

Université de Montréal

**Études de type structure fonction des mutations causant l'ataxie  
épisodique de type I sur les canaux potassiques dépendants du voltage**

Par

Dimitri Petitjean

Département de Physique

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences

en physique

Mai 2013

© Dimitri Petitjean 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Études de type structure fonction des mutations causant l'ataxie  
épisodique de type I sur les canaux potassiques dépendants du voltage**

Présenté par :

Dimitri Petitjean

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Yves Lapointe, président-rapporteur

Dr. Rikard Blunck, directeur de recherche

Dr. Rémy Sauvé, membre du jury

## Résumé

---

Les ataxies épisodiques (EA) d'origine génétique sont un groupe de maladies possédant un phénotype et génotype hétérogènes, mais ont en commun la caractéristique d'un dysfonctionnement cérébelleux intermittent. Les EA de type 1 et 2 sont les plus largement reconnues des ataxies épisodiques autosomiques dominantes et sont causées par un dysfonctionnement des canaux ioniques voltage-dépendants dans les neurones. La présente étude se concentrera sur les mutations causant l'EA-1, retrouvées dans le senseur de voltage (VSD) de Kv1.1, un canal très proche de la famille des canaux Shaker. Nous avons caractérisé les propriétés électrophysiologiques de six mutations différentes à la position F244 et partiellement celles des mutations T284 A/M, R297 K/Q/A/H, I320T, L375F, L399I et S412 C/I dans la séquence du Shaker grâce à la technique du "cut open voltage clamp" (COVC). Les mutations de la position F244 situées sur le S1 du canal Shaker sont caractérisées par un décalage des courbes QV et GV vers des potentiels dépolarisants et modifient le couplage fonctionnel entre le domaine VSD et le pore. Un courant de fuite est observé durant la phase d'activation des courants transitoires et peut être éliminé par l'application du 4-AP (4-aminopyridine) ou la réinsertion de l'inactivation de type N mais pas par le TEA (tétraéthylamonium). Dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la stabilisation d'un état intermédiaire, nous avons étudié séparément la neutralisation des trois premières charges positives du S4 (R1Q, R2Q et R3Q). Il en est ressorti l'existence d'une interaction entre R2 et F244. Une seconde interface entre S1 et le pore proche de la surface extracellulaire agissant comme un second point d'ancrage et responsable des courants de fuite a été mis en lumière. Les résultats suggèrent une anomalie du fonctionnement du VSD empêchant la repolarisation normale de la membrane des cellules nerveuses affectées à la suite d'un potentiel d'action.

**Mots-clés :** Canaux potassiques voltage-dépendants, courants transitoires, stabilisation d'un état intermédiaire, senseur de voltage, courant de fuite

## Abstract

---

The genetic episodic ataxias form a group of disorders with heterogeneous phenotype and genotype, but share the common feature of intermittent cerebellar dysfunction. Episodic ataxia (EA) types 1 and 2 are most widely recognised amongst the autosomal dominant episodic ataxias and are caused by dysfunction of neuronal voltage-gated ion channels. The present study focuses on mutations causing EA-1 located in the voltage sensor domains (VSDs) of Kv1.1. A member of the Shaker channel family. Here, we have characterised the electrophysiological properties of six different mutations at the position of F244 and we also reported the partiality effects of these following mutations T284A/M, R297K/Q/A/H, I320T, L375F, L399I S412C/I on Shaker sequence using the cut open voltage clamp technique (COVC). We have shown that mutations of F244 in the S1 of the Shaker Kv channel positively shift the voltage dependence of the VSD movement and alter functional coupling between VSD and pore domain. The mutations causing immobilization of the VSD movement during activation and deactivation and responsible for creating a leak current during activation, are removed by the application of 4-AP (4-aminopyridine) or by reinsertion of N-type inactivation but not by TEA (tetraethylammonium). Insights into the molecular mechanisms responsible for the stabilization of the intermediate state have been investigated by separately neutralizing the first three charges (R1Q, R2Q and R3Q) in the S4 segment. The result suggests an interaction between R2 and F244 mutants. It was established that a second co-evolved interface exists between S1 and the pore helix near the extracellular surface and it acts as a second anchor point. It is also responsible for generation of leak currents. The results suggest a dysfunction of the VSD in which the affected nerve cells cannot efficiently repolarize following an action potential because of altered delayed rectifier function

**Keywords:** Voltage-gated potassium channel, gating, intermediate state trapping, voltage sensor domains, leak current.

# Table des matières

---

1	Introduction.....	1
1.1	L'ataxie épisodique de type I.....	4
1.1.1	Symptômes Cliniques et diagnostic.....	5
1.1.2	Effets généraux des mutations menant à l'ataxie épisodique de type I sur les canaux Kv1.1.....	8
1.1.3	Traitements .....	14
1.2	Structure des canaux potassiques.....	16
1.2.1	Classification topologique et homologie structurale .....	18
1.2.2	Le pore.....	21
1.2.3	Le senseur de voltage .....	25
1.3	Propriétés ioniques du clone Shaker, canal potassique voltage dépendant .....	30
1.4	Étude statique et dynamique des charges électriques des canaux potassiques .....	38
1.4.1	Identification des charges sur les canaux voltage-dépendants.....	38
1.4.2	Caractéristiques cinétiques et énergétiques des courants de <i>gating</i> .....	41
1.5	Objectifs.....	44
2	Méthodologie .....	45
2.1	<i>Cut Open Voltage Clamp (COVC)</i> .....	45
2.2	Procédures expérimentales.....	49
2.2.1	Biologie moléculaire .....	49
2.2.2	Ovocytes de <i>Xenopus</i> et expression .....	49
2.2.3	Conditions électrophysiologiques .....	50
2.3	Analyse des données .....	51
3	Résultats .....	53
3.1	Mutations responsables de l'épisodique ataxie de type I.....	53
3.2	Mutation F244C.....	62
3.2.1	Effets des substitutions, au site F244, sur la probabilité d'ouverture :.....	62
3.2.2	Les mutations F244 altèrent le mouvement du VSD :.....	67
3.2.3	Le phénotype des mutations F244 dépend des arginines sur le S4 : .....	73
3.2.4	Caractérisation du courant de fuite :.....	80
3.2.5	Origine du courant de fuite .....	85

3.2.6	Conséquence sur l'inactivation de type C : .....	88
4	Discussion .....	91
4.1	Un deuxième point d'ancrage entre le VSD et le pore : .....	92
4.2	Stabilisation d'un état intermédiaire: .....	95
4.3	Éclaircissement des effets de la mutation original de l'EA-1 (F244C) : .....	98
5	Conclusion .....	100
6	Bibliographie.....	102
7	Annexe .....	117

# Liste des Tableaux

---

## Introduction :

<i>Tableau 1-1 : Symptôme Cliniques de l'EA-1 et l'EA-2.....</i>	<i>8</i>
<i>Tableau 1-2 : Synthèse du lien entre certaines mutations de l'EA-1, du phénotype, de la réponse aux médicaments et des conséquences physiologiques sur le canal.....</i>	<i>13</i>

## Résultats :

<i>Tableau 3-1 : Correspondance séquentielle entre les canaux potassiques de la famille Kv1.1 et la famille Shaker.....</i>	<i>53</i>
<i>Tableau 3-2 : Résumé des altérations fonctionnelles des mutations de l'EA-1 dans la littérature</i>	<i>55</i>
<i>Tableau 3-3 : Synthèse des résultats du lissage par deux fonctions de Boltzmann des courbes QV du Qon des mutations de l'EA-1 .....</i>	<i>60</i>
<i>Tableau 3-4 : Synthèse des <math>V_{1/2}</math> de la GV des mutations sur le site F244 .....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 3-5 : Synthèse des <math>V_{1/2}</math> des deux composantes de la GV des mutations sur le site F24471</i>	<i>71</i>
<i>Tableau 3-6 : Synthèse des <math>V_{1/2}</math> des deux composantes de Qon des mutations sur le site F244..</i>	<i>72</i>
<i>Tableau 3-7 : Synthèse des <math>V_{1/2}</math> des deux composantes de Qon des neutralisations des arginines et des triples mutations.....</i>	<i>79</i>
<i>Tableau 3-8 : Changement du potentiel d'inversion selon une variation de la concentration externe du NaMes. ....</i>	<i>88</i>
<i>Tableau 3-9 : Synthèse des constantes de temps de l'inactivation de type C .....</i>	<i>90</i>

# Liste des Figures

---

## Introduction :

<i>Figure 1-1 : Mutation de l'EA-1 sur Kv1.1 représenté en deux dimensions.</i>	10
<i>Figure 1-2 : Arbre phylogénétique des 143 protéines apparentées structurellement aux canaux ioniques chez l'humain.</i>	18
<i>Figure 1-3 : Tétramérisation des sous-unités d'un canal K<sup>+</sup>.</i>	19
<i>Figure 1-4 : Représentation topologique des différents canaux potassiques.</i>	21
<i>Figure 1-5 : Représentation structurelle du pore.</i>	23
<i>Figure 1-6 : Localisation des ions potassiques dans le pore.</i>	25
<i>Figure 1-7 : Le senseur de voltage.</i>	27
<i>Figure 1-8 : Illustration des différents VSD semblables aux canaux Kv.</i>	29
<i>Figure 1-9: Courants ioniques du canal Shaker.</i>	30
<i>Figure 1-10 : Schématisation des étapes de l'inactivation lente et rapide avec l'état du canal correspondant.</i>	32
<i>Figure 1-11 : Inactivation de type C.</i>	33
<i>Figure 1-12 : Courants capacitifs et de transitions.</i>	35
<i>Figure 1-13 : Courants de gating.</i>	36
<i>Figure 1-14: Schéma cinétique de l'action du 4-AP.</i>	37
<i>Figure 1-15 : Structure cristalline du Kv 1.2.</i>	39
<i>Figure 1-16 : Interactions intra sous-unitaires et inter sous-unitaires.</i>	41
<i>Figure 1-17 : Dépendance de la charge en voltage et modèle séquentiel.</i>	42
<i>Figure 1-18 : Courant transitoire.</i>	43

## Méthodologie :

<i>Figure 2-1 : COVC.</i>	48
---------------------------	----

## Résultats :

<i>Figure 3-1 : Localisation des mutations de l'EA-1 étudié sur deux sous-unités.</i>	54
<i>Figure 3-2 : Courants transitoires des mutations de l'EA-1.</i>	57

<i>Figure 3-3 : Histogramme de la variation entre le V12 du WT et le V12 des mutations de l'EA-1.</i>	61
<i>Figure 3-4 : Effet des mutations F244 sur la probabilité d'ouverture.....</i>	64
<i>Figure 3-5 : Effet de la mutation F244C sur les courants ioniques. ....</i>	66
<i>Figure 3-6 : Effets des mutations F244 sur les courants transitoires.....</i>	69
<i>Figure 3-7 : Couplage entre le pore et le VSD. ....</i>	70
<i>Figure 3-8 : Effet de la neutralisation des trois premières arginines situées sur le S4 et l'incorporation de la mutation F244 A et C dans cette environnement. ....</i>	76
<i>Figure 3-9 : Le phénotype des mutations F244A et C dépendent des arginines sur le S4. ....</i>	78
<i>Figure 3-10 : Caractérisation du courant de fuite. ....</i>	81
<i>Figure 3-11 : Dépendance en voltage du courant de fuite observé lors du Qon. ....</i>	84
<i>Figure 3-12 : Flux potassique dans le pore provoquant un courant de fuite. ....</i>	87
<i>Figure 3-13 : Inactivation de type C des mutations F244 après un pulse de +60 mV pendant 10 s. ....</i>	89

## Discussion :

<i>Figure 4-1 : Vue d'ensemble de la région du VSD et des segments S5-S6 de la sous unité adjacente autour de la position F244 dans l'état ouvert. ....</i>	92
<i>Figure 4-2 : Agrandissement montrant les interactions possibles de la deuxième interface du VSD avec le pore dans un état ouvert. ....</i>	93
<i>Figure 4-3 : Positionnement de F244 par rapport au segment S4.....</i>	97

## Liste des abréviations

---

### -A-

A : Acide Aminé Alanine, Ala

4-AP : 4-aminopyridine

### -C-

C : Acide Aminé Cystéine, Cys

Ca<sup>2+</sup> : Ion de calcium

Ci-VSP : Phosphatase sensible au voltage

COVC : Cut-Open Voltage Clamp

C<sub>1</sub> : État 1 fermé du pore

C<sub>2</sub> : État 2 fermé du pore

### -D-

D : Acide Aminé Acide Aspartique, Asp

### -E-

E : Acide Aminé Glutamate, Glu

EA-1 : Ataxie Épisodique de type 1 (*Episodic Ataxia type I*)

EA-2 : Ataxie Épisodique de type 2 (*Episodic Ataxia type II*)

EMG : Électromyogramme

EEG : Électro-encéphalogramme

### -F-

F : Acide Aminé Phénylalanine, Phe

### -G-

G : Acide Aminé Glycine, Gly

GV : Relation de la conductance ionique en fonction du Voltage

**-H-**

H : Acide Aminé Histidine, His

H<sup>+</sup> : Proton

HH : Hodgkin Huxley

HP : Potentiel de Maintient

**-I-**

I : Acide Aminé Isoleucine, Ile

**-K-**

K : Acide Aminé Lysine, Lys

K<sup>+</sup> : potassium

Kv : Canaux voltage-dépendants sélectifs au potassium

**-L-**

L : Acide Aminé Leucine, Leu

**-M-**

M : Acide Aminé Méthionine, Met

**-N-**

N : Acide Aminé asparagine, Asn

Na<sup>+</sup> : Ion de sodium

**-O-**

O : Élément d'oxygène

O : État ouvert du pore

**-P-**

P<sub>o</sub> : Probabilité d'ouverture

$P_o$  : État de pré activation du canal

### **-Q-**

QV : Relation de la charge de « gating » en fonction du Voltage

### **-R-**

R : Acide Aminé Arginine, Arg

R : État de *Repos* du senseur de voltage

### **-S-**

S : Acide amine Sérine, Ser

SX : Segment transmembranaire X

### **-T-**

TEV : Two Electrode Voltage

$\tau$  : Temps de vie

TEA : tétraéthylamonium

### **-V-**

V : Acide Aminé Valine, Val

$V_o$  : potentiel à l'équilibre

VSD : Senseur de voltage (*voltage sensor domain*)

### **-W-**

W : Acide Aminé Tryptophane, Trp

### **-Y-**

Y : Acide Aminé Tyrosine, Tyr

## Remerciements

---

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de l'obtention de mon diplôme.

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 son suivi constant et l'apport élémentaire de ces réflexions.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Mireille Marsolais, technicienne de laboratoire, et Madame Yolaine Charbonneau, agent de recherche, pour leurs générosités et leurs grandes patiences dont elles ont su faire preuve malgré leurs nombreuses charges professionnelles. Leurs expertises en biologie moléculaire fut essentielle à toute réussite qui me puisse être associée.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à mes collègues de travail : Indrani Bhattacharyya, Annemarie Brauser, Élise Faure, Georges Haddad, Tanja Kalstrup, Hugo McGuire et Juan Zhao.

Je remercie également la directrice du département Dr. Lucie Parent, ainsi que les collaborateurs du GEPROM, notamment le Dr. Jeans Yves Lapointe et le Dr. Rémy Sauvé pour leur enseignement, leurs conseils avisés et pour avoir accepté avec gentillesse de lire, de corriger et d'évaluer ce travail.

Enfin mes reconnaissances vont tout particulièrement à mes parents, ma sœur et ma famille ainsi qu'à mes amis, notamment Mélanie Bartz, Jeffrey Gouin, Alexis Dumais, Ludiguine Maggie et Thomas Sontag.

# 1 Introduction

---

Les canaux potassiques (K<sup>+</sup>) régulent le potentiel de la membrane cellulaire et l'excitabilité des neurones ainsi que d'autres types cellulaires (Debanne, Guerineau et al. 1997, Hoffman, Magee et al. 1997). Ils sont à l'origine, avec les canaux sodiques et calciques, de la genèse d'un potentiel d'action (PA). Ils se déclenchent lors de la dépolarisation du potentiel membranaire pour permettre une sortie des ions potassiques dans le compartiment extracellulaire afin de repolariser la cellule. De plus, les canaux potassiques dépendant du voltage (Kv) peuvent contrôler la transmission de neurotransmetteur aux parties terminales des axones, en réduisant l'excitabilité membranaire ainsi que le flux de calcium dans les cellules musculaires (Gu and Barry 2011). En d'autres termes, les canaux potassiques régulent le potentiel d'action dans les réseaux neurologiques. Une mutation génétique des canaux potassiques du système nerveux, provoque des symptômes cliniques répertoriés dans plus d'une centaine de pathologies (Tomlinson, Hanna et al. 2009).

Nous pouvons donner comme exemple : la paralysie périodique hypokaliémique qui empêche les contractions musculaires, le syndrome du long QT relié à des troubles de rythmicité cardiaque, l'épilepsie causant une hyperactivité cérébrale paroxystique qui peut se manifester par des convulsions pouvant mener à la perte de conscience. Un lien clair entre symptômes cliniques et mutations génétiques a pu être identifié chez des patients atteints de l'ataxie épisodique. Des mutations ponctuelles d'acides aminées sur les canaux potassiques Kv1 seraient la cause de neuromyotonie et de syndromes épileptiques. Les canalopathies sont de plus en plus reconnues en clinique (Rajakulendran, Schorge et al. 2007).

