

Université de Montréal

**Influence des glycines du lien S4-S5 sur
le couplage électromécanique des canaux ioniques
dépendants du voltage**

par

Sandra Barreto

Département de Physique

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de

Maître de Sciences

en physique

option biophysique et physiologie moléculaire

Mars 2011

© Sandra Barreto 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Influence des glycines du lien S4-S5 sur le couplage
électromécanique des canaux ioniques dépendants du
voltage**

Présenté par :

Sandra Barreto

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Rémy Sauvé, président-rapporteur

Dr. Rikard Blunck, directeur de recherche

Dr. Jean-Yves Lapointe, membre du jury

Résumé

Les canaux potassiques dépendants du voltage sont formés de quatre sous-unités, chacune possédant six segments transmembranaires (S1-S6) et une boucle (p-loop) qui se trouve entre le cinquième et le sixième segment au niveau du pore. Il est connu que le segment senseur du voltage (S1-S4) subit un mouvement lorsque le potentiel membranaire change. Pour ouvrir le canal, il est nécessaire de transférer l'énergie du senseur du voltage (généré par le mouvement des charges positives de S4) au pore. Le mécanisme exact de ce couplage électromécanique est encore sous étude. Un des points de liaison entre le senseur de voltage et le pore est le lien physique fait par le segment S4-S5 (S45L). Le but de cette étude est de déterminer l'influence de la flexibilité du segment S45L sur le processus de couplage. Dans le S45L, trois glycines sont distribuées dans des positions différentes. Elles sont responsables de la flexibilité des hélices-alpha. Ces glycines (mais pas leurs positions exactes) sont conservées pour tous les canaux potassiques dépendants de potentiel. En utilisant la technique de mutagènes dirigé, la glycine a été remplacée dans chacune de ces différentes positions par une alanine et dans une deuxième étape, par une proline (pour introduire un angle dans l'hélice). Pour étudier le comportement des canaux dans cette nouvelle conformation, on a appliqué la technique de « patch clamp » pour déterminer les effets lors de l'ouverture du pore (courant ionique). Avec le « cut-open oocyte voltage-clamp », nous avons étudié les effets sur le mouvement du senseur de voltage (courant «gating») et la coordination temporelle avec l'ouverture du pore (courant ionique). Les données ont montré qu'en réduisant la flexibilité dans le S45L, il faut avoir plus d'énergie pour faire ouvrir le canal. Le changement pour une proline suggère que le mouvement du senseur est indépendant du pore pendant l'ouverture du canal.

Mots-clés : biophysique, « gating », canal ionique, « patch clamp », « cut-open oocyte », «Shaker», senseur de voltage, glycine.

Abstract

Voltage-gated potassium channels are formed of four subunits, each one with six transmembrane segments (S1-S6) and a loop (p-loop) between S5 and S6 at the level of the pore. It is known that the voltage sensitive segment (S1-S4) undergoes a movement upon membrane potential changes. To open the channel, it is necessary to transfer the energy of the voltage sensor (generated by the displacement of the positive charges of S4) to the pore. The exact mechanism of this “electromechanical coupling” is still under investigation. The voltage sensor and pore are physically linked by the S4-S5 linker (S45L). The aim of this study is to determine the influence of S45L flexibility on the coupling process. In the S45L, three glycines are distributed at different positions and are responsible for the flexibility of the alpha-helix. These glycines (but not their exact position) are conserved within the potassium voltage-gated ion channels. The glycines were each replaced by an alanine using point mutagenesis. In a second step, a proline was introduced at the position in order to introduce a break in the helix. To study the behaviour of channels in this new conformation, we used the patch clamp technique to determine the effects during the pore opening (ionic current). With the cut-open voltage-clamp we determined the effects on voltage sensor movement (gating current) as well as the temporal correlation with the pore opening (ionic current). The data showed that when the flexibility of the S45L is reduced, the channel needs more energy to open. Exchange with proline suggests that the movement of the sensor is independent of pore opening.

Keywords: biophysics, gating, ion channel, patch clamp, cut-open oocytes, Shaker, voltage-sensor, glycine.

Table des matières

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. CANAUX IONIQUES	2
1.1.2. Senseur du voltage et couplage électromécanique	7
1.1.3. Sélectivité ionique de canaux potassiques	18
1.2. CANAL NACHBAC.....	21
1.3. RÔLE DE LA GLYCINE DANS LA STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DES PROTÉINES TRANSMEMBRANAIRES	22
1.3.1. CARACTÉRISTIQUES DE LA PROLINE	25
1.4. JUSTIFICATION DU TRAVAIL ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	26
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	30
2.1. MUTATIONS RÉALISÉES	30
2.2. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET MUTAGENÈSE.....	33
2.3. EXPRESSION D'ADN ET D'ARN	34
2.3.1. Culture cellulaire et transfection.....	34
2.3.2. Ovocytes de grenouille <i>Xenopus leavis</i>	35
2.3.3. Injection de l'ARN.....	36
2.4. ENREGISTREMENTS DE COURANTS IONIQUES DES CANAUX EXPRIMÉ EN CELLULES.....	37
2.4.1. Application de la technique de « Patch clamp ».....	37
2.4.2. Montage expérimental.....	38
2.4.3. Protocole utilisé pour le travail avec « patch-clamp »	40
2.5. ENREGISTREMENTS DE COURANTS DE « GATING » ET IONIQUES DE PROTÉINES EXPRIMÉES EN OVOCYTES.	42
2.5.1. Application de la technique de « cut-open oocyte »	42
2.5.2. Montage expérimental.....	47

2.5.3. Protocole utilisé pour le travail avec le « cut-open oocyte ».....	48
2.6. ANALYSE DES DONNÉES	50
3. RÉSULTATS	52
3.1. CANAL SHAKER	52
3.1.1. Mutations de glycine à alanine.	52
3.1.1.1. Courants ioniques.....	53
3.1.1.2. Courants de « gating »	57
3.1.2. Mutations de glycine en proline	60
3.1.2.1. Courants ioniques.....	61
3.1.2.2. Courants de « gating »	64
3.1.3. Étude de l'effet du mouvement du pore sur le mouvement du senseur.....	67
3.1.4. Étude de l'importance de la position de la glycine dans le lien S4- S5.....	71
3.2. CANAL NACHBAC	73
4. DISCUSSION	77
4.1. LE RÉSIDU G381 DU LIEN S45L	78
4.2. LE RÉSIDU G386 DU LIEN S45L	80
4.3. LE RÉSIDU G397 DU LIEN S4-S5	82
4.4. Y A-T-IL UN EFFET DU MOUVEMENT DU PORE SUR LE MOUVEMENT DU SENSEUR ?	83
4.5. COOPÉRATIVITÉ ENTRE LES GLYCINES G381 ET G386	84
4.6. LE CANAL NACHBAC	86
4.7. SUGGESTIONS POUR DE FUTURES ÉTUDES.....	87
5. CONCLUSIONS	89
6. RÉFÉRENCES.....	90

Liste de tableaux

Chapitre 2

Tableau II.I. Mutations réalisées. La division du Tableau est faite selon le vecteur utilise.....	32
Tableau II.II. Solutions utilisées pour le travail avec les cellules	38
Tableau II.III. Solutions utilisées pour le travail avec les ovocytes	42

Chapitre 3

Tableau III.I. Valeur du potentiel de mi-activation et facteur de pente des mutations de glycine à alanine.....	54
Tableau III.II. Valeur du potentiel de mi-activation et facteur de pente pour les mutations simples des graphiques de charges de « gating » déplacées dépendant du voltage pour les mutations de glycine à alanine.....	57
Tableau III.III. Valeur du potentiel de mi-activation et facteur de pente des mutants exprimés en ovocytes.....	61
Tableau III.IV. Valeur du potentiel de mi-activation et facteur de pente de mutations de glycine à proline.....	64
Tableau III.V. Valeur de potentiels de mi-activation et facteur de pente pour les mutations simples des graphiques Q(gating) vs V pour les mutations avec I384N.....	68
Tableau III.VI. Potentiel de mi-activation et facteur de pente des mutations multiples. La mutation G381A-I389G, n'a pas été fusionnelle (NF).....	71
Tableau III.VII. Valeur de potentiels de mi-activation et facteur de pente pour les mutations faites au canal NaChBaC.....	75

Liste de Figures

Chapitre 1

Figure 1. Illustration de la barrière d'énergie d'une membrane lipidique.	3
Figure 2. Schéma illustratif des différentes sortes de canaux ioniques.	4
Figure 3. Canal Kv 1.2 de la famille Shaker.	7
Figure 4. Modèle moléculaire du canal Shaker K.	8
Figure 5. Régions transmembranaires du Kv 2.1, canal chimère pagaie.	10
Figure 6. Connexion entre le segment S4-S5 du senseur de voltage et le segment S6 du pore.	12
Figure 7. Séquence d'alignement du S45L de Shaker et hERG. Image de Claydon et al. 2010.	13
Figure 8. Modèle structurel du couplage mécanique des segments L45 et S6 en hKv1.5.	14
Figure 9. Pore et Senseur de voltage du canal Kv 1.2.	15
Figure 10. A. l'interface S1-pores dans la structure de la chimère pagaie.	16
Figure 11. Modèle de transmission de forces en canaux Kv.	17
Figure 12. Région P constituée par les acides aminés D431-T449 du canal Shaker.	20
Figure 13. Le pore de conduction ionique des canaux potassique (KcsA).	20
Figure 14. Représentation de la structure d'une sous unité du canal NaChBac.	22
Figure 15. Sous unités du canal Kv1.2.	27
Figure 16. Linéarisation du lien S4-S5 de différents canaux potassiques et du NaChBac.	29

Chapitre 2

Figure 17. Schéma du montage expérimental pour la technique du Patch Clamp.	39
Figure 18. Protocoles appliqués pour l'étude du canal Shaker.	41
Figure 19. Protocole appliqué pour l'étude du canal NaChBaC.	41
Figure 20. Schéma du système d'amplification du «cut-open oocyte».	43
Figure 21. Exemple de soustraction.	46
Figure 22. Schéma du montage expérimental pour la technique de « cut open voltage clamp ».....	47
Figure 23. Protocole appliqué pour la mesure du courant de « gating » avec la technique du « cut-open voltage clamp » et le courant de « gating » enregistré du mutant WT (ZH4IR-W434F-PBSTA).	49
Figure 24. Protocole appliqué pour la mesure du courant ionique avec la technique du « cut-open voltage clamp » et le courant ionique enregistré du mutant WT (ZH4IR-M356C-T449Y-PBSTA).	50

Chapitre 3

Figure 25. Schéma de l'hélice S45L où sont montrées les positions des glycines en étude.	52
Figure 26. Enregistrements de mutations où la glycine est mutée en alanine..	53
Figure 27. Conductance dépendant du voltage pour des mutations simples du mutant témoin, G381A, G386A et G397A.	55
Figure 28. Dépendance du voltage du temps d'activation des mutations simples G381A, G397A et G386A.	55
Figure 29. Graphique de la dépendance du voltage de la conductance pour la double mutation G381A-G386A.	56
Figure 30. Dépendance du voltage du temps d'activation des mutations WT et G381A-G396A	56

Figure 31. Enregistrement de courant “gating” de mutations simples G386A, G381A et G397A.....	57
Figure 32. Charge de « gating » déplacée pour les mutations de glycine à alanine.....	58
Figure 33. Charge de « gating » déplacée pour les mutants à la position G397.	59
Figure 34. Temps (τ_1 et τ_2) d’activation des mutations de glycine à alanine.	59
Figure 35. Temps de désactivation du senseur de voltage.	60
Figure 36. Enregistrements de mutations simples où la Glycine est mutée en Proline.....	61
Figure 37. Dépendance du voltage de la conductance des mutations simples du mutant témoin, G381P et G386P.....	62
Figure 38. Dépendance du voltage du temps d’activation des mutations simples G381P et G386P.	63
Figure 39. Enregistrement de courant “gating” de mutations simples G386P et G381P.....	64
Figure 40. Charge de « gating » déplacée pour les mutations de glycine à proline.	65
Figure 41. Temps d’activation et d’inactivation du courant de « gating » pour les mutations de glycine à proline.	66
Figure 42. Dépendance en voltage du temps désactivation du senseur du voltage des mutations de glycine à proline.	66
Figure 43. Enregistrements de courant “gating” de mutations doubles avec la mutation I384N.	67
Figure 44. Charge de « gating » déplacé pour les mutants I384N, G381P-I384N, G381A-I384N et G386A-I384N.	68
Figure 45. Dépendance en voltage du temps d’activation (τ_1 et τ_2) du senseur du voltage des mutations I384N, G381A-I384N, G381P-I384N et G386A-I384N.	69

Figure 46. Dépendance en voltage du temps desactivation du senseur du voltage des mutations I384N, G381A-I384N, G381P-I384N et G386A-I384N.....	70
Figure 47. Enregistrement de la mutation G386A-L389G.....	71
Figure 48. Dépendance du voltage de la conductance pour la mutation double du mutant témoin et G386A-L389G.....	72
Figure 49. Dépendance en voltage du temps d'activation pour la mutation G386A-L389G.....	73
Figure 50. Enregistrement de courant ionique de mutations P142A, P128A et R132G du canal NaChBaC.....	74
Figure 51. Dépendance du voltage de la conductance des mutants WT (NaChBac), P128A, P142A et R132G.....	75
Figure 52. Dépendance du voltage du temps d'activation et d'inactivation des mutations WT (NaChBaC), P128A, P142A et R132G.....	76

Liste des abréviations

-A-

ATP : Adenosine triphosphate
 AND : Acide désoxyribonucléique
 ARN : Acide ribonucléique

-C-

C : Capacitance électrique

-D-

DMEN : « Dulbecco's Modified Eagle's Medium »

-F-

F : Acide fluorhydrique

-G-

G: Acide aminé glycine

GV : Conductance électrique dépendant du voltage

GS : « Guard shield »

-H-

HV : « Holding potential »

-I-

I : Courant électrique

-K-

K : L'ion potassium

-M-

MES : Acide méthane sulfurique

-N-

NF : Non fonctionnel

-P-

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

-R-

R : Résistance électrique

RS : Série de résistances

-V-

V : Voltage

-W-

WT : « Wild-type »

...A mi mamá, pues todo lo que soy y lo que puedo llegar a ser es gracias a lo que ella sembró en mí.

Remerciements

Je voudrais remercier spécialement le Dr. Rikard Blunck, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné l'opportunité de faire partie de son groupe de travail. Je le remercie également pour sa surveillance attentive tout au long de l'évolution de ce projet, pour sa patience et sa disponibilité inconditionnelle pour ses étudiants. Je suis fière d'avoir fait partie de son groupe de recherche.

Je tiens également à remercier mes partenaires de laboratoire pour leur collaboration tout au long de mon parcours, spécialement Mireille Marsolais pour son aide avec la biologie moléculaire.

Je veux remercier Élise Faure et Hugo McGuire pour leur collaboration avec la correction du français de mon mémoire. Je veux remercier spécialement Nicolas Groux pour son aide précieuse avec les corrections du français (pas seulement de mon mémoire) et mon amie Elodie Bordeaux pour sa collaboration importante, même si la biophysique n'est pas son fort. Je veux remercier Patricia Morales pour m'avoir aidée à mesurer la distance entre résidus avec pymol.

Je tiens également à remercier précieusement Michel Brunet qui, avec son excellent travail technique, son expérience et sa créativité a construit des outils pour compléter les montages expérimentaux. Sans son aide, notre travail aurait été bien plus compliqué.

J'aimerais remercier le groupe GEPROM, professeurs et étudiants qui génèrent une atmosphère de travail amicale, dynamique et coopérative.

Finalement, je veux remercier ma famille, Federico et Elisa, étant cette petite voix derrière mon dos m'encourageant à chaque moment tout au long de mon parcours.

1. Introduction

Les membranes biologiques constituent une barrière sélective entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (organite). Elles présentent donc la propriété de perméabilité sélective, qui permet de contrôler l'entrée et la sortie des différentes molécules et ions entre le milieu extérieur et celui intérieur. Cela permet à chaque organite cellulaire, mais également à la cellule tout entière d'avoir une composition propre différant de celle extérieure.

En elles-mêmes, les membranes ne sont perméables qu'aux petites molécules hydrophobes (O_2 , N_2 , glycérol,...), par diffusion simple. Mais elles servent de support à de nombreuses protéines transmembranaires ayant pour rôle de réguler les échanges transmembranaires, en rendant possible non seulement la communication entre les deux côtés de la membrane, mais aussi la génération de signaux biologiques (Alberts et al., 2002).

Une cellule est essentiellement constituée, d'une membrane lipidique imperméable compose d'un double feuillet de phospholipides, de protéines membranaires et des organites. Les modifications de potentiels membranaires sont attribuables aux changements conformationnels de protéines membranaires, appelées canaux ioniques et pompes ioniques. Ces changements produisent des variations de la perméabilité sélective de la membrane aux ions (Latorre, Lopez, Bezanilla et Linas, 1996)

Les pompes ioniques utilisent l'énergie produite par l'hydrolyse d'ATP pour faire passer certains ions à travers la membrane. Par exemple, la pompe Na^+/K^+ permet d'établir les gradients de concentration ionique en expulsant Na^+ et en faisant pénétrer K^+ dans la cellule (Bear et al, 2001).

Les canaux ioniques sont des protéines qui contrôlent le passage d'ions et donc

la perméabilité de la membrane cellulaire (Latorre, Lopez, Bezanilla et Linas, 1996). Ils agissent comme portes qui se ferment ou s'ouvrent en fonction d'un stimulus. Ils régissent des processus importants tels que l'excitation des nerfs, des muscles, la sécrétion d'hormones et de neurotransmetteurs, la transduction sensorielle et l'équilibre osmotique. Les canaux ioniques dépendants du potentiel sont responsables de la génération du potentiel d'action et jouent un rôle important dans le soutien du potentiel de repos dans les cellules neuronales.

Cette étude concerne sur la flexibilité existante dans le lien entre le senseur et le pore (S45L) et le rôle de cette flexibilité dans le couplage électromécanique du senseur de voltage et le pore des canaux potassiques et la façon dont le senseur de voltage transfère l'énergie au pore pour l'amener à l'ouverture. L'introduction débutera avec une discussion sur les canaux ioniques. On abordera aussi le fonctionnement du senseur de voltage et le filtre de sélectivité. Cette révision de la littérature établira les bases théoriques suffisantes pour pouvoir introduire le lecteur dans l'étude des canaux Shaker et NaChBac. Ensuite, nous rappellerons le rôle des glycines dans le fonctionnement des protéines et nous terminerons avec une explication sur l'objet de l'étude.

1.1. Canaux ioniques

Les particules polaires ne peuvent pas passer à travers la membrane cellulaire comme le font les particules liposolubles. Elles le font grâce à des structures protéiques appelées canaux ioniques, lesquelles se comportent comme pores d'eau entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

La présence d'un ion dans une membrane lipidique est normalement très peu probable étant donné l'énorme barrière d'énergie créée par un environnement hydrophobe au centre de la membrane (Parsegian, 1969). Les protéines

membranaires peuvent réduire la barrière d'énergie à un niveau très faible pour le passage des ions dans une membrane. La **Figure 1** illustre la barrière d'énergie qui doit être franchie par un ion K^+ , passant de l'environnement de constante diélectrique élevée, comme l'eau à un milieu de faible constante diélectrique, comme la membrane lipidique ainsi que dans un pore aqueux pour arriver à traverser la membrane et dont le diamètre est de 3 Å (Honig 1986, Roux et al. 2000).

Un canal fonctionnel à travers la membrane est un assemblage de sous-unités semblables qui forment un pore. Les canaux ioniques sont des protéines qui à l'état ouvert, ils permettent la diffusion d'ions d'un côté à l'autre de la membrane, en fonction du gradient électrochimique. Alors, le flux d'ions à travers un canal est dit passif. En fait, il n'y a pas de dépense énergétique du côté de la cellule, la direction et l'intensité du flux sont déterminées seulement par le gradient électrochimique.

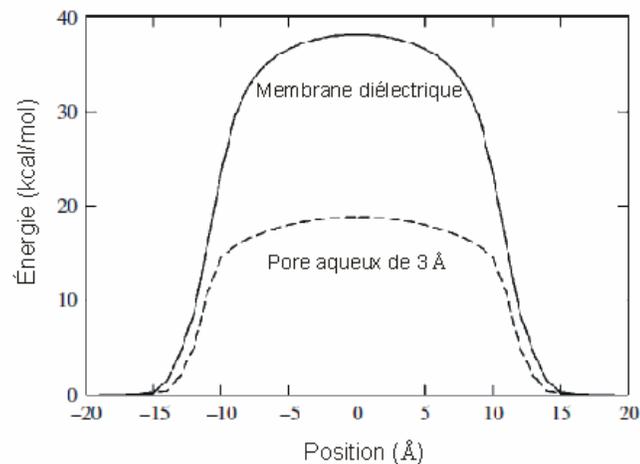


Figure 1. Illustration de la barrière d'énergie d'une membrane lipidique. Trait continu : passage d'un ion K^+ à travers la membrane. Trait pointillé: ce même passage, mais dans un pore aqueux dont le diamètre est de 3 Å. Adapté de Roux et al. (2000)

Le gradient électrochimique est composé de deux grandes forces qui permettent aux ions de traverser la membrane :

- Le gradient chimique est donné par la différence de concentration ionique des deux côtés de la membrane. Dans ce cas où il est thermodynamiquement favorable en absence d'autres forces, la migration d'une particule s'effectue du milieu ayant la plus grande concentration vers le milieu qui a la plus basse concentration. (Bear, Connors et Paradiso, 2002).
- Le gradient électrique. Puisque les charges opposées s'attirent mutuellement, la migration d'une particule de charge déterminée vers une région de charge opposée s'effectue selon le gradient de potentiel électrique (Bear, Connors et Paradiso, 2002).

Les canaux ont trois propriétés importantes : la conduction ionique, la sélectivité ionique, l'ouverture et la fermeture en réponse à des stimuli électriques, chimiques ou mécaniques.

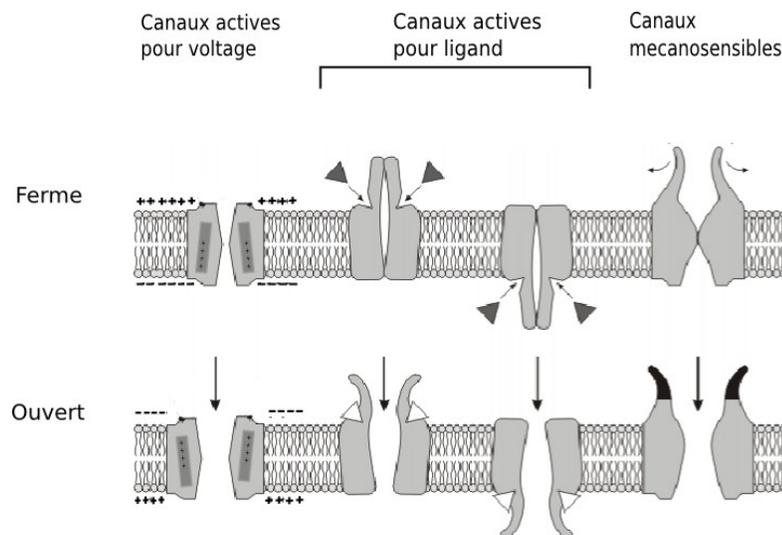


Figure 2. Schéma illustratif des différentes sortes de canaux ioniques. (Image pris de Romer, Sala, Gómez et Marquez, 2008)

Les canaux ioniques peuvent être classés selon le type de stimuli qu'il faut pour les ouvrir (voir **Figure 2**) :

- Canaux activés par le ligand
- Canaux mécanosensibles
- Canaux activés par le voltage
- Une combinaison par exemple BKca

Les canaux activés par le voltage sont exprimés dans tout l'organisme et sont importants pour les processus physiologiques, comme il a été dit précédemment. Il y a différentes sortes de canaux activés par le voltage, comme Na_v^+ , K_v^+ , Ca^{2+}_v et CL^-_v . Le présent travail sera centré sur les canaux potassiques activés par le voltage.

Les canaux potassiques sont en général complètement inactivés au potentiel de repos et ne s'ouvrent qu'à partir d'une certaine valeur de potentiel de membrane, que l'on appelle le seuil d'activation (Hille, 2001). Compte tenu du gradient électrochimique de l'ion potassium, l'ouverture de ces canaux va se traduire par une sortie massive de potassium qui entraîne le potentiel de membrane vers des valeurs négatives, causant ainsi la repolarisation des cellules. Les courants potassiques et sodiques déterminent la forme, la durée et la fréquence des potentiels d'action grâce à leur seuil d'activation qui se situe à des potentiels voisins de celui du seuil d'activation des potentiels d'action (Hodgkin et Huxley, 1952).

La mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*) est la clé qui a permis de connaître la topologie et la fonction des canaux Kv (Chandy and Gutman, 1993). L'identification du premier canal potassique voltage-dépendant est la conséquence de l'étude électrophysiologique du mutant Shaker de la *Drosophila melanogaster*. Pour ce mutant, les courants potassiques s'inactivent

plus rapidement que ceux des canaux natifs, ce qui indique que la mutation était localisée dans un gène qui encodait un canal potassique. Depuis, plus de 200 gènes qui encodent divers canaux potassiques ont été étudiés. Chez les mammifères, les gènes correspondant à ces canaux ont été identifiés et classés en quatre sous-familles: Kv1 (Shaker), Kv2 (Shab), Kv3 (Shaw) et Kv4 (Shal). D'autres gènes ont été clonés et dans chaque sous-famille (Kv1 à Kv9), une nomenclature permet de nommer les différents gènes codant pour des sous-unités de la même sous-famille (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3...) (Chandy and Gutman, 1993).

Les canaux de la famille Shaker sont formés de quatre sous-unités (voir **Figure 3**), chaque sous-unité possède six segments transmembranaires S1-S6. Quant aux extrémités amine et carboxyle, elles sont placées du côté intracellulaire. La région qui constitue le pore et le filtre de sélectivité est délimitée pour les segments S5-S6 qui sont attachés par la région P. Le domaine P des canaux potassiques a une séquence d'acides aminés qui est hautement conservée TTYGYG. Les mutations dans cette séquence provoquent la perte de sélectivité aux ions de K (Heginbotham et al., 1994; Aiyar et al. 1996).

Les sous-unités forment une structure homotétramérique (les quatre sous-unités sont codées par le même gène). S4 est chargé positivement. Parce qu'il contient des arginines et des lysines à tous les 3 résidus, le segment S4 a la fonction d'être le senseur de voltage du canal. La force du champ électrique sur les charges provoque le mouvement du senseur S4 qui est présumé couplé à l'hélice S6. Ce mouvement de S4 permet au canal de s'ouvrir et de se fermer (Pathak et al., 2005; Smith-Maxwell et al., 1998).

