polaire que la cystéine et par l'orientation de la C277. En utilisant un modèle du pore du canal hIKCa basé sur la structure cristalline du canal KcsA, nous pouvons déduire que la C277 est orientée vers l'intérieur de la membrane plasmique et non vers l'intérieur du pore (Figure 12, p.56). Si la C277 est bien orientée vers la membrane plasmique, l'introduction par mutation d'une sérine polaire face à la membrane non-polaire pourrait occasionner une déstabilisation de l'état ouvert telle qu'observée car la sérine aurait de la difficulté à s'enchâsser dans la membrane plasmique non-polaire. Ce mauvais enchâssement de la sérine pourrait avoir comme effet une modification du fonctionnement du mécanisme de d'ouverture et de fermeture du canal hIKCa. Le mécanisme d'activation (gating) du canal hIKCa n'étant pas connu, nous ne pouvons pas donner une explication exacte et précise de la modification de la cinétique du canal par la mutation C277S.

Il se peut que les acides aminés avoisinants la C277 jouent aussi un rôle dans la stabilisation de l'état ouvert du canal hIKCa, ainsi la mutation C276G semble engendrer, elle aussi, une déstabilisation de l'état ouvert du canal (Figure 6-A, p.37). La rareté des données concernant le canal hIKCa-C276G n'a pas permis la production d'un histogramme des taux de transitions mais les taux mesurés allaient de  $400 \text{ s}^{-1}$  à  $1099 \text{ s}^{-1}$ . Si cette tendance pouvait être vérifiée dans le futur, nous pourrions conclure que la C276 possède aussi un rôle stabilisateur de l'état ouvert du canal hIKCa. Une implication possible découlant de ces résultats serait que la région 276-277 serait importante pour assurer la stabilité des états ouverts. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la mutation C276S ait empêché soit l'expression du canal à la membrane, soit la fonction du canal. La région 276-277 du canal hIKCa est donc une région critique pour la stabilité du pore, la bonne fonctionnalité du canal et la stabilité des états ouverts du canal alors que la région 267-269 ne serait pas impliquée dans la stabilisation du canal hIKCa comme le montre les taux de transition similaires aux taux du canal de type sauvage des canaux hIKCa-C267S et C269S.

#### **4.4 hIKCa-mutants et agents modificateurs de thiol**

Les canaux hIKCa-C269S et C277S sont les canaux mutants dont le comportement se rapproche le plus du canal de type sauvage. Ainsi le canal hIKCa-C277S, comme rapporté à la Figure 11-A (p.49), est inhibé par l'application du DTNB mais récupère la majeure partie de son activité par l'application interne de 5mM de DTT tout comme le canal hIKCa-WT. Tous les canaux mutants sont inhibés par l'application interne de 5 mM de DTNB ce qui implique, à première vue, qu'aucune des quatre

cystéines étudiées n'est responsable individuellement de l'inhibition du canal hIKCa par le DTNB. Les différences de comportement ne proviennent pas de l'inhibition des canaux par le DTNB, inhibition qui est complète pour tous les canaux, mais dans la récupération d'une partie de l'activité des canaux lors du lavage de la chambre de perfusion avec la solution contrôle. C'est ainsi que les canaux hIKCa-C267S et C276G récupère une partie de leur activité lors de la perfusion en solution contrôle après inhibition par le DTNB. Ce phénomène est spectaculaire dans le cas du canal hIKCa-C267S où la réactivation atteint près de 50% de l'activité initiale (Figure 11-C, p.49). La perfusion subséquente de 5 mM de DTT n'augmente pas l'activité du canal (résultat non-illustré). Le cas du canal hIKCa-C276G est différent ; la réactivation du canal due à la perfusion en solution contrôle après l'inhibition par le DTNB est minime mais présente (Figure 11-D, p.49) et l'application interne de 5 mM de DTT après ce lavage augmente un peu, mais de manière perceptible, l'activité du canal (résultat non-illustré). Le comportement du canal hIKCa-C276G est difficile à interpréter car les effets de réactivation par la solution contrôle sont minimes et pourraient bien être des artefacts expérimentaux. De plus, l'étude de ce canal fut particulièrement ardue et ponctuée de problèmes chroniques d'expression de la protéine ce qui explique le peu d'expériences ayant été effectuées sur la mutation C276G. La réactivation observée en solution contrôle par le canal hIKCa-C267S pourrait s'expliquer par un blocage physique du pore du canal par le DTNB et non par une inhibition par réaction oxydative du canal. Nos résultats ont déjà démontré que le DTNB ne s'attaque pas aux cystéines 269, 276 et 277. Lorsqu'il est mis en contact avec le canal hIKCa-C267S, le DTNB ne peut pas se trouver de cystéine à oxyder car la C267 est mutée en sérine et les autres cystéines sont inaccessibles au DTNB, il irait donc se loger dans le pore et bloquerait le canal par une