L'ataxie épisodique (EA) est une maladie neurologique caractérisée par des syndromes intermittents cérébelleux avec un fonctionnement normal du cerveau. Deux formes principales d'ataxie épisodique sont reconnues à ce jour : l'ataxie épisodique de type I et II (EA-1 et EA-2), toutes les deux considérées comme des maladies génétiques autosomiques dominantes. Ces ataxies épisodiques sont l'exemple du phénomène de la convergence phénotypique. En effet, EA-1 est causé par les canaux potassiques de type humain voltage-dépendants Kv 1.1 (encodé par le gène KCNA1) (Browne, Gancher et al. 1994, Browne, Brunt et al. 1995) et l'EA-2 est causé par les canaux calciques voltage-dépendants de type P/Q Cav 2.1 (encodé par le gène CACNA1A) (Ophoff, Terwindt et al. 1996). Seul la neuromyotonie permet une distinction clinique entre l'EA-1 et l'EA-2, les épisodes d'ataxies, les migraines et nausée sont communes aux deux. Il existe aussi des ataxies épisodiques de type III, IV, V et VI. Néanmoins, elles sont si rares, souvent diagnostiquées dans une seule famille, et non génétiquement identifiées que nous n'en parlerons pas dans ce mémoire (Tomlinson, Hanna et al. 2009).

L'existence et l'implication de structures transmembranaires durant la signalisation électrique a été suggérée il y a 60 ans, grâce à l'intuition scientifique d'Alan Hodgkin et Andrew Huxley. Ils ont contribué à élucider la nature et le mécanisme de propagation du potentiel d'action (Hodgkin and Huxley 1952), et furent récipiendaires du prix Nobel de physiologie et médecine en 1963 pour cette découverte. Ce concept d'activation des canaux voltage-dépendants ainsi que leur structure étaient encore inconnus à cette époque. Mais ils sont arrivés à la conclusion que les modifications de perméabilité ionique devaient directement dépendre d'un changement de conformation localisé dans la membrane. Avec ces hypothèses et le développement technologique, la recherche et le temps ont permis, finalement, de distinguer les différents domaines qui forment les canaux ioniques dépendants du voltage ; le capteur de voltage (VS), le pore de conduction contenant les *gates* et le domaine cytoplasmique (Long, Campbell et al. 2005).

Cette thèse s'articulera autour de la description des perturbations fonctionnelles causées par les mutations de l'EA-1 situées sur le senseur de voltage des canaux potassiques dépendant du voltage de la famille Shaker, structurellement et fonctionnellement très proche des canaux Kv 1.1. Nous nous intéresserons plus précisément sur le dysfonctionnement du couplage électromécanique entre le senseur de voltage et le pore. Les mutations responsables pour l'EA-1 semblent être distribuées sur toute la protéine Kv1.1 dans la séquence primaire. Néanmoins, si on considère la structure quaternaire, on trouve qu'elles sont concentrées dans les deux régions du couplage électromécanique : la région du lien S4-S5 et le S6-C-terminal ainsi que le haut du senseur de voltage, où il interagit avec le pore (Lee, Banerjee et al. 2009). Notre hypothèse est donc que le couplage électromécanique entre le senseur de voltage et le pore joue un rôle important dans l'expression de l'EA-1, et nous allons ainsi investiguer cette hypothèse par la mesure des courants ioniques et transitoires. Les expériences seront réalisées grâce à l'étude de l'expression des canaux potassiques dans des ovocytes de *Xenopus laevis* avec la méthode de COVC (*Cut-Open Voltage Clamp*). Nous ferons une étude des courants transitoires de 7 mutations de l'EA-1 afin de déterminer une idée générale du comportement du senseur de voltage. Ainsi, nous pourrions nous concentrer sur la mutation F184C des canaux Kv1.1 (F244C des canaux Shaker), située dans une région faisant un contact physique entre le senseur de voltage et le pore (Lee, Banerjee et al. 2009). Nos expériences permettent de réaffirmer l'effet d'haploinsuffisance de la mutation F184C et de définir les causes structurelles d'une telle dominance négative. Les conséquences de ces nouvelles propriétés des canaux potassiques mutés sur les symptômes cliniques seront abordées lors de la discussion.

Dans l'introduction, nous ferons une revue de la littérature sur l'ataxie épisodique de type I et les canaux potassiques dépendants du voltage. Par la suite, le lecteur sera familiarisé aux procédures expérimentales ainsi qu'aux méthodes d'électrophysiologie en voltage imposé à haute résolution. Finalement, les effets fonctionnels et structuraux

des mutations de l'épisodique ataxie sur les canaux potassiques de la famille Shaker sera abordé avec les objectifs détaillés de cette recherche.

## 1.1 L'ataxie épisodique de type I

---

Bien qu'étant une maladie rare, l'ataxie épisodique de type I a apporté une compréhension non négligeable de l'interconnection complexe entre les canaux ioniques et le système nerveux périphérique. Ceci a permis de soulever l'idée que les mutations dans les canaux ioniques seraient à la base des maladies neurologiques communes telles que l'épilepsie et la migraine. Il y a 18 ans, ces maladies ne connaissaient pas d'explication biologique et étaient souvent relayées à des maladies psychogènes (Browne, Gancher et al. 1994, Browne, Brunt et al. 1995). Certaines hypothèses telle que épileptiforme, métabolique ou encore mitochondriale étaient proposées pour décrire ces dysfonctionnements neurologiques dans des tissus sains. De nos jours, le terme épisodique ataxie est devenu une appellation vaste car le phénotype des patients atteints de la maladie continue encore de s'étendre bien au-delà du simple symptôme d'incoordination fine. Il est maintenant bien défini que l'EA-1 est une maladie héréditaire de transmission autosomique dominante due à une mutation du gène humain KCNA1 (sur le chromosome 12p13) (Browne, Gancher et al. 1994, Litt, Kramer et al. 1994).

Les études *in vitro* des mutations associées avec les phénotypes de l'EA, nous ont permis de caractériser les conséquences sur les fonctionnalités du canal pour des mutations spécifiques. Bien qu'il existe des différences entre les mutations sur KCNA1 et CACNA1A, responsable de l'EA-2, il apparaît une perte générale du fonctionnement et un effet négatif dominant de l'ARN muté lors de la co-expression avec le canal de type sauvage (abréviation WT = *wild type* : canal non muté, présent chez le patient sain)(Adelman, Bond et al. 1995, Zerr, Adelman et al. 1998, Zuberi, Eunson et al. 1999, Eunson, Rea et al. 2000, Jouvenceau, Eunson et al. 2001). Néanmoins, le lien entre les mutations

généétiques et les phénotypes de la maladie reste incompris. Cela peut-être dû au modèle cellulaire utilisée qui ne peut reproduire parfaitement la traduction *in vivo* comme la phosphorylation, la glycosylation et l'adressage des protéines. De plus, l'expression *in vitro* ne peut reproduire l'expression différentielle topographique des canaux observés dans les neurones centraux et périphériques (Trimmer and Rhodes 2004, Vacher, Mohapatra et al. 2008).

Pour vraiment diagnostiquer l'EA, des tests neurophysiologiques sont nécessaires tels que l'électromyogramme (EMG) et l'électro-encéphalogramme (EEG). L'avantage des méthodes de diagnostic en électrophysiologie est l'observation *in vivo* du fonctionnement des canaux ioniques. Ces méthodes ont déjà prouvé leur efficacité dans le diagnostic des canalopathies musculaires (McManis, Lambert et al. 1986, Fournier, Arzel et al. 2004, Fournier, Viala et al. 2006, Michel, Sternberg et al. 2007). L'EA possède des manifestations centrales et périphériques sur le système nerveux, c'est pour cette raison que les tests neurophysiologiques sont des outils complémentaires solides qui guident les tests génétiques et cliniques.

### **1.1.1 Symptômes Cliniques et diagnostic**

---

En 1975, Van Dyke (VanDyke, Griggs et al. 1975) fait la première description d'une famille entière de 11 membres sur trois générations caractérisés par des ataxies périodiques, des mouvements continus des muscles (rigidité du corps, mouvements incontrôlés de la tête, spasmes carpiens) ainsi que par d'autres symptômes secondaires (vertiges, trouble de la vue, diplopie). Les attaques duraient en moyenne 3 minutes et apparaissaient entre l'âge de 2 et 12 ans. En 1976, Hanson (Hanson, Martinez et al. 1977) décrit une deuxième famille : une mère et ses deux enfants manifestant des épisodes intermittents de tremblements avec une démarche chancelante, une dysarthrie et une position anormale de la main. Les épisodes duraient en moyenne 10

minutes et apparaissaient entre la naissance et 5 ans. Enfin, en 1990, Brunt et Van Weerdan (Brunt and van Weerden 1990) décrivent une large famille de 28 membres sur cinq générations affectés par des épisodes soudain d'ataxie et des myokymies continues dans des proportions variables. Mais tous les EMG des membres de la famille, montrent clairement des décharges myokymiques. Depuis, plus d'une centaine d'individus ont été identifiés avec les phénotypes caractéristiques de l'EA-1 : des épisodes d'ataxie et la myokymie.

L'EA-1 augmente aussi de 10 fois le risque de développer l'épilepsie par rapport à des individus normaux relevant des mutations sur KCNA1 comme facteur pathogène de l'épilepsie (Zuberi, Eunson et al. 1999). A l'appui de cette hypothèse, les souris *knock-out* sur KCNA1 présentent des phénotypes d'épilepsies (Smart, Lopantsev et al. 1998). De plus, les convulsions néonatales familiales bénignes (benign familial néonatal convulsion BFNC) seraient la conséquence de mutations sur les gènes KCNQ2 et KCNQ3 exprimant les canaux potassiques voltage dépendant Kv7.2 et Kv7.3 respectivement. Il est peut être possible que le dérèglement des canaux potassiques soit impliqué dans l'épilepsie particulièrement lors de l'abaissement du seuil d'ouvertures, déclenchant ainsi un potentiel d'action plus rapide, allant jusqu'au tétanos du muscle. Il n'est pas encore vraiment clair pourquoi seulement certains individus atteints d'EA-1 présentent des symptômes épileptiques, d'autres facteurs épi génétique doivent être mis en jeu. Récemment, un mécanisme entre la protéine LGI-1 et une forme d'épilepsie du lobe temporale a été mis à jour. La protéine LGI-1 modifiera le mécanisme d'inactivation de type N des canaux Kv1.1 (Schulte, Thumfart et al. 2006).

Généralement, l'incidence de l'EA-1 se déclare durant la première ou seconde décennie de la vie mais peut survenir dès la naissance. On peut alors observer des épisodes d'ataxie de façon périodiques se manifestant par des tremblements corporels sévères, une démarche chancelante, une dysarthrie et une vision trouble. Ces symptômes sont généralement accompagnés de nausées, de migraines et sont provoqués par un stress physique et/ou émotionnel, des mouvements brusques ou la surprise (Brunt and van

Weerden 1990). La fièvre ainsi que des maladies secondaires comme la grippe peuvent abaisser le seuil de déclenchement des crises qui sont alors plus graves que d'habitude. La durée des crises est généralement variable selon les individus, les manifestations quotidiennes pouvant aller de quelques fois par année jusqu'à plus de 30 fois par jour, avec des durée de quelques secondes à quelques minutes. Des variantes atypiques de l'EA-1 peuvent prolonger les crises de 5 à 12 heures (Lee, Wang et al. 2004). Les épisodes se terminent spontanément. Certains patients trouvent que le repos ou le sommeil aide à réduire la récurrence des crises. La maladie est non-progressive et généralement la fréquence diminue avec l'âge. Pour un résumé des grands traits de l'EA-1 et l'EA-2, nous pourrions nous reporter au tableau 1.1.

La deuxième caractéristique de l'EA-1 est la myokymie ou la neuromyotonie spécifique au type 1. Ceci se manifeste par des raideurs musculaires, des spasmes musculaires (ou tic), des vacillements et parfois par une hypertrophie musculaire. Ces symptômes affectent généralement le visage (autour des yeux et de la bouche), les doigts et les mollets mais leurs degrés d'affectation peuvent être subtils. Parfois, seul un mouvement involontaire des doigts est observé (Hanson, Martinez et al. 1977, Gancher and Nutt 1986, Zuberi, Eunson et al. 1999, Eunson, Rea et al. 2000, Rajakulendran, Schorge et al. 2007). Sur la base des expériences effectuées par Newsom-Davis et Mills sur le mécanisme d'auto-immunité par les anticorps contre les canaux potassique (Newsom-Davis and Mills 1993), la neuromyotonie serait provoqué par une perte de la stabilité du potentiel membranaire des canaux Kv1.1.

Il existe aussi des variantes dans le phénotype de l'ataxie comme l'épilepsie partielle, le raccourcissement du tendon d'Achille chez l'enfant, la posture de transition anormal durant l'enfance, la fatigue secondaire et la neuromyotonie sans présence d'ataxie épisodique (Zuberi, Eunson et al. 1999, Eunson, Rea et al. 2000, Klein, Boltshauser et al. 2004). L'imagerie cérébrale est généralement normale (Brunt and van Weerden 1990, Vaamonde, Artieda et al. 1991, Zuberi, Eunson et al. 1999, Eunson, Rea et al. 2000,

Chen, von Hehn et al. 2007). L'examen clinique et surtout l'EMG permettent d'identifier les myokymies.

	Episodic ataxia type 1	Episodic ataxia type 2
Human gene	KCNA1 chromosome 12p13	CACNA1A chromosome 19p13
Channel	Potassium channel, K <sub>v</sub> 1.1	Calcium channel, Ca <sub>v</sub> 2.1
Duration of acute ataxia	Brief: Seconds to minutes	Prolonged: Hours to days
Association with seizures	Yes	Yes
Peripheral nerve features	Neuromyotonia	Occasional reports of intermittent weakness
Headache during acute episodes	No	Sometimes seen
Persistent or progressive cerebellar syndrome	No	Yes

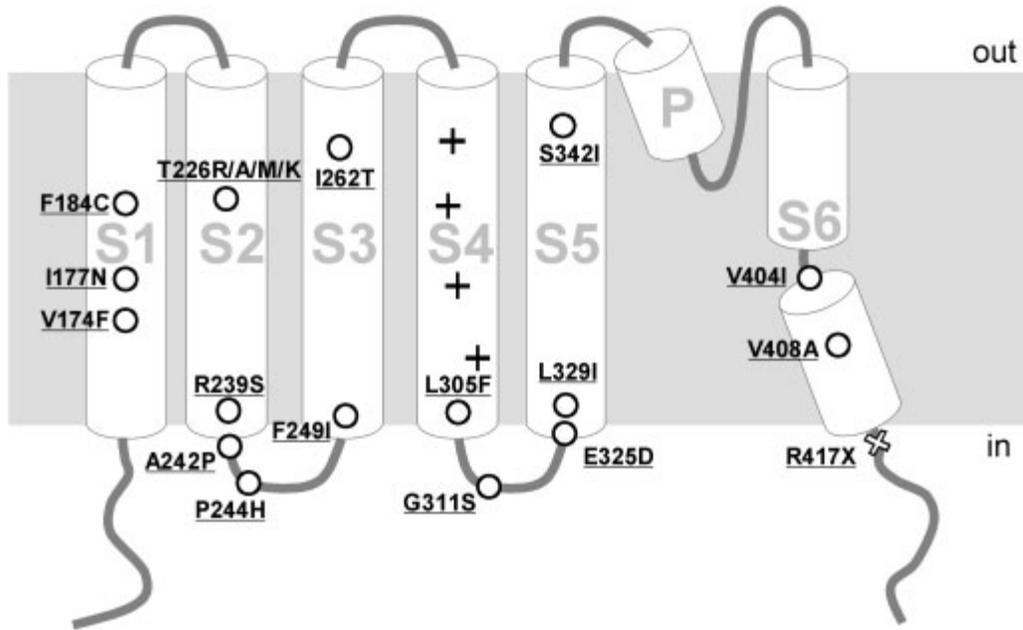
**Tableau 1-1 : Symptôme Cliniques de l'EA-1 et l'EA-2.** Tableau tiré de Tomlinson, Hanna et al. 2009.

### 1.1.2 Effets généraux des mutations menant à l'ataxie épisodique de type I sur les canaux Kv1.1

Le canal Kv1.1 est exprimé largement dans le système nerveux central et périphérique, particulièrement près du nœud de Ranvier des axones moteurs et dans les inhibiteurs des neurones GABAergiques des cellules du cerveau. La continuité de l'activité des fibres motrices dans la neuromyotonie est générée par une hyperexcitabilité des neurones moteurs. Les mutations sur les sous-unités de Kv1.1 introduisent une réduction dans la perméabilité potassique ce qui résulte à une prolongation du potentiel d'action et l'échec d'une repolarisation normale (Benatar 2000). Cet échec dans la repolarisation provoque des décharges répétées dans les muscles d'où la myokymie. Le mécanisme de l'ataxie est encore obscur. Bien que la vaste expression des canaux Kv1.1 dans le cortex cérébral et l'hippocampe peut être responsable de l'accroissement d'évènements épileptiques dans certains type d'EA-1, la présence du canal dans le cœur, les muscles

squelettiques, la rétine et les cellules pancréatiques ne montrent aucun impact sur ces différents tissus lors d'un diagnostic d'EA-1.