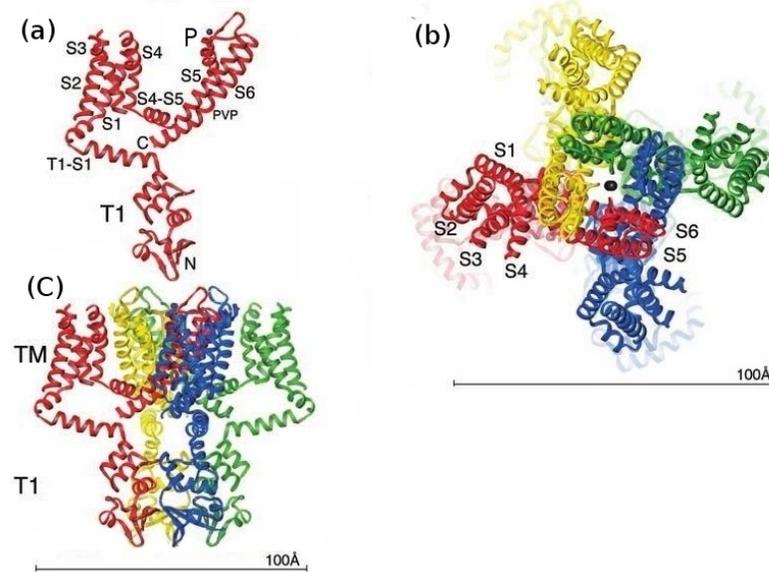


Figure 3. Canal Kv 1.2 de la famille Shaker. (a) Figure montrant une sous unité que comprend les segments transmembranaires S1-S6, la région P entre S5 et S6 et le domaine T1. (b) Structure homotétramérique vue depuis le côté extracellulaire, où il est possible de voir le pore du canal. (c) Structure homotétramérique vue de côté, la partie extracellulaire est en haut et la partie intracellulaire en bas.

1.1.1. Senseur du voltage et couplage électromécanique

Tel qu'il a été mentionné précédemment, les canaux ioniques dépendants du voltage sont composés d'un pore entouré de quatre senseurs de voltage. Chaque senseur de voltage a deux points de contact importants avec le pore qui sert d'interface, un proche de la partie extracellulaire du segment S1 et l'autre du côté intracellulaire avec S4 (Tao et al. 2010). Les senseurs du voltage changent leur conformation en réponse à une dépolarisation cellulaire. Ce changement est possible grâce au segment S4, car il contient des arginines et des lysines intercalées entre les résidus hydrophobes (Noda et al., 1984; Hille, 2001; Aggarwal et Mackinnon, 1996; Seoh et al., 1996). Les mutations dirigées en diminuant la charge positive dans cette région a résulté en la perte

de sensibilité aux changements de potentiel qui activent le canal (Papazian et Cols, 1991 ; Mackinnon et Aggarwal, 1996).

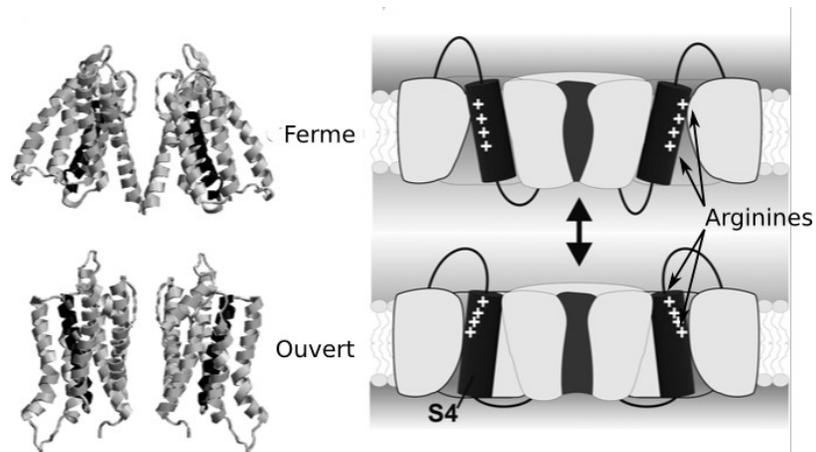


Figure 4. a. À gauche, modèle moléculaire du canal Shaker K en configuration fermée en haut et ouverte en bas. Le senseur de voltage S4 est montré en noir. À droite, le schéma du modèle du transporteur, le senseur de voltage se trouve dans une cavité aqueuse à l'état ouvert ou fermé. Le déplacement de charges (arginines) dans le segment S4, est produit par une dépolarisation de la membrane. (Images modifiées de Blunck, Chanda et al. 2005).

Quand la cellule est polarisée, le potentiel de repos de la cellule est négatif par rapport à l'extérieur, alors les charges positives du segment S4 sont orientées vers l'intérieur de la cellule. Lorsqu'il se produit une dépolarisation, la polarisation cellulaire est inversée et les charges positives du segment S4 sont attirées vers l'extérieur de la cellule. Le déplacement de ces particules chargées dans le segment S4 est appelé courant de « gating » avec les charges R 1-R4 comme constituants majeurs de ce courant et les charges négatives en S2 et S3 modulent l'activité (Armstrong CM et Bezanilla, 1973, Armstrong & Bezanilla, 1974). Les données obtenues pour Tao et ses collègues avec mutagenèses ponctuel ont montré, que la liaison-cation faite pour le résidu à la position 5 (la cinquième charge de S4, K5 dans la **Figure 5C**) dans le site occlus est requise pour l'ouverture de pore. Ce site est donné pour les charges résiduelles négatives que forment les ponts d'hydrogène avec les charges

positives (F, E et D). En fait, ils forment un site occlus obligatoire dans le senseur du voltage (voir **Figure 5C**) (Tao et al. 2010).

Pour déterminer de quelle façon le senseur de voltage bouge, il doit être clair que le senseur de voltage est dynamique, flexible et hautement sensible à l'environnement (Roux et al. 2008). Il y a eu différents modèles de mouvement du segment S4. Dans le modèle « *vis hélicoïdale* », le S4 tourne au tour de son axe en même temps qu'il avance, changeant ainsi l'exposition de ses résidus du côté intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Ce mouvement serait par contre limité dans la membrane. Ainsi, le fait que des charges se déplacent dans la membrane n'implique pas que l'hélice doive bouger beaucoup dans la membrane. Bien qu'il y ait eu une certaine controverse faisant suite au modèle du « *pagaie* » de Mackinnon (Jiang et al., 2003), les charges en périphérie du canal sont enfouies dans la membrane. Cette dernière implique un large mouvement de S3-S4. Comme un corps rigide dans la membrane, le mouvement est entre 15-20 Å. Dans le modèle de « *transporteur* » un déplacement de charges dans le segment provoque un mouvement de rotation et une petite inclination du segment S4 de chaque sous-unité. (Cha et al., 1999; Bezanilla, 2000, 2002, 2005; Horn, 2002).

Les études récentes suggèrent que le mouvement du senseur peut être vu comme une combinaison des trois modèles proposés. Posson et Selvin (2008) ont mesuré les déplacements du senseur du voltage avec « Luminescence Resonance Energy Transfer (LRET) » et ont trouvé que le segment S4 est déplacé $10 \pm 5 \text{ \AA}$ avec une composante verticale de $5 \pm 2 \text{ \AA}$, un mouvement tangentiel $21^\circ \pm 11$ le long du périmètre du canal, avec une composante radiale de 0° . S3 a un mouvement en direction opposé à S4 de $2 \pm 1 \text{ \AA}$ et S3-S4 ne se déplacent pas comme un corps rigide (contrairement au modèle de pagaie). S2 a un déplacement de 4 \AA en direction opposé à S4.

Il y a une partie du senseur qui reste presque fixe (S1, S2 et S3a) avec une charnière flexible entre S3a et S3b et une partie mobile (S3b, S4 et S45L) qui a un mouvement de rotation, déplacement et inclinaison de la pagaie vers S1 et S2 (Mackinnon et al. 2010, Tao et al. 2010).

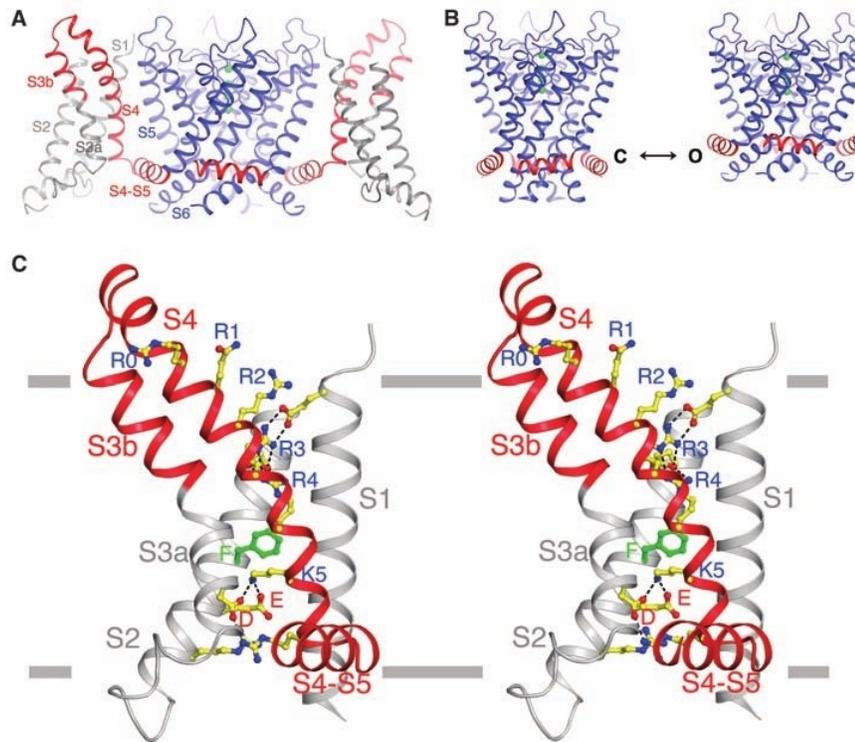


Figure 5. A. Régions transmembranaires du Kv 2.1, canal chimère pagaie-Kv 1.2. Vu de côté. Le pore est en bleu et le senseur de voltage pagaie en rouge (S3b, S4 et S45L). La partie statique du senseur de voltage est en gris (S1, S2 et S3a). B. Représentation (Ribbon) du pore et S45L dans la conformation hypothétique fermée (C) et ouvert (O). Dans l'état ferme les hélices S45L sont poussées vers le bas pour maintenir leurs contacts avec le pore. C. Senseur du voltage et l'hélice S45L dans la conformation ouverte. Les résidus chargés de S4 (R1-R4 et K5) et les charges résiduelles négatives qui forment les ponts d'hydrogène avec les charges positives (F, E et D) forment un site occlus obligatoire dans le senseur du voltage. Ils sont présentés comme des bâtons et colorés en fonction des types d'atomes (carbone jaune, bleu l'azote; rouge l'oxygène et vert, la phénylalanine) Image prise de Tao et al. 2010.

Résidus dans la séquence qui englobe la partie C-terminale de S4 à la partie N-terminale de S5 interagissent avec des résidus spécifiques dans la partie C-terminale de S6 et son extension, où la porte intracellulaire est située (Lu et al. 2001).

Lu et al. (2002) ont souligné deux séquences (LGRTLKASMRELGLL) de S45L et (PVPVIVSNFNIFY) de la partie COOH-terminal de S6 comme parties clé de la structure du canal Shaker qui permettent au senseur de voltage de contrôler l'activation de l'entrée intracellulaire. Le S45L est une hélice- α amphipathique qui est disposée parallèlement au plan intérieur de la membrane cellulaire. Cette hélice passe sur la partie supérieure interne de l'hélice S6 de la même sous-unité où plusieurs acides aminés font contact avec elle. Alors, S6 joue le rôle de récepteur du S45L. L'hélice S6 des canaux de potassium contient la séquence PXP, où X est F, G ou n'importe quel acide aminé. Puis ces configurations permettent à l'hélice S6 d'avoir la courbe nécessaire pour une bonne interaction avec le S45L (voir **Figure 8**). Cette interaction entre le S45L et l'hélice S6 est très importante pour le couplage du mouvement du senseur de voltage et l'ouverture et la fermeture du pore (Long, et al. 2005 ; Swartz et al. 2006 ; Labro et al. 2004, 2010 ; Tristani-Firouzi et al. 2005). Cet effet a été démontré par des mutations dans la séquence PXP de l'hélice S6 et dans S45L de canaux Shaker en trouvant que ces mutations ont des effets significatifs sur le « gating » ; effet qui peut être décrit comme un découplage du senseur et du pore (Yellen et al. 1997, Firouzi T. et al. 2006).

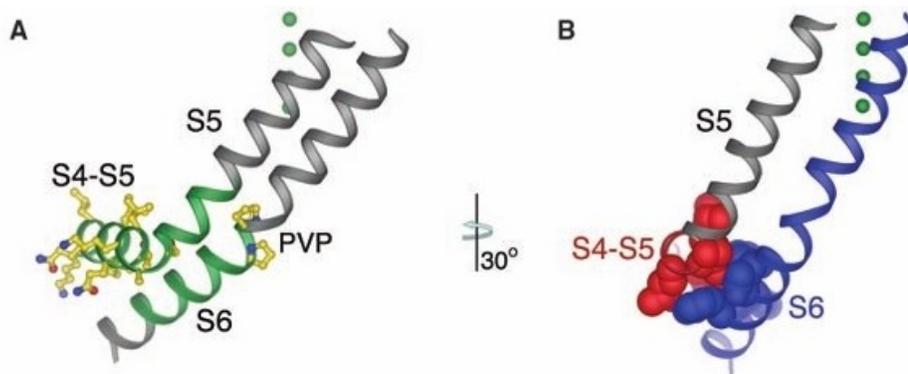


Figure 6. Connexion entre le segment S4-S5 du senseur de voltage et le segment S6 du pore. **A.** L'intérieur de S6 (résidus de 388-421), le S45L et S5 de la même sous-unité (résidus 311-342) sont montrés en vert. En jaune est présentée la séquence PVP. Les chaînes latérales de S45L sont présentées en jaune pour le carbone, rouge pour l'oxygène et bleu pour l'azote. **B.** Résidus de S45L en contact direct avec S6. Image extraite de Long, et al. (2005).

Tao et collègues ont montré qu'il y a un site d'occlusion donné pour les charges résiduelles négatives (F, E et D) que forment les ponts d'hydrogène avec les charges positives. Ils ont également montré que la liaison faite pour le résidu à la position 5 de S4 (K5 dans la **Figure 5C**) dans le site d'occlusion est requise pour l'ouverture du pore (Tao et al. 2010).

Dans l'étude que Labro J. et al (2009) ont menée sur les canaux potassiques dépendants du voltage, ils ont trouvé que la configuration hélicoïdale de S6 est nécessaire pour la création d'une fissure de S6 dans laquelle le segment S45L réside (**voir Figure 8**). Les résidus à l'interface de contact sont les plus susceptibles de compenser le couplage mécanique. Tandis que les résidus d'accompagnement jouent un rôle de stabilisation et de structuration en orientant correctement le segment S45L et la partie c-terminal de S6. (Sanguinetti et al. 2002, 2004, Labro J. et al. 2009). Batulan et collègues (2010) ont démontré avec mutagenèses ponctuels et « voltage clamp fluorometry » qu'il y a une interaction entre la partie C-terminal de S45L et le S5 (Glu395 et Leu398) d'une sous-unité avec la partie C-terminal de S6 de la sous-unité

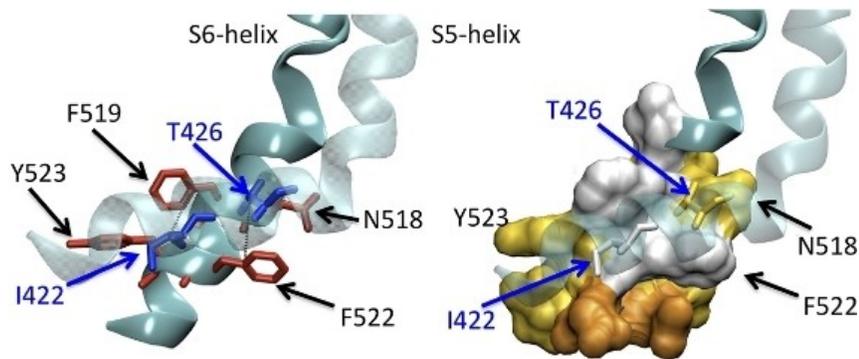


Figure 8. Modèle structurel du couplage mécanique des segments S45L et S6 en hKv1.5. Les résidus I422 et T426 de S45L sont montrés en bleu. Les résidus que forment la fissure en S6 sont montrés en rouge. À la droite : Les même résidus, les couleurs sont d'accord à la hydrophobicité, le blanc pour les plus hydrophobes et le orange pour les hydrophiles. Image extraite de Labro J. et al. (2009)

Les domaines S1-S4 se trouvent dans le coin du pore, adjacents aux hélices qui forment le pore (voir **Figure 9A**). Les deux premiers résidus d'Arg en S4 sont à 45 et 64 Å respectivement de la sous-unité adjacente (distance mesurée entre les C_{α}) (Long, et al. 2005). La structure cristalline et mutagenèse ont montré des contacts physiques entre les résidus du côté extracellulaire de la membrane de S4 (S357) du senseur du voltage et S5 (E418) du pore. Cependant, cette interaction est faible (voir **Figure 9B**). (Sivaprasadarao A. et al. 2003)

Dans la conformation de pore ouvert, les résidus d'Arg qui se trouvent dans S4 sont placés de telle façon que deux se trouvent vers la partie externe du senseur du côté lipidique et les deux autres interagissent avec S1 et S2 (ponts salins) (voir **Figure 9C**).

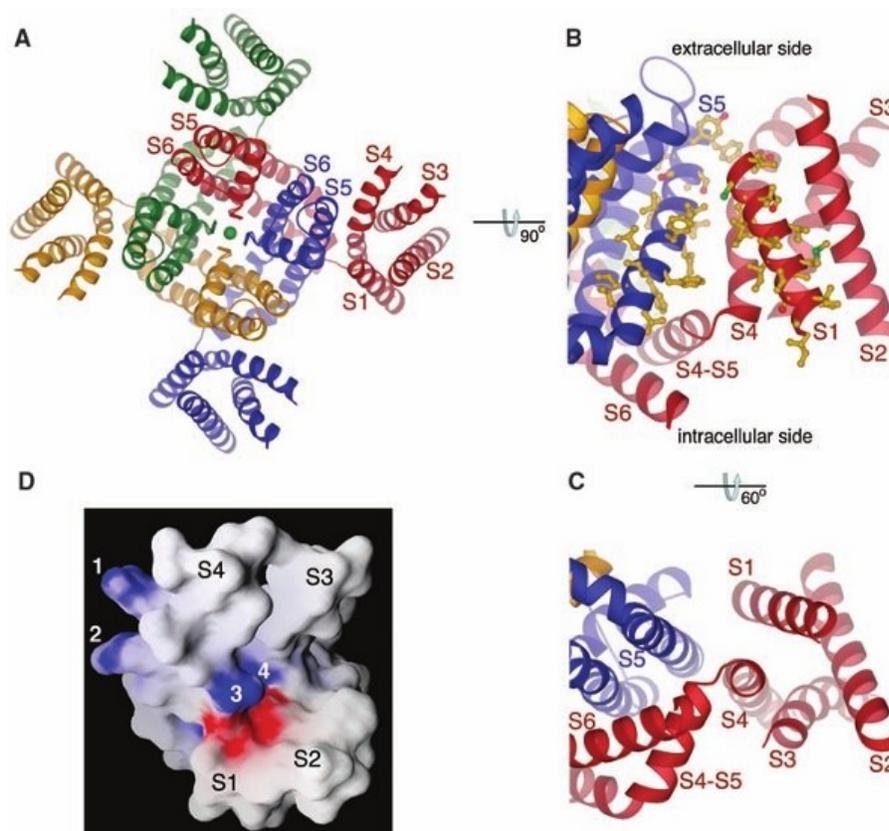


Figure 9. Pore et Senseur de voltage du canal Kv 1.2. **A.** Vu du côté extracellulaire, chaque sous-unité est colorée de la même couleur. **B.** Les chaînes de résidus de S1 et S5 de sous-unités voisines sont présentées. **C.** Senseur de voltage, domaine S1-S4 sans le pore. **D.** Interactions des résidus Arg avec S1 et S2. En bleu les charges positives et en rouge les charges négatives.

L'interface S1-pores comprend trois résidus de l'hélice du pore (I361, P362 et F365, la numérotation est basée sur Kv1.2) et deux de l'hélice S1 (C181 et T184) (voir **Figure 10A**) (Mackinnon et al 2009 et Tao et al. 2010). Des études montrent que mutations des trois résidus (I361, P362 et F365) sur le côté du pore qui fait l'interface avec S1 rendent les canaux non fonctionnels ou montrent des effets prononcés sur le « gating ». (Swartz KJ et al 2000, MacKinnon et al 2002, Mackinnon et al 2009). Dans une étude de mutagenèse de Trp de Shaker, Miller et ses collègues ont montré que C245 dans Shaker a un impact important sur le « gating » du canal. Le C245 (C181 dans Kv1.2) est l'un des deux résidus sur S1 qui forme l'interface S1-pore, l'autre résidu est le T248

(T184 dans Kv1.2). Le résidu final C-terminal testé sur S1 a été L246 (L182 dans Kv1.2). (voir **Figure 12A**) (Miller et al 2000). Mackinnon et ses collègues ont fait des expériences avec mutagenèses ponctuel en canaux Shaker (L246W, E247W, T248W, et L249W), (L182, E183, T184, et L185, respectivement, en Kv1.2). Les courants ioniques qui ont été mesurés montrent que la mutation E247W a un impact important sur le « gating » du canal, car le potentiel de mi-activation a une différence de 50 mV par rapport au WT . Le résidu E247 n'est pas un point d'interface mais il forme un pont salin avec une Arg (charge « gating ») de S4 (**Figure 10B**). Le grand impact de la mutation E247W découle probablement de la déstabilisation de l'état ouvert en excluant la formation d'un pont salin observée dans la conformation ouverte de la structure cristalline (Mackinnon et al. 2009).

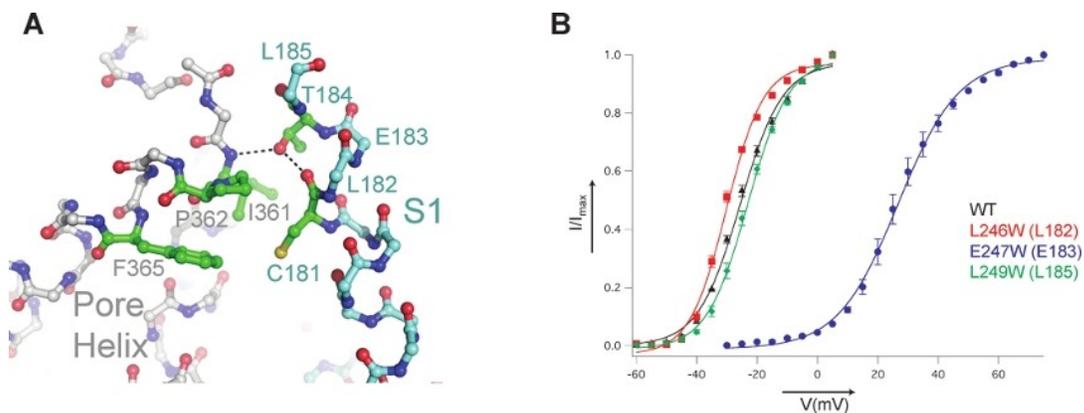


Figure 10. A. l'interface S1-pores dans la structure de la chimère pagaie (PDB ID: 2R9R). Les hélices-pores sont indiqués en gris et S1 est présenté en cyan. Les résidus qui font contact sont montrés en vert. B. Moyenne des courants ioniques à incréments de 5-mV, normalisé et adapté à une courbe de Boltzmann. Le résidu correspondant dans Kv1.2 est indiqué entre parenthèses. Image sortie de Mackinnon et al (2009)

Pour bien comprendre le rôle de cette interphase, on peut se baser sur la structure cristalline et les études fonctionnelles associées qui ont conduit à l'hypothèse suivante sur la façon dont s'effectue le mouvement du senseur de voltage. Le senseur du voltage a une moitié fixe (S1, S2, et S3a) et une moitié mobile (S3b, S4 et S4-S5 linker) (Mackinnon et al. 2005, 2007 et 2008). Dans

cette hypothèse, le champ électrique dans la membrane exerce une force sur les acides aminés chargés de S4. Cette force produit un mouvement de la moitié mobile du senseur du voltage : S3b-S4 est supposé avoir un mouvement sur une charnière située entre S3a et S3b et exercer une force sur le linker S4-S5. Le lien S4-S5 resserre (ferme) ou dilate (ouvre) l'hélice S6 vers l'entrée du pore. Dans cette perspective, l'interface S1-pore peut servir à garder la moitié fixée du senseur du voltage avec le pore, permettant ainsi un transfert plus efficace de la force par le senseur de voltage sur l'entrée du pore (voir **Figure 11**) (Mackinnon et al 2009, Tao et al.2010).

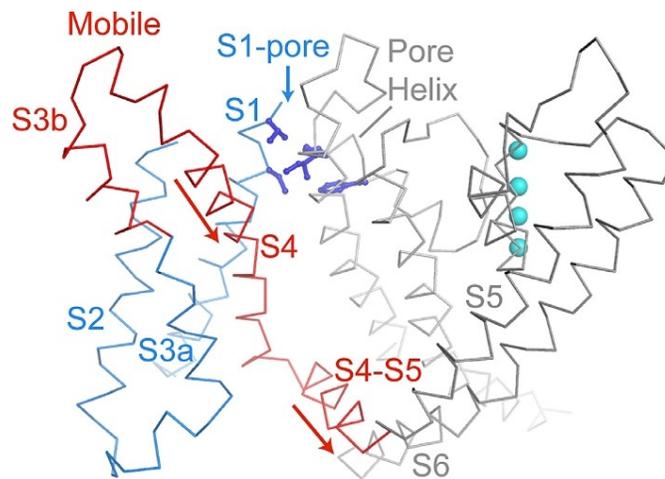


Figure 11. Modèle de transmission de forces en canaux Kv. Les composantes mobiles du senseur de voltage sont montrées en rouge et les composantes statiques sont montrées en bleu. La région du pore est montrée en gris. Les résidus que forment l'interface S1-pore sont montrés en bleu foncé. Les ions de potassium sont montrés comme balles bleues. Image pris de Mackinnon et al 2009.

Batulan et al. (2010) ont proposé un model cinétique de 5-états pour les canaux Shaker.



Des simulations des courants de gating obtenus à partir d'une série de dépolarisations utilisant Matlab ont été employées pour créer cet modèle de 5

étapes. Les deux premières transitions ont été des transitions avec transport de charge, avec un ratio de 0.45 pour ($C \leftrightarrow A1$) et 0.55 pour ($A1 \leftrightarrow A2$) de la charge totale. Les deux dernières transitions ($A2 \leftrightarrow A3 \leftrightarrow As$) étaient électro-neutres et représentent des étapes finales du couplage électromécanique. Dans cet article, des courants de « gating » mesurés expérimentalement dans le canal non conducteur de W434F et les canaux avec des mutations à l'interface entre le lien de S4-S5 et S6 ont été insérés dans ce modèle. Comme prévu par le modèle, il y avait 2 transitions dépendantes de voltage, représentant $C \leftrightarrow A1$ et $A1 \leftrightarrow A2$. Cependant, la dernière transition, $A3 \leftrightarrow As$, a semblé montrer la dépendance de voltage également, qui contraste avec le modèle, lequel décrit que les dernières transitions sont électro-neutres. Cette dernière transition, qui précède l'ouverture de canal, représente la stabilisation d'état ouverte qui résulte des interactions des quelques acides aminés situés à l'interface entre le lien de S4-S5 (R394, E395, L398) et S6 adjacent (Y485).