liaison non-covalente et de manière réversible. Lors de la perfusion en solution contrôlée le DTNB serait chassé hors du pore ce qui rétablirait la conduction du canal. Si cette hypothèse est vérifiée, cela indiquerait que la C267 est la seule cystéine responsable de l'inhibition du canal hKCa par oxydation car la mutation C267S rend le canal hKCa insensible à une réaction oxydative du DTNB. Par contre, le modèle tridimensionnelle de la Figure 13-A (p.70) semblent montrer que le DTNB serait trop volumineux pour avoir accès à la C267 qui est très près de la surface externe de la membrane et est protégée par la boucle P. De plus, le DTNB étant chargé négativement il est peu probable qu'il puisse se loger dans la cavité du pore. Dans le cas où la C267 serait inaccessible au DTNB et étant donné que les autres mutants sont toujours inhibés par celui-ci, cela impliquerait que l'inhibition oxydative du canal hKCa par le DTNB serait due à un mécanisme plus complexe impliquant plusieurs cystéines à la fois. Le raisonnement est le suivant : comme les autres mutants sont sensibles au DTNB, cela exclut les cystéines 269, 276 et 277 en tant que responsable individuel de l'inhibition par le DTNB hors, le DTNB n'ayant pas accès à la C267, il s'ensuit donc que l'inhibition du canal hKCa par le DTNB ne peut avoir lieu que par un mécanisme complexe impliquant plusieurs cystéines à la fois. Comme la C267 est inaccessible au DTNB, elle ne devrait pas jouer de rôle dans l'inhibition du canal, donc le canal hKCa-C267S devrait être inhibé (et non bloqué) par le DTNB, ce qui n'est pas le cas. Dans le cas d'une inhibition à plusieurs cystéines, au moins un des autres canaux mutés devrait être insensible au DTNB ce qui n'est pas le cas. Il faut ajouter à ces arguments que les autres cystéines du pore sont orientées vers la membrane et que le DTNB est peu lipophile. Il serait donc difficile au DTNB de s'attaquer aux cystéines 269, 276 et 277 et de les oxyder toutes ou individuellement si le canal possède une géométrie semblable à celle

du KcsA. Si toutefois le canal possède une géométrie semblable à celle proposée par del Camino [18], où le segment S6 se voit replié parallèlement à la membrane au niveau du domaine 278-282, les cystéines en position 276 et 277 pourraient devenir accessible à une substance même chargée négativement.

La Figure 13 (p.70) met aussi en doute l'inaccessibilité du pore par le MTSES. Comment peut-il ne pas pénétrer dans le pore alors que la Figure 13 nous montre qu'il est bien plus petit que le DTNB ? Le MTSES possède plusieurs atomes d'oxygène à chacune de ses extrémités et est chargée négativement. Ces atomes forment, non pas un plan comme pour le DTNB, mais un tétraèdre (Figure 14, p.71). Cette structure tridimensionnelle rend la surface efficace de la charge due aux atomes d'oxygène plus grande pour le MTSES que pour le DTNB. En d'autres termes, la surface d'interaction électrique du MTSES est plus grande que celle du DTNB. Le DTNB, avec ses groupements  $\text{COO}^-$  dans le plan, peut cependant avoir des effets structuraux beaucoup plus importants. Il est toujours possible que le MTSES n'entre pas dans le canal mais vu sa petite taille, il est plus plausible qu'il pénètre le pore mais ne puisse avoir accès à la C267. L'insensibilité du canal hIKCa au MTSES peut très bien être expliquée sans que ce dernier pénètre le pore. En effet, le MTSES étant très hydrophile et la membrane lui étant imperméable, il n'a probablement pas accès aux cystéines 269, 276 et 277. Il n'a probablement pas accès non plus à la C267 car sa surface de charge doit l'empêcher de se rendre jusqu'à elle entre les boucles P et les segments transmembranaires.

Les études d'application de DTNB démontrent que les cystéines 269 et 277 ne jouent aucun rôle dans l'inhibition du canal hIKCa par le DTNB et que la cystéine 267 pourrait être la seule responsable de l'inhibition du canal par le DTNB. Comme il n'est pas encore certain que le DTNB inhibe le canal par une oxydation d'une ou plusieurs

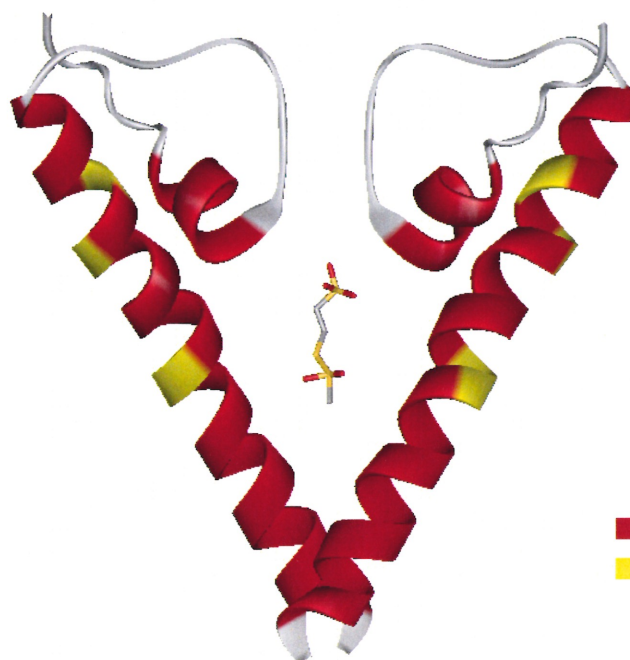
cystéines du segment S6, des expériences pour s'assurer que le pore est bien la région ciblée par le DTNB devraient être réalisées dans le futur. La première expérience possible serait de créer un canal hIKCa ne possédant pas de cystéines dans le segment S6 (S6 $\Delta$ C). Si ce canal hIKCa-S6 $\Delta$ C était inhibé par le DTNB, cela démontrerait que la ou les cibles du DTNB ne sont pas les cystéines du segment S6 du canal. Si ce canal hIKCa- $\Delta$ C ne venait pas à s'exprimer ou possédait des caractéristiques trop différentes du canal hIKCa-WT pour en faire une étude valable, nous pourrions empêcher le DTNB de pénétrer dans le pore en le fermant par absence de calcium intracellulaire. Un protocole de perfusion du genre :  $\emptyset$  Ca<sup>2+</sup> – DTNB –  $\emptyset$  Ca<sup>2+</sup> – contrôle, mettrait en contact le DTNB avec un canal hIKCa préalablement fermé par l'absence de calcium intracellulaire et empêcherait l'accès du DTNB à l'intérieur du pore. Si le canal s'active lors de la perfusion en solution contrôle, cela impliquerait que la fermeture aurait protégé les cystéines du segment S6 en bloquant l'accès du pore au DTNB et que le site d'oxydation du DTNB est accessible seulement par le pore. Des résultats obtenus récemment par Mme Line Garneau M.sc. du laboratoire du Dr Rémy Sauvé ont montré que le canal était toujours actif à la suite d'un protocole de perfusion comme celui décrit ci-haut. Le site d'action du DTNB se trouve bien dans le pore du canal hIKCa.