Les méthodes d'électrophysiologie *in vitro* nous ont beaucoup aidées dans la compréhension des mécanismes par lesquels les mutations sur les sous-unités de Kv1.1 aboutissent au phénotype d'EA-1. La plupart des études utilisent l'expression des canaux potassiques dans le système cellulaire d'ovocytes de *Xenopus laevis* (expression endogène faible des canaux potassiques) ou dans les cellules HEK. Les effets des mutations sur les fonctions du canal sont alors examinés par l'étude des changements des courants ioniques en réponse à une modification du voltage imposé à la membrane cellulaire. Les canaux potassiques sont en général composés de 4 sous-unités  $\alpha$  homogènes contenant 6 segments transmembranaires (S1-S6), lesquelles sont liées par des boucles intra- et extra-cellulaires. Les parties N- et C-terminales sont intracellulaires et une sous-unité  $\beta$  est accrochée à chaque sous-unité  $\alpha$  à la partie N-terminale. Les mutations dysfonctionnelles de l'EA-1 sont situées dans la sous-unité  $\alpha$  et 19 mutations ont été répertoriées. Pour plus d'information sur la structure et le fonctionnement des canaux potassiques, se reporter à la section 1.2 de ce mémoire. La figure 1-1 nous présente les mutations de l'EA-1 et leurs localisations sur le canal.



**Figure 1-1 : Mutation de l'EA-1 sur Kv1.1 représenté en deux dimensions.** Les cercles représentent les mutations faux-sens et la croix représente une mutation stop. Les + sur le S4 représentent les charges positives du segment. Ce schéma est tiré de Jen, Graves et al. 2007

La plupart des études (Adelman, Bond et al. 1995, D'Adamo, Liu et al. 1998, Zerr, Adelman et al. 1998, Zerr, Adelman et al. 1998, Boland, Price et al. 1999, Zuberi, Eunson et al. 1999, Eunson, Rea et al. 2000, Rea, Spauschus et al. 2002, Imbrici, Cusimano et al. 2003) montrent une réduction significative du pic d'amplitude des courants potassiques par rapport au courant de WT (voir tableau 1-2). Les réductions varient selon les mutations et aucune mutation augmentant le courant ionique a été trouvées à ce jour. L'altération des courants potassiques peut aussi être aussi mis en évidence sur les courants transitoires ainsi que sur la probabilité d'ouverture (modulation du seuil d'ouverture des canaux) qui sont décalés vers des voltages plus dépolarisants (Zerr, Adelman et al. 1998). Les constantes de temps d'activation et d'inactivation en sont aussi modifiées, résultant une diminution globale du flux d'ions potassiques traversant les canaux Kv1.1. EA-1 est une maladie autosomique dominante et si nous considérons

les patients atteints comme hétérozygote, nous pouvons supposer que les canaux Kv1.1 sont l'assemblage tétramérique de sous-unité normales et mutées transcrit par les deux copies du gène KCNA1. Les études tentant de se rapprocher des conditions *in vivo*, en co-exprimant les sous-unités mutées et normales, révèlent une densité de courants intermédiaires (en dessous de 50 %) entre le courant ionique provenant d'un homéomère muté (le plus bas) et un homéomère normal (Zerr, Adelman et al. 1998, Zuberi, Eunson et al. 1999).

Certaines mutations interfèrent avec l'inactivation rapide de type N (E325D, V404I et V408A) qui consiste en un peptide formé par la partie N-terminale du canal qui obstrue le pore, ce qu'on appelle le mécanisme de *ball and chain* (Maylie, Bissonnette et al. 2002, Imbrici, D'Adamo et al. 2006). Ces mutations ralentissent le blocage du pore par le peptide N-terminale et pourraient être une des causes du phénotype de l'EA-1. Les études sur les souris *knock-in* de la mutation V408A par recombinaison homogène (Herson, Virk et al. 2003), montrent que si la souris est homozygote V408A, elle meurt 3 jours après sa naissance, mais si la souris est hétérozygote V408A/+, elle présente des troubles de coordination induit par le stress qui sont améliorés par l'administration d'acétazolamide comme chez les humains.

Il existe aussi un deuxième type d'inactivation : l'inactivation de type C qui consiste en une obstruction du filtre de sélectivité par une réorientation des acides aminés formant celui-ci. Certaines mutations accélèrent ou ralentissent l'inactivation de type C, indiquant une modification du pore par ces mutations. Nous pouvons citer comme exemple les mutations V408A et R417X qui accélèrent l'inactivation de type C. Même si le fonctionnement du filtre de sélectivité semble être modifié, son rôle premier de sélection stricte des ions potassiques n'est pas altéré. Il reste perméable qu'aux ions K<sup>+</sup> par rapport aux ions Na<sup>+</sup> (Adelman, Bond et al. 1995, Eunson, Rea et al. 2000).

Les preuves les plus solides qui nous ont amené à faire le lien entre le dysfonctionnement des canaux potassiques et l'EA-1 sont les mutations qui associent un phénotype sévère incluant crises et résistance aux médicaments comme la mutation

R417stop qui tronque la partie C-terminale du canal et réduit drastiquement les courants potassiques (Eunson, Rea et al. 2000). Tandis que la mutation R417stop permet un lien direct avec la maladie, la mutation T226R est plus difficile à associer avec un phénotype particulier car même si ces mutations causent une réduction drastique du courant potassique (voir tableau 1.1.3), les patients présentant ce type de mutation sont atteints de plusieurs phénotypes comme une ataxie typique, une myokymie isolée, une épilepsie et une posture anormale (Zuberi, Eunson et al. 1999). D'autres mutations comme P244H altèrent peu les courants ioniques et provoquent une neuromyotonie bénigne sans ataxie. Ces altérations variables selon les mutations peuvent aussi expliquer les différents phénotypes constatés avec l'EA-1. À date, aucune mutation n'a été trouvée annulant la complète expression du gène KCNA1 et aucune dans la partie N-terminale du canal.

La question à résoudre est de comprendre comment l'haploinsuffisance des canaux potassiques aboutit aux nombreux symptômes de l'EA-1. Le tableau 1-2 résume les phénotypes liés à certaines mutations ainsi que leurs réponses aux médicaments et les conséquences physiologiques de la présence du canal muté.

Mutation (Segment Involved)	Phenotype	Functional Consequences	Response to Medication	References
V174F (S1)	EA-1 with epilepsy	Mutant channels are not functional	ACZ ineffective in one member; phenytoin reduced myokymia in one member In 12 members tested, ACZ reduced frequency of attacks in 8	(Gancher and Nutt 1986; Brunt and van Weerden 1990; Adelman, Bond et al. 1995)
I177N (S1)	EA-1	Reduction in K <sup>+</sup> current amplitude; alters channel kinetics	N/A	(Imbrici, Cusimano et al. 2003)
F184C (S1)	EA-1	Alters voltage dependence and kinetics of activation	Partial response to phenytoin	(VanDyke, Griggs et al. 1975; Adelman, Bond et al. 1995)
T226A (S2)	EA-1	Profound reduction in K <sup>+</sup> current amplitude. Slowed activation and deactivation kinetics	N/A	(Zerr, Adelman et al. 1998)
T226R (S2)	EA-1 with epilepsy and infantile contractures, postural abnormalities, skeletal deformities	Reduction in K <sup>+</sup> current, with mutant subunits exerting a dominant negative effect	ACZ reduced attacks in 1 member In 1 member, phenytoin improved neuromyotonia; in 1 other member, carbamazepine reduced frequency and severity of ataxic attacks	(Zuberi, Eunson et al. 1999; Kinali, Jungbluth et al. 2004)
T226M (S2)	EA-1	Profound reduction in K <sup>+</sup> current amplitude; shift in threshold of activation	N/A	(Zerr, Adelman et al. 1998)
T226K (S2)	Isolated myokymia	No K <sup>+</sup> current, with mutant subunits exerting a dominant negative effect	N/A	(Chen, von Hehn et al. 2007)
R239S (S2)	EA-1	Minimal K <sup>+</sup> current	N/A	(Adelman, Bond et al. 1995)
A242P (S2)	Myokymia and seizures	Profound reduction in K <sup>+</sup> current amplitude	Antiepileptic medication improved myokymia	(Eunson, Rea et al. 2000)
P244H (S2-S3 linker)	Isolated myokymia	Functionally no difference between wild-type and mutant channels	N/A	(Eunson, Rea et al. 2000)
F249I (S2-S3 linker)	EA-1	No detectable K <sup>+</sup> current	N/A	(Zerr, Adelman et al. 1998)
I262T (S3)	EA-1 with distal weakness	N/A	N/A	
G311S (S4-S5 linker)	EA-1	Reduction in K <sup>+</sup> current	N/A	(Zerr, Adelman et al. 1998)
E325D (S4-S5 linker)	EA-1	Altered kinetics of activation and voltage dependence	ACZ reduced frequency and severity of attacks in 3 members	(Adelman, Bond et al. 1995; Lubbers, Brunt et al. 1995)
L329I (S5)	EA-1	N/A	Carbamazepine significantly reduced frequency of attacks in 8 members	(Hand, Gardner et al. 2001)
S342I (S5)	EA-1 without myokymia seizures	N/A	N/A	
V404I (S6)	EA-1	Relatively small effect on channel properties; responds well to treatment	Carbamazepine improved attacks	(Eunson, Rea et al. 2000)
V408A (S6)	EA-1	Minor alterations in kinetics of activation and voltage dependence	N/A	(Adelman, Bond et al. 1995)
R417stop (C-terminus)	Drug-resistant EA-1	Profound reduction in K <sup>+</sup> current amplitude	No improvement with ACZ and antiepileptics	(Eunson, Rea et al. 2000)

**Tableau 1-2 : Synthèse du lien entre certaines mutations de l'EA-1, du phénotype, de la réponse aux médicaments et des conséquences physiologiques sur le canal.** ACZ = acétazolamide; N/A= data not available (données non disponibles). Tiré de Rajakulendran, Schorge et al. 2007.

### 1.1.3 Traitements

---

Le traitement de l'EA est assez difficile étant donné le large spectre de mutations survenant dans les gènes KCNA1 et CACNA 1A. Néanmoins de façon empirique, certains médicaments possèdent des propriétés curatives selon le type de patients mais aucune étude de contrôles ou de comparaison de l'efficacité des médicaments n'a été faite (voir tableau 1.1.3). Nous pouvons citer quelques exemples : Carbamazépine, phénytoïne, acide valproïque (molécule tératogène) et l'acétazolamide semblent efficaces pour l'EA-1 (Lubbers, Brunt et al. 1995, Eunson, Rea et al. 2000, Klein, Boltshauser et al. 2004), l'acétazolamide, phénytoïne (Griggs, Moxley et al. 1978), le flunarizine (Boel and Casaer 1988) et le 4-aminopyridine (Strupp, Kalla et al. 2004) pour l'EA-2.

L'acétazolamide est un inhibiteur de l'anhydrase carbonique qui change le  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Le mécanisme précis de l'EA-1 est encore inconnu, mais il a été rapporté qu'une altération du pH aux alentours des canaux ioniques causerait une hyperpolarisation de la membrane cellulaire et, par conséquent, réduirait l'excitabilité neuronale (Brunt and van Weerden 1990). Ainsi, un pH anormalement haut observé dans le cervelet par spectroscopie à résonnance magnétique chez des patients atteints EA (Bain, O'Brien et al. 1992, Sappey-Marinier, Vighetto et al. 1999) serait corrigé par l'acétazolamide. Cependant, ces études ont été faites sans caractéristiques génétiques. Il pourrait être intéressant d'observer si un changement de la sélectivité aux protons se produit sur des canaux potassiques mutés. De plus, l'acétazolamide provoque des calculs rénaux ce qui implique un traitement de prévention en association avec ce médicament.

Le 4-aminopyridine (4-AP) est un agent inhibiteur des canaux potassique de la famille Kv. Étrangement, cette molécule a récemment montré des qualités dans le traitement de l'EA-2, et non l'EA-1, en réduisant ou abolissant l'ataxie (Strupp, Kalla et al. 2004, Strupp, Kalla et al. 2008). Comme l'EA-1, les mutations provoquant l'EA-2 possèdent un effet négatif dominant et provoque une réduction de la libération des

neurotransmetteurs dépendant du calcium (par exemple, le neurotransmetteur GABA : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique), en particulier dans les cellules de Purkinje, présumées responsable de l'EA-2. Par conséquent, le 4-AP en fermant les canaux potassiques exprimé dans les cellules à paniers (Zhang, Messing et al. 1999), inhibitrices des neurones GABAergiques, permettrait d'augmenter ainsi la libération du neuromodulateur GABA (Strupp, Zwergal et al. 2007). Donc nous avons d'un côté les canaux Cav 2.1 qui permettent la libération des neurotransmetteurs GABA et de l'autre côté, les canaux Kv1.1 qui inhibent leurs libérations lorsqu'aucune mutation n'est présente. Il est clair que le 4-AP est un traitement indirect de l'EA-2 mais pourquoi ne possède-t-il pas d'effet curatif lors de l'EA-1? Pour comprendre cette différence, dans ce mémoire nous avons observé l'effet du 4-AP sur les canaux potassiques dépendant du voltage avec la mutation F184C. Les drogues bloquant les canaux potassiques chez l'homme sont proconvulsives (Bagetta, Nistico et al. 1992, Juhng, Kokate et al. 1999) d'où la nécessité d'un diagnostic précis.

D'autres patients répondent plus à des médicaments anticonvulsivants comme la carbamazépine et la phénytoïne. Ces drogues possèdent un effet inhibiteur sur les canaux sodiques dépendant du voltage en stabilisant l'état inactivés (Ragsdale, Scheuer et al. 1991). En réduisant l'amplitude du pic du potentiel d'action, tout en gardant celui-ci au-dessus du seuil d'activation, il sera plus facile pour les canaux Kv1.1 haploinsuffisants de repolariser la cellule et de retrouver un mécanisme neuronale proche de la normal. La carbamazépine et le phénytoïne semblent aussi avoir des effets sur les neurones GABAergiques de type A (Granger, Biton et al. 1995).

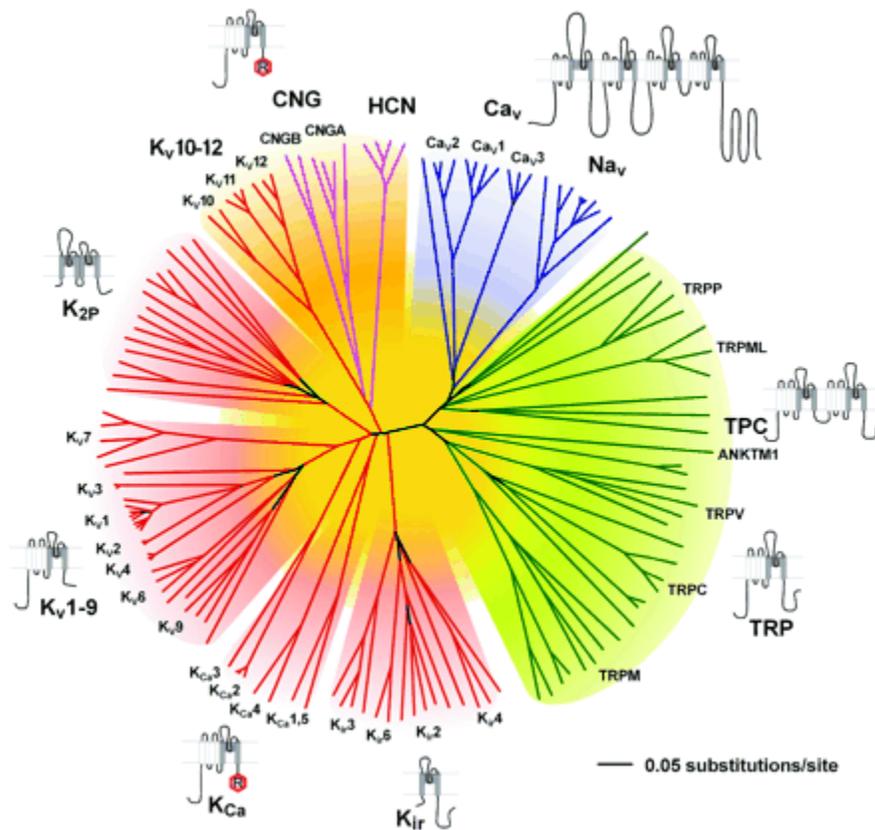
## 1.2 Structure des canaux potassiques

---

Chez les vertébrés, les signaux électriques régulent la contraction musculaire, la sécrétion d'hormones, la perception sensorielle, l'information cérébrale, et la communication entre le cerveau et les tissus périphériques. Tous ces processus physiologiques sont les conséquences directes du bon fonctionnement de la superfamille des canaux ioniques dépendants du voltage pour leurs ouvertures. Cette superfamille possède plus de 140 membres; c'est l'un des plus grand groupe de transduction du signal, et plusieurs membres de cette famille sont des cibles pour les toxines et les médicaments. Parmi cette superfamille, les canaux ioniques sélectifs aux ions potassiques sont les plus diversifiés comme on peut le constater sur l'arbre phylogénétique de la figure 1-2 (Yu, Yarov-Yarovoy et al. 2005). Ils représentent un peu plus du tiers de cette superfamille comparativement aux autres canaux ioniques retrouvés chez l'humain et l'ubiquité de ces canaux suggère fortement leur ancienneté dans le processus évolutif d'où leur importance dans le fonctionnement des organismes. Il existe 70 locus connus dans le génome des mammifères dont 40 gènes spécifiques pour les canaux Kv (Gutman, Chandy et al. 2005) dont fait partie les canaux Kv1.1.