On peut décrire la cinétique du senseur du voltage comme un processus qui se réalise en plusieurs étapes. Le début serait le mouvement du senseur dû au déplacement de charges dans S4 suivi par la dépolarisation de la membrane cellulaire. Les autres étapes seraient le déplacement dû au couplage électromécanique entre le senseur et le pore que fini pour activer le pore.

1.1.2. Sélectivité ionique de canaux potassiques

Le pore est formé par la région **P** qui attache les deux segments S5-S6 et par la région peptidique qui lie les segments S4-S5 (Lopez et al., 1994 ; Yellen et al., 1991 ; Choi et al., 1993 ; Heginbotham et al., 1994). La partie interne du pore est formée par la région peptidique qui attache les segments S4-S5 et la région cytoplasmique des segments S5 et S6. La partie externe du pore est formée par la région **P** et la partie extracellulaire des segments S5 et S6. La région **P** est

constituée de 19 acides aminés (D431-T449, **Figure 12**). Elle s'introduit à l'intérieur de la membrane en formant le pore (Yool et Schwartz 1991).

Les premiers huit acides aminés et les trois derniers sont placés à l'entrée du pore. La région centrale du **P** présente une séquence VTMTTV (438-443) où le point le plus proche du côté intracellulaire est occupé par la position T441 de **P** (Heginbotham et Mckinnon, 1990-1992 ; Salkoff et al., 1992 ; Hille, 2001 ; Grissmer et al. 1994).

La séquence TMTTVGYGD (439-447) qui se trouve dans la région **P** est conservée dans la plupart de canaux potassiques. Pour cette raison, elle est considérée comme étant une séquence clef du filtre de sélectivité (Heginbotham et al., 1994, Makinnon 2003). Il est aussi connu que deux acides aminés de la région centrale de **P** (F433 et T441) jouent un rôle important dans la sélectivité ionique du canal Shaker car les mutations en ces positions ont un effet significatif sur la sélectivité du canal (Yool et Schwarz 1991).

Le passage des ions de K^+ par le filtre de sélectivité se fait de la façon suivante : les groupements carbonyles des acides aminés de TTVGYG sont alignés pour stabiliser les ions de K^+ (Noskov et al, 2004 ; Mackinnon et al. 1999), car les ions de K^+ sont déshydratés dans le filtre de sélectivité où les groupements carbonyles des acides aminés peuvent remplacer efficacement les molécules d'eau d'ion hydratée. Les ions plus petits ou divalents ne sont pas bien stabilisés donc il reste une barrière d'énergie qui empêche le passage de ces ions par le filtre de sélectivité. Pour les ions de K^+ , la barrière est pratiquement nulle. Quand il y a plus d'un ion dans le filtre de sélectivité, la force de répulsion entre les charges aide le passage des ions en poussant l'ion suivant. Cet effet et le fait que la barrière d'énergie soit presque nulle font que la conduction soit favorisée (Allen et al, 2000; Makinnon, 2003; Roux, 2005).

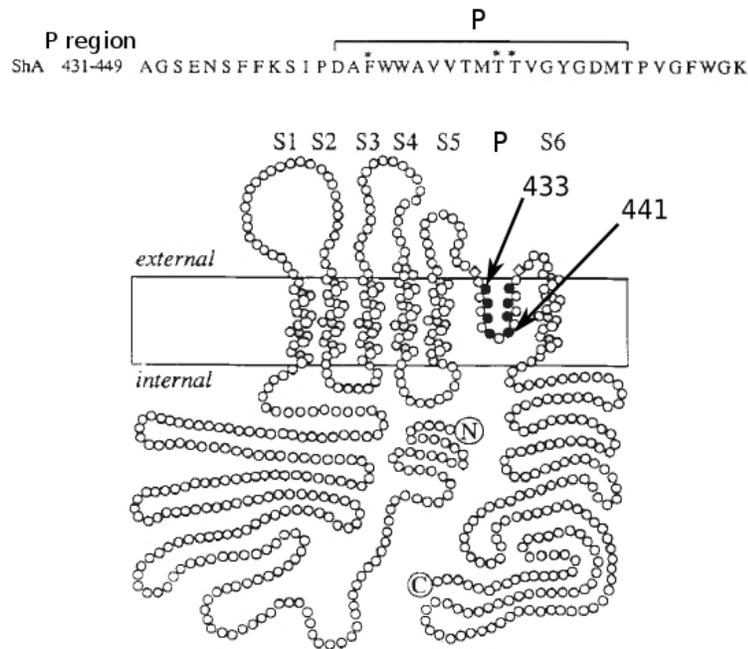


Figure 12. Région P constitué par les acides aminés D431-T449 du canal Shaker. En haut, la séquence de la région P. En bas, le schéma représentatif d'une sous-unité, où sont montrées en noir les positions des acides aminés importants pour la sélectivité des canaux potassiques dépendants du voltage (Image modifié de Yool et Schwarz 1991).

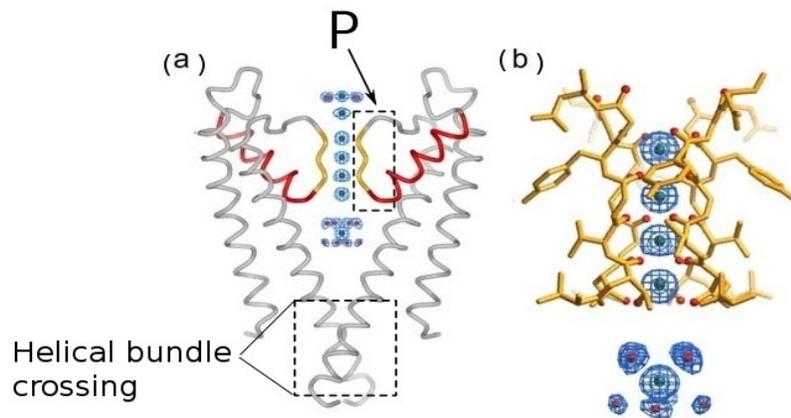


Figure 13. Le pore de conduction ionique des canaux potassiques (KcsA): (a) Le côté extracellulaire de la membrane est haut, en jaune. Il montre le *filtre de sélectivité*. En bas se trouve le « *helical bundle crossing* ». (b) Un rapprochement du filtre de sélectivité où est représenté le passage des ions à travers le filtre de sélectivité. Les images sont prises et modifiées de MacKinnon (2003).

Il y a une autre région très importante outre le filtre de sélectivité ionique du canal potassique (**Figure 13**), cette région est appelée « helical bundle crossing ». Cette « gate » est contrôlée par le voltage et le segment S45L. Ce croisement d'hélices empêche les ions de la traverser (Doyle et al., 1998; Long et al., 2005; Meuser et al., 1999; Perozo et al., 1998). Pour permettre le passage des ions K^+ , il faut que le « helical bundle crossing » change de conformation quand les ions de K^+ sont en train de passer par le filtre de sélectivité, en passant d'une conformation empêchant le passage des ions K^+ à une autre permettant la conduction (Blunck et al., 2006; Cordero-Morales et al., 2006; Chakrapani et al., 2007; Chakrapani et al., 2007). Selon Cordero-Morales et al., (2006b), les hélices de cette région pourraient se déplacer latéralement par au moins 9Å pour permettre la conduction des ions de K^+ . Zimmer et al. (2006) ont montré une ouverture totale de 20 à 30 Å avec des résultats de diffraction en solution aux rayons X et aux neutrons.

1.2. Canal NaChBaC

Le canal NaChBaC est de notre intérêt parce que sa structure est semblable au canal Shaker et présente des caractéristiques opposées au modèle à étude.

Le NaChBaC est formé par quatre sous unités et chaque sous unité a six segments transmembranaires S1-S6, les extrémités amine et carboxyle sont localisées du côté intracellulaire. La région qui forme le pore et le filtre de sélectivité est délimitée par les segments S5-S6 qui sont attachés par la région P (voir **Figure 14**). Ces sous-unités forment une structure homotétramérique comme le Shaker. Le segment S4 a la fonction d'être le senseur de voltage (Ren et al, 2001).

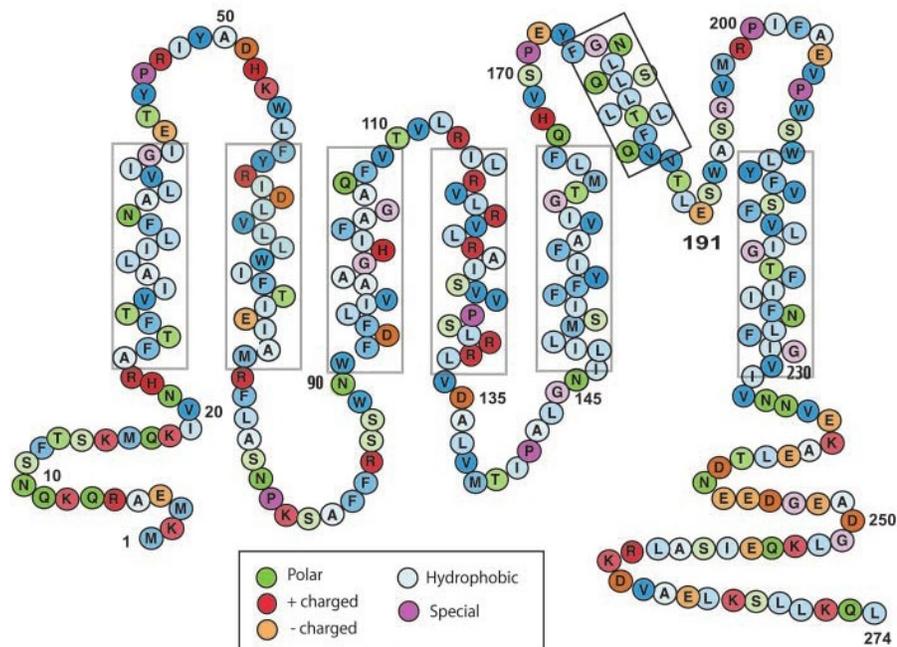


Figure 14. Représentation de la structure d'une sous-unité du canal NaChBac. Il montre les acides aminés qui le composent (274). Les couleurs représentent les propriétés des acides aminés. (Yue, Navarro, Ren, Ramos et Clapham, 2002)

Malgré la similitude entre les deux canaux, dans ce canal il y a seulement une glycine (G145) et deux prolines en positions proches aux glycines du lien S4-S5 du canal Shaker. C'est la raison pour laquelle cela est considéré un cas spécial, si on le compare au modèle à l'étude dans ce travail.

1.3. Rôle de la glycine dans la structure et fonctionnement des protéines transmembranaires

La glycine (G) est le plus petit et le seul acide aminé non chiral. Sa fonction en tant qu'élément de protéines transmembranaires a été longuement étudiée par divers groupes de recherche. Il est maintenant reconnu que c'est un acide aminé

très important au niveau structurel et fonctionnel des protéines transmembranaires (Lemon et Engelman, 1994).

La glycine a deux propriétés connues qui la rendent importante quant à la constitution des protéines membranaires:

- Petite taille : cela donne la possibilité de rapprochement des hélices (Lemon et Engelman, 1994 ; Javadpou et al., 1999 ; Russ et Engelman, 2000 ; Engelman et al, 2001).
- Flexibilité : l'absence d'une chaîne latérale augmente la liberté de mouvement car elle donne une tolérance spatiale (Chou et Fasman, 1974). Ce manque d'une chaîne latérale lui permet d'accepter les angles de liaison beaucoup plus extrêmes que d'autres acides aminés. Elle joue donc un rôle clé en permettant une large gamme de conformations de protéines, sans que cela implique une grande dépense d'énergie. (Li et Deber, 1992 ; Bright et Sansom, 2003)

Il y a deux facteurs qui contribuent aux interactions favorables des glycines dans les interfaces, les deux résultant de l'absence d'une chaîne latérale. Le premier facteur est tout simplement lié à la complémentarité entre les chaînes latérales de résidus. Les résidus avec des chaînes latérales volumineuses peuvent bien se lier avec des résidus de glycine, et la glycine elle-même peut faire des liens avec les glycines d'autres hélices. Le deuxième facteur qui contribue aux interactions favorables des glycines, est que l'absence d'une chaîne latérale expose le squelette peptidique polaire de l'hélice. Le squelette carbonyle et les groupes méthylène supportent des charges partielles. De plus, des interactions de charges complémentaires dans un faible environnement diélectrique de membrane peuvent représenter une « driving force » importante pour l'association des hélices. En fait, la charge partielle sur le squelette et les

groupes carbonyle NH eux-mêmes représentent la « driving force » pour la formation de la structure secondaire en hélices. (Smith et al., 1999).

La glycine peut fonctionner comme un cran moléculaire qui stabilise les transitions feuillet-feuillet (Smith et al., 1999, 2002, 2005). La grande incidence de résidus glycine en points de transition d'hélices peut contribuer à une grande distribution d'angles des liens entre hélices transmembranaires, où la grosseur de résidu et la flexibilité de l'union définissent l'angle (Smith et al., 1999; Bowie 1997).

La glycine fonctionne comme une charnière flexible (Parent et al, 2006), car elle est souvent trouvée dans les transitions hélice α -feuillet β . Elle a une haute préférence pour les feuillets β . La glycine se trouve souvent dans la région transmembranaire, ce qui facilite les interactions entre hélices. Ce fait a été démontré par simulations de dynamique moléculaire (Bright et al., 2002, Bright et Sanso, 2003). Elle facilite l'union entre hélices puis favorise la formation de surfaces de *Van der Waals* en permettant les interactions dipolaires des atomes qui forment l'épine dorsale de molécules polypeptidiques.

Il existe une grande variété de motifs de séquences où la glycine sert de médiateur de dimérisation. Ces motifs ont au minimum une glycine et sont hautement hydrophobiques. Les études sur les crémaillères de glycine ont montré l'implication de ces crémaillères dans les interactions entre hélices (Bowie et al., 2005). Des motifs comme GXXXG et GXXXGXXXG sont fréquemment retrouvés dans l'association d'hélices transmembranaires et sont présumés impliqués dans des associations de haute affinité. Le motif GXXXG est considéré comme une marque pour la dimérisation d'hélices transmembranaires (Engelman et al., 1999 ; Bowie et al., 2005). Le rôle de la glycine dans l'association d'hélices transmembranaires est due au fait qu'elle permet des interactions plus étroites hélice-hélice. Les études faites autour du

motif GXXXG suggèrent l'existence d'une grande gamme d'interactions énergétiques entre hélices (Degrado, 2004). La glycine dans cette configuration sert à maximiser la surface d'interaction hélice-hélice dans le voisinage du motif GXXXG et à favoriser la formation de ponts C α H-amide carbonyle et H-ponts (Senes et al., 2001). Mackenzie et al. (1997), dans une étude sur le domaine transmembranaire de GpA avec RMN ont suggéré que les résidus de glycine ont un effet de dimérisation pour trois raisons: 1) pour fournir une surface pour faire paquets d'hélices (contacts de van der Waals), 2) pour permettre la proximité entre hélices et 3) par l'entropie des chaînes latérales. Le manque d'atomes de chaîne latérale dans la glycine a comme conséquence de n'entraîner aucune perte d'entropie de chaîne latérale lors de la dimérisation à ces positions, un effet moins déstabilisant relativement à la plupart des autres acides. Alors, le motif GXXXG peut être considéré comme un cadre pour la dimérisation des hélices transmembranaires. La surface fournie par les résidus de glycine peut servir comme un modèle pour de nombreuses combinaisons possibles des chaînes latérales d'autres positions inter-faciales qui agissent comme déterminants de spécificité (Engelman et al 2000).

À cause de ces caractéristiques des glycines, elles peuvent servir de pivot (pour sa petite taille) et de charnière (à cause de sa flexibilité).

1.3.1. Caractéristiques de la proline

La proline est un acide-amine protéinogénique pour qui son α -amine est une amine secondaire plutôt qu'une amine primaire comme pour les autres acides-amines. La proline peut agir en brisant les hélices α , car elle ne peut former de liaison hydrogène (du fait de son amine secondaire) parce que la proline manque un atome d'hydrogène sur le groupe amide. Il ne peut donc pas agir comme un donneur de liaison hydrogène, seulement comme un accepteur de

liaison hydrogène. Il déstabilise l'hélice α ou forme une bifurcation dans les feuille- β . Ainsi, la proline agit comme un perturbateur structurel au milieu des éléments de structure secondaire, tels que les hélices- α et feuillet- β . (Mayo et al. 2006). La proline est généralement trouvée comme le premier résidu d'une hélice- α et aussi dans les brins bord des feuille- β . (Conte Camerino et al. 2001; Klein et al. 2008).

La structure cyclique particulière de la chaîne latérale de la proline bloque l'angle dièdre du épine dorsal à environ -70° en donnant à la proline une rigidité exceptionnelle de conformation en comparaison aux autres acides-aminés. Par conséquent, la proline perd moins entropie conformationnel lors du pliage, ce qui peut rendre compte de sa prévalence plus élevée dans les protéines d'organismes thermophiles (Klein et al. 2008; Yaliraki et al. 2006; Mayo et al. 2006).

1.4. Justification du travail et objectifs de l'étude

Comme il a été précédemment mentionné, les canaux potassiques dépendants du voltage sont formés de quatre sous-unités, chacune possédant six segments (S1-S6) et une boucle (p-loop) qui se trouve entre le cinquième et le sixième segment au niveau du pore. Il est connu que le segment S4 subit un mouvement de rotation et d'inclination lorsque le potentiel membranaire change. Pour ouvrir le canal, il est nécessaire de transférer l'énergie du senseur du voltage (généralisé pour les charges positives de S4) au pore mais ce transfert n'est pas instantané.

Dans le S45L, trois glycines sont trouvées en positions différentes G381, G386 et G397 (GX₄GX₁₀G). Dans la structure cristalline de Kv1.2 (Long et al., 2005), la position de la première glycine sur la boucle se situe entre S4 et S45L, et la

dernière glycine où S5 est alignée avec le S45L. Ces glycines (mais pas leur position exacte) sont conservées pour tous les canaux potassiques dépendants du potentiel, comme le montre la **Figure 16**. Ces glycines sont présumées donner une certaine flexibilité au segment S45L, lequel est présumé être un point clé pour le couplage électromécanique des canaux potassiques dépendants du potentiel.

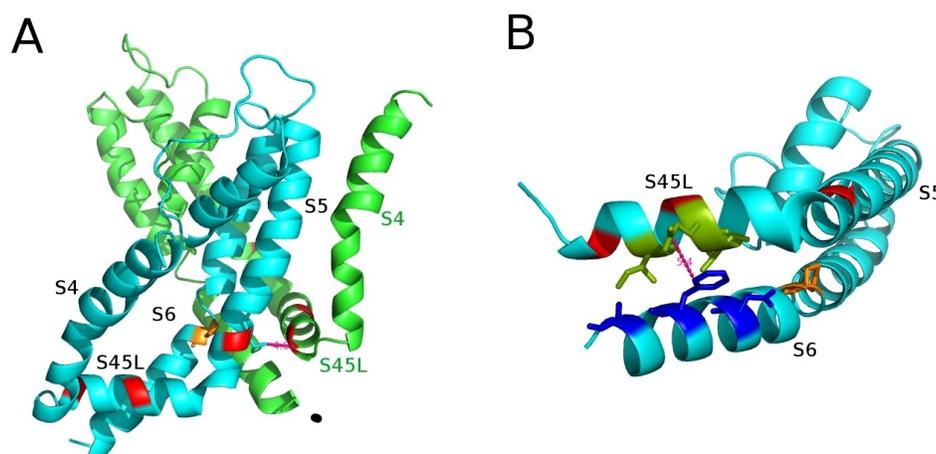


Figure 15. A. Deux sous-unités du canal Kv1.2. En rouge sont montrées les glycines G313, G318 et G329. En orange est montré la proline du segment S6. En rose est mesurée la distance entre la glycine correspondant à G313 et L330 de S5 de la sous-unité adjacente. B. Les interactions entre S45L et S6 de la même sous unité.

Selon la proximité de résidus, qui a été mesurée avec le programme pymol, la glycine dans la première position G313 (G381 par shaker) aurait plus de probabilité d'interagir avec le résidu leucine dans la position L330 (L398 par le shaker) de S5 de la sous unité adjacente, juste à côté de la troisième glycine du segment S45L, G329 (G397 par shaker) (Voir **figure 15. A**). En fait, cette leucine est le résidu le plus proche. La distance entre G313 et L330 est de 4.6 Å. Cette première glycine (G313 ou G381 en shaker) a 91.5% de rotamer #1(mesurée avec le programme pymol). Cette mesure peut donner une

idée de l'importance de cette glycine dans la flexibilité du segment, puis fournit l'information sur les degrés de liberté du résidu dans cette position.

Le résidu Q319 de S45L, juste à côté de G318 (G386 en shaker) a plus de probabilités d'interagir avec F416 de S6 de la même sous unité, avec une distance de séparation de 5.4 Å. (Voir **figure 15. B.**)

En partant du fait que la glycine a des propriétés qui lui confèrent un rôle important dans la structure et le fonctionnement des protéines transmembranaires, notre hypothèse est que ces glycines servent de charnière flexible dans le processus de couplage électromécanique des segments S4, S5 et S6 en aidant au transfert d'énergie du senseur au pore.

Notre objectif est de déterminer si les glycines présentes dans le segment S45L des canaux potassiques jouent réellement un rôle important dans le transfert d'énergie entre le senseur de voltage et le pore. Si elles le font, de quelle façon le font-elles.

Dans ce but, on a étudié le rôle de chacune des positions des glycines dans le transfert d'énergie du senseur au pore. Dans les mutations où les glycines sont changées pour des alanines dans deux positions simultanément, on veut étudier la possibilité de coopérativité entre elles. Pour étudier comment le couplage électromécanique avec le pore affecte le mouvement du senseur, les mutations avec I384N ont été réalisées, car cette mutation coupe l'effet de l'ouverture du pore sur le mouvement du senseur. Pour finaliser, a été réalisée l'étude du NaChBac qui a été considéré comme un modèle opposé au nôtre. Les prolines du lien S4-S5 ont été mutées par une alanine et postérieurement par une glycine. On espérait que ces mutations puissent faciliter le transfert d'énergie.

En accord avec les données obtenues, on veut construire une théorie sur le fonctionnement des canaux potassiques dépendants du voltage, qui soit un complément des théories existantes.

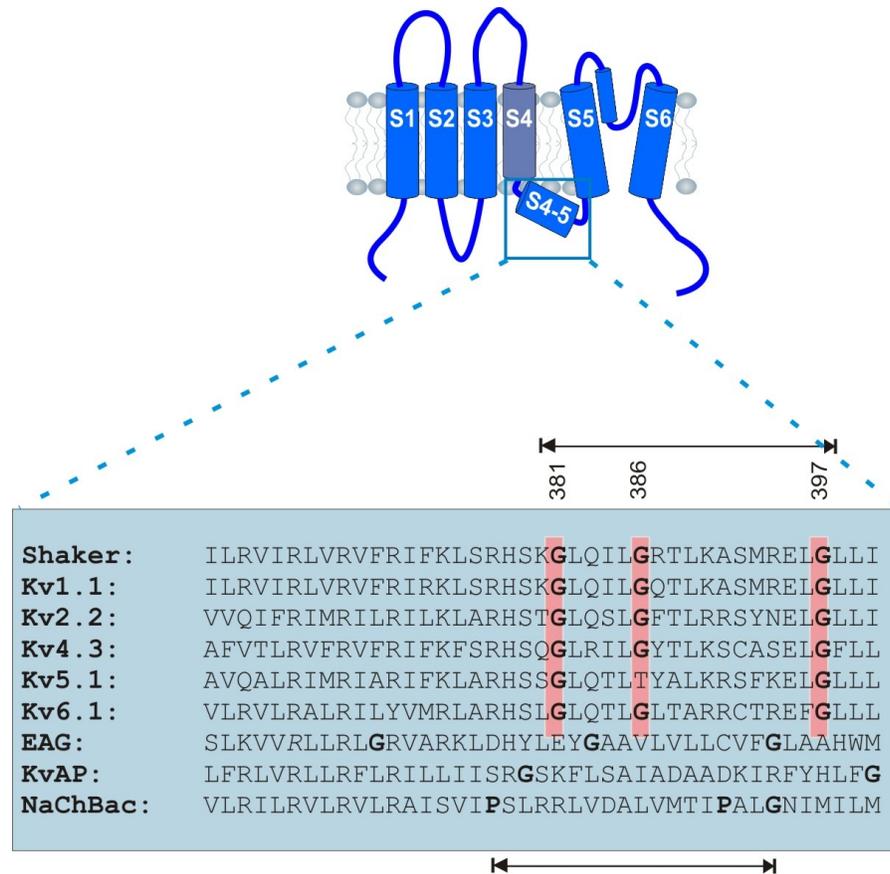


Figure 16. Linéarisation du lien S4-S5 de différents canaux potassiques et du NaChBac. Il est montré que la position des glycines est conservée dans la plupart des canaux potassiques. Le NaChBac a deux prolines qui sont en positions proches des positions des glycines par les canaux potassiques et à juste une glycine proche de la position de la troisième glycine de canaux potassiques.

2. Matériels et méthodes

Dans le premier chapitre, on a expliqué les techniques d'électrophysiologie qui sont utilisées dans le cadre du présent travail.

Le chapitre débutera avec une présentation des mutations réalisées, continuera avec les techniques de biologie moléculaire. Ensuite, suivra une section sur le traitement et la culture cellulaire, ainsi que sur les techniques d'insertion de l'ADN et de l'ARN dans les cellules utilisées. Une explication de la méthodologie des techniques électrophysiologiques utilisées va être donnée, comme le « Patch Clamp » et le « Cut-Open oocyte ». Le chapitre se terminera avec un bref rapport sur la méthode d'analyse appliquée.

2.1. Mutations réalisées

Les mutations qui ont été utilisées comme témoin pour les expériences sont :

- **zH4-41-eGFP-42-pcDNA3** (pour l'expression en cellules HEK et COS-1). L'eGFP (« enhanced green fluorescent protein ») a été introduit entre les résidus 41 et 42 de la séquence du canal Shaker H4 pour pouvoir identifier les cellules dans lesquelles la mutation est exprimée. Le pcDNA3 est un vecteur promoteur de CMV (cytomégalovirus), pour l'expression dans les cellules mammifères.