## DTNB et MTSES à l'intérieur du canal hKCa

A.



B.



■ Hélice- $\alpha$   
■ Cystéines

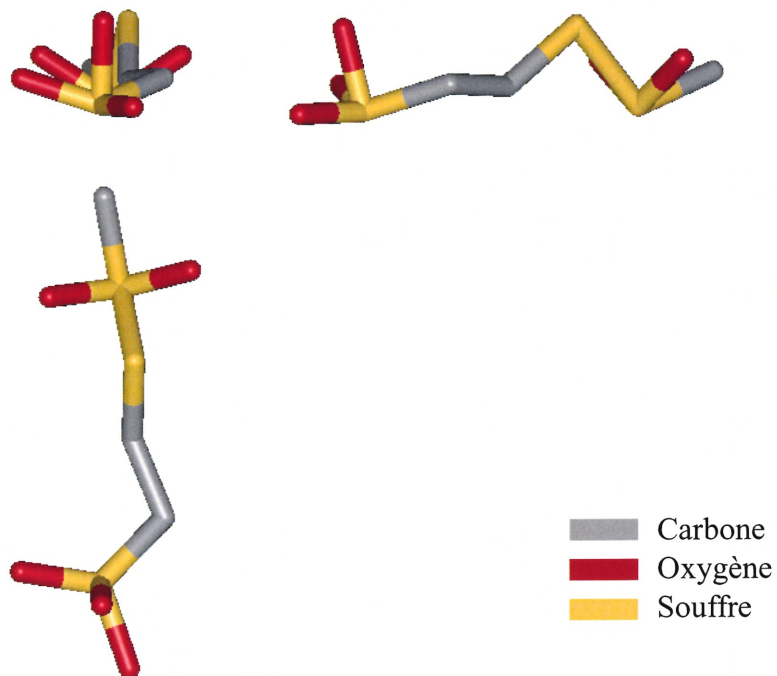
**FIGURE 13** : **A.** Molécule de DTNB dans le pore du canal hKCa. **B.** Molécule de MTSES dans le pore du canal hKCa. La molécule de DTNB semble occuper plus d'espace dans le pore du canal que celle de MTSES.

## Structure 3D du DTNB et du MTSES

### A. DTNB



### B. MTSES



**Figure 14 :** Structure tridimensionnelle du DTNB (A.) et du MTSES (B.). Le DTNB possède une géométrie plane contrairement au MTSES et est plus long que celui-ci.

## 5. Connaître la suite...

L'étude qui est présentée ici n'est que le point de départ d'une compréhension accrue de la structure, de la fonction et de la régulation du canal hKCa. Plusieurs expériences devraient être entreprises dans le futur pour compléter ou pour expliquer les résultats et hypothèses qui sont rapportés plus haut dans le texte. Il serait intéressant d'étudier la sélectivité au potassium des mutants présentés dans ce mémoire particulièrement pour les canaux hKCa-C269S et C277S qui sont caractérisés par des conductances différentes de celle du canal de type sauvage. De plus, les mutations des différentes cystéines du segment transmembranaire S6 par des acides aminés chargés ou possédant des chaînes latérales de différentes longueurs pourraient nous aider à élucider les mécanismes régissant la conductance et la cinétique du canal hKCa. Par exemple, des substitutions de ce type pourraient nous aider à comprendre les mécanismes régissant l'augmentation de la conductance due à la mutation C269S, cette augmentation est-elle le résultat d'un encombrement stérique différent, d'une interaction avec la région près du filtre de sélectivité ou d'une stabilisation accrue de l'ion potassium dans la cavité aqueuse du canal par un effet de charge ? De la même manière nous pourrions savoir si la faible conductance du canal hKCa-C277S est due au changement du diamètre de l'ouverture du *teepee inversé*, à un effet de polarité ou à un changement stérique. De plus, des études sur les canaux hKCa-C74S et C115S devraient être entreprises pour vérifier l'existence de ponts  $H^+$  entre ces cystéines et le segment S6, plus particulièrement avec les C276 ou C277. Des substitutions de la cystéine 277 par des acides aminés chargés mettraient à l'épreuve l'hypothèse avancée dans le texte que la cinétique rapide du canal hKCa-C277S serait le résultat de l'introduction d'un acide

aminé polaire (sérine) dans une position face à la membrane plasmique. Si l'hypothèse se tient, l'introduction d'un résidu chargé de dimensions semblables à la cystéine en position 277 du canal devrait résulter en une déstabilisation de l'état ouvert du canal. De plus, des expériences devraient être effectuées pour compléter et raffiner la caractérisation du canal hIKCa-C276G. Il serait intéressant de vérifier en détail la cinétique de fermeture de ce canal car elle semble plus rapide que la cinétique du canal de type sauvage. La confirmation de taux de fermeture très rapides pour le canal hIKCa-C276G impliquerait que la région 276-277 est importante pour la stabilisation de l'état ouvert du canal. La C276 devrait être étudiée plus longuement car cette position semble être critique pour l'expression ou la fonctionnalité du canal hIKCa, rappelons-nous que la mutation C276S avait rendu le canal inobservable.