Le ver *C.elegans*, un organisme très simple qui n'utilise que 302 neurones, en détient autant (Salkoff, Wei et al. 2005). Le premier canal potassique à avoir été découvert et cloné est le canal *Shaker* du génome de la mouche drosophile ou *Drosophila melanogaster* (Tempel, Papazian et al. 1987, Adams, Celniker et al. 2000). Cette découverte a permis d'ouvrir la voie à l'identification de la famille des canaux homologues chez les vertébrés, faisant partie de la superfamille des Kv. Ils sont impliqués dans le contrôle de la direction de propagation et de la repolarisation du potentiel d'action (Hoffman, Magee et al. 1997) et dans la filtration des signaux excitateurs en retardant l'apparition du potentiel d'action (Debanne, Guerineau et al. 1997).

Il existe, généralement, un rapport direct entre le fonctionnement d'une protéine et sa structure. Dans le cas d'un canal dépendant du voltage, la variation du champ électrique membranaire permet un bouleversement structural favorisant la formation d'un pore qui permettra la conduction ionique. C'est ce que l'on appelle un mouvement d'*ouverture* et de *fermeture* permettant le contrôle de l'accès des ions à l'intérieur du pore central pour leur permettre de traverser la bicouche lipidique qui possède une barrière énergétique élevée à leurs passages passifs. Le rôle principal des canaux est donc de faire passer, plus ou moins sélectivement, dépendamment du type de canal, des ions à travers une membrane de phospholipides extrêmement hydrophobes.

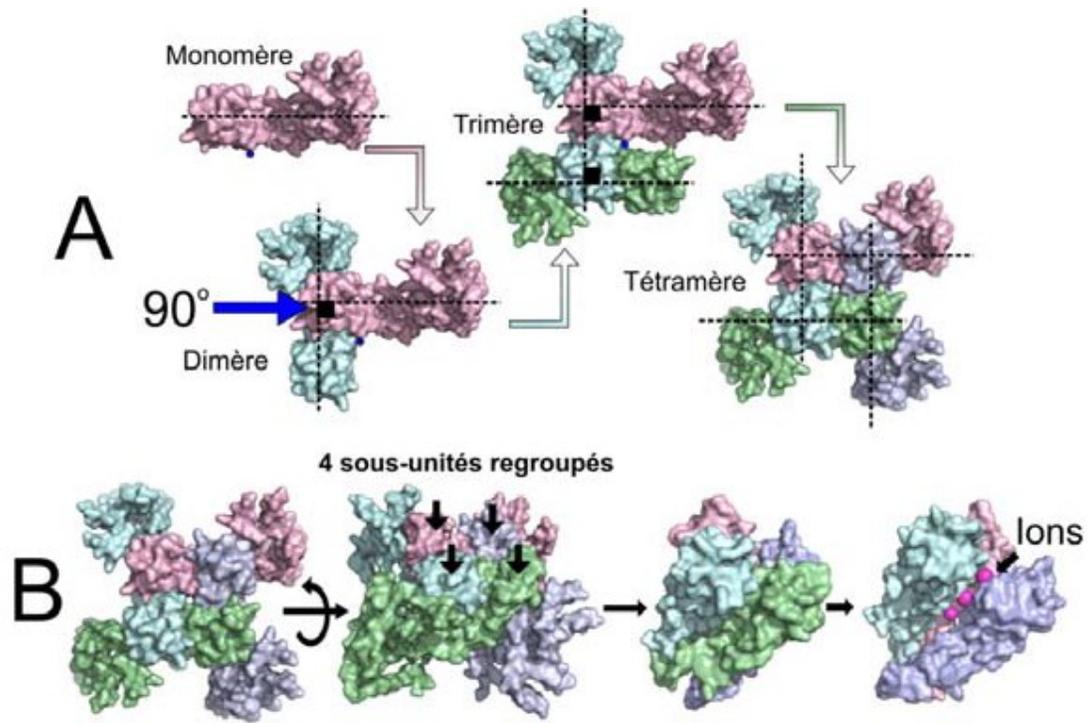


**Figure 1-2 : Arbre phylogénétique des 143 protéines apparentées structurellement aux canaux ioniques chez l'humain.** Les canaux sodiques et calciques sont en bleu, les canaux HCN et CNG en magenta et les canaux mécano-sensitif (TRP) et leurs cousins en vert. Une représentation primaire des structures des canaux est accolée à coté de chaque groupe. Tiré de Yu, Yarov-Yarovoy et al. 2005

### 1.2.1 Classification topologique et homologie structurale

Le prototype des canaux potassiques consiste en 4 sous-unités se regroupant pour former un chemin ionique à travers la membrane cellulaire. Cette architecture tétramérique est constituée de monomères déplacés de 90° dans le plan de la membrane par rapport à la sous-unité précédente autour d'un axe central formé par le

chemin de conduction. Pour une meilleure compréhension visuelle se rapporter à la figure 1-3.



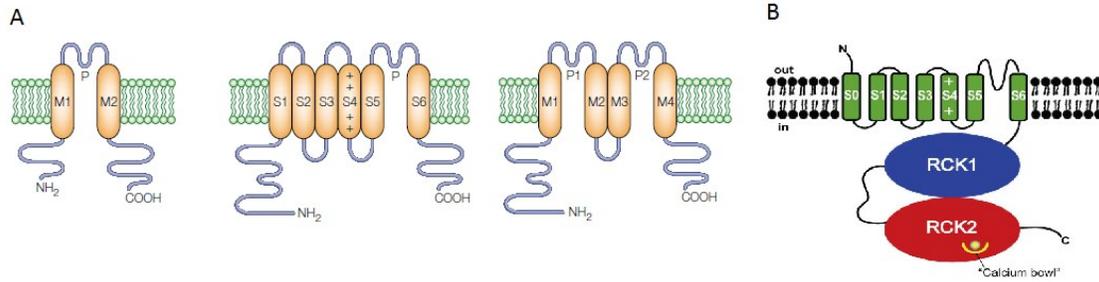
**Figure 1-3 : Tétramérisation des sous-unités d'un canal  $K^+$ .** (A) Illustration de l'assemblage des sous-unités d'un canal potassique vu du dessus. La structure est orientée de  $90^\circ$  par rapport à la sous-unité adjacente. (B) Vue 3D de l'agencement tétramérique de Kv1.2 et de la présence des ions dans le pore central. Tiré du mémoire de Georges Haddad 2010.

Il existe deux sortes de classifications des canaux potassiques : une classification selon le processus de signalisation et, une autre, selon le nombre de segments transmembranaires et de pores.

Selon la signalisation intra- ou extracellulaire, il existe 5 types de canaux potassiques : les canaux potassiques voltage dépendants ( $K_v$ ) qui ressentent le changement de potentiel membranaire, les canaux potassiques activés par le calcium ( $K_{Ca}$ ) qui comme le nom l'indique possèdent des récepteurs aux ions calciques, les canaux potassiques activés par le calcium de grande conductance ( $BK_{Ca}$ ) qui sont activées par le calcium et

par le potentiel membranaire, les canaux potassiques à rectification entrante (Kir) qui sont sensibles à la présence de polyamines et les canaux potassiques à double pore (K2p) qui répondent aux protéines G (Plant, Rajan et al. 2005).

Tous les canaux potassiques possèdent une structure commune composée du pore, de deux segments transmembranaires et d'une boucle reliant les deux. Cette structure est classée comme 2TM/P. La boucle intermédiaire entre les segments et le pore est aussi appelé la *P-loop* (Heginbotham, Abramson et al. 1992, Heginbotham, Lu et al. 1994) qui est constituée de trois sections : une structure en tourelle (structure de répulsion), une petite hélice  $\alpha$  et une signature séquentielle T(S)V(I)GY(F)G (Doyle, Morais Cabral et al. 1998) nommée le filtre de sélectivité. Le motif 2TM/P, comme les canaux potassiques Kir et KcsA, est relativement conservé entre toutes les familles de canaux potassiques, spécialement la *P-loop*. À partir de cette structure commune se décline plusieurs variétés : les 6TM/P qui possèdent six segments transmembranaires et un seul pore, ces quatre segments supplémentaires permettent aux canaux de ressentir le potentiel membranaire, c'est ce qui forme le senseur de voltage. On peut retrouver les canaux  $K_v$  et  $K_{Ca}$  dans ce groupe. Il existe aussi des canaux 7TM/P comme les canaux  $K_{Ca}$  1.1 ou BK (Wallner, Meera et al. 1996, Yuan, Leonetti et al. 2010). Ainsi que les canaux 4TM/2P ou 2(2TM/P) qui sont les canaux K2p.



**Figure 1-4 : Représentation topologique des différents canaux potassiques.** (A) Représentation topologique des différentes familles K<sup>+</sup>. Adapté de Choe 2002. (B) Représentation topologique du canal BK. Adapté de Yuan, Leonetti et al 1996.

En plus du domaine membranaire, les canaux potassiques sont dotés de plusieurs structures intracellulaires qui leur permettent d’interagir avec le milieu cytosolique. Par exemple, les canaux  $K_v$  possèdent une sous-unité  $\beta$  pour chaque sous-unité  $\alpha$  qui sont responsables de la tétramérisation, de l’adressage à la membrane et de l’inactivation de type N du canal (Kobertz and Miller 1999). Nous pouvons aussi citer les deux domaines cytosoliques RCK1 et RCK2, illustré dans la figure 1.4, qui régulent en partie la dépendance du canal  $K_{Ca}$  1.1 au calcium. D’autres fonctions existent pour ces domaines supplémentaires qui interagissent avec des protéines de régulation, de signalisation (kinases, phosphatases, protéine G) et avec le cytosquelette.

### 1.2.2 Le pore

---

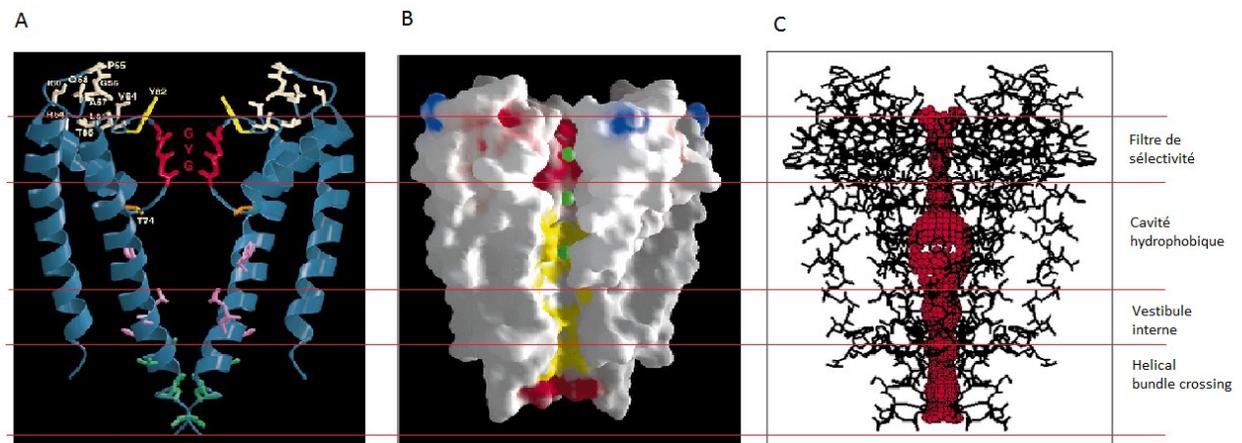
La membrane cellulaire est composée d’une bicouche lipidique. Les lipides sont des entités amphiphiles, c’est-à-dire avec une tête polaire hydrophile située sur la surface de la membrane au contact des molécules d’eau et un corps hydrophobe au centre de celle-ci. Les ions ont tendance à polariser leurs environnements pour se stabiliser comme les molécules d’eau, tandis que le centre de la membrane cellulaire est peu polarisable créant une barrière énergétique élevée empêchant le passage des ions. Mais lors de la présence de canaux ioniques potassiques dans la membrane cellulaire, il est

possible d'obtenir un flux potassique de  $10^7$  ions par seconde, tout en conservant une très grande sélectivité. Comment est-il possible de franchir cette barrière énergétique avec une sélectivité précise. Car la différence entre le diamètre des ions potassiques et sodiques, tous les deux de charge positive, n'est que de 0.8 Å (2.7 Å pour les ions K<sup>+</sup> et 1.9 Å pour les ions sodiques).

En 1998, fut établie la première structure cristalline du canal KcsA à une résolution de 3.2 Å (Doyle, Morais Cabral et al. 1998). KcsA est un canal potassique de type 2TM/P avec la dénomination TM1 et TM2 pour les deux segments transmembranaires. C'est un canal d'origine procaryote qu'on retrouve chez la *Streptomyces lividans* (Schrempf, Schmidt et al. 1995) activé par le pH intracellulaire (Cuello, Romero et al. 1998, Heginbotham, LeMasurier et al. 1999). Il est similaire structurellement aux canaux Kir mais sa séquence d'acides aminés est plus proche des canaux voltage-dépendants  $K_v$ . Il présente une légère sensibilité au voltage grâce à l'acide aminé E71 (sur la *P-loop* du canal KcsA) qui le rend plus actif lors d'une dépolarisation (Heginbotham, LeMasurier et al. 1999, Meuser, Splitt et al. 1999, Cordero-Morales, Cuello et al. 2006) mais ceci reste petit comparablement aux canaux potassiques 6TM/P qui possèdent un senseur de voltage.

Le pore est asymétrique entre le côté extra et intracellulaire. Différentes structures peuvent être observées : le filtre de sélectivité, une grosse cavité hydrophobique, un vestibule interne et l'*helical bundle crossing*, en partant du côté extracellulaire de la cellule vers le côté intracellulaire (figure 1.5). Le pore a une longueur de 45 Å (Shieh, Coghlan et al. 2000) qui varie en diamètre selon le niveau où on se trouve dans la protéine (figure 1.5 C). Cet agencement dans l'état fermé est aussi appelé « inverted teepee » ou tipi inversé (Yu, Yarov-Yarovoy et al. 2005), architecture typique retrouvée partout chez les canaux ioniques. L'*helical bundle crossing* est composé des parties C-terminal des segments TM2 et sert, généralement, de barrière énergétique principale. C'est une porte qui selon son *ouverture* et *fermeture* régule la conduction ionique. Même si cette structure est identique, son mécanisme d'activation et de régulation est

différent pour chaque famille. Par exemple, la conduction ionique est contrôlée principalement par le filtre de sélectivité chez les canaux BK (Cox and Hoshi 2011).

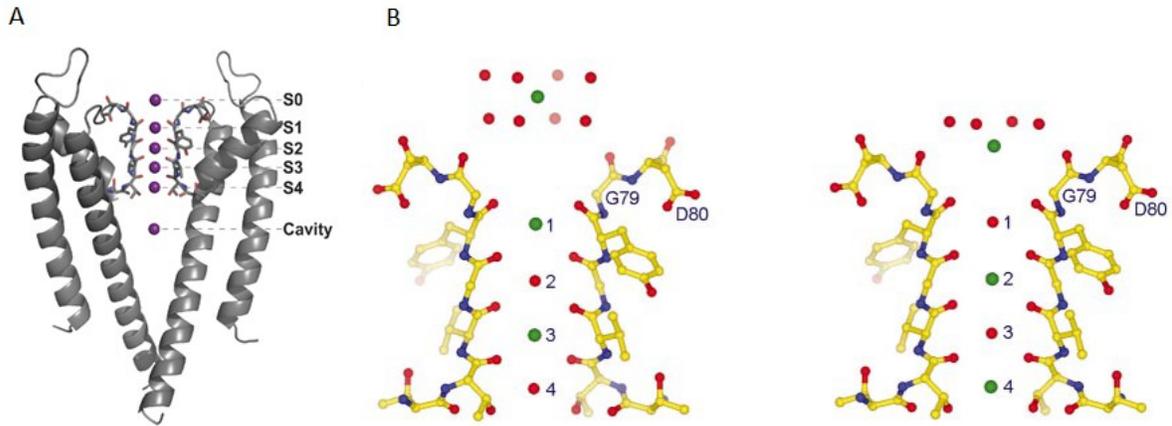


**Figure 1-5 : Représentation structurale du pore.** (A) Vue schématique de deux sous-unités du canal KcsA. (B) Vue d'ensemble du canal KcsA de la surface accessible aux solvants. Le bleu représente les charges positives, en rouge négatives, en jaune les parties hydrophobes et en vert les ions potassiques. (C) vue d'ensemble de l'intérieur du pore. Adapté de Doyle, Morais Cabral et al. 1998.