- **zH4IR-W434F-pBSta** (pour l'expression en ovocytes, « gating current »). La mutation W434F a été introduite pour empêcher la conduction ionique du canal (Cha et Bezanilla. 1997).
- **zH4IR-M356C-T449Y-pBSta** (pour l'expression en ovocytes, courant ionique et fluorescence). La mutation M356C est introduite dans la partie supérieure de S4 pour avoir un lieu de liaison avec les fluorophores. T449 réduit l'inactivation de « type C » et augmente la sensibilité au TEA (Cha et Bezanilla. 1997).
- **NaChBac-pTracer** (expression en cellules HEK). Le NaChBac est un canal sodique dépendant de voltage de « Bacillus halodurans ». Le canal a été sous cloné dans le vecteur pTracer, qui contient aussi l'eGFP « enhanced green fluorescent protéine » sous un deuxième promoteur.

Les trois premières constructions ont servi à produire mutants Shaker (canaux potassiques), alors que la dernière a servi à produire est le mutant NaChBac (canaux sodique). Toutes les mutations qui ont été faites sont montrées dans les **Tableau II.I**, qui sont divisés en fonction du vecteur utilisé pour les mutations.

PCDNA3	Mutations simples	G381A
		G386A
		G397A
	Mutations doubles	G381A-G386A
		G386A-L389G
		G381A-I384G
P-Tracer	Mutations simples	P128G
		P142G
		P128A
		P142A
		G219P
pBSta	Mutations Simples avec W434F	G381A
		G386A
		G397A
		G381P
		G386P
		G397P
	Mutations doubles avec W434F	G381A- I384N
		G386A- I384N
		G381P- I384N
		G386P- I384N
	Mutations Simples avec M356C-T449Y	G381A
		G386A
		G397A
		G381P
		G386P
	Mutations doubles avec M356C-T449Y	G381A- I384N
		G386A- I384N
		G381P- I384N
		G386P- I384N

Tableau II.I. Mutations réalisées. La division du tableau est faite selon le vecteur utilisé.

2.2. Techniques de biologie moléculaire et mutagenèse

PCR (Réaction en chaîne par polymérase) : Cette technique de biologie moléculaire permet d'obtenir un grand nombre de copies d'un fragment d'ADN particulier, en partant d'une quantité minimale (théoriquement un seul fragment est suffisant).

La réaction en chaîne par polymérase est possible grâce à la propriété de l'ADN polymérase de répliquer les chaînes d'ADN en utilisant des cycles thermiques alternants pour séparer les chaînes d'ADN, en donnant ensuite la possibilité de se joindre de nouveau aux polymérases afin qu'une duplication se fasse. Ce processus est répété en fonction du nombre de cycles qui sont réalisés, créant ainsi une réaction en chaîne (Horton et al., 1990).

Application de PCR et transformation bactérienne : La mutagenèse ponctuelle de l'ADN a été introduite dans les vecteurs en étude par PCR, via la trousse QuickChange XL (Stratagene, New England BioLabs, CA).

Après avoir digéré l'ADN parental grâce à l'enzyme DpnI, les bactéries compétentes XL1-blue sont transformées avec 50 ng d'ADN, pour avoir ainsi une augmentation du nombre de copies de l'ADN.

L'augmentation de bactéries a été vérifiée en plaques d'agar-ampicilline, qui ont été en incubation pendant 12-16 heures à 37°C. L'extraction de l'ADN muté se fait en utilisant la trousse QIAfilter Plasmid Midi (Qiagen, Mississauga, ON). La vérification est faite par séquençage automatisé.

La matrice d'ADN qui est contenue dans un plasmide circulaire est linéarisée en utilisant l'enzyme de restriction NotI.

La purification de l'ADN qui sera soumis postérieurement au traitement enzymatique (digestion avec enzymes de restriction ou «transcription in vitro») a été faite par une extraction en phénol-chloroforme et chloroforme-isoamyl (24 :1). La précipitation a été faite avec sodium acétate (3M, pH 5.2) et 200µl d'éthanol 100%. Ensuite est réalisée une sédimentation des acides nucléiques avec la centrifugeuse. Le précipité a été lavé trois fois avec l'éthanol 70% et finalement suspendu dans 20 µl d'eau nucléase-free.

En utilisant ensuite la trousse de transcription mMessage T7 mMachine (Ambion, Austin, TX), est obtenu l'ARNm. Une fois obtenu, il faut vérifier son poids moléculaire et son intégrité sur du gel d'agarose 1 % (révélé au bromure d'ethidium). La quantification de sa concentration finale se fait par absorbance. Le stockage des aliquotes de 6 µl avec une concentration entre 0.5-1 µg/ µl s'est fait à -80°C.

2.3. Expression d'ADN et d'ARN

L'expression de l'ADN et de l'ARN mutés a été réalisée dans les cellules dans lesquelles a été introduit l'ADN par transfection et dans les ovocytes auxquels a été introduit l'ARN par injection. Les processus de culture des cellules et des ovocytes ainsi que les processus d'insertion de l'ADN et de l'ARN mutés seront expliqués avec plus de détails dans les sections suivantes.

2.3.1. Culture cellulaire et transfection

Les cellules utilisées sont:

- HEK, qui est une lignée cellulaire d'origine de cellules rénales embryonnaires humaines.
- COS-1, ligne cellulaire dérivée de cellules CV-1, dérivées elles-mêmes à partir du rein d'un singe mâle adulte (singe vert d'Afrique).

Les cellules ont été incubées à 37°C avec 5 % de CO₂ en “Dulbecco's modified Eagle's medium” (DMEM) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal et pénicilline-streptomycine (100 unités / ml, 100 µg / ml). Avec l'intention de maintenir la ligne cellulaire disponible, les cellules ont été séparées chaque fois que la confluence était de 70 % -80 %.

Un jour avant la transfection, les cellules ont été divisées pour avoir une concentration de 2×10^5 cells/ml et ont été incubées en milieu libre d'antibiotiques (DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal) pendant 12 heures. Avant la transfection (20 min) le milieu cellulaire est changé avec « Reduced serum Medium » (OPTI-MEM) pour réduire la quantité de sérum dans la solution et par conséquent, dans la membrane cellulaire et pour augmenter l'efficacité de la transfection.

Les cellules ont été transfectées avec le mutant. La lipofectamine 2000 (Invitrogen) a été utilisée pour introduire 1µg de l'ADN dans les cellules (la quantité d'ADN varie dépendamment du mutant).

24 hors après la transfection, les cellules étaient prêtes à être étudiées. Les cellules ont été trypsinisées pour les enlever des puits, centrifuge et elles ont été mises dans la solution extracellulaire utilisée pour les expériences. Elles ont été utilisées pendant 2-3 jours. L'efficacité de la transfection a été entre 80%-90% et cette mesure a été basée sur le nombre de cellules qui ont exprimé le GFP.

2.3.2. Ovocytes de grenouille *Xenopus leavis*

La grenouille *Xenopus leavis* est originaire des marais et étangs d'Afrique situé

au sud du Sahara. Cette grenouille pond de 1×10^4 - 4×10^4 ovocytes. Nos grenouilles sont élevées et gardées en eau statique (ancien système), eau de la ville, à température pièce décolorée pendant 24 heures. Les grenouilles sont nourries 2 fois par semaine et le bac d'eau est changé par la suite.

Le nouveau système (système Techniplast) fait un pré-traitement de l'eau avant de la mettre dans le système Techniplast. L'eau est filtrée. De plus, il y a un filtre bactérien naturel. L'eau est en circulation continue avec mesure du pH, de la température et de la conductance.

La grenouille a été anesthésiée par immersion dans un bain avec de la tricaine pendant 5-10 min maximum. Une opération est réalisée par la suite pour extraire les lobules ovariens, qui sont ensuite transférés dans une solution « Barth » (90 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.82 mM MgSO₄, 0.41mM CaCl₂, 0.33 mM Ca(NO₃)₂ et 5 mM Hepes)

Pour enlever la membrane folliculaire les ovocytes sont lavés avec « Barth » sans calcium et sont immergés dans « Barth » sans calcium avec la collagénase (1mg:100ml) et incubés sous agitation pendant environ 20-30 min. Il faut ensuite les laver 8 fois avec « Barth » sans calcium, trier et incuber à 18°C dans une solution de «Barth antibio» (Barth supplémenté avec pénicilline (100U/ml), Streptomycine (100mg/ml), Kanamycine (10mg/100ml), sodium pyruvate (2.5mM) et sérum de cheval 5%). Une heure après, ils sont prêts pour l'injection.

2.3.3. Injection de l'ARN

L'expression fonctionnelle des canaux est faite au stade V et VI des ovocytes. Précédemment a été préparée la solution à injecter en aliquotes de 10 µl (avec une concentration de 1 µg/µl d'ARNm, cette concentration varie

dépendamment du mutant). Un volume de 46 nl (avec une concentration de 0.5-1µg/µl dépendant du mutant) est injecté dans les ovocytes, puis ils sont incubés à 12°C pendant 1-3 jours (pour mieux conserver la membrane, puis il y a l'expression de protéines mais l'incorporation à la membrane est bloquée à 18 °C). Les ovocytes sont sortis de l'incubateur avant les expériences et laissés à température de la pièce environ 20 °C, pendant deux heures, temps pendant lequel les protéines s'incorporent à la membrane (Loots et al. 2000 (JGP)).

2.4. Enregistrement de courant ionique des canaux exprimés en cellules

L'enregistrement des courants ioniques des mutants qui ont été exprimés dans les cellules a été réalisé dans l'ensemble par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière.

2.4.1. Application de la technique de « Patch clamp »

Un jour après la transfection, les cellules sont extraites du puits en utilisant la trypsine, puis sont ensuite centrifugées pendant trois minutes à 3200 rev / min pour enlever le milieu de culture et pouvoir ajouter la solution externe (voir **Tableau II.II**) avec laquelle les expériences ont été réalisées.

20 µl de la solution sont ajoutés avec les cellules dans une chambre de travail. Il est nécessaire d'attendre 20 min pour que la décantation soit terminée. Quand les 20 min sont passées, 2 ml supplémentaires de solution externe sont ajoutés. Une électrode en verre finement étirée et remplie de solution interne (voir **Tableau II.II**) est introduite dans la chambre contenant les cellules pour mesurer sa résistance (d'environ 6 MOhm).

Ensuite suit le processus pour obtenir la configuration cellule entière. Une fois la configuration cellule entière et la compensation faites, la cellule est élevée du fond afin qu'elle reste suspendue sans toucher les murs de la chambre, pour éviter les vibrations du montage et est appliqué le protocole pour canaux potassiques dépendants du potentiel en enregistrant la réponse de la cellule. Nous mesurons ainsi les courants macroscopiques de K (dans la **section 2.4.3** sont représentés les protocoles appliqués).

Patch-clamp		
<i>Interne</i>		<i>Externe</i>
<i>Shaker</i>	<i>NaChBaC</i>	<i>Shaker-NaChBaC</i>
145 mM KOH-MES	145 mM NMDG-F	145 mM NaOH-MES
5mM NaCl	5mM Choline-Cl	5mM KCl
10 mM Hepes	5 mM EGTA	10 mM Hepes
1mM EDTA	10 mM Hepes	1mM CaCl ₂
10 mM Glucose		10 mM Glucose
PH 7		
MES (Acide méthane sulfurique)		
F (Acide fluorhydrique)		

Tableau II.II. Solutions utilisées pour le travail avec les cellules.

2.4.2. Montage expérimental

- *Microélectrodes* : les microélectrodes utilisées ont été faites avec des capillaires de verre de borosilicate (OD 1.5 mm, ID 1.17 mm, GC150TF-10, Harvard) qui ont été étirés avec un étireur vertical (PP-830, Narishige Group), en deux cycles, le premier pour l'étirer et le deuxième pour créer la pointe finale.

- *Système d'isolation électrique et mécanique* : l'isolation mécanique s'est faite grâce à une table anti-vibration (Kinetic systems, vibraplane #1201-02-11). Le microscope et le micromanipulateur sont situés sur cette table. Une cage de faraday protège tout ce système des ondes électromagnétiques.

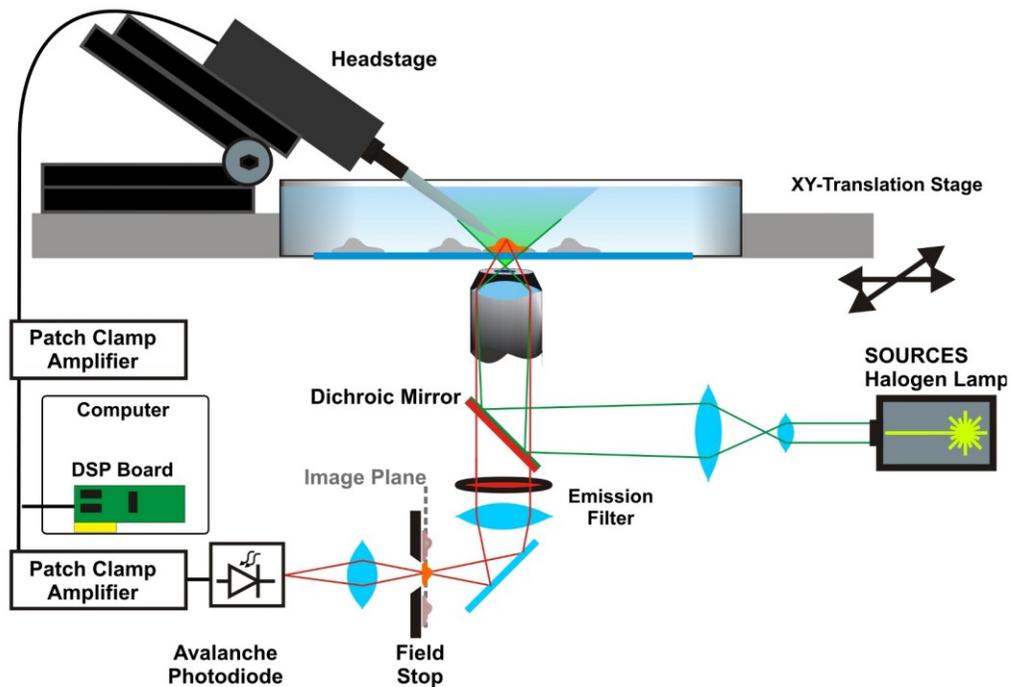


Figure 17. Schéma du montage expérimental par la technique du Patch Clamp. Réalisé par Rikard Blunck.

- *Système microscopique et micromanipulateur* : les cellules sont déposées sur la platine d'un microscope inversé (Nikon 805049). Le micromanipulateur est un MP-225 (Sutter Instruments Company). La source lumineuse est placée au dessus de la platine du microscope.

- Système électronique et d'enregistrement : la microélectrode est incorporée à un « headstage » qui était le CV203 BU (Axon Instruments). Le courant est ensuite dirigé vers l'amplificateur Axopatch -1D (Axon Instruments) pour les canaux potassiques et Axopatch 200B (Axon instruments) pour les canaux sodiques. Les données sont filtrées à 5 KHz. L'enregistrement est fait avec le programme Clampex 6 (Axon Instruments)
- Système de réchauffement : ce système a été incorporé juste pour le travail avec le NaChBac, et est un « température incubator» (Solent scientifique).

Les expériences avec le Shaker ont été faites à température de la pièce et celles avec le NaChBac à 30 °C

2.4.3. Protocole utilisé pour le travail avec « patch-clamp »

Comme on travaille avec le canal Shaker, qui est un canal potassique dépendant du voltage, nous avons appliqué le protocole suivant :

Le potentiel imposé a varié de 50 jusqu'à -120 mV par sauts de 10 mV, pendant un temps de 100 ms entre les impulsions de potentiel. Le potentiel de maintien étant de -90 mV (voir **Figure 18.A**).

Pour trouver le potentiel d'inversion de courant de notre protéine d'une façon expérimentale, on a appliqué le protocole montré dans la **Figure 18.B**. dans lequel avec un HP de -90 mV, on amène le potentiel à 0 mV pour garantir que les canaux sont ouverts. Après, on applique le protocole de 50 jusqu'à -120 mV augmenté chaque 10 mV, en un temps de 100 ms.

Pour le canal NaChBac le HP est de -120 mV et l'imposition de potentiel va de -100 mV à 50 mV pendant un temps de 750 ms (voir **Figure 19**).

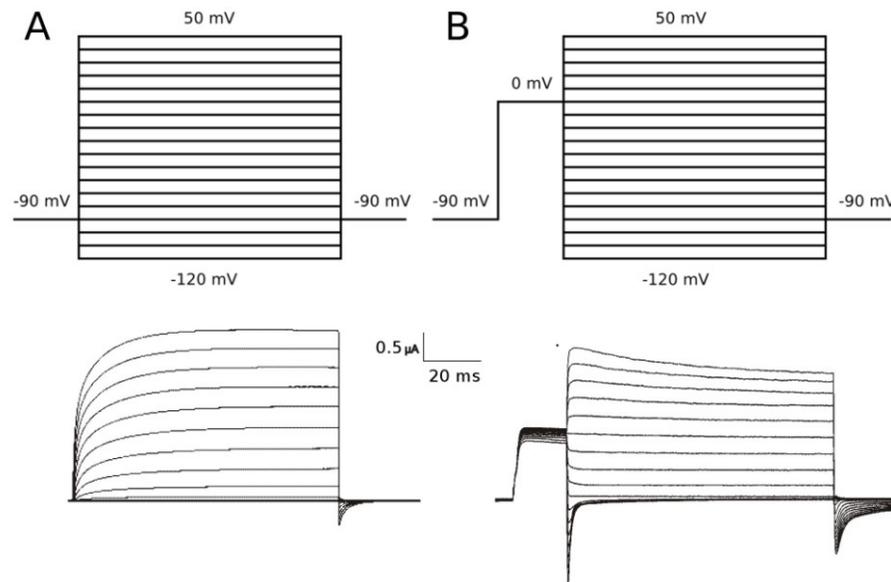


Figure 18. Protocoles appliqués pour l'étude du canal Shaker. A. L'image supérieure montre le protocole par l'enregistrement de courants macroscopiques de canaux potassiques. L'image inférieure montre l'enregistrement de courant ionique du mutant WT (ZH4-41-EGF-42-PCDNA3) B. L'image supérieure montre le protocole qui permet de trouver le potentiel d'inversion de façon expérimentale. L'image inférieure montre l'enregistrement de courant ionique du mutant WT (ZH4-41-EGF-42-PCDNA3) obtenu par le biais de ce protocole.

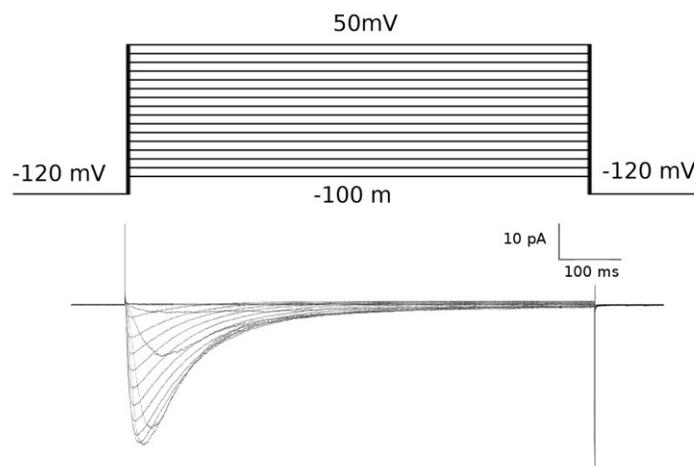


Figure 19. Protocole appliqué pour l'étude du canal NaChBaC. L'image supérieure montre le protocole appliqué pour l'étude de NaChBac. L'image inférieure montre l'enregistrement du courant ionique du mutant WT (NaChBac-Ptracer)

2.5. Enregistrement de courants de « gating » et ioniques de protéines exprimés en ovocytes.

L'étude de protéines exprimées en ovocytes a été faite avec la technique de « Cut-open oocytes », avec laquelle est obtenu le courant de « gating » et courant ionique.

2.5.1. Application de la technique de « cut-open oocyte »

Une fois que l'ovocyte a été injecté et incubé pendant un minimum de 18-19 heures, les ovocytes sont sortis de l'incubateur et laissés à température de la pièce 2h avant l'application de la technique pour que la protéine s'incorpore à la membrane.

Cut-open voltage clamp			
<i>Gating</i>		<i>Ionique</i>	
<i>Interne</i>	<i>Externe</i>	<i>Interne</i>	<i>Externe</i>
115mM NMDG	115 mM NMDG	115 mM KOH	115mM NAOH
10 mM Hepes	10 mM Hepes	10 mM Hepes	10 mM Hepes
2mM EDTA	2mM Ca(OH) ₂	2 mM EDTA	1 mM Ca(OH) ₂
PH 7			
Le PH de toutes les solutions a été ajusté avec			
MES (Acide méthane sulfurique)			

Tableau II.III. Solutions utilisées pour le travail avec les ovocytes

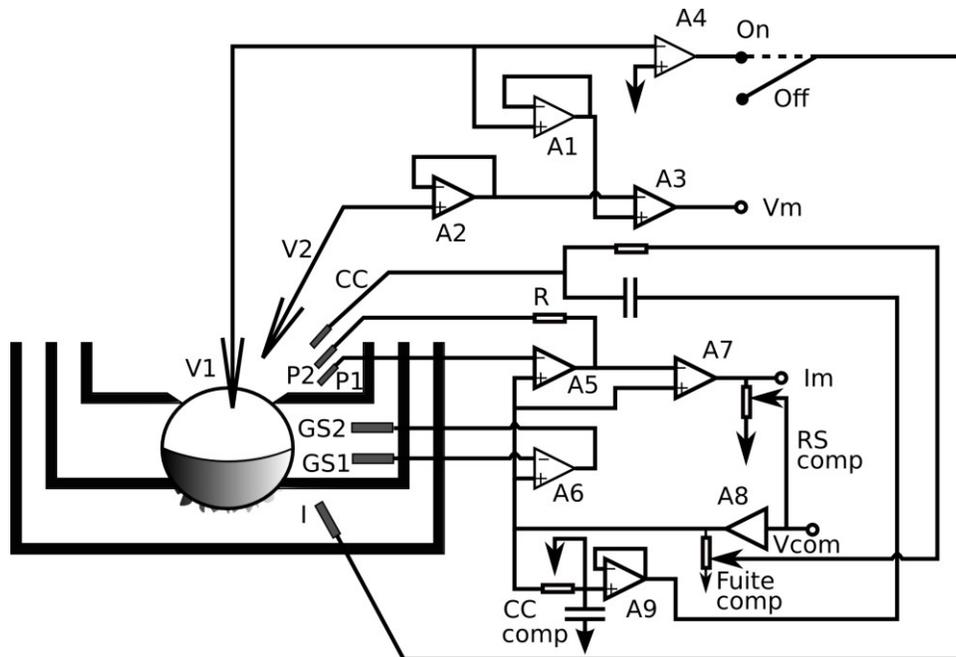


Figure 20. Schéma du système d'amplification du «cut-open oocyte». Image modifiée de (E.Stefani, L. Toro, E. Perozo et F. Bezanilla, 1994 et Taglialatela, 1992)

Les puits (GS1, GS2, CC, I, P1 et P2 Voir **figure 20**) pour les électrodes d'agar sont remplis d'une solution (3 M NaCl). À ce point, il faut vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air qui puissent isoler le contact. Les ponts d'agar (1 M Na-MES, 10 mM Hepes avec 1/100 agarose, avec un fil de platine) sont placés dans les puits.

Les électrodes P1 (chambre supérieure) et GS1 (chambre de garde ou moyenne) sont les électrodes de détection ; les électrodes P2 (chambre supérieure) et GS2 (chambre de garde ou moyenne) injectent le courant pour maintenir P1 et GS1 au potentiel imposé par les amplificateurs A5 et A6 (Taglialatela, 1992)

La pipette pour la microélectrode (V1, voir **Figure 20**) est faite de la même façon que pour la technique de « patch-clamp ». Les microélectrodes sont remplies avec une solution de 3M KCl, la haute concentration de ces solutions sert à avoir une haute conductivité pour minimiser les pertes de courant

détectées et diminuer le potentiel de jonction entre les ponts d'agar et les électrodes. La résistance de la microélectrode doit être entre 0.3 – 0.62 MOhm. L'amplificateur A4 maintient la partie interne de l'ovocyte connectée à la masse en mesurant intra cellulièrement avec la microélectrode V1 (chambre supérieur).

Ensuite, sans mettre la solution dans la chambre inférieure et avec juste une goutte de solution externe (voir **Tableau II.III**) dans la deuxième chambre sur le trou central, l'ovocyte est placé dans le centre du trou. Une fois que l'ovocyte est bien centré, la troisième chambre est placée sur l'ovocyte, de telle façon que le centre de l'ovocyte soit aligné avec le centre des trois chambres.

Quand cette condition est réussie, il faut remplir rapidement les trois chambres avec la solution de « gating » externe (voir **Tableau II.III**). Après, les électrodes d'agar sont placées dans leur chambres respectives et il est possible de voir un signal de courant capacitif membranaire sur l'écran.

On échange la solution de la chambre inférieure pour la solution de « gating » avec 0.2% de saponine (voir **Tableau II.III**). On applique une impulsion de 20 mV et on observe le courant capacitif. Il faut attendre que la constante de temps commence à changer. Juste quand elle commence à changer, il faut rapidement changer la solution par une solution de « gating » interne jusqu'à obtenir la stabilisation du courant. 5-10 ml de solution de « gating » interne peuvent être nécessaires. Une fois que le courant est stabilisé, l'ovocyte est considéré comme perméabilisé.

Une fois que l'ovocyte est perméabilisé, il est placé dans le microscope, la microélectrode est mise dans la solution (dans la chambre supérieure ou troisième chambre) pour ajuster le voltage ($V1=0$, $V2=0$, voir **Figure 20**). Une

fois que cela est confirmé, il faut faire l'insertion de la microélectrode dans l'ovocyte, le potentiel membranaire doit être entre -20 et -40 mV.

Pour faire la compensation, il faut mettre le HP à 40 mV et activer la capacitance et la résistance de compensation pour faire une compensation de capacitance membranaire et courante de fuite. La compensation de capacitance se fait par injection de courant à travers de CC dans la chambre supérieure par l'amplificateur A9 et la compensation de courant de fuite par l'amplificateur A8 (Voir **Figure 20**). Cette compensation incrémente le rang dynamique et prévient la saturation des amplificateurs de control (A4, A5 et A6). Le système contient un circuit de compensation de série de résistance RS qui injecte un potentiel proportionnel au potentiel de membrane au potentiel de commande par l'amplificateur A7 (Bezanilla et al, 1994 ; Dagan corporation, 1996). Il faut faire attention de ne pas en avoir une sur compensation car ça peut occasionner des problèmes quand la soustraction est appliquée. Une fois que la compensation est faite restent deux pics de basse amplitude qui sont éliminés par la soustraction.

Une fois la compensation finie, le HP est mis à 40mV et la soustraction est appliquée en 4 parties. Le protocole repose sur la différence de HP et le potentiel de commande. La soustraction consiste à prendre la différence d'amplitude et la diviser par 4 ($\Delta V/4$), chaque impulsion avec le même rang de temps. Une fois le protocole appliqué, l'ordinateur additionne ces quatre réponses et les soustrait du signal original. Sans soustraction, le courant obtenu est un courant capacitif, courant « gating » et courant de fuite. La soustraction élimine le courant capacitif et le courant de fuite du signal obtenu.