Notre étude nous a permis de vérifier que le canal cloné à partir des cellules humaines ECV 304 était bien le canal hIKCa aussi connu dans la littérature sous les noms de : hIK1, hSK4, et IKCa1. La comparaison de nos résultats avec ceux de Cai et Sauvé [11], montre que l'inhibition par le DTNB du canal hIKCa n'est pas tributaire du système d'expression. Nous avons émis l'hypothèse que l'insensibilité du canal au MTSES serait due à l'incapacité de ce dernier à avoir accès à la C267. Nous avons montré que la mutation C269S provoque une augmentation de la conductance du canal de l'ordre de 30% alors que la mutation C277S fait diminuer la conductance de 22% par rapport au canal de type sauvage. Cette dernière mutation est aussi responsable d'une augmentation des taux de fermeture du canal ce qui démontre que la C277 stabilise l'état ouvert du canal hIKCa. Il a été impossible d'observer le canal hIKCa-C276S ce qui signifie que la mutation C276S a empêché l'expression ou la bonne fonction du canal. Nous pensons donc que les C277 et C276 sont indispensables au bon fonctionnement et

à la stabilité du canal. Trois des canaux mutés étudiés furent inhibés hors de tout doute par le DTNB ce qui implique que les cystéines 269, 276 et 277 du segment S6 ne sont pas responsables individuellement de cette inhibition. Il est possible que la C267 soit la seule cystéine responsable de l'inhibition du canal par le DTNB, mais il semble plus plausible que l'inhibition du canal par le DTNB soit le fruit d'un mécanisme complexe impliquant plusieurs cystéines ce qui suggèrerait une géométrie différente de celle du canal KcsA.



## Bibliographie

1. Adams DJ, Rusko J, and Van Slooten G. Calcium signaling in vascular endothelial cells:  $\text{Ca}^{2+}$  entry and release. *Ion Flux in Pulmonary Vascular Control*, 259-275. 1993. New York, Plenum Press.
2. Adelman JP, Shen KZ, Kavanaugh MP, Warren RA, Wu YN, Lagrutta A, Bond CT, and North RA, 1992. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* **9**: 209-216.
3. Aiyar J, Rizzi JP, Gutman GA, and Chandy KG, 1996. The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *J.Biol.Chem.* **271**: 31013-31016.
4. Aiyar J, Withka JM, Rizzi JP, Singleton DH, Andrews GC, Lin W, Boyd J, Hanson DC, Simon M, and Dethlefs B, 1995. Topology of the pore-region of a  $\text{K}^+$  channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron* **15**: 1169-1181.
5. Atkinson NS, Robertson GA, and Ganetzky B, 1991. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science* **253**: 551-555.
6. Blatz AL and Magleby KL, 1986. Single apamin-blocked Ca-activated  $\text{K}^+$  channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* **323**: 718-720.
7. Boland LM, Jurman ME, and Yellen G, 1994. Cysteines in the Shaker  $\text{K}^+$  channel are not essential for channel activity or zinc modulation. *Biophys.J.* **66**: 694-699.
8. Brugnara C, de FL, and Alper SL, 1993. Inhibition of  $\text{Ca}(2+)$ -dependent  $\text{K}^+$  transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J.Clin.Invest.* **92**: 520-526.
9. Busse R and Mulisch A, 1990. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett.* **265**: 133-136.
10. Cai S, Garneau L, and Sauve R, 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.
11. Cai S and Sauve R, 1997. Effects of thiol-modifying agents on a  $\text{K}(\text{Ca}2+)$  channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. *J.Membr.Biol.* **158**: 147-158.

12. Candia S, Garcia ML, and Latorre R, 1992. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance  $\text{Ca}(2+)\text{-activated K}^+$  channel. *Biophys.J.* **63**: 583-590.
13. Chang CP, Dworetzky SI, Wang J, and Goldstein ME, 1997. Differential expression of the alpha and beta subunits of the large-conductance calcium-activated potassium channel: implication for channel diversity. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **45**: 33-40.
14. Christophersen P 1991.  $\text{Ca}2(+)\text{-activated K}^+$  channel from human erythrocyte membranes: single channel rectification and selectivity. *J.Membr.Biol.* **119**: 75-83.
15. Chung SH, Krishnamurthy V, and Moore JB, 1991. Adaptive processing techniques based on hidden Markov models for characterizing very small channel currents buried in noise and deterministic interferences. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* **334**: 357-384.
16. Colden-Stanfield M, Schilling WP, Ritchie AK, Eskin SG, Navarro LT, and Kunze DL, 1987. Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ.Res.* **61**: 632-640.
17. Cox DH, Cui J, and Aldrich RW, 1997. Allosteric gating of a large conductance  $\text{Ca-activated K}^+$  channel. *J.Gen.Physiol.* **110**: 257-281.
18. del Camino D, Holmgren M, Liu Y, and Yellen G, 2000. Blocker protection in the pore of a voltage-gated  $\text{K}^+$  channel and its structural implications. *Nature.* **403**: 321-325.
19. DiChiara TJ and Reinhart PH, 1997. Redox modulation of hslow  $\text{Ca}2+\text{-activated K}^+$  channels. *J.Neurosci.* **17**: 4942-4955.
20. Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, and MacKinnon R, 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of  $\text{K}^+$  conduction and selectivity [see comments]. *Science* **280**: 69-77.
21. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch.Biochem.Biophys.* **82**, 70-77. 1959.
22. Fakler B, Brandle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner HP, and Ruppersberg JP, 1995. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier  $\text{K}^+$  channels is caused by intracellular spermine. *Cell* **80**: 149-154.
23. Falke JJ, Dernburg AF, Sternberg DA, Zalkin N, Milligan DL, and Koshland DEJ, 1988. Structure of a bacterial sensory receptor. A site-directed sulfhydryl study. *J.Biol.Chem.* **263**: 14850-14858.

24. Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, and Aiyar J, 1999. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J.Biol.Chem.* **274**: 5746-5754.
25. Goldstein SA, Pheasant DJ, and Miller C, 1994. The charybdotoxin receptor of a Shaker K<sup>+</sup> channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* **12**: 1377-1388.
26. Grissmer S, Lewis RS, and Cahalan MD, 1992. Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in human leukemic T cells. *J.Gen.Physiol.* **99**: 63-84.
27. Groschner K, Graier WF, and Kukovetz WR, 1992. Activation of a small-conductance Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channel contributes to bradykinin-induced stimulation of nitric oxide synthesis in pig aortic endothelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1137**: 162-170.
28. Hanner M, Schmalhofer WA, Munujos P, Knaus HG, Kaczorowski GJ, and Garcia ML, 1997. The beta subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel contributes to the high-affinity receptor for charybdotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 2853-2858.
29. Hidalgo P and MacKinnon R, 1995. Revealing the architecture of a K<sup>+</sup> channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* **268**: 307-310.
30. Holmgren M, Liu Y, Xu Y, and Yellen G, 1996. On the use of thiol-modifying agents to determine channel topology. *Neuropharmacology* **35**: 797-804.
31. Hoshi T, Zagotta WN, and Aldrich RW, 1990. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation [see comments]. *Science* **250**: 533-538.
32. Ishii TM, Maylie J, and Adelman JP, 1997. Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *J.Biol.Chem.* **272**: 23195-23200.
33. Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, and Maylie J, 1997. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 11651-11656.
34. Islam MS, Berggren PO, and Larsson O, 1993. Sulfhydryl oxidation induces rapid and reversible closure of the ATP-regulated K<sup>+</sup> channel in the pancreatic beta-cell. *FEBS Lett.* **319**: 128-132.
35. Jan LY and Jan YN, 1989. Voltage-sensitive ion channels. *Cell* **56**: 13-25.

36. Jan LY and Jan YN, 1997a. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu.Rev.Neurosci.* **20**: 91-123.
37. Jan LY and Jan YN, 1997b. Ways and means for left shifts in the MaxiK channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 13383-13385.
38. Jensen BS, Odum N, Jorgensen NK, Christophersen P, and Olesen SP, 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.
39. Jensen BS, Strobaek D, Christophersen P, Jorgensen TD, Hansen C, Silahtaroglu A, Olesen SP, and Ahring PK, 1998. Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *Am.J.Physiol.* **275**: C848-C856.
40. Joiner WJ, Wang LY, Tang MD, and Kaczmarek LK, 1997. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 11013-11018.
41. Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, Paschetto K, Kem WR, Grissmer S, Gutman GA, Christian EP, Cahalan MD, Norton RS, and Chandy KG, 1998. ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J.Biol.Chem.* **273**: 32697-32707.
42. Keen JE, Khawaled R, Farrens DL, Neelands T, Rivard A, Bond CT, Janowsky A, Fakler B, Adelman JP, and Maylie J, 1999. Domains responsible for constitutive and Ca(2+)-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca(2+)-activated potassium channels. *J.Neurosci.* **19**: 8830-8838.
43. Kohler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, and Adelman JP, 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain [see comments]. *Science* **273**: 1709-1714.
44. Lancaster B and Adams PR, 1986. Calcium-dependent current generating the afterhyperpolarization of hippocampal neurons. *J.Neurophysiol.* **55**: 1268-1282.
45. Lancaster B, Nicoll RA, and Perkel DJ, 1991. Calcium activates two types of potassium channels in rat hippocampal neurons in culture. *J.Neurosci.* **11**: 23-30.
46. Liu Y and Joho RH, 1998. A side chain in S6 influences both open-state stability and ion permeation in a voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Pflugers Arch.* **435**: 654-661.

47. Long CJ and Stone TW, 1985. The release of endothelium-derived relaxant factor is calcium dependent. *Blood Vessels* **22**: 205-208.
48. Luckhoff A and Clapham DE, 1992. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca(2+)-permeable channel [see comments]. *Nature* **355**: 356-358.
49. MacKinnon R, Cohen SL, Kuo A, Lee A, and Chait BT, 1998. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels [comment] [see comments]. *Science* **280**: 106-109.
50. Matsuda H, Saigusa A, and Irisawa H, 1987. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature* **325**: 156-159.
51. McManus OB, Helms LM, Pallanck L, Ganetzky B, Swanson R, and Leonard RJ, 1995. Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* **14**: 645-650.
52. Meera P, Wallner M, Song M, and Toro L, 1997. Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 14066-14071.
53. Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA, 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* **43**: 109-142.
54. Mourre C, Schmid-Antomarchi H, Hugues M, and Lazdunski M, 1984. Autoradiographic localization of apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in rat brain. *Eur.J.Pharmacol.* **100**: 135-136.
55. Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, and Lederer WJ, 1995. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks [see comments]. *Science* **270**: 633-637.
56. Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A, and Reinhart PH, 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.
57. Ogielska EM and Aldrich RW, 1998. A mutation in S6 of Shaker potassium channels decreases the K<sup>+</sup> affinity of an ion binding site revealing ion-ion interactions in the pore. *J.Gen.Physiol.* **112**: 243-257.
58. Park YB 1994. Ion selectivity and gating of small conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J.Physiol.(Lond.)* **481**: 555-570.