Grâce à cette structure cristalline, le mécanisme du passage des ions potassiques à travers la membrane a pu être élucidé pour les canaux potassiques procaryotes et eucaryotes. Des études de mutagénèse dirigées sur les différentes parties de cette région ont permis de démontrer ce mécanisme (Heginbotham, Lu et al. 1994). Premièrement, nous allons voir comment les ions potassiques passent cette barrière énergétique. On remarque que chaque entrée, intracellulaire et extracellulaire, est composée d'acides aminés négatifs (figure 1.5 B) qui permet d'attirer les ions chargés positivement. Ensuite, il y a des groupements carbonyles dirigés vers le centre du pore dans le filtre de sélectivité qui forme quatre anneaux successifs d'un diamètre de 3 Å, idéal pour stabiliser un ion potassique déshydraté (2.7 Å). La déshydratation de l'ion potassique est essentielle, car grâce à ça, l'ion pourra être stabilisé par les groupements C=O à la place des atomes d'oxygène de l'eau résultant en une barrière d'énergie

favorable au passage à travers la membrane. Deuxièmement, cette structure carbonylée est stabilisée par des interactions fortes avec les acides aminés entourant le filtre, l'empêchant de s'adapter à des ions plus petits tel que le sodium (1.9 Å), principal compétiteur (Roux, Berneche et al. 2000, Berneche and Roux 2001). La différence de taille des ions  $K^+$  et  $Na^+$ , et la rigidité du filtre de sélectivité serait la clef de la sélectivité ionique des canaux car le diamètre de l'ion  $Na^+$  étant trop petit pour être stabilisé par les liaisons carbonyles et le filtre trop rigide pour s'adapter à son diamètre, il ne pourra pas passer cette barrière. Cependant, des mesures de fluorescence ont démontré que l'orientation du filtre de sélectivité change pour produire l'inactivation de type C (Blunck, Cordero-Morales et al. 2006, Cordero-Morales, Cuello et al. 2006, Chakrapani, Cordero-Morales et al. 2007, Chakrapani, Cordero-Morales et al. 2007) indiquant une certaine flexibilité.

Ce mécanisme permet une vitesse de circulation des ions potassiques proche de la vitesse de diffusion libre. Les simulations de dynamique moléculaire ont permis d'estimer que deux ions potassiques pouvaient se retrouver en même temps dans le pore (Berneche and Roux 2001, Morais-Cabral, Zhou et al. 2001). Ceci a été confirmé lors de l'obtention de la structure cristalline de KscA à 2.0 Å dans différentes conditions ioniques (Zhou, Morais-Cabral et al. 2001). De plus, cette structure a permis de mettre en évidence six sites de liaisons des ions  $K^+$  dans la région du filtre de sélectivité : quatre internes (S1, S2, S3, S4) et deux externes (S0, S5) (Voir figure 1.6 A). Ils sont situés entre les anneaux des groupements C=O qui stabilisent l'ion par 8 atomes d'oxygène et conservés dans les sites externes grâce aux molécules d'eau.



**Figure 1-6 : Localisation des ions potassiques dans le pore.** (A) Chemin de liaison des ions potassiques (en violet) dans le filtre de sélectivité. (B) Vue d'ensemble des molécules d'eau et des ions potassiques dans le filtre de sélectivité. Adapté de Zhou, Morais-Cabral et al. 2001.

Le mouvement de circulation à l'intérieur du pore est créé d'une part par le potentiel électrochimique des ions  $K^+$  et par l'arrivée d'un ion  $K^+$  externe au niveau de S0 qui crée une répulsion entre les ions déjà présents (S1-S4), les obligeant à se déplacer vers les sites internes du pore. Les canaux potassiques peuvent transporter les molécules d'eau qui seraient intermédiaire entre chaque ion  $K^+$  pour éviter une trop grande force de répulsion entre eux. Tout ceci est fonctionnel seulement si l'*helical bundle crossing* ou les « portes », permet l'ouverture du canal ce qui nous amène au moyen d'activation de l'*helical bundle crossing* pour les canaux voltage-dépendants : le senseur de voltage.

### 1.2.3 Le senseur de voltage

---

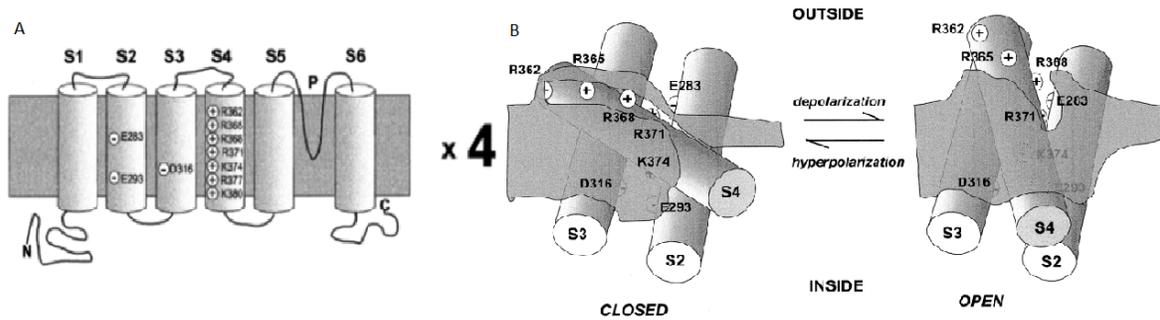
La membrane cellulaire est la frontière entre deux milieux drastiquement différents. Bien que la force ionique soit similaire entre les deux côtés, la concentration spécifique d'un ion est différente (par exemple l'ion  $K^+$  est concentré à 145 mM à l'intérieur de la cellule tandis que sa concentration n'est que de 5 mM à l'extérieur). Ce gradient de concentration est conservé par la pompe  $Na^+/K^+$  ATPase. L'électrodifusion des ions à

travers de la membrane génère une séparation des charges qui crée un potentiel membranaire de l'ordre de -80 mV (négatif à l'intérieur de la cellule). La partie hydrophobe des lipides membranaires agit comme le diélectrique d'un condensateur sur lequel s'accumulent les charges qui génèrent le potentiel membranaire. Comme cette région est très petite (environ 27 Å), le potentiel membranaire génère un champ électrique de l'ordre de  $10^7$  V/m (Bezaniilla 2008). Les protéines incluses dans la membrane ressentent le champ électrique et certaines de ces protéines ont même développé des senseurs de voltage qui permettent de produire des changements de conformation. Pour pouvoir saisir cette différence, des charges électriques ou des dipôles électriques doivent être présents dans le domaine du senseur de voltage (VSD : *voltage sensor domain*). Les mouvements de ceux-ci sont orchestrés dans le but de participer à diverses fonctions de la protéine.

Les acides aminés chargés tels que l'acide aspartique (Asp), l'acide glutamique (Glu), l'arginine (Arg), la lysine (Lys) et l'histidine (His) sont de bons candidats pour sentir le champ électrique car ils subiront une force proportionnelle au champ électrique membranaire, c'est le mécanisme retrouvé dans les canaux potassiques voltage dépendants. Mais il existe aussi d'autres structures polarisées répondant au champ électrique, comme les chaînes latérales contenant un cycle aromatique, exemple la tyrosine (Tyr), l'hélice  $\alpha$  avec un moment dipolaire intrinsèque, et les cavités présentes dans les protéines contenant des ions libres. Plusieurs de ces mécanismes peuvent opérés simultanément en créant des courants transitoires (*gating current*) lors d'un changement de potentiel membranaire qui peuvent être mesurés expérimentalement et fournir des informations sur les changements de conformations.

Nous allons maintenant nous intéresser spécifiquement au senseur de voltage des canaux potassiques voltage-dépendants et spécifiquement le canal *Shaker*, toutefois, la majorité des caractéristiques présentées peuvent s'appliquer à toutes les protéines possédant un VSD. Les canaux ioniques potassiques voltage-dépendants sont composés de six segments transmembranaires (S1-S6) dont trois portant des acides aminés

chargés : les segments S4, S2 et S3 (par ordre d'importance) comme on peut les voir sur la figure 1.7 A. Ces segments sont conservés à travers la famille des canaux ioniques dépendants du voltage et même les transporteurs de protons. Le segment S4 est chargé positivement par des arginines et lysine que l'on nomme, suivant la notation du *Shaker*, R1 (R362), R2 (R365), R3 (R368), R4 (R371) et K5(K374). Les segments S3 et S2 sont chargés négativement par l'acide glutamique (D316) et les acides aspartique (E283 et E293), respectivement.



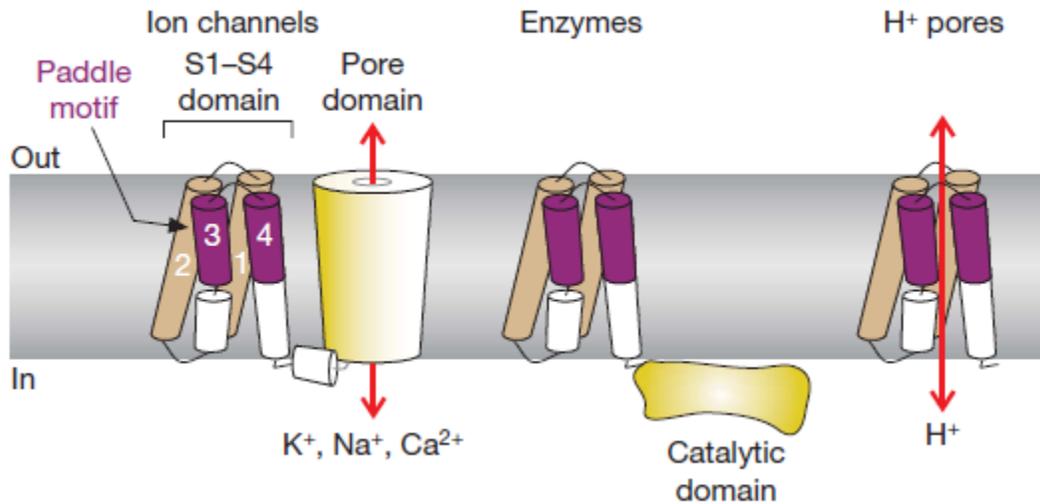
**Figure 1-7 : Le senseur de voltage.** (A) Structure du canal voltage dépendant Shaker B. Les S1-S4 composent le senseur de voltage, S5-S6 composent le pore.(B) Modèle du S4, S2, S3 et des crevasses aqueuses ou la position des charges basiques sont placées et modifiées selon une dépolarisation. Tiré de Bezanilla 2000.

Il est important de réaliser que l'ampleur du mouvement des charges, mesuré expérimentalement, dépend de la magnitude de la charge et de la force du champ électrique dans cette région (tiré de la loi de Coulomb :  $\vec{F} = q\vec{E}$  ). À cause de la structure complexe moléculaire du canal, la force électrostatique ( $\vec{F}$ ), ou plus précisément l'intensité locale du champ électrique, peut être différente quand elle est proche du senseur de voltage ou proche de la bicouche lipidique qui possède une structure moléculaire homogène. On peut nommer comme exemple les crevasses entourant le senseur de voltage (figure 1.7 B) qui furent mise en évidence par des expériences d'accessibilités aux agents méthylthiosulfonate (MTS) (Goldstein 1996, Larsson, Baker et al. 1996, Yang, George et al. 1996, Yusaf, Wray et al. 1996, Baker,

Larsson et al. 1998, Wang, Yusaf et al. 1999, Starace and Bezanilla 2001, Starace and Bezanilla 2004). La variation de l'épaisseur membranaire a cet endroit (5-10 Å) a pour effet d'élever la constante diélectrique ( $\epsilon_0$ ) et de réduire la distance d'action du potentiel membranaire sur S4. Cela concentre le champ électrique au niveau de la partie hydrophobe de la membrane (Islas and Sigworth 2001, Asamoah, Wuskell et al. 2003, Ahern and Horn 2005) et impose une plus grande force d'interaction sur S4 (Keynes and Elinder 1999), ce qui diminue le nombre de charges négatives nécessaire à la stabilisation du VSD lors du mouvement du S4 (Yang, George et al. 1996). Cette zone concentrant le champ électrique, est formée par une douzaine de résidus qui sont fortement, conservés chez les canaux ioniques sensibles au voltage, tel qu'on peut le voir dans le cas du résidu F290 (*Shaker*).

La grande dépendance au voltage des canaux *Shaker* est le résultat d'un grand nombre de charges qui se déplacent dans le champ électrique. Il a été démontré que ce nombre s'élève à 13  $e_0$  par canal en mesurant les courants transitoires combinés avec l'analyse du bruit avec la méthode de *patch-clamp* sur des canaux ne possédant pas l'inactivation de type N (Schoppa, McCormack et al. 1992). Cette estimation a aussi été confirmée par une approche de mesures thermodynamiques (Seoh, Sigg et al. 1996). Le segment S4 est le plus important dans le mécanisme du senseur de voltage en raison de ces Arginines et Lysines positionnés tous les trois acides aminés (Noda, Shimizu et al. 1984) et c'est le segment le mieux conservé dans toutes les familles de canaux voltage-dépendants. En fait, il a été prouvé que les quatre premiers résidus basiques extracellulaires (R1-R4) sur S4 et les résidus acides intracellulaires (E293, E283 et D316) sur S2 et S3 sont impliqués dans le courant transitoire en mesurant le nombre de charge par canal après une neutralisation d'un ou des acides aminés chargés (Aggarwal and MacKinnon 1996, Seoh, Sigg et al. 1996, Jiang, Lee et al. 2003, Chanda, Asamoah et al. 2005). En neutralisant une charge, le nombre de charge total par canal est diminué à moins de 4  $e_0$ , indiquant que l'ampleur du mouvement a été modifiée et/ou que le champ électrique vu par les autres charges a été modifié (Papazian, Timpe et al. 1991). Ces résultats montre l'importance du profile du champ électrique dans cette régions pour le senseur de voltage. Mais, bien

que nous connaissons le nombre total de charges par canal, une mesure électrique du mouvement des charges ne peut être utilisée pour suggérer les distances parcourus même si la force électrostatique est connu (Bezanilla 2008).

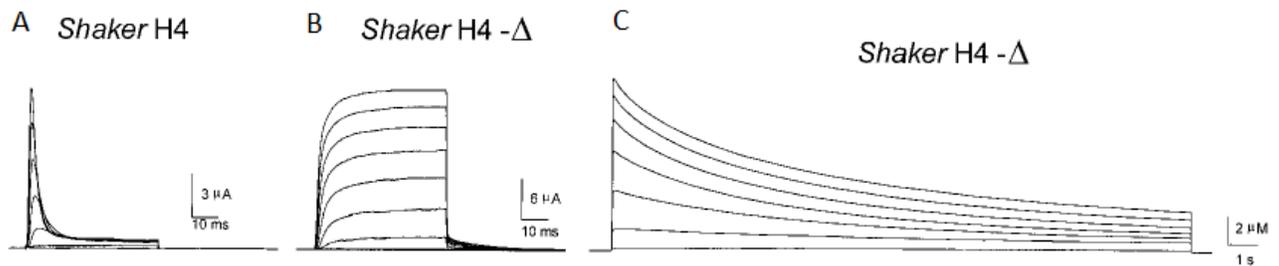


**Figure 1-8 : Illustration des différents VSD semblables aux canaux  $K_v$ .** Le VSD des canaux ioniques est relié à un pore, le VSD de l'enzyme Ci-VSP est lié à un domaine catalytique tandis que le VSD des canaux à protons est relié à rien. Adapté de Swartz 2008.

Le senseur de voltage des canaux  $K_v$  peut être actif séparément du pore (Kubo, Reuveny et al. 1993), suggérant une évolution autonome du VSD qui a pu être relié plus tard à un domaine conducteur (Kumanovics, Levin et al. 2002). Cette idée fut renforcée par l'isolation de l'enzyme Ci-VSP, une phosphatase ne comportant qu'un seul domaine sensible au voltage, homologue à celui des canaux  $K_v$ , et qui répond au potentiel membranaire pour activer autre chose qu'un pore de conduction (Murata, Iwasaki et al. 2005, Murata and Okamura 2007, Kohout, Bell et al. 2010). Tout ceci nous pousse à faire l'hypothèse du fonctionnement autonome et indépendante du senseur de voltage.

### 1.3 Propriétés ioniques du clone Shaker, canal potassique voltage dépendant

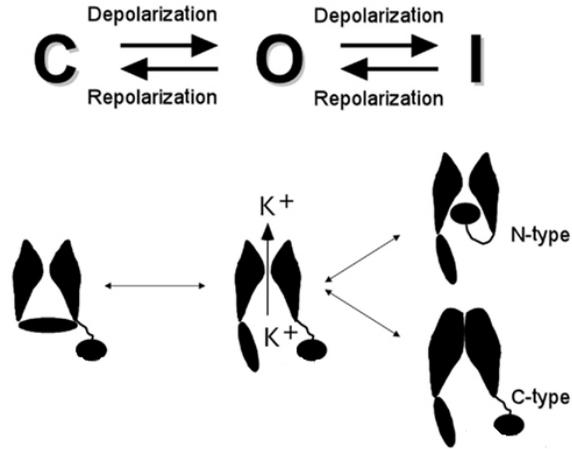
Le canal potassique *Shaker* est caractérisé par un courant potassique de type A ( $I_a$ ) (figure 1.9 A). Il s'active lors d'une dépolarisation avec un potentiel membranaire supérieur à -50 mV (Gola and Romey 1971), et possède une activation et inactivation rapide en comparaison avec les courants à rectification retardée ( $I_d$ ) (Hodgkin and Huxley 1952) par exemple. Il existe deux mécanismes d'inactivation pour le canal *Shaker*, l'inactivation de type N qui est l'inactivation rapide (figure 1.9 A) et l'inactivation de type C qui est l'inactivation lente (figure 1.9 C). Dans cet état, le canal inactivé ne répond plus au stimulus activateur et, pour retrouver son activité, une repolarisation du potentiel inférieur à -60 mV est nécessaire.