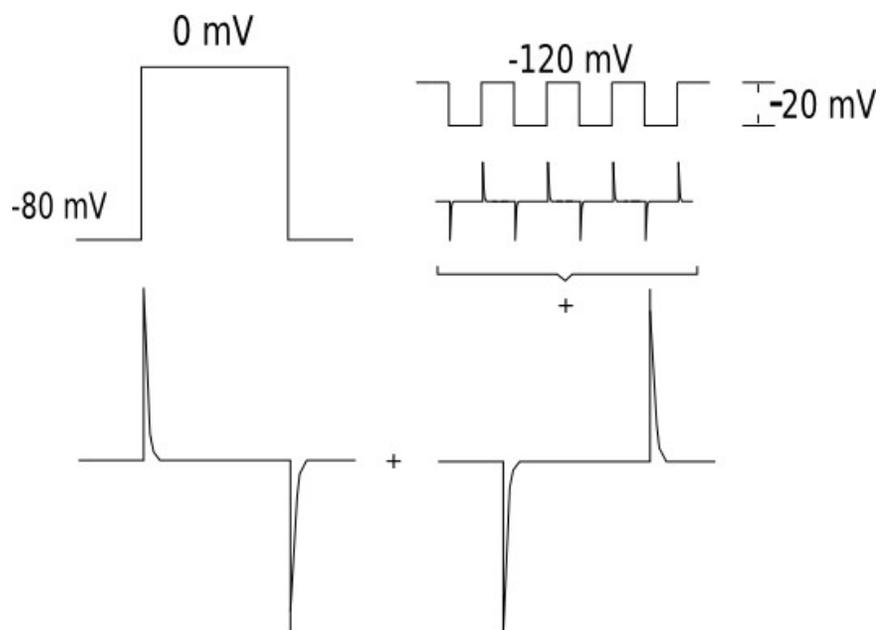


Figure 21. Exemple de soustraction. A gauche, pulse appliqué et le courant capacitif produit. A droite le protocole pour contrer l'effet du courant capacitif et faire la soustraction.

2.5.2. Montage expérimental

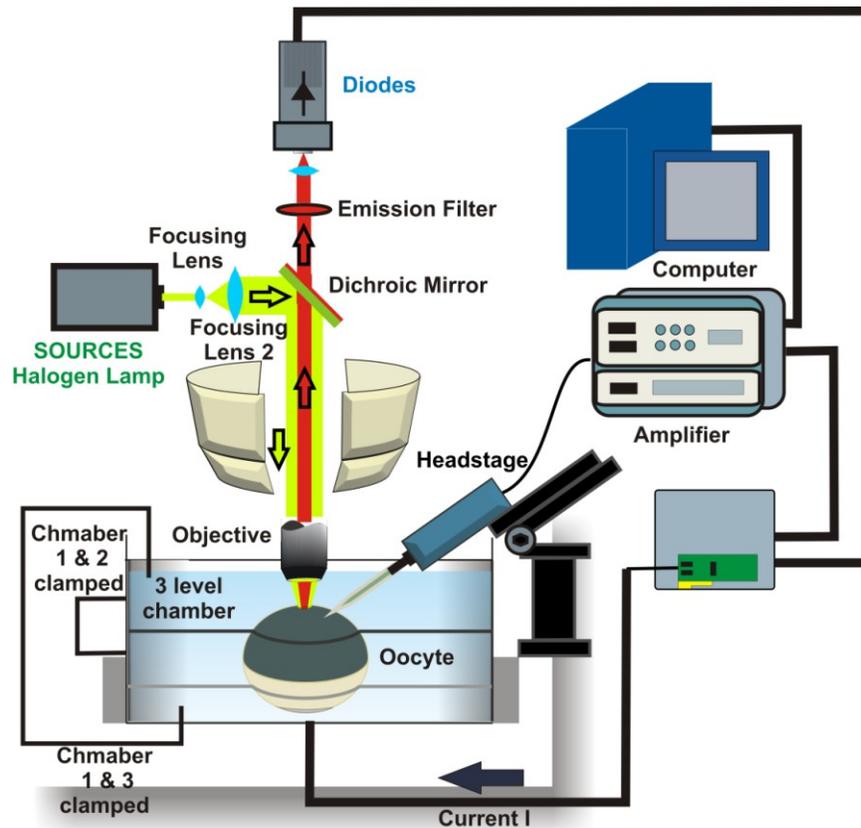


Figure 22. Schéma du montage expérimental de la technique de « cut open voltage clamp ».

Image réalisée par Georges Haddad.

- **Microélectrodes** : les microélectrodes utilisées ont été faites avec des capillaires de verre de borosilicate (OD 1.5 mm, ID 1.17 mm, GC150TF-10, Harvard) qui ont été étirées avec un étireur horizontal (micropipette puller Flaming/Brown. Model P-97 de Sutter instruments), en deux cycles, un pour l'étirer et le deuxième pour couper et polir.

- *Systeme d'isolation électrique et mécanique* : l'isolation mécanique s'est faite grâce à une table anti-vibration (Newport corporation VH3648W-OPT). Le microscope et le micromanipulateur sont situés sur cette table. Une cage de faraday isole le système pour empêcher l'influence d'ondes électromagnétiques sur les enregistrements.
- *Systeme microscopique et micromanipulateur* : les ovocytes sont déposés dans une chambre. Le microscope utilisé est un Axioskop2 FS plus (Carl Zeiss). Le micromanipulateur mécanique a été un MX160R (SD Instruments).
- *Systeme électronique et d'enregistrement* : tout le système de « Headstage » a été le CA-1 (Dagan Corporation). Le signal est ensuite dirigé vers l'amplificateur CA-1B, « High performance oocyte clamp » (Dagan Corporation). L'enregistrement est fait avec le programme GpatchW.

2.5.3. Protocole utilisé pour le travail avec le « cut-open oocyte »

Le protocole appliqué pour mesurer le courant de « gating » est le même que pour le travail avec les cellules mais appliqué pour une période de temps plus courte (70 ms) (voir **figure 23**).

Pour l'enregistrement de courant ionique avec la technique de « cut-open voltage clamp », le processus à suivre est le même que pour le courant de « gating », mais les solutions internes et externes utilisées sont différentes (voir **Tableau II.III**). Le protocole appliqué est semblable à celui utilisé avec les

cellules mais l'impulsion est appliquée pendant un temps de 200 ms (voir **Figure 24**).

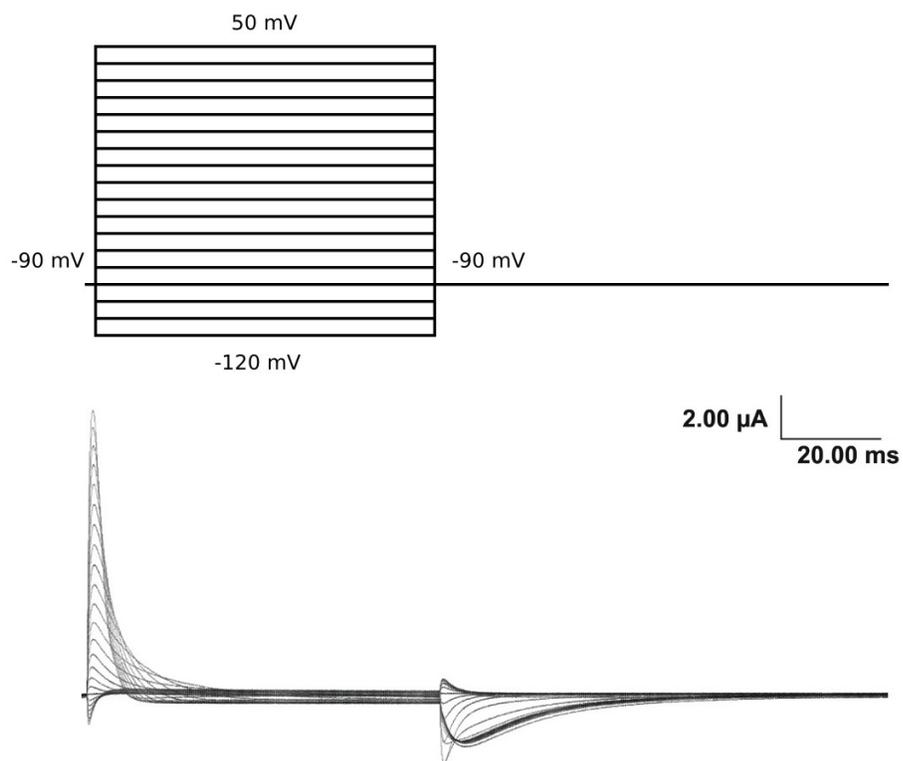


Figure 23. L'image supérieure montre le protocole appliqué pour la mesure du courant de « gating » avec la technique du « cut-open voltage clamp ». L'image inférieure montre le courant de « gating » enregistré du mutant WT (ZH4IR-W434F-PBSTA).

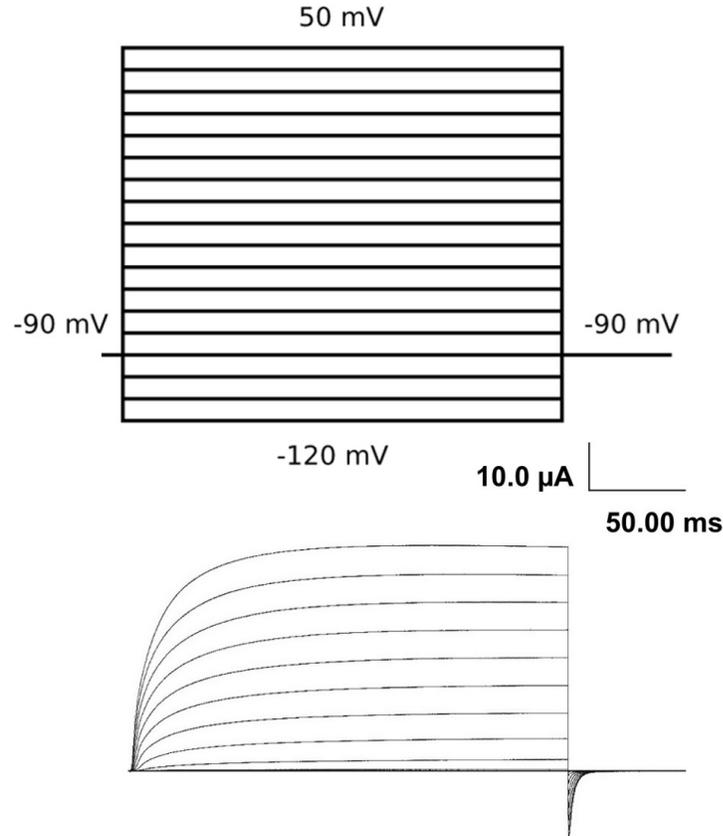


Figure 24. L'image supérieure montre le protocole appliqué pour la mesure du courant ionique avec la technique du « cut-open voltage clamp ». L'image inférieure montre le courant ionique enregistré du mutant WT (ZH4IR-M356C-T449Y-PBSTA).

2.6. Analyse des données

Pour faire l'analyse des données obtenues sur le travail avec les cellules, on a considéré un minimum de 6 expériences provenant d'un minimum de 3 transfections différentes pour chaque mutant. Pour faire l'analyse des données obtenues sur le travail avec les ovocytes on a considéré un minimum de 6 expériences provenant d'un minimum de 3 injections d'ARN différentes pour chaque mutant. Les données sont extraites des programmes d'enregistrement

(Clampex 6, pour le « patch clamp » et GpatchW, pour le « cut-open voltage clamp») et transféré au programme Analysis.

- **Courant ionique** : les données ont été normalisées. Avec I (courant mesuré), V (le potentiel imposé) et E_r (le potentiel d'inversion) la conductance a été trouvée avec l'expression suivante.

$$I = G (V - E_r)$$

Les courbes GV ont été tracées pour chaque expérience et on a obtenu une courbe moyenne qui représente chaque mutant. La déviation standard a été calculée. Les courbes obtenues ont été ajustées avec une courbe de Boltzmann.

Les constants de temps τ d'activation, d'inactivation et de fermeture (désactivation) sont déduits directement de l'enregistrement de courant.

- **Courant de « gating »** : les données ont été normalisées (I_i/I_{MAX}). On a fait une intégration des courbes de courant enregistrées pour trouver la charge de « gating » déplacée dans le processus d'activation et fermeture.

Les courbes QV ont été tracées pour chaque expérience et il a été obtenu une moyenne pour chaque mutant. Les erreurs (déviations standard) ont été calculées. Les courbes obtenues ont été ajustées avec une courbe de Boltzmann.

Les temps d'activation, d'inactivation, de désactivation et de fermeture sont déduits directement de l'enregistrement de courant.

3. Résultats

3.1. Canal Shaker

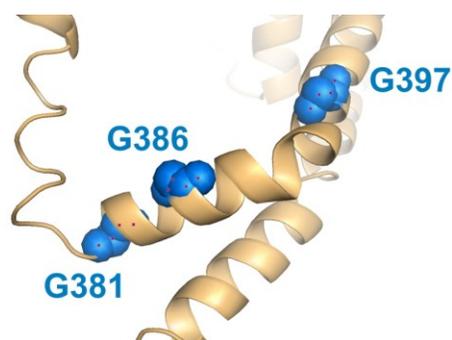


Figure 25. Schéma de l'hélice S45L où sont montrées les positions des glycines en étude.

La fonction des glycines dans le lien S45L a été étudiée en remplaçant les glycines par des alanines pour réduire la flexibilité dans ses positions respectives et postérieurement par des prolines pour enlever complètement la flexibilité.

3.1.1. Mutations de glycine à alanine.

Après la glycine, l'alanine est le plus petit résidu hydrophobe. L'alanine a un groupement méthyle au niveau de sa chaîne latérale à la même place où la glycine a un hydrogène. Ils sont des résidus très proches en structure et en dimension. Pour cette raison, l'alanine a été choisie comme premier mutant, car elle garde un peu les caractéristiques de la glycine, mais réduit la flexibilité dans l'hélice.

3.1.1.1. Courant ionique

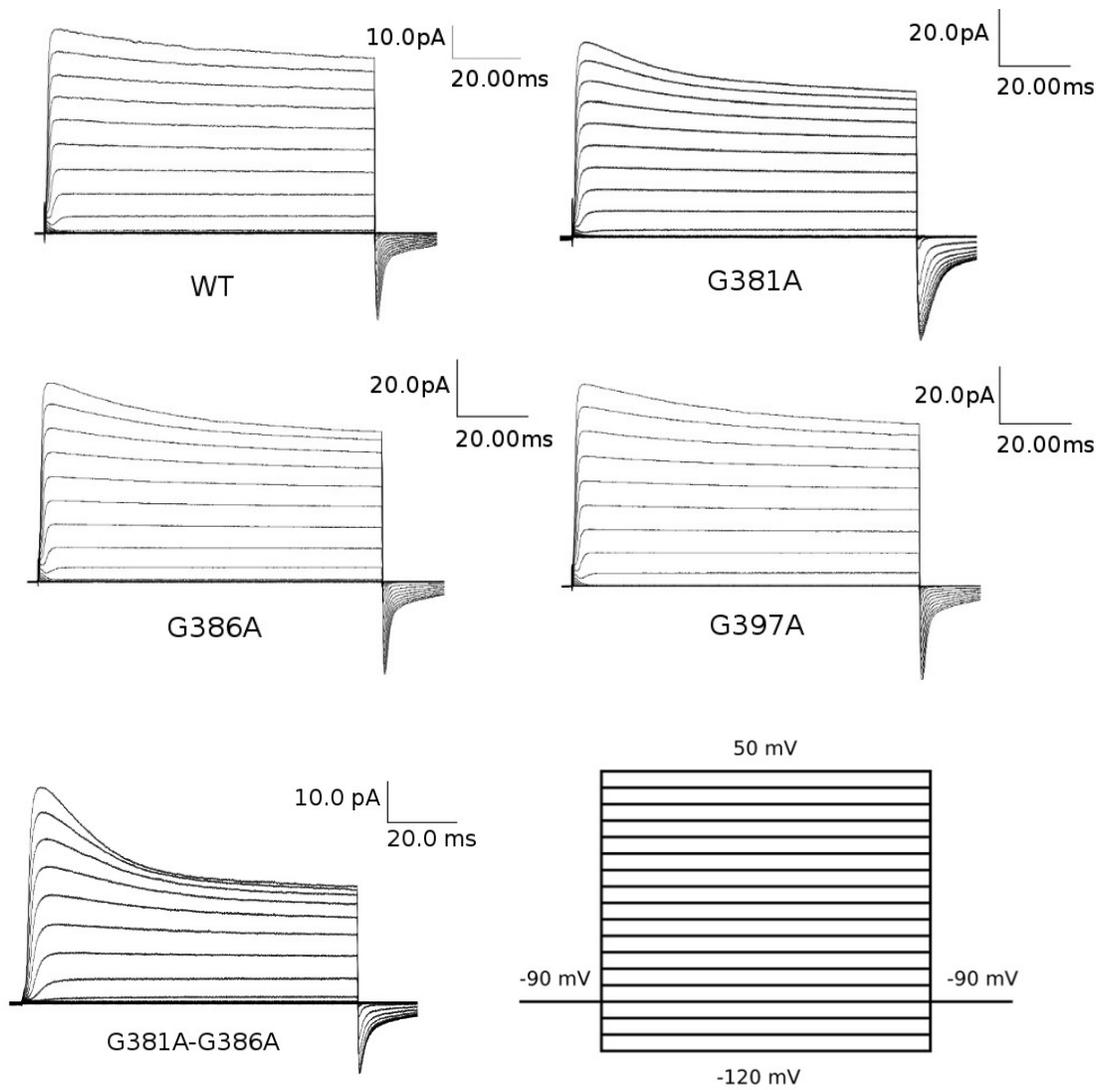


Figure 26. Enregistrements de mutations où la glycine est mutée en alanine. Enregistrements faits avec la technique du « patch-clamp » en cellules HEK.

Mutant	Potentiel de mi-activation	Facteur de pente
WT	-37.2 ± 0.6 mV	7.9 ± 0.5
G381A	-26.2 ± 0.8 mV	8.2 ± 0.7
G386A	-34.3 ± 0.9 mV	7.8 ± 0.8
G397A	-35.2 ± 0.6 mV	9.7 ± 0.5
G381A-G386A	-17.1 ± 0.6 mV	9.5 ± 0.5

Tableau III.I. Valeur du potentiel de mi-activation et facteur de pente des mutations de glycine à alanine

Le potentiel de mi-activation ($E_{0.5,act}$) du canal est légèrement déplacé vers les potentiels dépolarisants avec les mutations G386A (-34.3 ± 0.9 mV, $n=9$) et G397A (-35.2 ± 0.6 mV, $n=13$), en étant plus significatif avec le mutant G381A (-26.2 ± 0.8 mV, $n=6$) par rapport au mutant témoin (-37.2 ± 0.6 mV, $n=13$) (voir **Figure 27**).

Une différence de 3-4 mV, c'est significatif par le 1-way ANOVA, mais un shift comme ça n'est pas suffisant pour déduire un changement dans le mécanisme du canal. Alors pour tout l'analyse faite dans cette mémoire on ne le prend pas comme significatif (Rikard Blunck).

La **Figure 28** illustre la cinétique du canal pour les différentes mutations simples faites en changeant la glycine par une alanine. La courbe pour le mutant G381A s'éloigne du mutant témoin à potentiels négatifs, en montrant chaque fois une cinétique plus lente. La cinétique du canal avec les autres mutations G386A et G397A ne diffère pas significativement du mutant témoin.

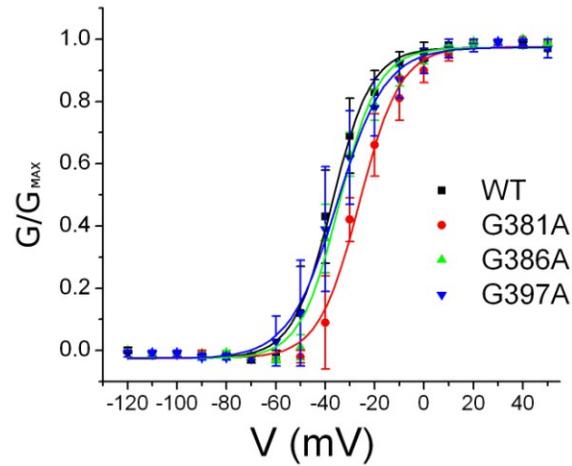


Figure 27. Conductance dépendant en voltage pour des mutations simples du mutant témoin, G381A, G386A et G397A.

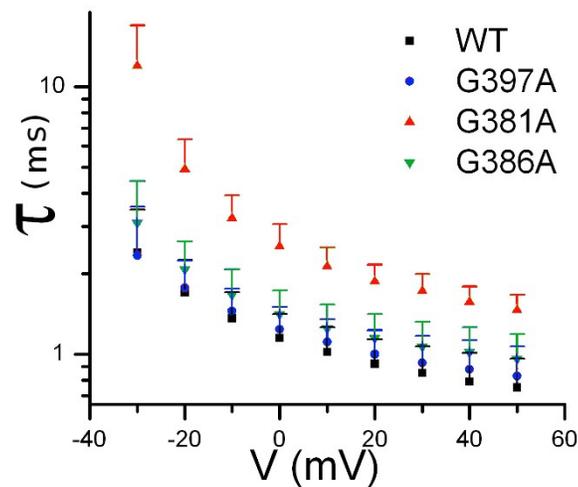


Figure 28. Dépendance en voltage du temps d'activation des mutations simples G381A, G397A et G386A.

La mutation double G381A-G386A a été réalisée pour évaluer la coopérativité des glycines dans le mécanisme d'ouverture du pore. Pour cette mutation, le potentiel de mi-activation est déplacé vers les potentiels dépolarisants (-17.1 ± 0.6 mV, $n=10$) par rapport au mutant témoin (-37.2 ± 0.6 mV, $n=13$) (voir

Figure 29). Ce déplacement est à peu près le double que celui pour la mutation simple G381A (voir **Figure 27**).

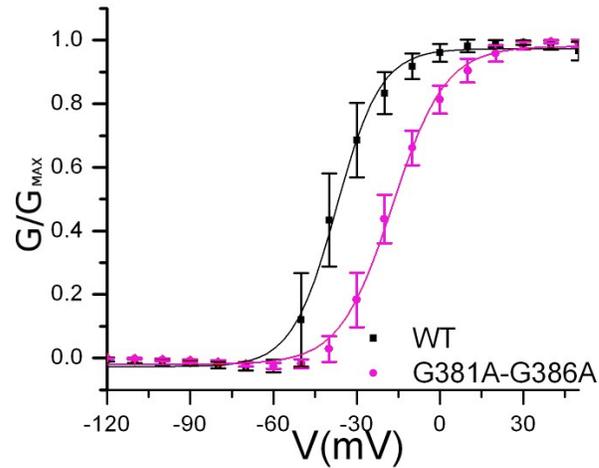


Figure 29. Graphique de la dépendance en voltage de la conductance pour la double mutation G381A-G386A.

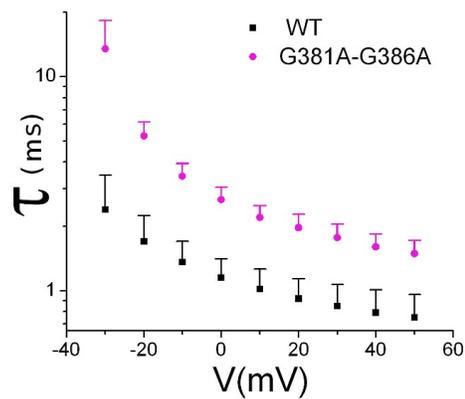


Figure 30. Dépendance en voltage du temps d'activation des mutations WT et G381A-G396A

Dans la **Figure 30**, on montre la cinétique du canal par la mutation G381A-G386A. Le comportement de la courbe est semblable au mutant G381A montré dans la **Figure 28**. La cinétique est chaque fois plus lente, à potentiels négatifs dans la cellule.

3.1.1.2. Courant de « gating »

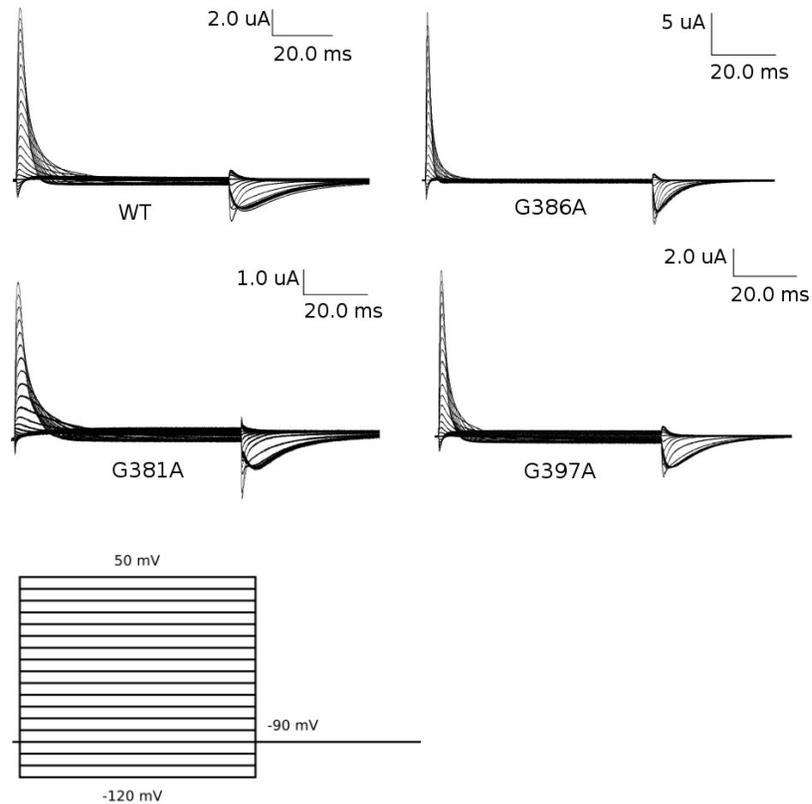


Figure 31. Enregistrement de courants «gating» de mutations simples G386A, G381A et G397A. Enregistrements faits avec la technique de « cut-open voltage clamp »..

Mutant	Potentiel de mi-activation	Facteur de pente
WT	-46.7 ± 0.8 mV	9.2 ± 0.7
G381A	-32.4 ± 0.8 mV	9.1 ± 0.7
G386A	-48.7 ± 0.8 mV	8.8 ± 0.7
G397A	-51.9 ± 0.7 mV	8.9 ± 0.6

Tableau III.II. Valeurs de potentiels de mi-activation et facteurs de pente pour les mutations simples des graphiques de $Q(\text{gating})$ vs V pour les mutations de glycine à alanine.

On a vu le changement dans le comportement du pore en mesurant le courant ionique. Avec le courant de « gating », on a étudié l'influence des mutations faites directement dans le senseur du voltage.