59. Pena TL, Chen SH, Konieczny SF, and Rane SG, Ras/MEK/ERK Up-regulation of the fibroblast KCa channel FIK is a common mechanism for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta suppression of myogenesis. *J.Biol.Chem.* 2000. May. 5.; 275. (18.): 13677-82. **275:** 13677-13682.
60. Pena TL and Rane SG, 1999. The fibroblast intermediate conductance K(Ca) channel, FIK, as a prototype for the cell growth regulatory function of the IK channel family. *J.Membr.Biol.* **172:** 249-257.
61. Pennefather P, Lancaster B, Adams PR, and Nicoll RA, 1985. Two distinct Ca-dependent K currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **82:** 3040-3044.
62. Rane SG The growth regulatory fibroblast IK channel is the prominent electrophysiological feature of rat prostatic cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2000. Mar. 16.; 269. (2.): 457.-63. **269:** 457-463.
63. Ranganathan R, Lewis JH, and MacKinnon R, 1996. Spatial localization of the K<sup>+</sup> channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* **16:** 131-139.
64. Rauer H, Pennington M, Cahalan M, and Chandy KG, 1999. Structural conservation of the pores of calcium-activated and voltage-gated potassium channels determined by a sea anemone toxin. *J.Biol.Chem.* **274:** 21885-21892.
65. Reinhart PH and Levitan IB, 1995. Kinase and phosphatase activities intimately associated with a reconstituted calcium-dependent potassium channel. *J.Neurosci.* **15:** 4572-4579.
66. Riquelme G, Fernandez AM, Encinar JA, Gonzalez-Ros JM, and Sepulveda FV, 1999. Effect of the inactivating "ball" peptide of Shaker B on intermediate conductance Ca(2+)-dependent inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels of HeLa cells. *Pflugers Arch.* **438:** 879-882.
67. Rittenhouse AR, Vandorpe DH, Brugnara C, and Alper SL, 1997. The antifungal imidazole clotrimazole and its major in vivo metabolite are potent blockers of the calcium-activated potassium channel in murine erythroleukemia cells. *J.Membr.Biol.* **157:** 177-191.
68. Roberts DD, Lewis SD, Ballou DP, Olson ST, and Shafer JA, 1986. Reactivity of small thiolate anions and cysteine-25 in papain toward methyl methanethiosulfonate. *Biochemistry* **25:** 5595-5601.

69. Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ, and Charlton MP, 1993. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* **11**: 645-655.
70. Sah P 1995. Properties of channels mediating the apamin-insensitive afterhyperpolarization in vagal motoneurons. *J.Neurophysiol.* **74**: 1772-1776.
71. Sah P and McLachlan EM, 1991. Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents underlying the afterhyperpolarization in guinea pig vagal neurons: a role for Ca(2+)-activated Ca<sup>2+</sup> release. *Neuron* **7**: 257-264.
72. Saito M, Nelson C, Salkoff L, and Lingle CJ, 1997. A cysteine-rich domain defined by a novel exon in a slo variant in rat adrenal chromaffin cells and PC12 cells. *J.Biol.Chem.* **272**: 11710-11717.
73. Sauve R, Chahine M, Tremblay J, and Hamet P, 1990. Single-channel analysis of the electrical response of bovine aortic endothelial cells to bradykinin stimulation: contribution of a Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent K<sup>+</sup> channel. *J.Hypertens.Suppl.* **8**: S193-S201.
74. Schreiber M and Salkoff L, 1997. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys.J.* **73**: 1355-1363.
75. Shih TM and Goldin AL, 1997. Topology of the Shaker potassium channel probed with hydrophilic epitope insertions. *J.Cell Biol.* **136**: 1037-1045.
76. Stocker M and Miller C, 1994. Electrostatic distance geometry in a K<sup>+</sup> channel vestibule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**: 9509-9513.
77. Tanaka Y, Meera P, Song M, Knaus HG, and Toro L, 1997. Molecular constituents of maxi KCa channels in human coronary smooth muscle: predominant alpha + beta subunit complexes. *J.Physiol.(Lond.)* **502**: 545-557.
78. Toro L, Stefani E, and Latorre R, 1992. Internal blockade of a Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel by Shaker B inactivating "ball" peptide. *Neuron* **9**: 237-245.
79. Vandenberg CA 1987. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**: 2560-2564.
80. Wang ZW, Nara M, Wang YX, and Kotlikoff MI, 1997. Redox regulation of large conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells. *J.Gen.Physiol.* **110**: 35-44.