**Figure 1-9: Courants ioniques du canal *Shaker*.** (A) Exemple de courant potassique du canal *Shaker* WT (B) Exemple de courant potassique du canal *Shaker* sans l'inactivation rapide. Il y a eu délétion de 40 acides aminés à la partie N-terminale  $\Delta 6-46$ . (C) Exemple de courant potassique montrant l'inactivation de type C avec des *pulses* d'une durée de plusieurs secondes. Tirée d'Olcese, Latorre et al 1997.

Lors de la première description quantitative des canaux  $K^+$  et  $Na^+$ , Hodgkin et Huxley postulèrent l'existence de plusieurs « portes » (*gates*) qui expliqueraient le changement de conductivité avec le temps (Hodgkin and Huxley 1952). Lors d'une dépolarisation, les canaux s'ouvrent par l'ouverture des « portes » puis rentrent dans un état de non conduction, l'inactivation. Les canaux restent dans cet état aussi longtemps que la

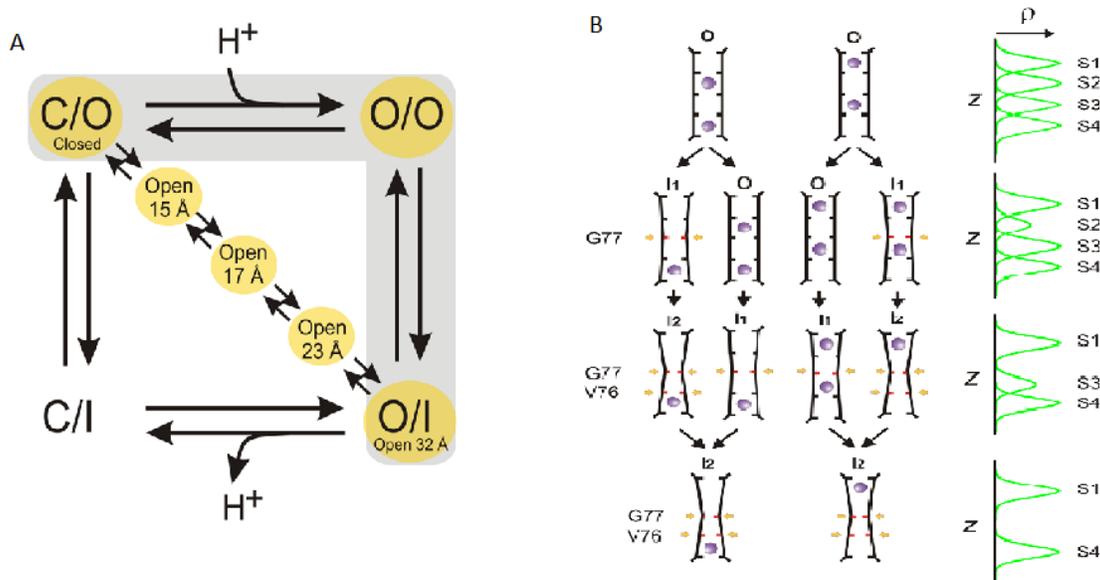
membrane est dépolarisée et seulement lors de la repolarisation les « portes » inactivées se retirent pour permettre la prochaine activation. Dans le formalisme de Hodgkin-Huxley, l'activation et l'inactivation sont dépendant du voltage membranaire. Mais, plus tard, lorsque Bezanilla et Armstrong (Armstrong and Bezanilla 1973, Bezanilla and Armstrong 1974) détectèrent des courants transitoires en voltage imposé, aucune charge ne pouvaient être associées avec le processus d'inactivation, amenant l'idée que le mécanisme d'inactivation serai en dehors de la membrane. Cette idée fut appuyée par le fait que l'inactivation pouvait être sélectivement enlevée par des agents protéolytiques (pronases ou N-bromoacetamide) quand ils étaient appliqués à l'intérieur de la cellule (Armstrong, Bezanilla et al. 1973). De plus, des agents pharmaceutiques comme le tétraéthylamonium (TEA), ou le N-propylguanidinium, sont en compétition avec le système d'inactivation quand ils sont appliqués à l'intérieur de la cellule (Armstrong 1981). Tous ces agents introduits à l'extérieur de la cellule n'ont aucun effet. Finalement, ceci a mené Bezanilla et Armstrong à proposer un nouveau mécanisme pour l'inactivation : le *ball and chain model*. Dans ce modèle, l'inactivation est activée par un polymère d'acides aminés ou peptide (*ball*) qui est attaché sur la face cytoplasmique du canal par un domaine pouvant être clivé par une protéase (*chain*). Ce peptide s'attache sur un récepteur lors de l'activation du canal et obstrue le pore. Lors d'expériences avec la trypsine menée par Aldrich et ses collègues, ils ont pu déterminer la localisation du mécanisme d'inactivation rapide situé dans la partie N-terminal du canal en enlevant les acides aminés 6 à 46 (Hoshi, Zagotta et al. 1990) et ainsi produire des courants du canal Shaker sans inactivation rapide (figure 1.9 B). Ils purent aussi restaurer cette inactivation avec un peptide synthétique (Zagotta, Hoshi et al. 1990).



**Figure 1-10 : Schématisation des étapes de l'inactivation lente et rapide avec l'état du canal correspondant.** Les inactivations de type C et N ne sont pas exclusives, dans le canal WT, elles sont toutes les deux présentes. Tiré de Barros, Dominguez et al. 2012.

Une fois le mécanisme de l'inactivation de type N isolé, une deuxième perte de la conductance du canal a pu être observée après quelques secondes (figure 1.9 C). C'est ce que l'on appelle l'inactivation de type C et serait produit par une constriction du filtre de sélectivité (Choi, Aldrich et al. 1991, Hoshi, Zagotta et al. 1991). D'après une étude sur le pore du canal KcsA, il y aurait deux niveaux de constriction, un dû à la réorientation de l'acide aminé G77 (G444 sur le canal *Shaker*), représenté par l'état  $I_1$ , avec une action sur le site S2 du pore et le deuxième niveau de constriction serait dû à une possible liaison carbonyle de l'acide aminé V76 (V443 sur le canal *Shaker*) associé à l'état  $I_2$  avec une constriction au niveau du site S3 du pore (Cuello, Jogini et al. 2010). Un modèle d'inactivation de type C a été présenté par la même équipe (Figure 1.11 A) avec des états fermés au niveau du *helical bundle crossing* et conductifs pour le filtre de sélectivité, nommé : C/O, ainsi que ouvert et conducteur : O/O, ouvert et inactivé : O/I et fermé et non conducteur : C/I. Le canal doit atteindre l'état ouvert pour développer une inactivation lente mais, apparemment, il peut aussi atteindre cet état avec un ouverture partielle (Chakrapani, Cordero-Morales et al. 2007), ce qui explique la liaison entre l'état C/O et O/I, identifiée à partir de la distance entre la liaison  $C_\alpha-C_\alpha$  de l'acide aminé G77

par densité électronique. Mais ce modèle ne permet pas de comprendre les transitions rapides dans un état fermé, intercalé entre deux pics d'activité (*flicker*), caractéristiques de tous les canaux potassiques, car les auteurs s'appuient sur une représentation cristalline d'états d'ouverture stable et non sur ses transitions de fermeture rapide (Piskorowski and Aldrich 2006). L'inactivation de type C peut être complètement inhibée par une mutation sur l'acide aminé E71 ou ralentie par la présence d'ions  $Rb^+$  ce qui a permis d'obtenir une cristallisation du canal KcsA dans l'état ouvert en diminuant la probabilité d'être dans un état O/I (Cuello, Jogini et al. 2010).



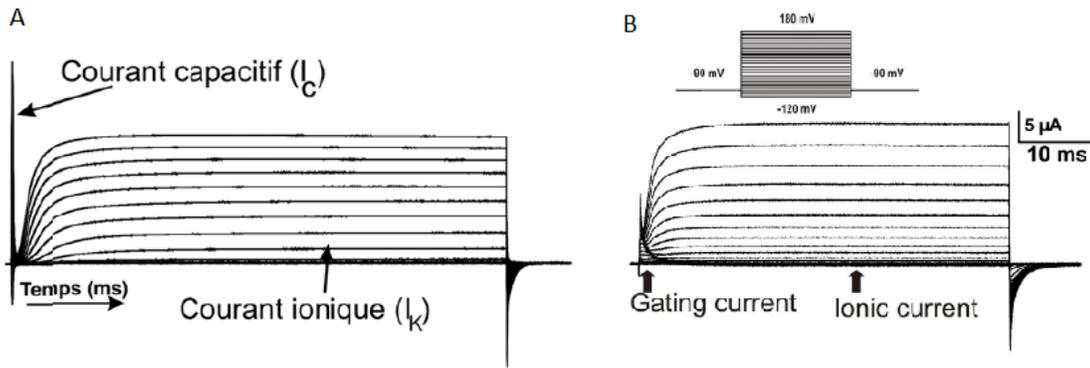
**Figure 1-11 : Inactivation de type C.** (A) Modèle cinétique des états de l'inactivation de type C. (B) Modèle mécanique de l'inactivation de type C dans le filtre de sélectivité. A gauche, les structures de transition du filtre de sélectivité associées avec les positions des ions. A droite, la carte de densité électronique des électrons en une dimension selon une forme idéale. Tiré de Cuello, Jogini et al. 2010

Pour comprendre l'essentiel des propriétés biophysiques des canaux voltages dépendants, il faut contrôler les différentes conformations responsables de sa fonction. Ceci est simplifié par l'étude des caractéristiques électriques du VSD, grâce à l'électrophysiologie en voltage imposé. Un voltage membranaire de -90 mV est

nécessaire pour maintenir le canal dans un état fermé. De là, un changement de potentiel positif de la membrane cellulaire nous permet d'observer un courant ionique (figure 1.12) possédant trois composantes : un courant capacitif ( $I_C$ ) produit par les ions libres dans la solution, un courant de fuite ( $I_{fuite}$ ) rassemblant tous les courants intrinsèques à l'ovocyte, et un courant ohmique saturant ( $I_K$ ) créé par le flux potassique à travers la membrane. D'après la loi des nœuds, nous pouvons exprimer mathématiquement ces courants parallèles par le courant membranaire ( $I_M$ ):

$$I_M = I_K(V) + I_C(V) + I_{fuite}(V) = G_K(V)(V_M - E_K) + C_M \frac{dV}{dt} + I_{fuite}(V) \quad (1.1)$$

Avec  $G_K = \frac{1}{R} = N * \gamma(V) * P_o(V)$  : Conductance potassique,  $N$  : nombre total de canaux,  $\gamma(V)$  : conductance unitaire,  $P_o(V)$  : probabilité d'ouverture,  $E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i}$  : potentiel de Nernst qui permet de calculer le potentiel d'équilibre des ions potassiques. La conductance ionique est une valeur très utilisée car elle est proportionnelle à la probabilité d'ouverture ( $P_o$ ) selon le voltage imposé. La conductance potassique n'est plus linéaire (Stefani, Toro et al. 1994) lors de condition ionique asymétrique extrême ou d'un blocage dépendant du voltage. La vitesse d'apparition du courant  $I_C$  est le reflet de la variation du ratio  $\frac{dV}{dt}$  qui est maximal au début du *pulse* pour, ensuite, tendre vers 0 lorsque la différence de potentiel rejoint le potentiel demandé. Le courant capacitif se développe entre 10-50  $\mu$ s tandis que le courant ionique varie sur des millisecondes voire des secondes, ce qui nous permet d'avoir une séparation temporelle entre ces deux courants (figure 1.12 A). De ce qui a été mentionné avant, le fait que les charges de *gating* contrôlent l'activation des canaux  $K_v$  et par conséquent l'ouverture, la translocation de ces charges doit précéder le courant ionique. La charge transportée par le courant capacitif en fonction du changement de voltage appliqué ainsi que sa constante de temps étant une valeur linéaire, nous pouvons le soustraire au courant ionique et observer un début du courant de *gating* (figure 1.12 B).



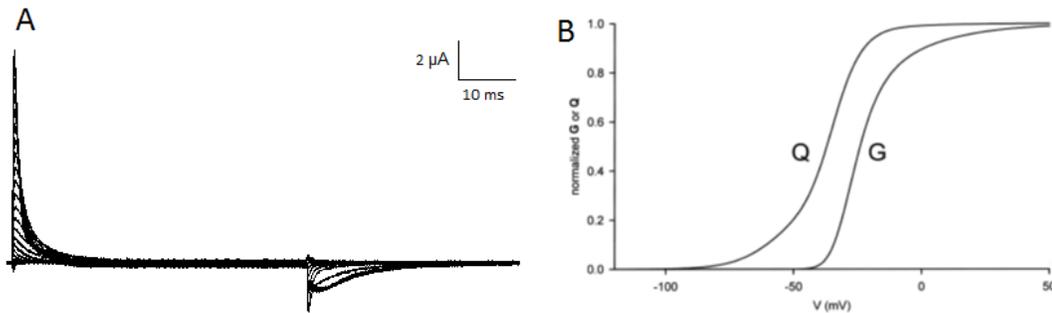
**Figure 1-12 : Courants capacitifs et de transitions.** (A) Représentation du courant ionique avec le courant de capacitance. (B) Représentation du courant ionique sans le courant de capacitance après application d'un protocole P/4 (voir partie 2.2.3 pour plus de détails) montrant le début du courant transitoire, spécifique à la mutation I384N sur le canal *Shaker*. Tiré du mémoire de Georges Haddad 2010 et Haddad et Blunck 2011.

Nous pouvons éliminer le courant ionique de trois façons différentes afin d'observer les courants transitoires (figure 1.13 A) : soit par l'intermédiaire de bloqueurs de pore (charibdotoxine, CTX), soit par des agents inhibiteurs (tétraéthylammonium, TEA, 4-aminopyridine, 4-AP) ou par mutagénèse dirigée (mutation W434F situé dans le pore)(Perozo, MacKinnon et al. 1993). On peut observer deux types de cinétiques (figure 1.13 A), une rapide apparaissant lors de la dépolarisation, surnommée le *ON-gating* et une plus lente, lors de la repolarisation, décrit comme le *OFF-gating*. Mathématiquement, l'intégrale sur le temps du courant transitoire pour un voltage spécifique nous donne la charge totale transposée à la surface de l'ovocyte  $Q(V)$  :

$$\int I_{g(V)}(t)dt = \int \frac{dq}{dt} dt = Q_v = N \sum_i q_i \delta_i \quad (1.2)$$

Dans le cas général,  $Q_v$  est égal à la somme de  $i$  charges élémentaires ( $q_i$ ) se déplaçant sur une fraction du champ ( $\delta_i$ ) multiplié par le nombre totale de canaux. Si nous traçons la charge en fonction du voltage ( $QV$ ) ainsi que la conductance selon le voltage ( $GV$ ) avec l'équation 1.1, nous obtenons une figure sigmoïde donnant la dépendance en voltage du

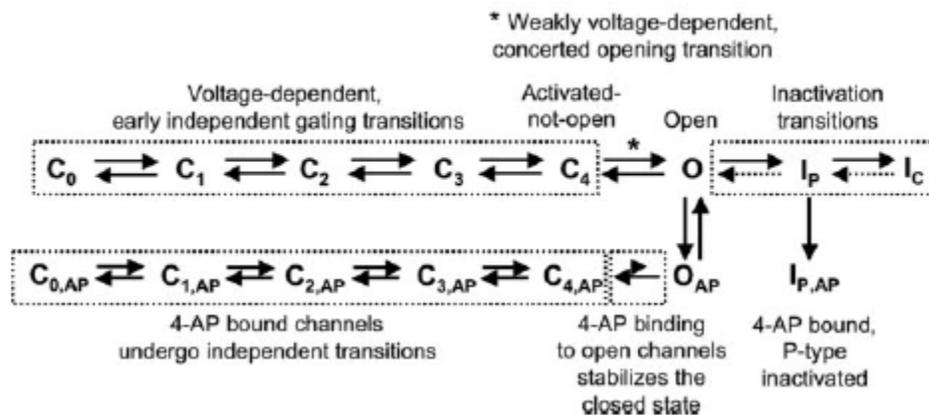
déplacement des charges ainsi que la dépendance en voltage de la conductance (figure 1.13 B). Nous pouvons clairement observer que les charges se déplacent avant que le canal ne s'ouvre, c'est-à-dire que la courbe QV se développe avant la courbe GV.



**Figure 1-13 : Courants de gating.** (A) Forme du courant de *gating* de Shaker K<sup>+</sup> après introduction de la mutation W434F, bloqueuse de pore sans modification des processus de réorientation des charges dans le champ électrique. (B) Dépendance en voltage des charges et de la conductance. Tiré de données personnel et de Bezanilla 2000.