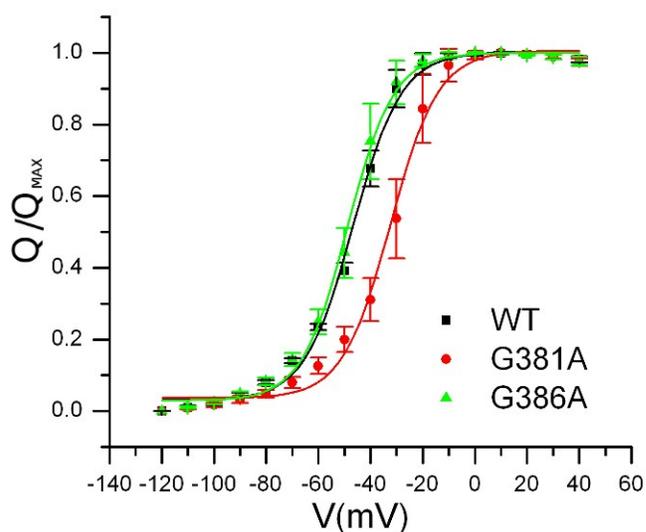


Figure 32. Charge de « gating » déplacée des mutations de glycine à alanine.

Dans les graphiques de charge de « gating » déplacée pendant l'activation en fonction du voltage (voir Figure 32), on peut voir que la mutation en une alanine en position G381 produit un déplacement du potentiel de mi-activation vers les potentiels dépolarisants (-32.4 ± 0.8 mV, $n = 7$) par rapport au mutant témoin (-46.7 ± 0.8 mV, $n = 10$). Dans les positions G386 ($n = 6$) et G397 ($n = 8$) il n'y a pas eu un effet significatif (voir Tableau III.II), (voir Figure 33).

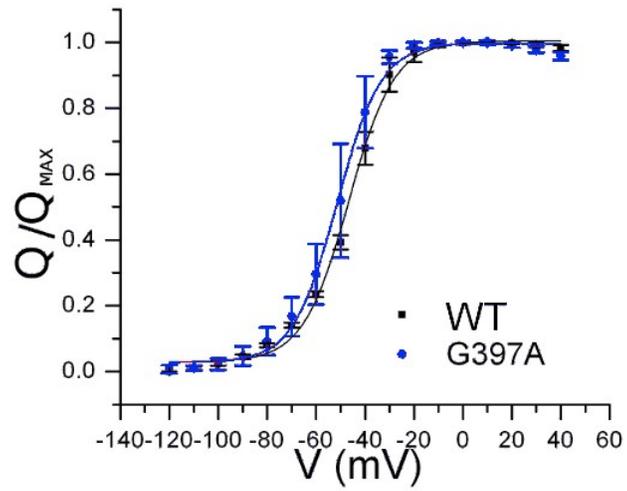


Figure 33. Charge de « gating » déplacée des mutants à la position G397.

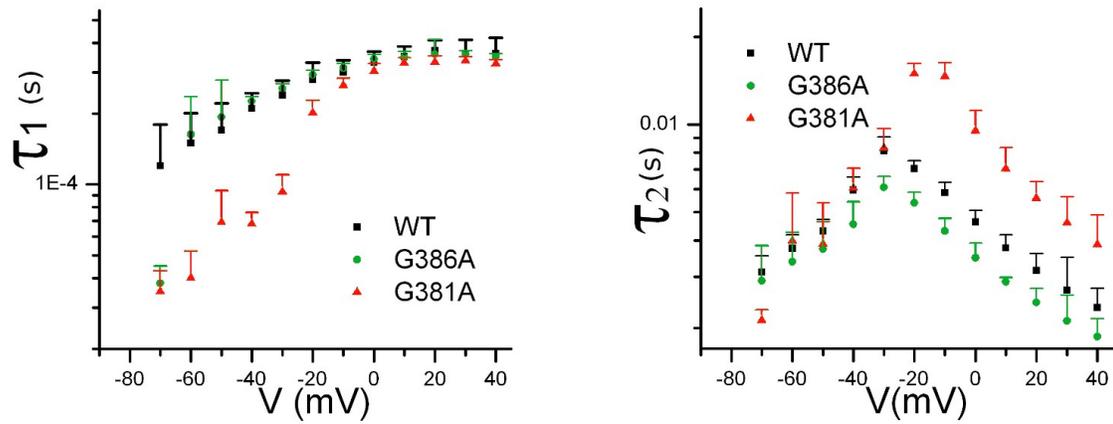


Figure 34. Constants de temps (τ_1 et τ_2) d'activation du courant de « gating » déplacé des mutations de glycine à alanine.

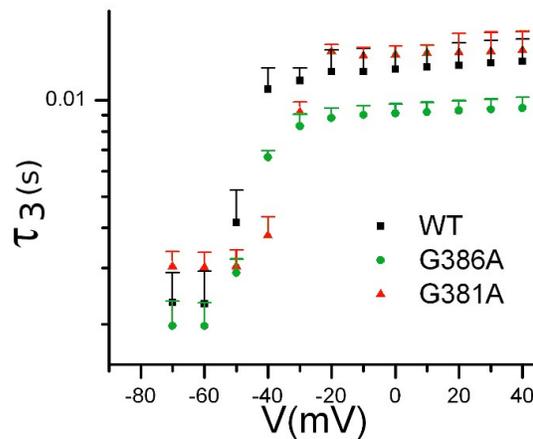


Figure 35. Temps de désactivation du senseur de voltage.

La cinétique du senseur de voltage avec la mutation G381A est plus rapide que par rapport au WT pour des potentiels plus négatifs de -10 mV. Cependant, pour des potentiels plus grands, elle ne montre pas une différence significative. La mutation G386A ne montre pas un effet significatif (voir **Figure 34**).

Pour le temps d'activation (τ_2) le senseur de voltage avec la mutation G381A est significativement plus lent que le WT et est plus rapide avec le G386A. Pendant le temps de désactivation du senseur (τ_3), la mutation G386A montre une différence importante par rapport au WT, le mutant G381A ne diffère pas du mutant témoin (voir **Figure 35**).

3.1.2. Mutations de glycine en proline

La proline a tendance à interrompre les hélices α (Chou et Fasman 1974, Parce et Scholtz 1998) , car elle ne peut pas former de liaison d'hydrogène en créant des bifurcations rigides et les angles ne fittent pas. Due à sa rigidité, la proline est considérée comme opposée à la glycine et c'est pour cela que ces mutations ont été effectuées.

3.1.2.1. Courant ionique

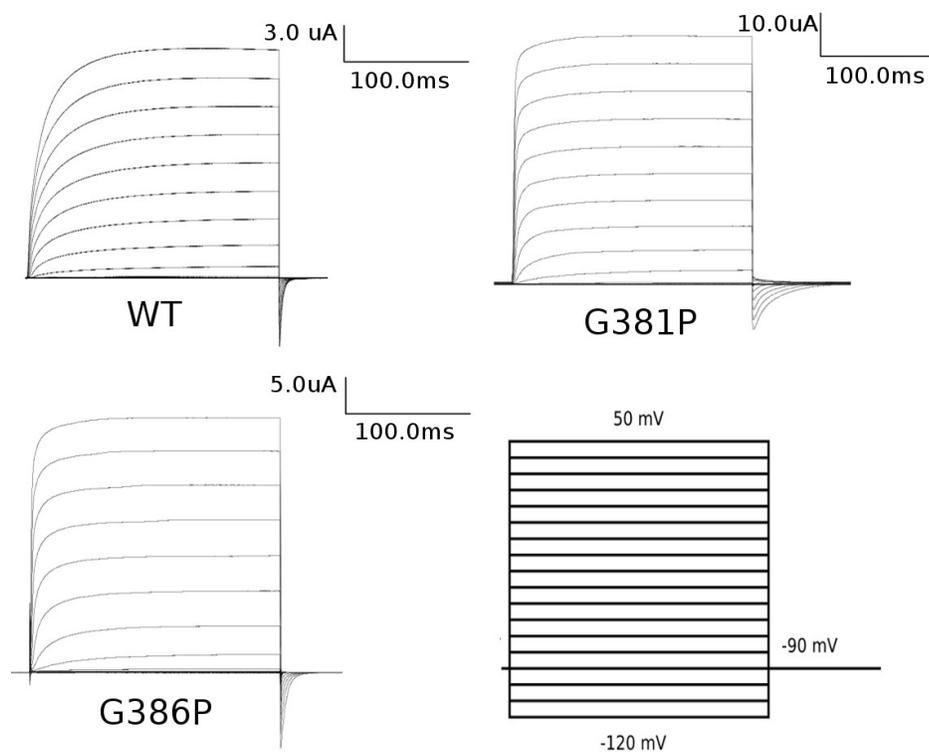


Figure 36. Enregistrements de mutations simples où la Glycine est mutée en proline. Expériences faites avec la technique du « cut-open voltage clamp » en ovocytes..

Mutant	Potentiel de mi-activation	Facteur de pente
WT (ovocytes)	-26.1 ± 0.9 mV	11.3 ± 0.8
G381P	-12 ± 1 mV	13 ± 1
G386P	-7 ± 1 mV	13 ± 1
G397P	NF	NF

Tableau III.III. Valeur du potentiel de mi-activation et facteur de pente des mutants exprimés en ovocytes

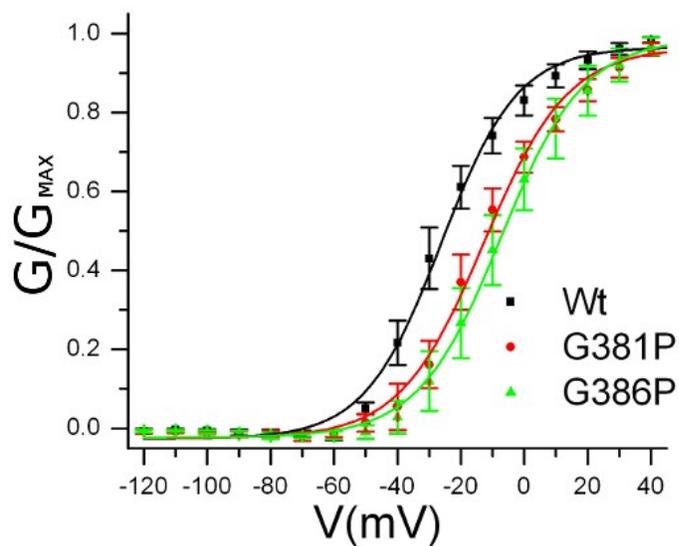


Figure 37. Dépendance du voltage de la conductance des mutations simples du mutant témoin, G381P et G386P

Le potentiel de mi-activation de la mutation G381P (-12 ± 1 mV, $n = 11$) est déplacé significativement vers des potentiels dépolarisants. Le déplacement du potentiel de mi-activation de la mutation G386P (7 ± 1 mV, $n=14$) est plus significatif par rapport au mutant témoin (-26.1 ± 0.9 mV, $n = 10$) (voir **Figure 37**).

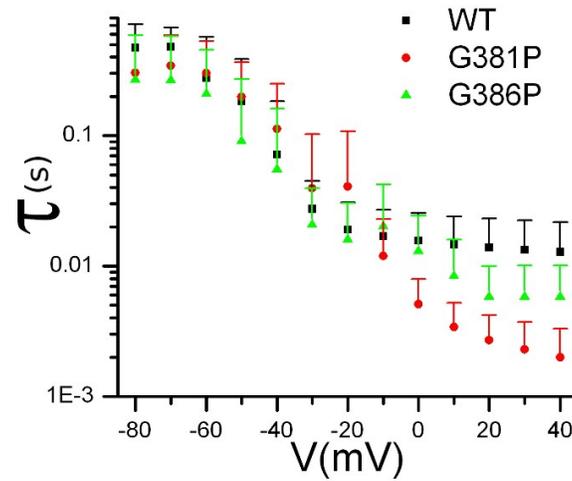


Figure 38. Dépendance du voltage du temps d'activation des mutations simples G381P et G386P.

Pour les mutations avec la proline, l'effet est l'opposé de celui avec l'alanine, les mutants G381P et G386P s'éloignent du mutant témoin à mesure que la cellule est dépolarisée, en montrant chaque fois une cinétique plus rapide. Le mutant G381P est plus rapide que le mutant G386P à potentiels dépolarisants, (voir **Figure 38**).

3.1.2.2. Courant de « gating »

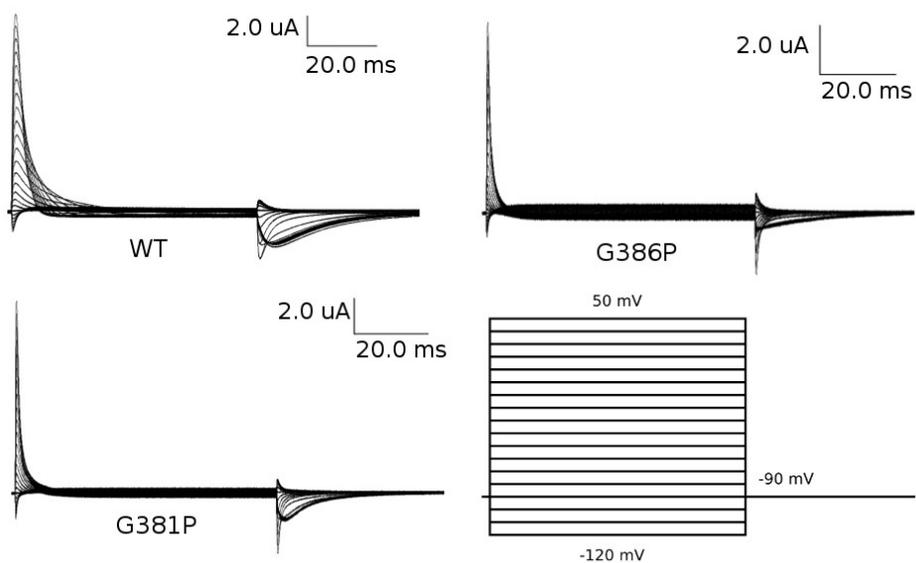


Figure 39. Enregistrement de courant «gating» de mutations simples G386P et G381P. Enregistrements faits avec la technique de « cut-open voltage clamp ».

Mutant	Potentiel de mi-activation	Facteur de pente
WT	-46.7 ± 0.8 mV	9.2 ± 0.7
G381P	-44 ± 1 mV	15.8 ± 0.9
G386P	-27 ± 1 mV	16 ± 1
G397P	NF	NF

Tableau III.IV. Valeur du potentiel de mi-activation et facteur de pente de mutations de glycine à proline.

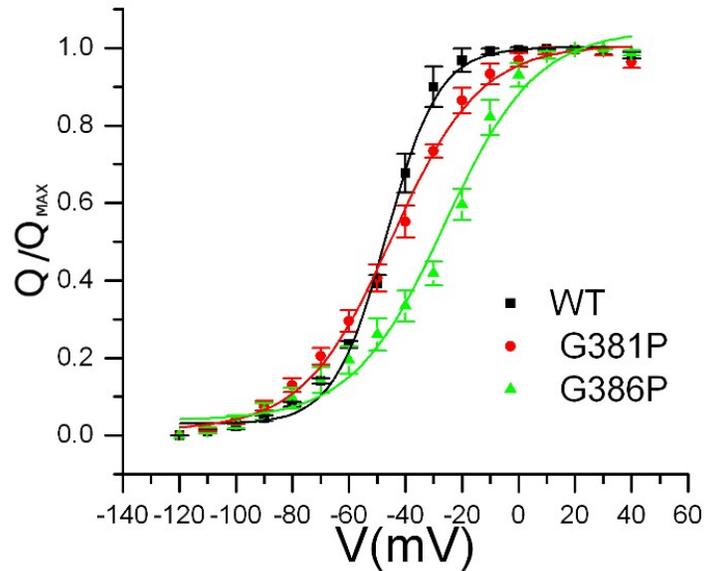


Figure 40. Charge de « gating » déplacée des mutations de glycine à proline.

Quand on change la glycine pour une proline dans la position G381, la courbe diverge du mutant témoin pour des dépolarisations plus positives que -50 mV. Le potentiel de mi-activation du mutant G381P (-44 ± 1 mV, $n = 6$) ne diverge pas beaucoup de celui du mutant témoin (voir **Figure 40**). Dans la position G386, la substitution de la glycine par une proline produit un effet semblable à G381, la courbe diverge du mutant témoin pour des dépolarisations plus positives que -70 mV (-27 ± 1 mV, $n = 8$) (voir **Figure 40**). Cet effet peut se voir refléter dans le facteur de pente qui diffère significativement par rapport au mutant témoin, par les mutations par proline (voir **Tableau III.IV**).

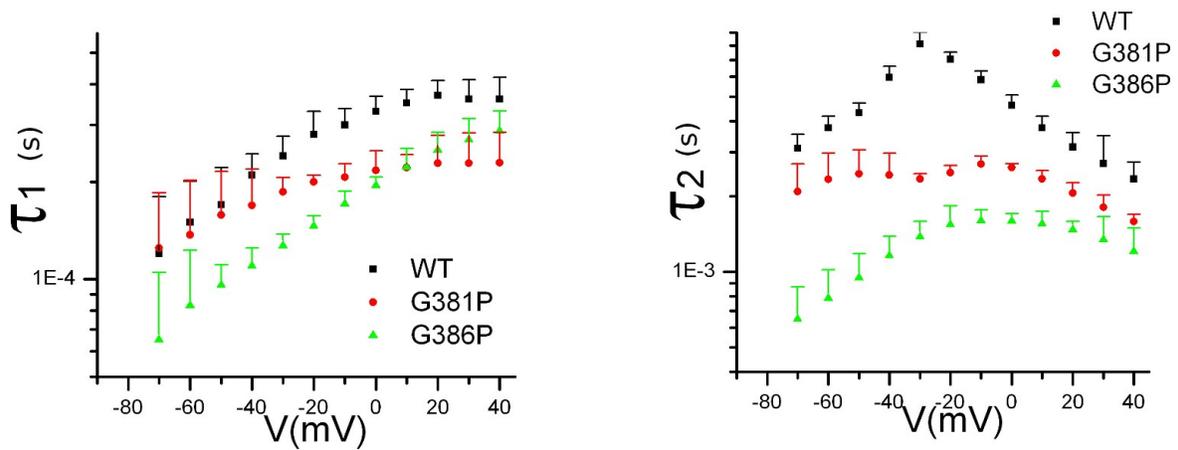


Figure 41. Temps d'activation et d'inactivation du courant de « gating » des mutations de glycine à proline.

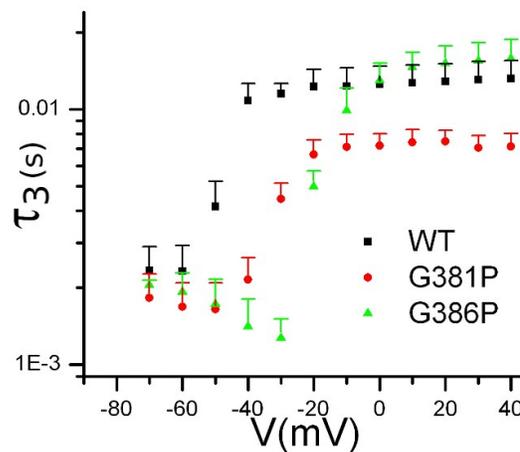


Figure 42. Dépendance en voltage du temps désactivation du capteur du voltage des mutations de glycine à proline.

Le temps d'activation (τ_1), du capteur du canal avec la mutation par une proline dans la position G381 ne montre pas de différences statistiquement significatives entre -50 mV et -80 mV par rapport au mutant témoin (WT), la rapidité augmentant avec des potentiels plus dépolarisants. Avec le mutant G386P, le canal est plus rapide que pour le mutant témoin, mais la différence diminue au fur et à mesure que le potentiel augmente (voir **Figure 41**).

Le temps d'activation (τ_2), du sensor du canal est plus rapide avec la mutation G381P comparativement au WT. Le mutant G386 ne montre pas une différence significative (voir **Figure 42**).

3.1.3. Étude de l'effet du mouvement du pore sur le mouvement du sensor

Pour voir s'il y avait une influence du mouvement du pore sur le mouvement du sensor on a réalisé les mutations G381A-I384N, G381P-I384N, G386A-I384N et G386P-I384N, car la mutation I384N ne permet pas que le pore influence le mouvement du sensor (Rikard Blunck et Georges Haddad, données non publiées).

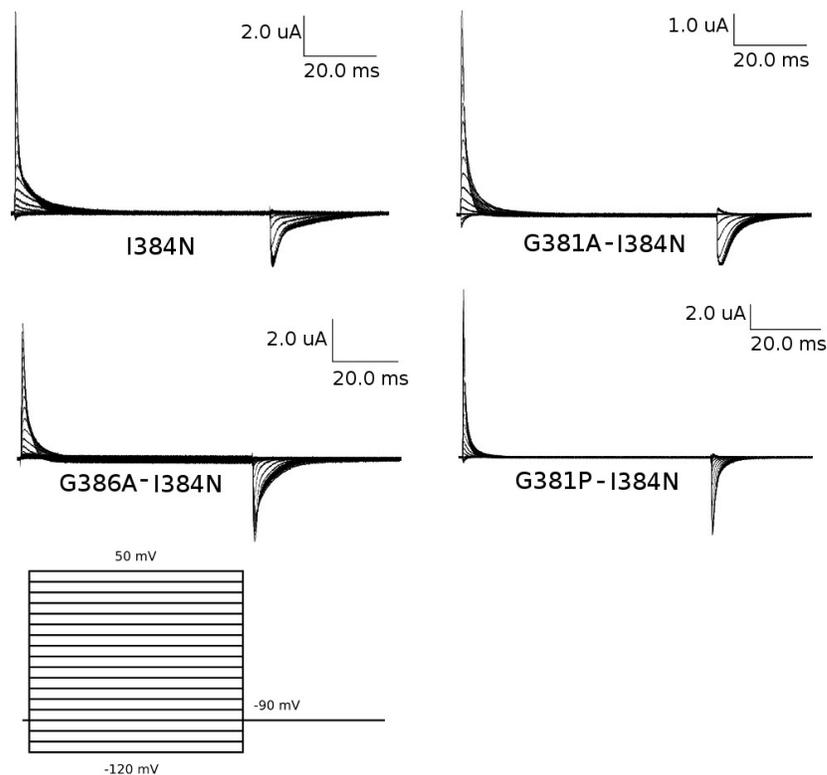


Figure 43. Enregistrements de courant “gating” de mutations doubles des G381A, G386A et G381P avec la mutation I384N. Enregistrements faits avec la technique de « cut-open voltage

clamp».

Mutant	Potentiel de mi-activation	Facteur de pente
I384N	-62.5 ± 0.2 mV	9.2 ± 0.2
G381A-I384N	-43.3 ± 0.4 mV	7.9 ± 0.4
G386P-I384N	NF	NF
G381P-I384N	-53.1 ± 0.4 mV	11.6 ± 0.3
G386A-I384N	-61.7 ± 0.2 mV	8.9 ± 0.2

Tableau III.V. Valeur de potentiels de mi-activation et facteur de pente pour les mutations simples des graphiques de charge de « gating » déplacé en fonction du voltage pour les mutations avec I384N

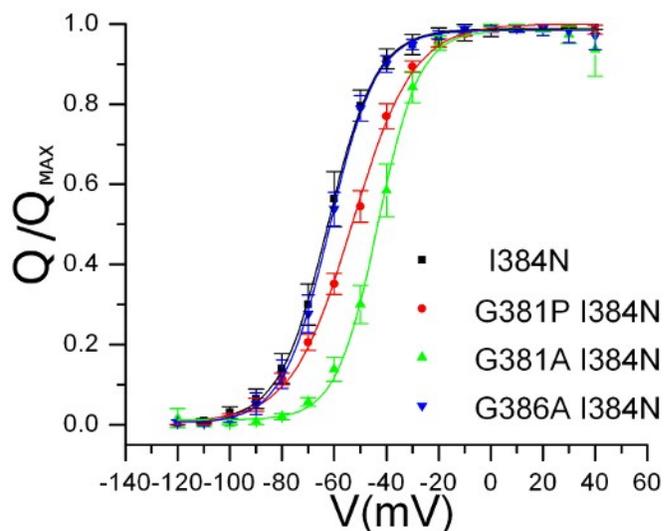


Figure 44. Charge de « gating » déplacé des mutants I384N, G381P-I384N, G381A-I384N et G386A-I384N.

Les mutations faites avec le mutant I384N n'ont pas montré une différence significative par rapport aux mutations faites sans I384N. Les mutants G381P, G381A, G386A et le WT montrés dans la **Figure 44** ont le même comportement que dans le graphique **Figures 32 et 40**.

La mutation par une alanine en position G381 produit un déplacement du potentiel de mi-activation vers les potentiels dépolarisants (-43.3 ± 0.4 mV, $n=7$) par rapport au mutant témoin I384N (-62.5 ± 0.2 mV, $n=7$). La position G386 ($n=9$) n'a pas d'effet significatif (voir **Tableau III.V**). Cependant, quand on change la glycine pour une proline dans la position G381, la courbe diverge du mutant témoin I384N pour des dépolarisations plus positives que -80 mV, jusqu'à atteindre la courbe du mutant G381A. Le potentiel de mi-activation du mutant G381P (-53.1 ± 0.4 mV, $n=8$) ne diverge pas beaucoup de celui du mutant témoin I384N. Cet effet peut se voir refléter dans le facteur de pente qui ne diffère pas significativement par rapport au mutant témoin I384N pour les mutations par la proline (voir **Tableau III.V**). Les deux effets de I384N et G381X sont « additive » ça veut dire, que les mécanismes sont indépendants. Dans la position G386, la substitution de la glycine par une proline n'a pas été fonctionnelle.

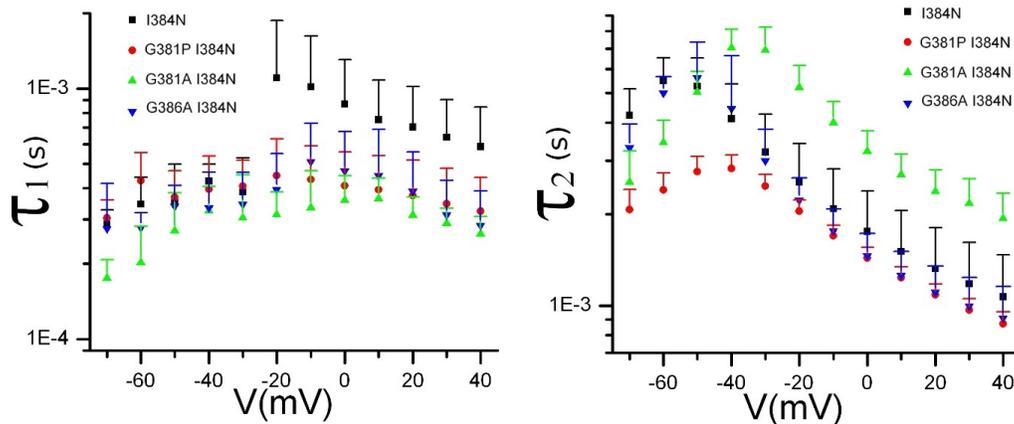


Figure 45. Dépendance en voltage du temps d'activation (τ_1 et τ_2) du capteur de voltage des mutations I384N, G381A-I384N, G381P-I384N et G386A-I384N.