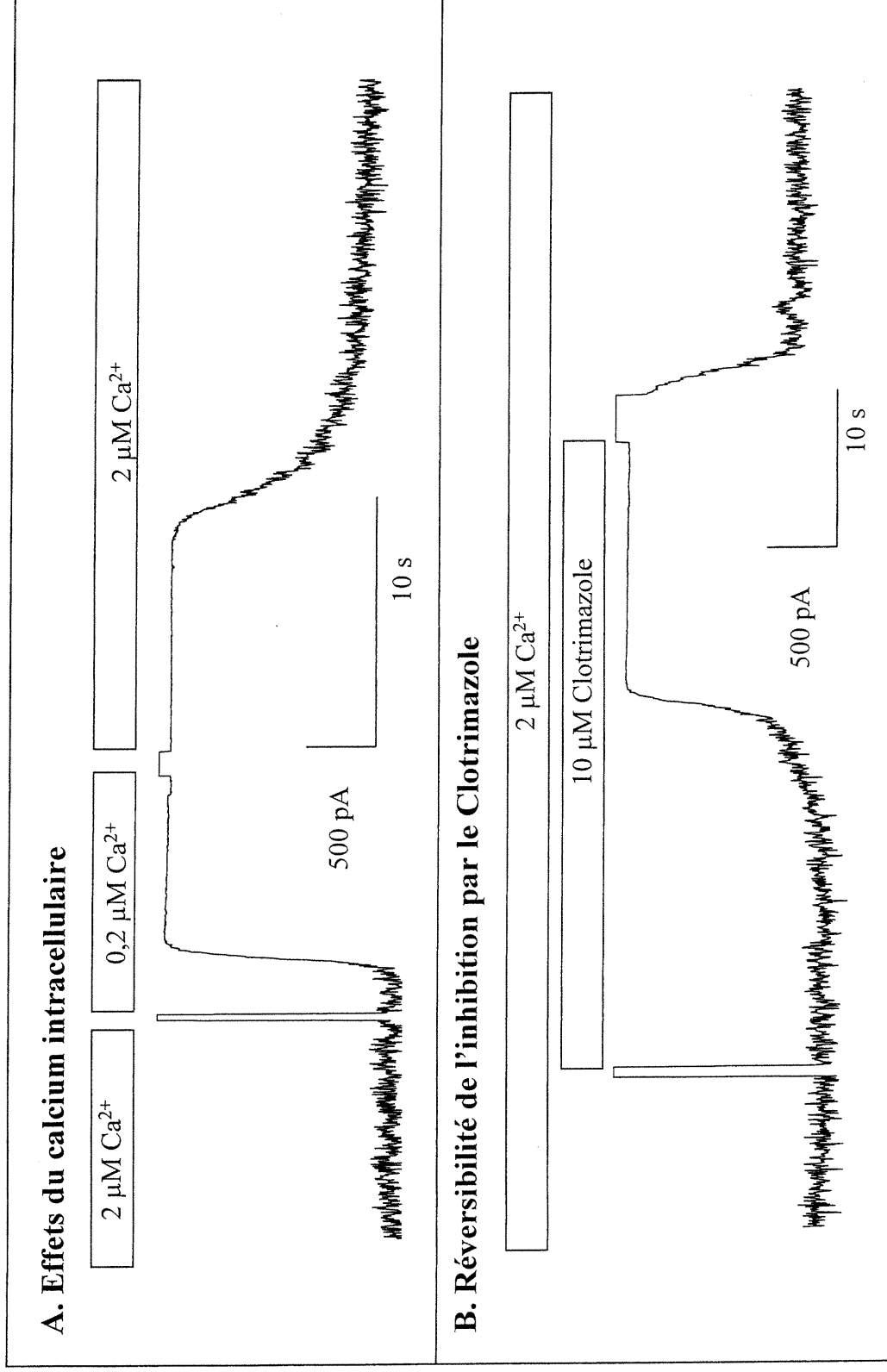
81. Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, and Adelman JP, 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **395**: 503-507.
82. Yamada Y, Tohse N, Nagashima M, and Yabu H, 1999. Characteristics of current fluctuations originating from activities of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels in guinea-pig heart cells. *J.Membr.Biol.* **167**: 141-149.
83. Yazejian B, DiGregorio DA, Vergara JL, Poage RE, Meriney SD, and Grinnell AD, 1997. Direct measurements of presynaptic calcium and calcium-activated potassium currents regulating neurotransmitter release at cultured *Xenopus* nerve-muscle synapses. *J.Neurosci.* **17**: 2990-3001.



## **Annexe**

**Figures supplémentaires clarifiant le comportement du canal hIKCa de type sauvage en présence de calcium intracellulaire, de clotrimazole et de DTNB .**

# Effet du $[Ca^{2+}]_i$ et du clotrimazole sur le canal hIKCa



**Figure 15:** A. Sensibilité du canal hIKCa de type sauvage à la concentration intracellulaire de calcium. Ce tracé montre bien l'ouverture et la fermeture des canaux. B. Le clotrimazole (10  $\mu\text{M}$ ) bloque de manière réversible le canal hIKCa.