Tous les résultats de courants transitoires présentés dans cette étude seront produits en utilisant la mutation W434F. Pour mieux comprendre l'effet de cette mutation nous pouvons nous reporter à l'article de Yang, Yan et al 1997. Le TEA et le 4-AP seront utilisés dans la compréhension de la localisation du courant de fuite grâce à leurs effets spécifique sur le pore. Par contre, leur utilisation demande quelques précautions car ils changent la nature du *gating* en supprimant la partie lente du *OFF-gating* ou, si on veut, en accélérant la cinétique du *gating* (Loboda and Armstrong 2001). L'ion TEA est très utilisé depuis des années pour fournir des informations sur la structure et la fonction des canaux K<sup>+</sup> (Armstrong 1966, Hille 1967, Armstrong and Hille 1972, Kirsch, Taglialatela et al. 1991), sans doute à cause de sa charge positive et de sa taille proche d'un ion K<sup>+</sup> hydraté. L'ion TEA appliqué du coté externe de la cellule peut bloquer toutes sortes de canaux potassiques mais avec des sensibilités différentes (Kavanaugh, Varnum et al. 1991). Cette variation peut être attribuée à un acide aminé situé à l'entrée du pore : T449 (dans *Shaker*) (MacKinnon and Yellen 1990, Gomez-Hernandez, Lorra et al.

1997) qui possède une sensibilité spécifique à l'action du TEA. Si on remplace la thréonine par une tyrosine, le canal devient grandement sensible au TEA (Heginbotham and MacKinnon 1992). Le TEA se lie au canal lors de la dernière étape du *gating* juste avant l'ouverture du canal (Thompson and Begenisich 2003). Le mécanisme moléculaire du 4-aminopyridine n'a pas encore été résolu mais on sait déjà que son action se situe lors de l'étape concertée d'ouverture dans le modèle d'activation sans altérer les transitions de *gating* précédentes (Loboda and Armstrong 2001). Un modèle cinétique de l'action du 4-AP a pu être proposé, voir figure 1.14.



**Figure 1-14: Schéma cinétique de l'action du 4-AP.** Modifiée de celui de Loboda et Armstrong (2001).  $C_0$  à  $C_4$  représentent les états fermés du canal, et  $O$  représente l'état ouvert. Les transitions entre  $C_0$  et  $C_4$  représentent les premières transitions voltage-dépendantes du *gating* et la transition de  $C_4$  à  $O$  représente la dernière étape concertée avant l'ouverture du canal qui est faiblement voltage-dépendante. 4-AP ne peut se lier que lorsque les canaux s'ouvrent, et une fois liée, la drogue biaise fortement l'état fermé 4-AP-bound ( $C_{4,AP}$ ). Une fois 4-AP liés, les canaux sont en mesure de subir les transitions indépendantes ( $C_0$ , AP à  $C_4$ , AP), mais la transition d'ouverture en sera retardée.  $I_P$  et  $I_C$  représentent les états P- et C-type-inactivés, respectivement. Les flèches en pointillés reflètent le fait que les transitions réalisées au cours de la récupération de l'inactivation ne sont pas connues. Adapté de Claydon, Vaid et al. 2007.

## 1.4 Étude statique et dynamique des charges électriques des canaux potassiques

---

Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement aux propriétés électriques des canaux potassiques par une description de la structure cristalline, des caractéristiques du courant de *gating* et des modèles qui en découlent.

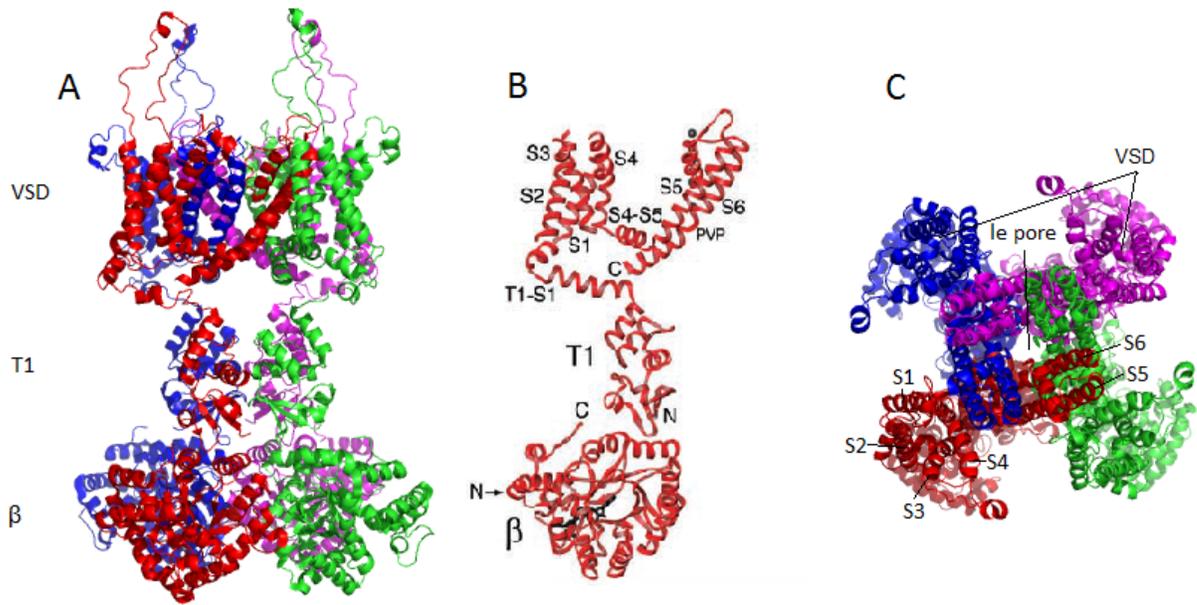
### 1.4.1 Identification des charges sur les canaux voltage-dépendants

---

La structure du canal  $K_v$  1.2 a été résolue à 2.9 Å par l'équipe de MacKinnon en 2005 (Long, Campbell et al. 2005), puis une chimère  $K_v$  2.1/1.2 cristallisée à 2.4 Å en 2007 (Long, Tao et al. 2007) pour enfin donner une structure affinée de  $K_v$  1.2 en 2010 par l'équipe de Ma (Chen, Wang et al. 2010) avec laquelle les figures ont été réalisées (figure 1.15). Ceci nous a permis de mettre en évidence les interactions se produisant dans une même sous-unité (intra sous-unitaire) ainsi que les interactions entre sous-unité proche (inter sous-unitaire).

Le segment S4 est entouré des hélices  $\alpha$  S1 à S3, orientées antiparallèlement de façon à entourer les charges sur le S4. Les hélices sont inclinées les unes contre les autres comme dans un sablier de manière à façonner des crevasses où l'eau peut pénétrer profondément dans la membrane et être à proximité du VSD (voir section 1.2.3). Une mutation dans cette région rend le senseur de voltage conducteur selon l'état dans lequel il se trouve (fermé ou ouvert). Par exemple, en remplaçant les arginines situées dans la région extracellulaire du segment S4 (R1 à R4) par des histidines, un flux d'anion est observé lors de grande dépolarisation (Starace, Stefani et al. 1997, Starace and Bezanilla 2001, Starace and Bezanilla 2004) tandis que pour les mutations R1 A/C/S/V (Tombola, Pathak et al. 2005), I241H et I287H (Campos, Chanda et al. 2007), le VSD devient un transporteur de cation pour des potentiels hyperpolarisants. Ces

informations révèlent l'existence d'un courant de fuite d'une nature cationique ('*omega*' current) ou anionique ('*alpha*' current) provenant directement du VSD, démontrant ainsi que le pore n'est pas la seule entité pouvant créer des échanges entre les milieux extra et intracellulaires.



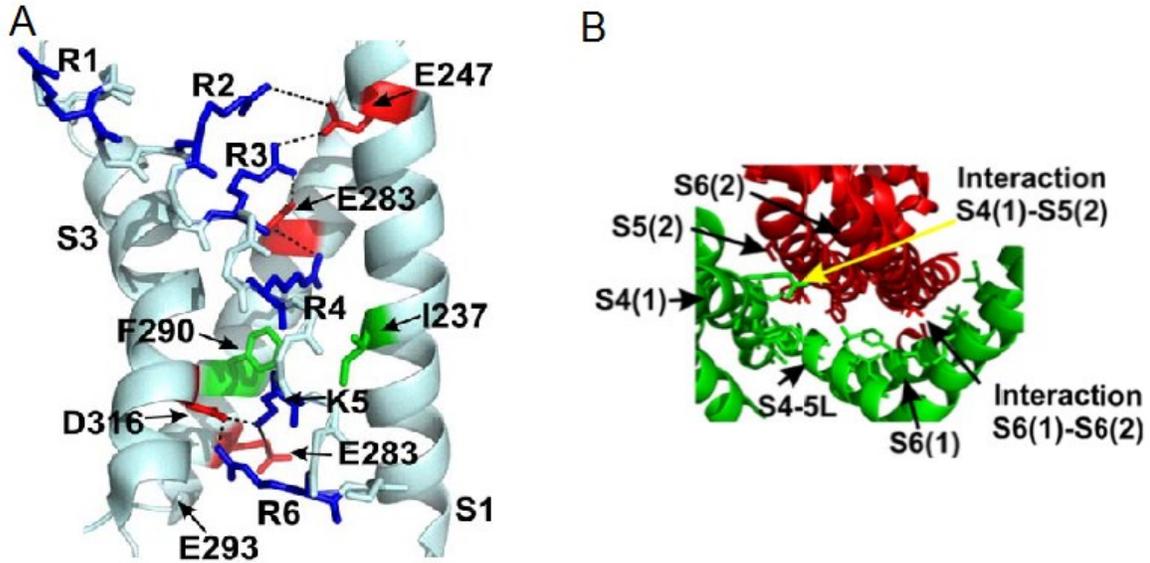
**Figure 1-15 : Structure cristalline du  $K_v$  1.2.** (A) Schématisation du tétramère  $K_v$  1.2 avec son domaine membranaire, son domaine de tétramérisation et la sous-unité  $\beta$ . (B) Vue d'ensemble d'une seule sous-unité du canal et de la sous-unité  $\beta$ . Vu de côté. Les légendes correspondent aux hélices transmembranaires (S1 à S6), la séquence Pro-Val-Pro dans S6 (PVP), et les extrémités N (N) et C (C) de la sous-unité  $\beta$ . La position de l'extrémité N-terminale de la sous-unité  $\beta$ , qui est située sur le côté le plus éloigné de l'observateur, est indiquée par une flèche. (C) Illustration vue du côté extracellulaire du canal. Adapté de Long, Campbell et al. 2005 et construit de 3LUT.pdb.

Les segments S1-S4 sont stabilisés par des interactions électrostatiques et hydrophobes provenant des acides aminés internes d'une même sous-unité (figure 1.16 A). Comme nous l'avons déjà vu dans la section 1.2.3, les acides aminés E283, E293 et aussi E247 pour S2, D316 pour S3 et E218 pour S1 sont chargés négativement. Nous pouvons ainsi former deux groupes de charges négatives qui stabilisent le segment S4 positivement

chargé, le premier est exposé à la crevasse externe (E247 et E283) (Tiwari-Woodruff, Lin et al. 2000, Khalili-Araghi, Jogini et al. 2010), le second est situé dans la membrane (E218, E293 et D316) (Papazian, Shao et al. 1995, Papazian, Silverman et al. 2002, Borjesson and Elinder 2008). Cette proximité permet une restriction lors du déplacement du S4 pour l'ouverture/fermeture du pore. Le S4 ne possède pas la même chiralité le long de son axe hélicoïdale : du côté extracellulaire on retrouve une hélice  $\alpha$  tandis que du côté intracellulaire, on observe une hélice  $3_{10}$  après le résidu R3 (Long, Tao et al. 2007). Il a été suggéré que ce phénomène est causé par la résistance du pore lors du déplacement du S4.

La membrane lipidique est aussi impliquée dans la stabilité globale du senseur de voltage par l'interaction des tête polaires des phospholipides avec les résidus du segment S4 (R1 et R2) (Cuello, Cortes et al. 2004, Schmidt, Jiang et al. 2006, Jogini and Roux 2007, Long, Tao et al. 2007) et ceci serait indispensable dans la rapidité du mouvement du VSD (Tombola, Pathak et al. 2006). Les arginines externes peuvent créer des ponts salins (Jogini and Roux 2007) ou même des interactions électrostatiques avec le milieu lipidique chargé négativement (Ramu, Xu et al. 2006, Xu, Ramu et al. 2008, Milesco, Bosmans et al. 2009). Comme les lipides, les acides aminés de nature hydrophobes et lipophiles, intercalés entre les charges positives du S4 participeraient à la modulation fonctionnelle du senseur de voltage (Gandhi and Isacoff 2002) ainsi que dans l'interaction protéine-protéine (Schonherr, Mannuzzu et al. 2002, Gonzalez-Perez, Stack et al. 2010).

En ce qui concerne les interactions inter sous-unitaires, plusieurs méthodes expérimentales (comme les ponts disulfures entre deux cystéines de chaque sous unité proche) ont permis de les mettre en évidence et ainsi de comprendre leurs rôles de maintien lors du déplacement du segment S4 (Elinder, Mannikko et al. 2001, Broomand, Mannikko et al. 2003, Gandhi, Clark et al. 2003, Laine, Lin et al. 2003, Elliott, Neale et al. 2004) (figure 1.16 B).



**Figure 1-16 : Interactions intra sous-unitaires et inter sous-unitaires.** (A) Interactions intra sous-unitaires. Les charges positives sont en bleu et les charges négatives sont en rouge. La majorité des charges positives du segment S4 sont exposées vers le côté externe de la membrane, indiquant une conformation ouverte du canal. (B) Interactions inter sous-unitaires. La sous unité verte (1) interagit avec la sous unité rouge (2).

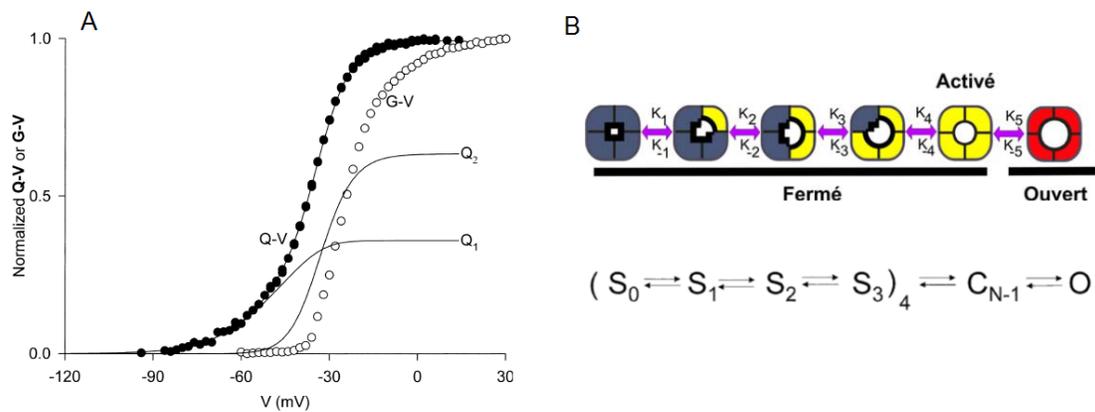
#### 1.4.2 Caractéristiques cinétiques et énergétiques des courants de *gating*

Nous avons vu dans l'équation 1.3 comment se définissait  $Q_v$ . Nous pouvons la définir comme une fonction sigmoïde (pour plus d'information, voir section 2.3) :

$$\frac{Q_{v_i}}{Q_{v_{max}}} = \frac{1}{1 + e^{-(v-v_{1/2})/dV}} \quad (1.3)$$

Avec  $dV = \frac{RT}{zF}$ , R : constante des gaz parfait, T : température, F : constante de Faraday et z : valence de la charge se déplaçant dans tout le champ électrique (charge efficace). Nous pouvons faire de même avec la conductance et nous obtenons des courbes de Boltzmann qui décrivent le comportement des charges et de la conductance

(figure 1.13 B). La distribution de probabilité de la conductance peut très bien être représentée par une distribution de Boltzmann tandis que la distribution de probabilité des charges nous donne plus d'information si elle est représentée avec deux composantes que l'on peut associer à la quantité de charge  $Q_1$  et  $Q_2$  (figure 1.17 A).  $V_{1/2}$  représente le voltage pour lequel nous avons un déplacement de la moitié des charges du VSD, par exemple, la première composante  $Q_1$  possède un  $V_{1/2}$  de  $-63$  mV, transportant une charge plus petite (s'éloignant de  $27$  mV du potentiel d'équilibre :  $-90$  mV) que la deuxième composante possédant un  $V_{1/2}$  de  $-44$  mV (Bezanilla, Perozo et al. 1994). Nous pouvons interpréter ceci par la présence de différentes transitions fermées évoluant selon différents voltages.