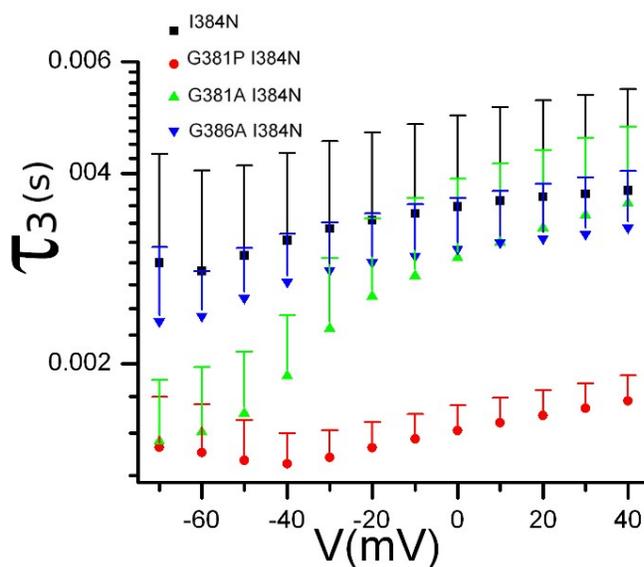


Figure 46. Dépendance en voltage du temps désactivation à la position initiale du sensor du voltage des mutations I384N, G381A-I384N, G381P-I384N et G386A-I384N.

La cinétique pour les mutations dans lesquelles a été produite une interruption entre le sensor et le pore, on trouve que pour le temps d'activation du sensor (τ_1) par des potentiels dépolarisants plus grands que -30 mV, tous les mutants ont une cinétique du sensor significativement plus rapide que le mutant témoin, en proportions semblables (voir **Figure 45**).

Pour le temps d'activation (τ_2), le mutant G381A-I384N est significativement plus lent que le mutant témoin I384N. Les autres mutations ne montrent pas une différence importante par rapport au mutant témoin (voir **Figure 45**).

Pour le temps de désactivation, le mutant G381P-I384N est significativement plus rapide que le mutant témoin, et le mutant G381A-I384N présente un comportement intéressant, car pour -70 mV a la même valeur que G381P-I384N et au fur et à mesure que le potentiel augmente vers des potentiels dépolarisants, il se rapproche du mutant témoin (voir **Figure 46**).

3.1.4. Étude de l'importance de la position de la glycine dans le lien S4-S5

Les mutations doubles G386A-L389G et G381A-I384G ont été réalisées dans le but d'évaluer l'importance de la position de la glycine et de la distance entre elles dans le processus d'ouverture du canal.

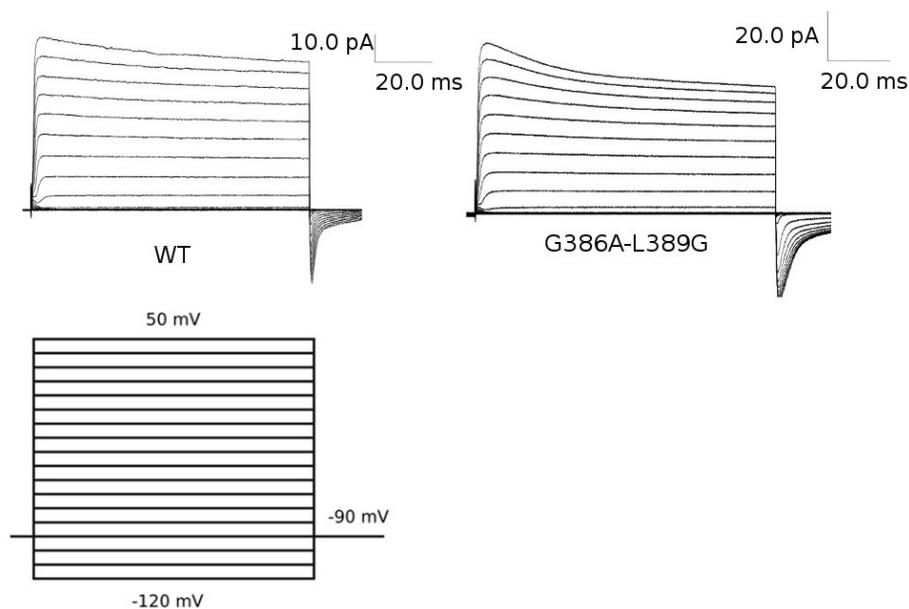


Figure 47. Enregistrement de la mutation G386A-L389G. Enregistrement faits avec la technique de “patch clamp”.

Mutant	Potentiel de mi-activation	Facteur de pente
WT	-37.2 ± 0.6 mV	7.9 ± 0.5
G381A-I389G	NF	NF
G386A-L389G	-36 ± 1 mV	8.9 ± 0.8

Tableau III.VI. Potentiel de mi-activation et facteur de pente des mutations multiples. La mutation G381A-I389G, n'a pas été fusionnelle (NF)

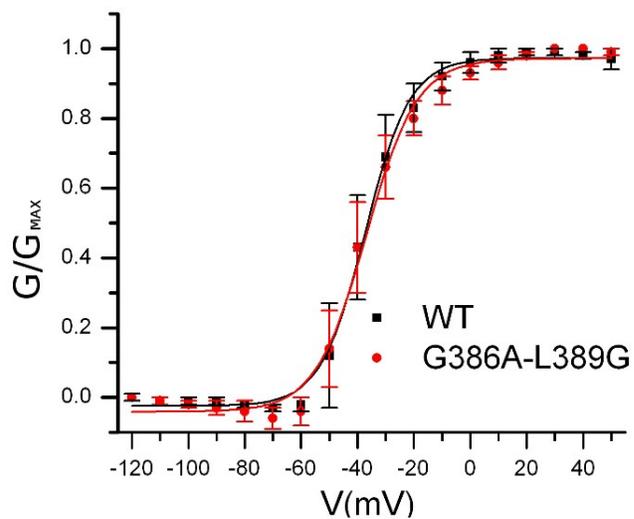


Figure 48. Dépendance du voltage de la conductance de la mutation double du mutant témoin et G386A-L389G.

La mutation G386A-L389G n'a pas eu un effet significatif sur le canal, le potentiel de mi-activation (-36 ± 1 mV, $n=7$) ne s'éloigne pas du potentiel de mi-activation du mutant témoin (-37.2 ± 0.6 mV, $n=13$) (voir **Figure 48**).

La mutation G381A-I384G n'a pas été fonctionnelle, probablement parce que I384 joue un rôle important du couplage (voir sections antérieures).

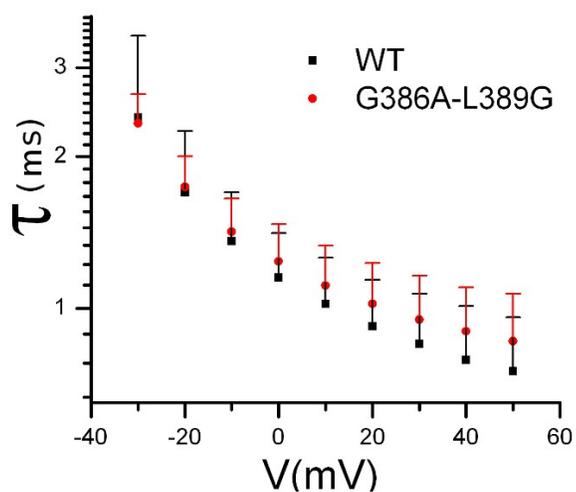


Figure 49. Dépendance en voltage du temps d'activation de la mutation G386A-L389G

La cinétique du mutant G386A-L389G se comporte comme le mutant témoin, sans montrer aucune différence significative (voir **Figure 49**).

3.2. Canal NaChBaC

Comme il a été dit dans le premier chapitre, le canal Shaker et le NaChBaC ont une structure semblable. Malgré la similitude entre les deux canaux, le NaChBaC a juste une glycine (G145) et deux prolines en positions proches des glycines du lien S4-S5 du canal Shaker, raison pour laquelle il est considéré comme un cas opposé au modèle en étude dans ce travail. Une substitution des prolines dans les positions P142 et P128 a été faite par des alanines et par la suite par des glycines. Une glycine a été incorporée dans la position R132.

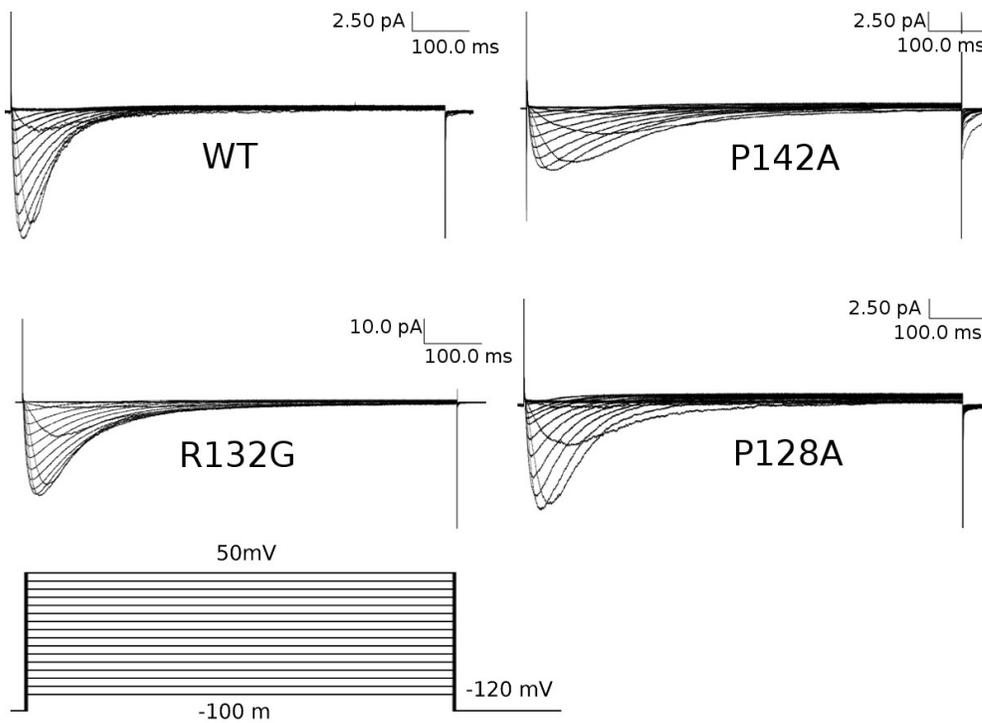


Figure 50. Enregistrement de courant ionique de mutations P142A, P128A et R132G du canal NaChBaC. Enregistrements faits avec la technique de « patch-clamp ».

Dans le graphique de GV, pour les mutations du canal NaChBac WT, P128A, P142A et R132G (voir **Figure 51**), il est possible de voir que lorsque la liberté des angles de torsion possibles est augmentée pour la substitution de la proline par une alanine, un potentiel plus positif est nécessaire pour ouvrir le canal, contrairement au comportement du canal Shaker. Le potentiel de mi-activation ($E_{0.5,act}$) du canal est légèrement déplacé vers les potentiels dépolarisants avec les mutations P128A (-47.7 ± 0.2 mV, $n=13$), en étant plus significatif le déplacement du mutant P142A (-38.6 ± 0.2 mV, $n=10$) par rapport au mutant témoin (-53.1 ± 0.6 mV, $n=21$). Le mutant R132G présente un comportement semblable au mutant P128A avec un déplacement du potentiel de mi-activation vers les potentiels dépolarisants (-47.4 ± 0.5 mV, $n=12$).

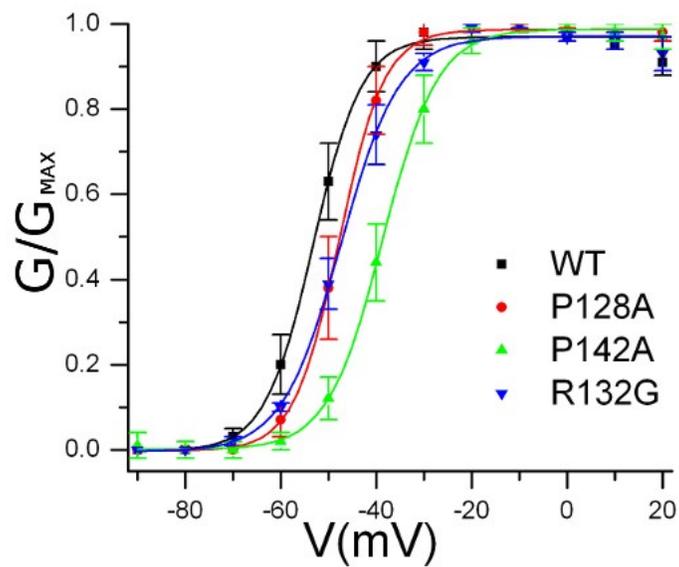


Figure 51. Dépendance du voltage de la conductance des mutants WT (NaChBac), P128A, P142A et R132G

Mutant	Potentiel de mi-activation	Facteur de pente
WT	-53.1 ± 0.6 mV	5.1 ± 0.5
P128A	-47.7 ± 0.2 mV	4.75 ± 0.1
P142A	-38.6 ± 0.2 mV	5.73 ± 0.2
P128G	NF	NF
P142G	NF	NF
R132G	-47.4 ± 0.5 mV	6.1 ± 0.4

Tableau III.VII. Valeur de potentiels de mi-activation et facteur de pente pour les mutations faites au canal NaChBaC.

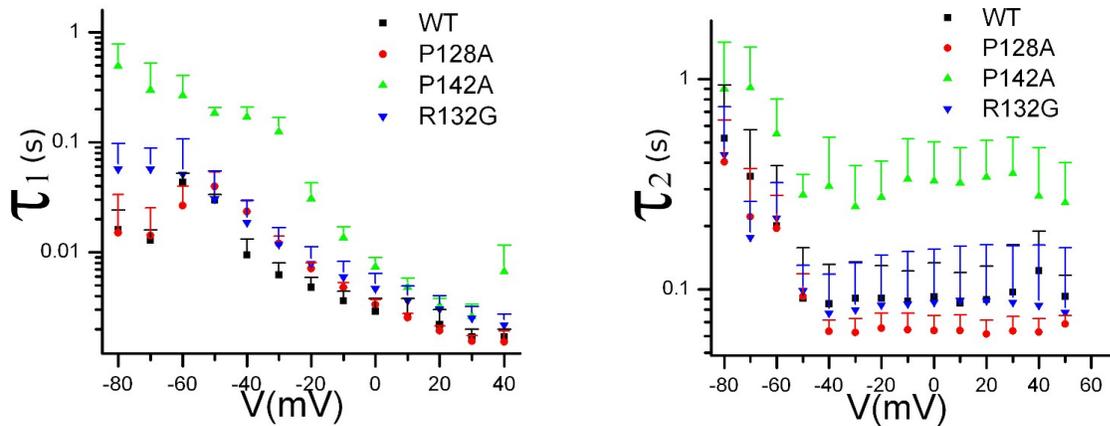


Figure 52. Dépendance du voltage du temps d'activation et d'inactivation des mutations WT (NaChBaC), P128A, P142A et R132G

Dans les graphiques de cinétique pour le canal NaChBaC le temps d'activation (τ_1) est cohérent avec le graphique de conductance, et le mutant P142A (**Figures 51 et 52**), qui montre un besoin de plus d'énergie pour ouvrir le pore, est celui qui prend plus de temps pour le faire. Les autres mutants ne montrent pas une différence significative par rapport au mutant témoin.

Pendant l'inactivation, le même comportement se conserve. Le mutant P142A est le plus lent puisque la différence par rapport au WT est plus grande. Le mutant P128A est le plus rapide, mais la différence n'est pas significative. Le mutant R132G ne montre pas une différence significative.

4. Discussion

Dans le présent travail, nous avons investigué dans quelle mesure la flexibilité et la longueur du lien S45L sont impliquées dans le mécanisme du couplage électromécanique.

Quand le senseur de voltage bouge, il le fait en deux étapes, mais le canal ne s'ouvre pas immédiatement. Donc, il y a un délai. Comme dans le cas d'un ressort, c'est possible que l'énergie soit accumulée dans le lien S45L. On veut savoir quel est le mouvement de S4 et S6, et aussi de quelle façon les interactions entre S4 et S45L et entre S45L et S6 sont impliquées avec le mouvement du senseur.

Dans ce but, nous avons étudié l'importance de chacune des positions des glycines dans le lien S45L (G381, G386 et G397). Ces glycines sont variablement conservées dans presque tous les canaux potassiques voltage-dépendants (Figure 16). De plus, nous avons investigué l'influence que peut avoir la distance entre elles en déplaçant la glycine de sa position de quelques acides aminés, et l'influence du mouvement d'ouverture du pore sur le mouvement du senseur de voltage. Nous avons étudié le canal NaChBac puisque nous avons pensé qu'il était un cas opposé à notre modèle. Nous avons augmenté la possibilité de variation des angles de torsion dans le lien S45L en substituant les prolines par les alanines et postérieurement par les glycines.

Dans ce chapitre, quand on parle d'accumulation d'énergie on n'est pas en train de réduire le segment S45L à un ressort. On utilise plutôt une des propriétés du segment, comme la flexibilité due aux glycines, comme outil d'interprétation.

Car un corps avec cette caractéristique peut être déformé en acquérant plus d'énergie potentielle élastique sans qu'il existe une transformation thermodynamique irréversible. Cette énergie peut être accumulée jusqu'à atteindre certaines limites après lesquelles le corps bouge pour récupérer sa condition énergétique initiale.

4.1. Le résidu G381 du lien S45L

Les résultats des mutations à la position G381 ont montré que lorsque la flexibilité est réduite en substituant la glycine par une alanine ou par une proline, il y a besoin de plus d'énergie pour ouvrir le canal. Toutes les mutations effectuées ont montré un déplacement du potentiel de mi-activation vers des potentiels dépolarisants, ce qui favorise l'état fermé du canal (voir **Tableaux III.I et III.III, Figure 27 et 37**).

Avec une petite réduction de flexibilité due à la mutation de cette glycine à une alanine, cela rend la cinétique du canal plus lente, en accord avec les graphiques de conductance. Cela pourrait être dû au fait qu'avec cette réduction de flexibilité, la difficulté du canal pour s'ouvrir serait plus grande, et le canal prendrait plus de temps pour le faire (voir **Figures 27 et 28**). Quand la flexibilité est réduite substantiellement en substituant la glycine par une proline, un angle rigide est mis à cette position. Le comportement cinétique est différent car l'ouverture du canal devient plus rapide même si plus d'énergie est nécessaire pour ouvrir le canal (voir **Figures 37 et 38**). Cet effet pourrait être expliqué de la façon suivante: quand il n'y a pas de flexibilité dans cette position, le canal accumule l'énergie (dans le segment S45L grâce à la flexibilité donnée pour les glycines restantes) jusqu'à obtenir l'énergie suffisante pour s'ouvrir. Cependant, comme il n'y a pas de flexibilité dans cette position, l'ouverture est donc plus rapide.

Le mouvement du senseur est en accord avec le mouvement du pore puisque le potentiel de mi-activation est aussi déplacé vers des potentiels dépolarisants dans les graphiques de « gating » (voir **Figure 32** et **Tableau III.II**). Il faut alors plus d'énergie pour déplacer le senseur lorsque la flexibilité est réduite à cette position, car la réduction de flexibilité peut rendre plus difficile le mouvement du senseur. Pour cette raison, la cinétique du canal est significativement ralentie (voir **Figure 34**).

La mutation G381P a produit un effet intéressant (voir **Figure 40**). Au début, le comportement du senseur est semblable au mutant témoin, mais pour des potentiels dépolarisants plus grands que -60 mV la courbe s'éloigne du mutant témoin jusqu'à égaler la courbe du mutant G381A. La cinétique du senseur dans cette conformation est accélérée. Cet effet peut être expliqué de la façon suivante: le senseur bouge en deux étapes lorsque la flexibilité est éliminée complètement de cette position. Le senseur peut bouger normalement jusqu'à un certain potentiel à partir duquel il commence à avoir besoin de plus d'énergie pour changer sa conformation (voir **Figure 41**). Avant d'arriver à ce point, le temps et l'énergie nécessaires sont les mêmes que pour le mutant témoin. Ensuite, de la même façon que le pore quand il n'y a pas flexibilité à cette position, le senseur accumule l'énergie dans le segment S45L jusqu'à en avoir suffisamment pour bouger. Mais comme il n'y a pas de flexibilité dans cette position, les étapes faites normalement pour s'ouvrir (voir section 1.1.1) peut être aussi réduites, donc le déplacement de charges est plus rapide (voir **Figure 41**). Cela pourrait indiquer que la première étape du mouvement du senseur n'a pas besoin de flexibilité à cette position.

Tous les résultats obtenus pour la position G381 ont montré une plus grande différence par rapport au mutant témoin. Ce dernier indique que la glycine dans cette position joue un rôle de charnière flexible (Parent et al, 2005), car cette position est la transition de deux hélices transmembranaires (S4 et S45L), où la taille des résidus et la flexibilité de l'union peuvent définir l'angle et la stabilité

de l'union entre les hélices, ainsi comme le fait d'avoir 91.5% de rotamere (obtenu avec pymol), valeur qui donne information sur les degrés de liberté dans cette position (Smith et al., 1999; Bowie 1997; Bright et al., 2002; Bright et Sanso, 2003).

La non-fonctionnalité de la double mutation G381A-I384G, où la glycine est déplacée de 3 résidus, pourrait être expliquée par un mauvais repliement des protéines mutées lors de l'insertion dans la membrane plasmique.

Cependant, même s'il est possible que la non-fonctionnalité de cette mutation soit le produit d'un mauvais repliement des protéines, il pourrait aussi renforcer indirectement notre conclusion concernant l'importance de ce résidu dans cette position pour être la transition de deux hélices- α , où la mutation peut changer dramatiquement les propriétés d'activation du canal.

Une autre possibilité est que la position I384 semble être trop importante pour le couplage comme on l'a vu dans la section 3.1.3.

4.2. Le résidu G386 du lien S45L

Les résultats des mutations dans la position G386 ont montré que lorsque la flexibilité est réduite en substituant la glycine par une alanine, l'effet sur le canal n'est pas significatif. Cet effet est décrit dans les graphiques de conductance et de temps d'activation dépendants du potentiel (voir **Figures 27 et 28**), où la courbe de G386A ne se déplace pas beaucoup vers les potentiels dépolarisants par rapport à la courbe du mutant témoin. Avec l'introduction d'un angle rigide par la mutation de la glycine à une proline G386P, le potentiel de mi-activation est significativement déplacé vers des potentiels dépolarisants, ce qui favorise l'état fermé du canal et sa cinétique est accélérée (voir **Figures 37 et 38**). Cet effet pourrait signifier qu'il faut un peu de flexibilité à cette position pour que le canal puisse s'ouvrir normalement. Sinon, le canal a besoin de plus d'énergie pour s'ouvrir, car l'état fermé est favorisé. De la même façon

qu'avec G381, il accumule l'énergie dans le segment S45L jusqu'à en avoir suffisamment. Et comme il n'y a pas de flexibilité dans cette position, les étapes qui suivent normalement pour s'ouvrir sont aussi réduites (voir section 1.1.1), et donc l'ouverture est plus rapide.

Le mouvement du senseur pour la mutation G386A est en accord avec le mouvement du pore, car le potentiel de mi-activation n'a pas été déplacé non plus (voir **Figure 40** et **Tableau III.II**). Ainsi, même un peu de flexibilité à cette position est suffisante pour le fonctionnement normal du senseur.

La mutation G386P a montré un effet intéressant semblable à G381P. Au début, le comportement du senseur est semblable au mutant témoin, mais pour des potentiels dépolarisants plus grands que -70 mV, la courbe s'éloigne significativement du mutant témoin. La cinétique du senseur dans cette conformation est accélérée. Cet effet peut être expliqué de la même façon que pour le mutant G381A: le senseur bouge en deux étapes. Lorsque la flexibilité est éliminée complètement dans cette position, le senseur peut bouger normalement jusqu'à un certain potentiel (-70 mV), à partir duquel il commence à avoir besoin de plus d'énergie pour changer sa conformation. Avant d'arriver à ce point, l'énergie nécessaire est la même que pour le mutant témoin. Ensuite de la même façon que pour le pore quand il n'y a pas de flexibilité dans cette position, le senseur accumule l'énergie jusqu'à en avoir suffisamment pour bouger. Comme il n'y a pas de flexibilité dans cette position, le déplacement de charges est plus rapide (l'explication est la même que pour le pore puis les effets sont cohérents pour le pore et pour le senseur) (voir **Figure 40** et **41**).

La mutation en déplaçant la glycine de 3 positions (G386A-L389G) a gardé les mêmes propriétés d'activation que le mutant témoin. En fait, il n'y a pas eu un déplacement du potentiel de mi-activation par rapport au mutant témoin. La

cinétique du canal n'a pas été affectée non plus par la mutation. Pourtant, la position spécifique de cette glycine ne joue pas un rôle important dans le fonctionnement du canal (voir **Tableau III.VI** et **Figures 48** et **49**.)

Les résultats obtenus pour la position G386 ont montré que même un peu de flexibilité à cette position est suffisante pour que le canal puisse fonctionner. Ceci suggère que la glycine dans cette position pourrait jouer un rôle de pivot (point d'appui), plus qu'un rôle de charnière (articulation flexible). Cela est cohérent avec sa position dans l'hélice- α (S45L), dans le rang de positions 384-389, lequel on croit qui pourrait être le point de contact avec S6 (Haddad et Blunck, données non publiées et Faure et Blunck, données non publiées). Également, les données obtenues avec pymol pour le canal Kv1.2, qui montrent que l'interaction est plus probable entre S45L et S6, est entre les résidus Q319 de S45L juste à côté de G318 (G386 en shaker) et F416 de S6 avec une distance de 5.4 Å. Car même si la glycine a été déplacée de 3 résidus, elle a été gardée proche de ce rang de contact. Il faudra donc approfondir les études du contact entre le S45L et S6 pour clarifier si vraiment la glycine dans cette position joue un rôle de pivot.

4.3. Le résidu G397 du lien S4-S5

La position G397 ne semble pas être particulièrement importante pour le fonctionnement du senseur ou du pore. Les résultats des mutations faites en changeant la glycine pour une alanine n'ont montré aucune différence importante par rapport au mutant témoin. Cette observation est évidente dans les graphiques de conductance et de charge de « gating » déplacée selon le voltage ainsi que dans les courbes de temps d'activation du canal (voir **Tableaux III.I**, **III.II** et les **Figures 27**, **28** et **33**).

Cependant, la présence de cette glycine dans tous les canaux potassiques dépendants du voltage suggère l'existence d'un rôle dans le mécanisme des canaux potassiques. La non-fonctionnalité du canal en changeant la glycine par une proline à cette position, peut signifier qu'à cette position un minimum de flexibilité est nécessaire pour que le canal puisse fonctionner normalement (comme la position G386), flexibilité sans laquelle le canal ne peut pas faire le transfert d'énergie du senseur au pore. Mais on ne peut pas exclure la possibilité que la non-fonctionnalité de cette mutation pourrait aussi s'expliquer par un mauvais repliement des protéines mutées lors de l'insertion dans la membrane plasmique. Plus d'études sont nécessaires afin d'être en mesure de conclure la fonction de cette glycine (G397).