# Inhibition du canal hIKCa par le DTNB

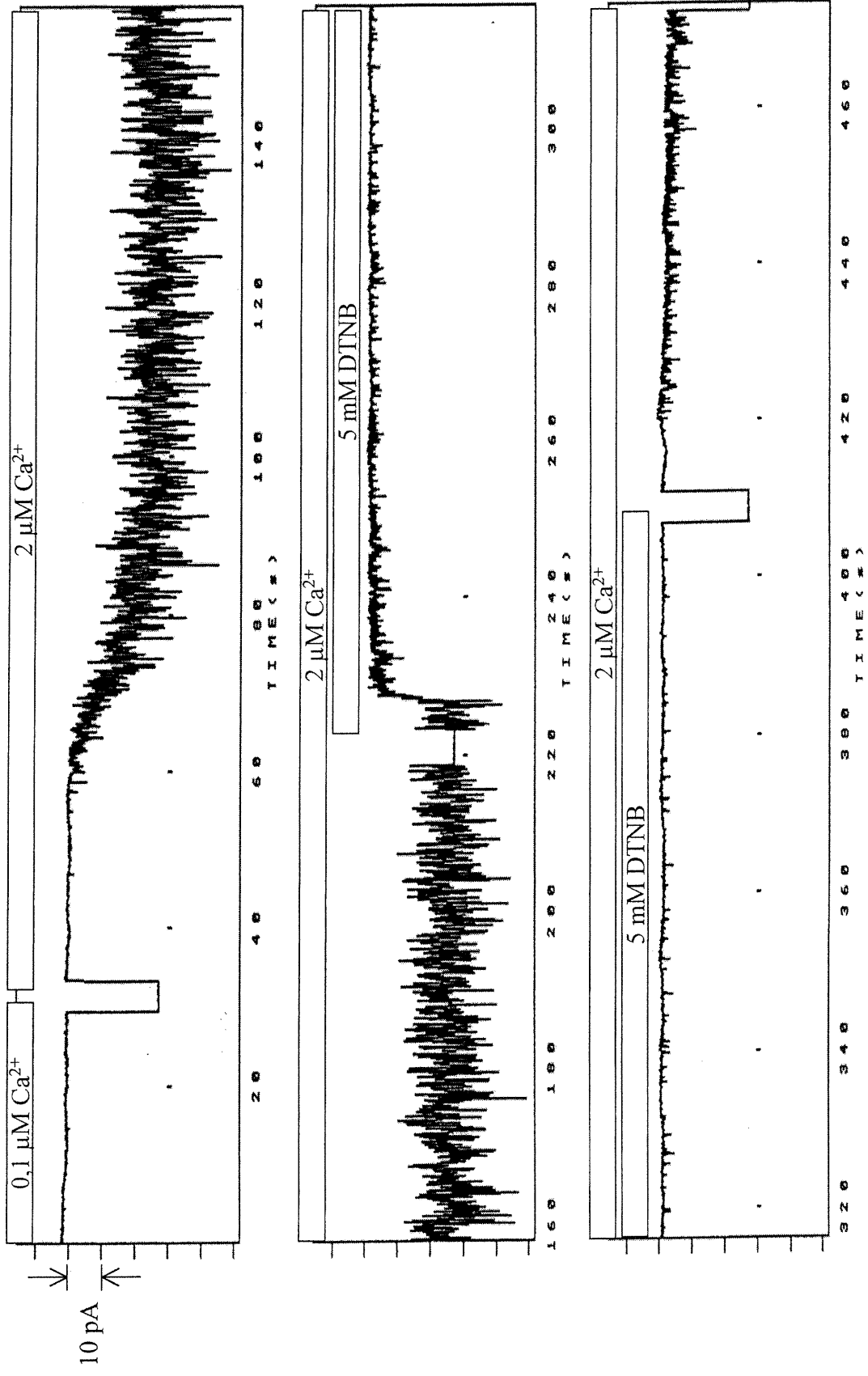


FIGURE 16 : Le canal hIKCa est inhibé par 5 mM de DTNB et ne recouvre pas son activité originale après lavage du bain en solution contrôlée en absence de DTNB.

## Remerciements

Je remercie chaleureusement mon directeur de recherche le Dr Rémy Sauvé pour ses conseils, sa patience et de m'avoir confié un projet stimulant. Un grand merci à Line Garneau qui m'a tout appris du *patch-clamp*, pour ses résultats arrivant toujours au bon moment et de m'avoir fait découvrir la radio de Radio-Canada. Hélène Klein pour ses clones, mutants et plus généralement car c'est elle la boss après LE boss du lab. Liviu Pogan pour ses mesures de concentration de calcium, sa conversation et ses excellentes saucisses. A Manuel Simoes, pour m'avoir aidé à faire les figures comprenant les modèles 3D du canal, parce qu'il continue le projet et parce qu'il faut bien des gens à gauche pour compenser pour la droite scientifique (ex-aequo avec Olivier).

Un grand merci à mes parents et mes grands-parents pour leur amour et leur soutien. Mercis tout spécial à ma mère qui, plus souvent qu'autrement, me botte le cul pour que je fasse quelque chose de ma vie, à mon père, source d'inspiration, et aux Obila Bros. (Sach, Ximeng et Le Jeune) sans qui la vie serait terne.

Le plus gros merci est pour Anaïck, parce que tu m'as conseillé, parce que tu es tannée de relire mon mémoire et de me corriger et surtout parce que quotidiennement tu m'endures, me soutiens et ris de mes blagues, en un mot parce que tu m'aimes.

Mercis en vrac. A tous ceux qui m'ont démontré jour après jour que c'est pas parce qu'on fait de la recherche qu'on est plate et qu'on n'a pas de vie : Pierre, Bazou, Emmanuelle, Bernadette, J-F, Dominique, Olivier, Joanne et Julie. A tous mes amis de physique en particulier Migou, Stefan, Marie, le Chin, Clonda, Erv, Karine et Arguin. Les bénévoles de CISM 89,3 FM qui ont pu suivre l'évolution de mes études depuis 3 ans et parce qu'on est la meilleure radio à Montréal. Les amis du rafting qui rient de moi parce que je suis encore étudiant, les potes du ultimate montréalais et de MUT A<sup>+</sup> qui me comprennent... surtout en anglais.