4.4. Y a-t-il un effet du mouvement du pore sur le mouvement du senseur ?

Le comportement des mutations faites en remplaçant la glycine par la proline aux positions G381 et G386 dans les graphiques de charge de « gating » déplacée en fonction du voltage montre que les courbes des mutants G381P et G386P se comportent comme le mutant témoin jusqu'à -60 mV. Au delà de cette valeur, ils divergent du mutant témoin jusqu'à ce qu'ils se rejoignent au mutant G381A. Ce comportement suggère un effet possible du mouvement du pore sur le deuxième mouvement du senseur.

Les doubles mutations G381P-I384N, G381A-I384N et G386A-I384N faites avec la mutation I384N, qui coupe l'effet de l'ouverture du pore sur le mouvement du senseur (Blunck et Haddad, données non publiées), ont eu le même effet que les mutations simples G381A, G381P et G386A dans les graphiques de charge de « gating » déplacée en fonction du voltage (voir

Figures 44). Donc, il est possible de dire que cet effet est dépendant du senseur de voltage et indépendant de l'ouverture du pore.

Cependant, la cinétique du senseur a été affectée puisque le mutant témoin I384N dévient substantiellement plus lent que les autres mutations pendant l'activation. Pendant la désactivation, le mutant G381A-I384N devient le plus lent et le mutant témoin I384N reste proche des autres mutations (voir Figure 45). Pendant le retour à l'état initial, le mutant G381P-I384N devient substantiellement plus rapide et les autres mutants restent proches entre eux (voir **Figure 46**). *Pour ce phénomène, on cherche encore une bonne explication.*

4.5. Coopérativité entre les glycines G381 et G386

Dans les graphiques de conductance en fonction du voltage de la double mutation G381A-G386A (voir **Tableau III.I** et **Figures 29** et **30**), il est possible de voir un déplacement significatif du potentiel de mi-activation vers des potentiels dépolarisants par rapport aux mutations simples. De plus, un changement de la cinétique du canal qui devient plus lent est observé.

Ce changement dans les propriétés d'activation suggère une coopérativité entre ces deux glycines, de telle façon que chaque glycine agit comme supplément de l'autre. Ainsi quand la flexibilité à la position G381 est réduite, la flexibilité de la position G386 compense en partie cette perte. Pour cette raison, quand la flexibilité aux deux positions est réduite simultanément, le double d'énergie par rapport à la mutation simple G381 est nécessaire pour ouvrir le canal.

Les mutations dans une protéine se traduisent par des variations dans l'énergie libre. Ainsi, les variations de potentiels de mi-activation peuvent nous donner

une idée des changements de l'énergie libre de chaque mutation (Jackson, 2006)

$$\Delta\Delta G = RT \left(\frac{\Delta V_o}{dV} \right)$$

Avec R, la constante de gaz parfait et T la température. Ainsi la différence entre le potentiel de mi-activation de chaque mutant et celui du mutant témoin sont

- $\Delta V_{0.5,act}([G381A-G386A]-WT) = 20.1 \text{ mV}$
- $\Delta V_{0.5,act}(G381A-WT) = 11 \text{ mV}$
- $\Delta V_{0.5,act}(G386A-WT) = 2.9 \text{ mV}$

Alors, si on étudie la possibilité d'une additivité énergétique de ces deux glycines:

$$\Delta\Delta \mathcal{J}_{(X,Y)} = \Delta\Delta \mathcal{J}_{(X)} + \Delta\Delta \mathcal{J}_{(Y)} + \Delta \mathcal{J}_{(1)}$$

- $\Delta\Delta \mathcal{J}_{G_{381A}-G_{386A}} = 5189.25 \text{ J/mol}$
- $\Delta\Delta \mathcal{J}_{G_{381A}} = 3290.11 \text{ J/mol}$
- $\Delta\Delta \mathcal{J}_{G_{386A}} = 911.8 \text{ J/mol}$

Où (X) et (Y) représentent les mutations simples (X,Y) la double mutation et $\Delta G_{(1)}$ est l'énergie de couplage (Wells 1990). On trouve que la somme des énergies des mutations simples n'est pas équivalente à l'énergie pour la mutation double avec une différence de 987.34 J/mol. Ceci peut vouloir dire que l'énergie d'état final a augmenté par $\Delta G(1)=987.34 \text{ J/mol}$.

4.6. Le canal NaChBac

Dans les graphiques de conductance pour les mutations du canal NaChBac WT, P128A et P142A (**Figure 51**), il est possible de voir que lorsque la liberté des angles de torsion possibles est augmentée par la substitution de la proline pour une alanine, un potentiel plus grand est nécessaire pour ouvrir le canal. Contrairement à ce qui était attendu, le potentiel de mi-activation pour toutes les mutations subit un déplacement vers des potentiels dépolarisants, le déplacement pour la mutation P142 étant plus significatif. De la même façon, quand on remplace une arginine par une glycine à la position 132, le potentiel de mi-activation est déplacé vers les potentiels dépolarisants.

Cependant, les résultats obtenus n'ont pas été ceux attendus. En fait, le modèle du NaChBac n'est pas très loin de celui du Shaker puisque, dans le Shaker les GXXXXG jouent le rôle de charnière dans le lien S45L. Le NaChBac peut aussi avoir une charnière, mais avec une configuration différente. Il existe dans le S45L du NaChBac le motif PXXG qui pourrait travailler comme une charnière de pliage (« hinge-bending »), selon des simulations de dynamique moléculaire faites par Sansom et al (2001). Ces derniers montrent que des motifs comme GXP et GXXP pourraient avoir un comportement de charnière de pliage dans le mécanisme de « gating » pour différentes structures de plusieurs familles de canaux ioniques: par exemple, l'hélice S6 des canaux potassiques dépendants du voltage (Kv), l'hélice D5 des canaux chloriques dépendants du voltage (CLC) et l'alamethicin (Alm), qui est un peptide hélicoïdal formant un canal (Sansom et al 2001). Ainsi selon nos résultats, la mutation faite à la position P142 a eu un effet plus significatif que les autres (**Figure 51**). Ceci peut être expliqué, car dans cette configuration de charnière (PXXG), l'angle donné par la proline peut jouer un rôle important dans le transfert d'énergie du senseur au pore. Donc, l'angle est significativement

modifié si une alanine remplace la proline. Cet effet est également reflété dans la cinétique du canal, puisque la mutation P142A est significativement plus lente, ce qui est en accord avec les résultats de conductance. Ainsi, sans la proline à cette position, il est plus difficile de transférer de l'énergie qui pourrait déclencher l'ouverture du pore. Par conséquent, le canal prend plus de temps pour s'ouvrir et s'inactiver (voir **Figure 52**).

Les autres positions n'ont pas montré jouer un rôle important dans le transfert d'énergie.

4.7. Suggestions pour de futures études

- On a déjà étudié l'effet de déplacer la glycine pour étudier à quel point la distance entre les glycines dans le lien S45L est importante. Mais pour la position G386, le déplacement a été dans la gamme de résidus qu'on suppose faire contact avec S6. Donc, effectuer le déplacement de la glycine après cette gamme de résidus pourrait nous clarifier le rôle de cette glycine sur le couplage électromécanique du senseur de voltage et le pore.
- Il serait très intéressant de connaître l'influence qu'a la longueur du lien S45L du canal Shaker dans le transfert d'énergie du senseur au pore. À cet effet, il pourrait être coupé progressivement (de quelques acides amines) en contrôlant l'effet de ces mutations sur la conductivité du canal en mesurant le courant ionique et le mouvement du senseur en mesurant le courant de « gating ».
- La glycine est présente à la position G397 de tous les canaux potassiques dépendants du potentiel (sauf BK). Même si nos résultats n'ont pas montré de différences importantes par rapport au mutant témoin, cette présence dans tous les canaux potassiques dépendants du

voltage suggère un rôle dans le mécanisme des canaux. La triple mutation G381A-G386A-G397A n'a pas été faite et elle pourrait exclure la possibilité de l'existence d'une sorte de coopérativité entre les trois glycines du lien S45L.

- La glycine à la position G145 pour le canal NaChBac semble avoir un rôle important dans le lien S45L. Il est possible que le motif PXXG joue le rôle de charnière pour le transfert d'énergie du senseur au pore. Il serait donc intéressant de connaître les effets des mutations G145A, G145P, P142G-G145P. Ces dernières pourraient montrer s'il existe une permutabilité de ces acides aminés.

5. Conclusions

La flexibilité représentée par les glycines aux positions G381 et G386 dans le lien S4-S5 des canaux potassiques dépendants du voltage joue un rôle important dans le transfert d'énergie entre le senseur de voltage et le pore. La position G381 semble fonctionner comme une charnière flexible indispensable pour le mécanisme d'ouverture du canal pour être la transition entre deux hélices α et la position G386 pourrait marcher comme un pivot de support entre le lien S45L et S6 pour le transfert d'énergie du senseur sur le lien S45L et l'hélice S6. Ces deux glycines semblent avoir une sorte de coopérativité de telle façon que la perte de flexibilité dans la position G381 est compensée en partie par la position G386 et vice versa.

Les mutations en proline G381P, G386P et G381P-I384N ont permis de voir que le mouvement du senseur est indépendant de l'ouverture du pore. Ce processus semble être effectué avant que le couplage énergétique ne fasse sa fonction.

Le canal NaChBac a été considéré comme un modèle opposé au notre. Cependant, il a été montré que lui aussi a besoin d'une sorte de charnière dans le lien S45L pour le transfert d'énergie. Le motif PXXG semble avoir le rôle de charnière de pliage pour le mouvement du senseur de voltage S4 dans ce canal.

6. Références

Abramson et al. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*. 301(5633):610-5.

Aggarwal and MacKinnon. (1996). Contribution of the S4 Segment to Gating Charge in the Shaker K Channel. *Neuron*. 16: 1169-77.

Aiyar et al. (1996) The Signature Sequence of Voltage-gated Potassium Channels Projects into the External Vestibule. *The journal of biological chemistry*. 271:31013–31016

Alberts et al. (2002). *Molecular biology of the cell*, 4th ed. Garland Science, New York.

Allen, Bliznyuk, Rendell, Kuyucak, & Chung (2000). The potassium channel: Structure, selectivity and diffusion. *Journal of Chemical Physics* 112, 8191-8204.

Armstrong & Bezanilla (1973). Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 242, 459-461.

Armstrong & Bezanilla (1974). Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. *J Gen Physiol* 63, 533-552.

Axon guide. (1993). A guide to electrophysiology and biophysics laboratory techniques. MDS

Batulan et al (2010). An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 Is responsible for the slow off-gating component in shaker K⁺ Channels. The Journal of Biological Chemistry. 285:14005–1401

Bear, Connors, et Paradiso. 2001. Neuroscience: Exploring the Brain. Editions Pradel.

Bezanilla et al (1994) Gating of Shaker K⁺ Channels: 1. Ionic and Gating Currents. Biophysical Journal 66:996-1010.

Bezanilla & Stefani (1994). Voltage-dependent gating of ionic channels. Annu Rev Biophys Biomol Struct 23, 819-846.

Bezanilla, Stefani et al. (1998). Fast Inactivation in Shaker K Channels. Properties of Ionic and Gating Currents. Journal of General Physiology, 111: 625–638

Bezanilla. (2000). The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. Physiological Reviews, 80:555-592

Bezanilla. (2002). Voltage Sensor Movements. Journal of General Physiology. 120:465-473

Bezanilla. (2005). The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. TRENDS In Biochemical Sciences. 30:166-168

Blunck et Haddad. (en process). Investigating the Electromechanical Coupling in Voltage Gated K⁺ channels. Université de Montréal

Blunck, Chanda, Bezanilla. (2005). Nano to Micro Fluorescence Measurements of Electric Fields in Molecules and Genetically Specified Neurons. *Journal of Membrane Biology*. 208: 91-102

Blunck, Cordero-Morales, Cuello, Perozo, & Bezanilla (2006). Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction. *J Gen Physiol*. 128, 569-581.

Bowie et al. PNAS (2005). Transmembrane glycine zippers: Physiological and pathological roles in membrane proteins. 102: 14278-14283.

Bowie. (1997). Helix Packing in Membrane Proteins. *J. Mol. Biol* 272: 780-789

Bright and Sansom.(2003). The Flexing/Twirling Helix: Exploring the Flexibility about Molecular Hinges Formed by Proline and Glycine Motifs in Transmembrane Helices. *J. Phys. Chem*. 107: 627-636

Bright et al. (2002). Conformational dynamics of helix S6 from Shaker potassium channel: simulation studies. *Biopolymers*. 64, 303–313

Cha et Bezanilla. (1997). Characterizing Voltage-Dependent Conformational Changes in the Shaker K Channel with Fluorescence. *Neuron*. 19(5):1127-40.

Cha, Snyder, Selvin & Bezanilla. (1999). Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* 402: 809-813

Chakrapani, Cordero-Morales, et Perozo (2007). A quantitative description of KcsA gating II: single-channel currents. *J Gen Physiol* 130, 479-496.

Chakrapani, Cordero-Morales, et Perozo (2007). A quantitative description of KcsA gating I: macroscopic currents. *J Gen Physiol* 130, 465-478.

Chanda, Asamoah, Blunck, Roux et Bezanilla. (2005). Gating charge displacement in voltage gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature*. 11;436(7052):852-6.

Choi, Mossman, Aubé, Yellen. (1993). The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron*. 10(3):533-41

Chou et Fasman. (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry*. 15;13(2):222-45.

Chou et Fasman. (1979). Prediction of beta-turns. *Biophys J*. 26(3): 367–37

Claydon et al. (2010). Mutations within the S4–S5 Linker Alter Voltage Sensor Constraints in hERG K_v Channels. *Biophysical Journal*. 99: 2841–285.

Conte camerino. (2001) Increased rigidity of the chiral centre of tocainide favours stereoselectivity and use-dependent block of skeletal muscle Na⁺ channels enhancing the antimyotonic activity in vivo. *British Journal of Pharmacology*. 134: 1523-1531

Cordero-Morales, Cuello et Perozo (2006). Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter. *Nat Struct Mol Biol* 13, 319-322.

Cordero-Morales, Cuello, Zhao, Jogini, Cortes, Roux et Perozo (2006). Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat Struct Mol Biol* 13, 311-318.

Dagan Corporation. (1996) CA-1B High performance oocyte clamp. 38-53.

Degrado. (2004). Association of a Model Transmembrane Peptide Containing Glycine in a Heptad Sequence Motif. *Biophysical Journal*. 87: 3421–342.

Descal (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22:317–387

Doyle, Morais, Pfuetzner, Kuo, Gulbis, Cohen, Chait et MacKinnon. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K conduction and selectivity. *Science*. 280, 69-77.

Durell et Guy. (1992). Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophysical Journal*. 62: 238-250

Engelman et al. (2000). The GxxxG Motif: A Framework for Transmembrane Helix-Helix Association. *J. Mol. Biol.* 296: 911-919

Falcon et Matthews. (1998) Glycine Insertion in the Hinge Region of Lactose Repressor Protein Alters DNA Binding. *J. Biol. Chem* 274: 30849-30857

Falke et al. (1994). Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins. *Q Rev Biophys.* 27(3):219-90.

Firouzi et al. (2006). *The journal of biological chemistry.* 281;18: 12858 – 12864

Fleming et Engelman. (2001). Specificity in transmembrane helix–helix interactions can define a hierarchy of stability for sequence variants. *PNAS*. 98: 14340–14344

Fu, Grimsley, Razvi, Scholtz et C. N. (2009). Pace. Increasing protein stability by improving beta-turns. *Proteins*. 77(3): 491–498.

García Moreno, (2009) Proyecto biosfera. Ministerio de Educación. España.

Grissmert, Aiyar, Nguyen Chandy. (1994). The P-Region and S6 of Kv3.1 Contribute to the Formation of the Ion Conduction Pathway. *Biophysical Journal*. 67: 2261-2264

Grummt et al. (1998). Importance of a flexible hinge near the motor domain in kinesin-driven motility. *EMBO J*. 17(19):5536-42.

Guy et Conti. (1990) Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. *Trends Neurosci*. 13(6):201-6.

Guyton et Hall. (2007). Tratado de Fisiología Medica. M Graw Hill.

Heginbotham, Abramson et MacKinnon (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K channels. *Science* 258:1152-1155.

Heginbotham, Lu, Abramson, and MacKinnon. (1994). Mutations in the K⁺ Channel Signature Sequence. *Biophysical Journal*. 66:1061-1067.

Hille (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed., 1-814. Sinauer Associates.

Hodgkin et Huxley. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 117(4): 500–544.

Honig (1986). Electrostatic interactions in membranes and proteins. *Biophys. Biophys. Chem.* 15 : 163-93

Horn. (2000). A New Twist in the Saga of Charge Movement in Voltage-Dependent Ion Channels. *Neuron.* 25:511-514

Horn. (2003). How S4 Segments Move Charge. Let Me Count the Ways. *J. Gen. Physiol.* 123:1-4

Horton et al (1990). Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 8(5): 528-535.

Jackson. (2006). *Molecular and Cellular Biophysics.* Cambridge. 14-17.

Javadpour, Eilers, Groesbeek et Smith. (1999). Helix Packing in Polytopic Membrane Proteins: Role of Glycine in Transmembrane Helix Association. *Biophysical Journal.* 77:1609 –161

Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, & MacKinnon R (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 33-41.

Joffre. (2001). *Electrophysiologie moléculaire I: la technique du patch clamp.* Hermann. Editeurs des sciences et des arts.

K⁺ channels. *Journal of biological chemistry.* 285;18: 14005–1401

Kandel, Schwartz et Jessell. (2001) Principios de Neurociencia Cuarta edición. McGraw-Hill

Klein et al. (2008) Evidence That Proline Focuses Movement of the Floppy Loop of Arylalkylamine N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *The journal of biological chemistry*. 283: 14552–14558

Kreusch, Pfaffinger, Stevens et Choe. (1998) Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 392: 945-948.

Labro J. et al (2004) Coupling of Voltage Sensing to Channel Opening Reflects Intrasubunit Interactions in Kv Channels. *J. Gen. Physiol.* 125: 71–80.

Labro J. et al (2009) Kv Channel Gating Requires a Compatible S4-S5 Linker and Bottom Part of S6, Constrained by Non-interacting Residues. *J. Gen. Physiol.* 132(6):667–68

Latorre, Lopez, Bezanilla, Linas. (1996). *Biofísica y fisiología celular.* Universidad de Sevilla, España.

Lee S-Y, Banerjee A, MacKinnon R (2009). Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K⁺ channels. *Plos Biol.* 7(2): e1000047

Lemmon, Engelman. (1994). Specificity and promiscuity in membrane helix interactions. *FEBS* 346:17-20

Li et Deber. (1992) Glycine and β -branched residues support and modulate peptide helicity in membrane environments. *FEBS.* 311: 217-220

Liman, Hess, Weaver, and Koren. (1991). Voltage sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel. *Nature* . 353:752-756.

Long, Campbell et MacKinnon (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309: 897-903.

Long, et al. (2005) Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science*. 309: 903-908

Lopez, Jan, Jan. (1994). Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K⁺ channel comprises part of the pore; *Nature*. 367:179-182.

Lu et al. (2001) Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature*. 413:809-813.

Lu et al. (2002) Coupling between Voltage Sensors and Activation Gate in Voltage-gated K⁺ Channels. *J. Gen. Physiol.* 120: 663–67

MacKinnon et Heginbotham, (1990). Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor. *Neuron*. 5:767-771

Mackinnon et al. (1996). Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K channel. *Neuron*. 16: 1169-77.

Mackinnon et al. (1999). The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 285, 100-102.

MacKinnon et al (2002) Energetics of pore opening in a voltage-gated K⁺ channel. *Cell* 111: 231–239

Mackinnon. (2003). Potassium channels. FEBS. 555: 62-65

Mackinnon et al (2005) Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K_p channel. Cell 123: 463–475

Mackinnon et al. (2005) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. Science 309: 903–908.

Mackinnon et al. (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K_p channel in a lipid membrane-like environment. Nature 450: 376–382

Mackinnon et al. (2008) Inferred motions of the S3a helix during voltage-dependent K_p channel gating. J Mol Biol 381: 569–580

Mackinnon et al. (2009) Two Separate Interfaces between the Voltage Sensor and Pore Are Required for the Function of Voltage-Dependent K⁺ Channels. PLoS Biology. 7:676-686

Mayo et al. (2006). Generation and analysis of proline mutants in protein G. Protein Engineering, Design & Selection. 19: 285–289

McComarck et al (1991). A role for hydrophobic residues in the voltage dependent gating of Shaker K⁺ channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:2931-2935.

Meuser, Splitt, Wagner, & Schrempf. (1999). Exploring the open pore of the potassium channel from Streptomyces lividans. FEBS Lett . 462, 447-452.

Miller et al (2000) The lipid-protein interface of a Shaker K⁺ channel. J Gen Physiol 115: 5

Mol. Biol. (2000). The GxxxG Motif: A Framework for Transmembrane Helix-Helix Association. 296: 911-919

Noda, et al. (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312:121 – 127

Noskov, Berneche & Roux (2004). Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature* 431, 830-834.

Pace et Scholtz. (1998). A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins. *Biophysical Journal* 75:422–42.

Palczewski, et al. (2000). Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* 289:739-745

Papazian, Timpe, Jan et Jan. (1991). Alternation of voltage-dependence of shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349: 305-310.

Parent et al. (2006). The Role of the GX9GX3G Motif in the Gating of High Voltage-activated Ca²⁺ Channels. *The journal of biological chemistry.* 281:51: 39424 –39436.

Parsegian A (1969). Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems. *Nature* 221, 844-846.

Pathak, Kurtz, Tombola and Isacoff. (2005). The Cooperative Voltage Sensor Motion that Gates a Potassium Channel. *JGP.* 125:57-69

Perozo, Cortes et Cuello. (1998). Three-dimensional architecture and gating mechanism of a K⁺ channel studied by EPR spectroscopy. *Nat Struct Biol* 5,459-469.

Posson et Selvin (2008). The Shaker K⁺ Channel S4 Voltage Sensor Translates 10 Å during Gating. *Neuron*. 10;59: 98-109.

Ren et al. (2001). A Prokaryotic Voltage-Gated Sodium Channel. *Science* 2372 - 2375

Romer, Sala, Gómez et Marquez. (2008). Introducción a la biología celular, CBC Avellaneda, Russ et Engelman.

Roux (2005). Ion conduction and selectivity in K(+) channels. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34, 153-171.

Roux B, Berneche S, & Im W (2000). Ion channels, permeation, and electrostatics: insight into the function of KcsA. *Biochemistry* 39, 13295-13306.

Roux et al. (2008) Atomic Constraints between the Voltage Sensor and the Pore Domain in a Voltage-gated K⁺ Channel of Known Structure. *J. Gen. Physiol.* Vol. 131 No. 6 549–561

Salkoff, Baker, Butler, Covarrubias, Pak, Wei. Trends Neurosci. (1992) An essential 'set' of K channels conserved in flies, mice and humans. 15(5):161–166

Sanguinetti et al. (2002). Interactions between S4-S5 Linker and S6 Transmembrane Domain Modulate Gating of HERG K⁺ Channels. *The journal of biological chemistry*. 277;21: 18994–19000

Sanguinetti et al. (2004). Voltage-dependent Gating of Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-gated Pacemaker Channels. Molecular coupling between the S4–S5 and C-linker. *The journal of biological chemistry*. 279;14: 13859–13865

Sansom et al (2001). Proline-induced hinges in transmembrane helices: possible roles in ion channel gating. *Proteins*. 44(2):63-72.

Schoppa et Sigworth (1998). A activation of shaker potassium channels. III. An activation gating model for Wild-type and V2 mutant channels. *J. Gen. Physiol*. 111:313-342.

Schuller et al. (1999) Crystal structure of human heme oxygenase-1. *Nature Struct. Biol*. 6:860–867

Senes et al (2001). The C_α-H...O hydrogen bond: A determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *PNAS* 98: 9056–9061

Seoh, Sigg, Papazian and Bezanilla. (1996). Voltage-Sensing Residues in the S2 and S4 Segments of the Shaker K Channel. *Neuron*. 16:1159-1167

Sigworth (1994). Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 27, 1-40.

Sivaprasadarao et al. (2003). Evidence for Intersubunit Interactions between S4 and S5 Transmembrane Segments of the Shaker Potassium Channel. *The journal of biological chemistry*. 31: 29079 –2908

Smith et al. (1999). Absence of secondary structure in a carbopeptoid tetramer of a trans-5-aminomethyl-tetrahydrofuran-2-carboxylate. *Tetrahedron Letters* 40: 2191-2194

Smith et al. (1999). Helix Packing in Polytopic Membrane Proteins: Role of Glycine in Transmembrane Helix Association. *Biophysical Journal* 77:1609 – 161

Smith et al. (2002). Implications of Threonine Hydrogen Bonding in the Glycophorin A Transmembrane Helix Dimer. *Biophysical Journal* 82(5):2476-2486

Smith et al. (2005). Structural Role of Glycine in Amyloid Fibrils Formed from Transmembrane α -Helices. *Biochemistry* 44: 3591-3597

Smith-Maxwell, Ledwell et Aldrich (1998). Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol* 111,421-439.

Smith-Maxwell, Ledwell and Aldrich. (1998). Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol*. 111(3):399-420.

Smith-Maxwell, Ledwell et Aldrich (1998). Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol* 111, 399-420.

Swartz KJ. et al (2000) A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K⁺ channel. *Neuron* 25: 411–423.

Swartz KJ. et al (2006). Functional interactions at the interface between voltage-sensing and pore domains in the shaker Kv channel. *Neuron*. 52:623–63.

Tao et al.(2010) A Gating Charge Transfer Center in Voltage Sensors *Science* 328: 67-73.

Taglialatela, Toro, and Stefani. (1992). Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J. Biophysical Society*. 61:78-82

Tristani-Firouzi et al. (2005) The S4-S5 Linker Directly Couples Voltage Sensor Movement to the Activation Gate in the Human Ether-a'-go-go-related Gene (hERG) K⁺ Channel. *J. of Biological Chemistry*. 281: 12858–12864

Wells. (1990). Additivity of mutational effects in proteins. *Biochemistry*. 29 (37). 8509–851

Yaliraki et al. (2006). Role of Rigidity on the Activity of Proteinase Inhibitors and Their Peptide Mimics. . *Phys. Chem. B*. 110 : 18981-18988

Yellen et al. (1997). Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron*. 9(1):175-84.

Yellen, Jurman, Abramson, MacKinnon. (1991). Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region. *Science* 251: 939-42

Yool et Schwarz. (1991). Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature* 349:700-704

Yue, Navarro, Ren, Ramos et Clapham (2002). The Cation Selectivity Filter of the Bacterial Sodium Channel, NaChBac. *J. Gen. Physiol.* 120:845–85

Zagotta, Hoshi, Dittman et Aldrich (1994). Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *J Gen Physiol* 103, 279-319.

Zimmer et al (2006). Structural characterization and pH-induced conformational transition of full-length KcsA. *Biophys J* 90, 1752-1766.