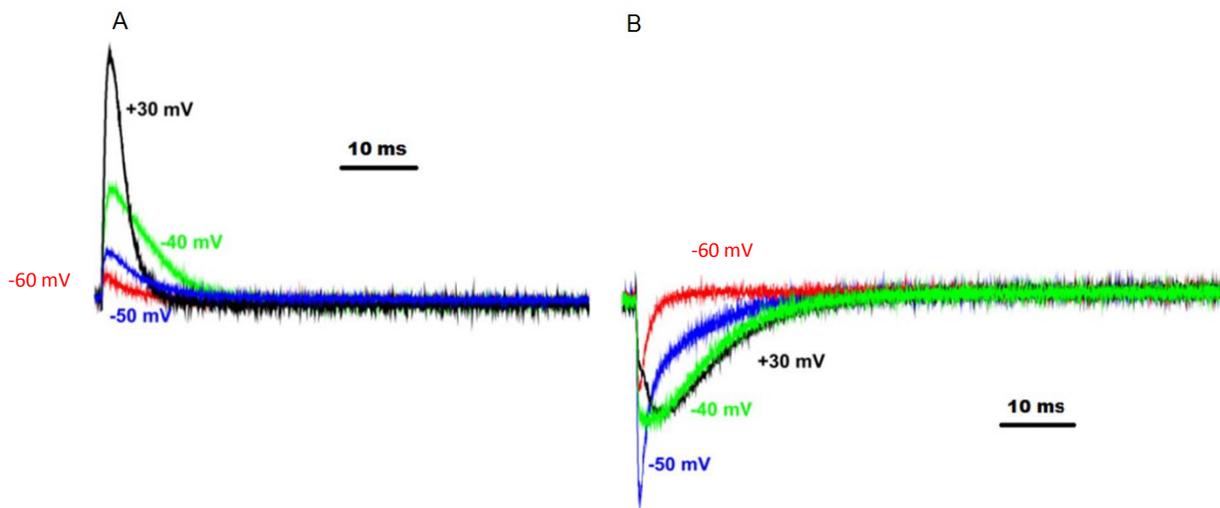


**Figure 1-17 : Dépendance de la charge en voltage et modèle séquentiel.** (A) Relation de la charge normalisée versus le potentiel en point noir qui est le fit de deux composantes  $Q_1$  et  $Q_2$  illustré en trait plein. La conductance normalisée est en point blanc. Tiré de Bezanilla, 2000. (B) Modèle séquentiel. Tiré de Fedida et Hesketh 2001 (Fedida and Hesketh 2001).

Lors de la phase d'atténuation du *ON-gating* (figure 1.18 A), nous pouvons voir le comportement de ces deux composantes. Pour de petites dépolarisations inférieures à  $-60$  mV, c'est la composante  $Q_1$  qui domine, pour des potentiels intermédiaires entre  $-50$  et  $-40$  mV, on peut observer les deux composantes et pour de grandes dépolarisation, supérieur à  $-20$  mV, c'est la composante  $Q_2$  qui domine. En ce qui

concerne la phase de décroissance du *ON-gating*, deux groupe de charge sont responsables de ce déplacement ce qui nous indique un modèle de 3 états minimums (Perozo, MacKinnon et al. 1993, Stefani, Toro et al. 1994).

En revanche, pour le *OFF-gating* (figure 1.18 B), pour de petites dépolarisations inférieures à -50 mV, les courants sont rapides, entre -40 et -30 mV, le courant montre deux composantes une lente et une rapide et pour les grandes dépolarisations, une phase ascendante prononcée avec une atténuation très lente vers l'état de repos créant un décalage entre les courbes Q-V du *ON-gating* avec celle du *OFF-gating*. La composante lente du *OFF-gating* se manifeste au potentiel où la conduction ionique apparait, indiquant que la quantité de charges est ralentie lorsqu'elle atteint l'état d'ouverture (Perozo, MacKinnon et al. 1993, Stefani, Toro et al. 1994, Bezanilla 2000). Ceci nous indique que les transitions proche de l'ouverture du canal possèdent une constante de vitesse rétrograde élevée ou lentement réversible et implique toutes les sous-unités (état coopératif,  $C_{N-1}$  de la figure 1.17 B) tandis que les première transitions du modèle d'activation sont rapides et facilement réversibles (Taglialatela, Kirsch et al. 1992, Bezanilla, Perozo et al. 1994, Loboda and Armstrong 2001).



**Figure 1-18 : Courant transitoire.** (A) *ON-gating*. (B) *OFF-gating*.

Avec toutes ces caractéristiques, un modèle séquentiel fut proposé que l'on présente dans la figure 1.17 B qui repose sur les principes de Markov, expliquant les taux de transitions entre des états consécutifs totalement indépendants de leur historique. La composante  $Q_1$  est responsable des premières transitions (S0 à  $C_{N-1}$ ) car elles sont rapides et réversibles tandis que  $Q_2$  est responsable de la dernière transition permettant l'ouverture car elle est lente et difficilement réversible.

## 1.5 Objectifs

---

Ce mémoire propose une exploration de l'influence des mutations de L'EA-I sur le mécanisme du couplage électromécanique entre le senseur de voltage et le pore. À ce jour, seuls des traitements changeant l'environnement des canaux Kv1.1 ont permis une certaine amélioration de la condition des patients atteints de la maladie. Trois modes d'actions ont été mis en lumière dans le chapitre 1.1 : l'inhibition du fonctionnement de l'anhydrase carbonique afin de changer le pH de la cellule et par conséquent le potentiel membranaire, l'atténuation de la transmission du signal neuronale au niveau des synapses et, enfin, la modulation du potentiel d'action en piégeant les canaux sodiques dans un état inactivés. Afin d'améliorer le fonctionnement des canaux potassiques dépendants du voltage, il faut une meilleure compréhension du rôle des mutations de l'EA-1 sur le mécanisme interne de ces canaux.

Afin d'atteindre cet objectif, la technique du *cut-open voltage-clamp* (Stefani and Bezanilla 1998) va nous permettre d'explorer les courants transitoires afin d'obtenir une information plus importante sur le rôle du senseur de voltage, au-delà des courants ioniques qui ont permis de mettre en lumière l'effet d'haploinsuffisance des mutations.

Une étude générale des courants transitoires de sept mutations sera abordée en première partie pour ensuite nous concentrer sur la mutation F184C située à cheval entre le senseur de voltage et le pore sur le haut du S1. Nous pourrions réaffirmer son

effet d'haploinsuffisance mais aussi son influence dans la stabilisation d'un état intermédiaire dans le modèle d'activation et la confirmation d'un deuxième contact physique entre le pore et le senseur de voltage.

## 2 Méthodologie

---

Il existe trois techniques pour décrypter les courants macroscopiques et individuels des canaux potassiques : le traditionnel voltage imposé à deux-électrodes (*two-electrode voltage clamp* (TEVC)), le *patch clamp* et le *cut open voltage clamp* (COVC). La technique utilisée dans ce mémoire est le COVC qui est une amélioration du TEVC. Bien que cette technique soit plus compliquée à mettre en œuvre que le TEVC, elle offre un contrôle plus rapide et précis du voltage imposé, idéal pour enregistrer des cinétiques rapides.

### 2.1 *Cut Open Voltage Clamp* (COVC)

---

La découverte que les ovocytes de la grenouille *Xenopus laevis* constituaient un système d'expression valable pour les canaux ioniques (Dascal 1987) a permis de rendre cette technique très populaire auprès des biophysiciens pour l'étude des protéines membranaires. De plus, les ovocytes de *Xenopus laevis* ont un faible niveau d'expression de canaux potassiques endogènes et sont très facilement maniables, faisant d'eux des candidats parfaits pour les études électrophysiologiques. Sachant que les temps d'activation des courants macroscopiques des canaux *Shaker* sont de l'ordre de la microseconde et que la vitesse pour charger la membrane est également de l'ordre de la milliseconde en TEVC, cela en fait une technique inutilisable. Par contre, le COVC permet

de dépasser cette limite en ayant résolu les problèmes de résistance d'accès et de répartition du voltage imposé sur l'ovocyte.

Dans l'introduction on a expliqué que l'évolution temporelle des courants de *gating* est essentiellement importante pour déterminer la cinétique entre différents états fermés. Celle-ci est limitée par le mouvement de charge confiné à la bicouche lipidique. D'ailleurs, dépendamment de la quantité de charges transportée par le canal, le courant de *gating* peut être accéléré (beaucoup de charge, grande amplitude) ou ralenti (moins de charges, petite amplitude). À cet égard, si la transition est trop vite, comme dans le cas de Shaker K<sup>+</sup>, le courant de *gating* partage les mêmes propriétés temporelles que le courant capacitif. Par conséquent, les deux signaux deviennent confondus et difficile à séparer. La réponse du courant capacitif au voltage détermine la vitesse du clamp. Alors, pour étudier des mouvements d'événement rapide il faut trouver une méthode qui permet de bien résoudre la décharge du courant capacitif. De plus, pour les méthodes du TEV, la réponse indicielle au potentiel de commande est la cause primaire dans l'erreur du potentiel membranaire. Suivant les lois de Kirchhoff, la constante de temps du voltage traversant le condensateur, avec  $R_a$  : résistance d'accès et  $\mu$  : gain, s'exprime ainsi :

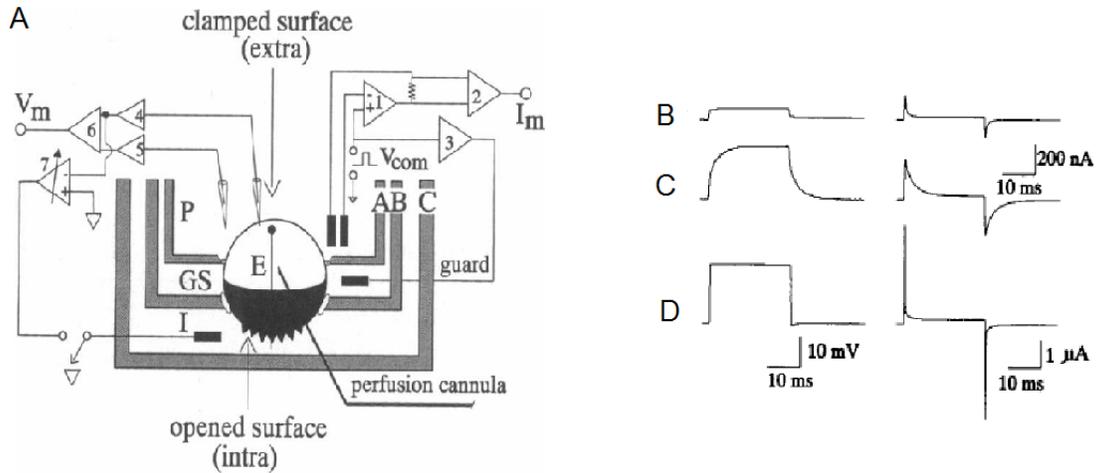
$$\tau = \frac{R_a C}{\mu} \quad (2.1)$$

Ainsi plus la résistance d'accès sera grande, plus lent sera le chargement et le déchargement de la membrane et moins bonne sera la résolution du « clamp ». Autrement dit, la réponse au voltage ne suivra pas assez bien le *pulse* de commande. Donc, évidemment, pour résoudre la décharge capacitive il faut diminuer la résistance d'accès.

Le second problème est la répartition non uniforme du voltage sur la cellule, due à la 'grande' taille de l'ovocyte et de la résistance cytoplasmique. Ceci est résolu par la perméabilisation stratégique de l'ovocyte et le courant est directement injecté à l'intérieur de l'œuf en diminuant la résistance d'accès. Toutefois, la résistance du cytosol

est encore présente. C'est pour cela que l'ovocyte est séparé en trois compartiments électriquement indépendants (voir figure 2.2.1) et seul le compartiment supérieur, isolé, est objet d'étude. Si la population des canaux potassiques présents sur l'ovocyte ne ressentait pas tous le même voltage, il en résulterait une diminution de la précision des mesures.

La figure 2.2.1 A est une représentation schématique de la chambre et des systèmes électriques du montage. L'ovocyte est divisé en trois parties électriquement indépendantes, la chambre basse (I), la chambre du milieu (GS : *guard shield*) et la chambre du haut (P). La perforation de l'ovocyte se fait soit grâce à une solution saponine (détergent) perfusée dans la chambre basse soit manuellement par une aiguille introduite directement dans l'ovocyte. Pour cela, on mesure le potentiel membranaire ( $V_m$ ) et on applique le courant voulu pour que  $V_m$  soit égal au potentiel de commande ( $V_{com}$ ). P est fixé au potentiel de commande tandis que l'intérieur de l'ovocyte est virtuellement relié à la terre par deux amplificateurs. Un des amplificateurs est connecté à la microélectrode de verre implantée sur la surface de l'ovocyte au niveau de la chambre P et le second, par le biais de la chambre I. La mise à la terre au niveau de I n'est pas suffisante pour réduire la résistance d'accès du cytoplasme d'où la présence d'un deuxième point de relais au niveau de la chambre P. Le courant est injecté au niveau de I (voir figure 2.1 B-D). Pour éviter les courants de fuites, la chambre haute est séparée de la chambre basse par la chambre du milieu qui est au même voltage que la chambre P. Cette séparation permet de répartir le voltage sur 1/5<sup>ème</sup> de l'ovocyte, la partie étudiée et réduit considérablement le problème de non uniformité du potentiel.



**Figure 2-2-1 : COVC.** (A) Schéma transverse du montage. (B-D) Traces des courants selon différentes caractéristiques du montage. A gauche, trace du *pulse* de 20 mV, à droite trace du courant correspondante. B : ovocyte sans perforation. C : après application d'une solution saponine. D : même ovocyte mais avec la mise à terre de la microélectrode de verre sur la face intérieure de l'ovocyte au niveau de la chambre P. Tiré de Tagliatela, Toro et al 1992

Pour résumer les avantages de cette méthode nous pouvons citer :

- Réponse à haute fréquence avec une constante de temps inférieure à 30  $\mu$ s et un faible bruit de fond lors de la prise de donnée (1.2 nA à 5 kHz). Ceci nous permet d'obtenir des données d'évènements rapides.
- L'ovocyte est stable durant des heures comparé au *patch clamp* qui est très limité dans le temps. Le TEVC est limité dans le temps par l'augmentation spontanée de la résistance de la microélectrode, problème résolu par le COVC.
- Contrôle de la solution intracellulaire. Permet un certain contrôle de l'environnement autour des protéines membranaires.

## 2.2 Procédures expérimentales

---

### 2.2.1 Biologie moléculaire

---

Les expériences avec le canal *Shaker* sont obtenues à partir d'une variante du gène de la *Drosophile ShakerIR* ( $\Delta 6-46$ )-zH4. Le IR veut dire *inactivation remove* par la délétion des acides aminés 6 à 46 (voir section 1.3). Le z est utilisé pour dénoter la présence de la séquence Kozak et H4 signifie que le canal est un homotétramère, c'est-à-dire que les 4 sous unités sont identiques, amplifiant l'effet de la mutation étudiée, ce qui n'est pas souvent le cas *in vivo*. Cette variante du Shaker sera le type sauvage (WT) de notre étude. Le gène est sous-cloné (*subcloning*) dans le vecteur pBSTA. Les courants transitoires seront déterminés avec la mutation W434F qui abolit le courant de conduction.

Les mutations sont introduites par mutagénèse dirigée (*QuickChange; Agilent Technologies*). Les transformations sont effectuées par choc thermique avec les cellules compétentes XL1-Blue (*Agilent technologies*) puis mises sur des boîtes de pétri contenant du LB agar avec l'antibiotique approprié (ampicilline à 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) puis incubées durant la nuit à 37 ° C. Après une préparation plasmidique (*QIAGEN Spin Miniprep Kit*), l'ADN est séquencée (Plateforme Génomique, IRIC, Université de Montréal) pour pouvoir être amplifiée (*QIAGEN Plasmid Midi Kit*), puis transcrite de l'ADN vers l'ARN (mMachine T7; Ambion). Les constructions qui n'exprimaient pas ont été séparées sur gel d'agarose pour vérifier s'il y a eu une dégradation de l'ARN.

### 2.2.2 Ovocytes de *Xenopus* et expression

---

Des ovocytes au stade V-VI sont obtenus chirurgicalement après anesthésie de la grenouille *Xenopus laevis*. Les sacs d'ovocytes enveloppés dans un follicule, sont

soigneusement ouverts, nettoyés dans une solution SOS (102 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 5 mM Hepes ; pH 7.2) et mis dans de la collagénase à une concentration de 1 mg/ml pour 30 minutes avec agitation. De cette manière, nous pouvons enlever la membrane folliculaire enveloppant l'ovocyte sans détruire la matrice cellulaire. Les ovocytes en bonne santé et en bonne forme sont triés et placés dans une solution de Barth (90 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.82 mM  $MgSO_4$ , 0.41mM  $CaCl_2$ , 0.33 mM  $Ca(NO_3)_2$  et 5 mM Hepes ) à 18 ° C pour au moins 2h avant utilisation.

Pour une bonne expression, 9.2 nl d'ARNt avec une concentration de 0.5  $\mu l/\mu g$  pour les mutations donnant des courants ioniques et 46 nl d'ARNt avec une concentration de 1  $\mu l/\mu g$  pour les mutations donnant des courants transitoires sont injectés dans l'ovocyte au niveau de la délimitation entre les deux pôles. L'incubation dure entre 16h à 48 heures (ionique et *gating* respectivement) à 18 ° C ou à 15 ° C pour un meilleur contrôle de l'expression. Les ovocytes doivent être mis à température pièce 1h avant l'expérience lorsqu'ils sont incubés à 15 ° C.

### 2.2.3 Conditions électrophysiologiques

---

Les expériences en voltage imposé sont accomplies avec un CA-1B *Performance Oocyte Clamp* (Dagan Corp., Minneapolis, MN). Les courants sont enregistrés avec le logiciel d'acquisition *GPatch* (département d'anesthésiologie, Université de Californie, Los Angeles) et analysés avec le logiciel *Analysis* (département d'anesthésiologie, Université de Californie, Los Angeles).

Les solutions externes utilisées pour les conditions ioniques contiennent 5 mM KOH, 110 mM NMDG, 10 mM HEPES et 2 mM  $Ca(OH)_2$ , tandis qu'elles contiennent 115 mM NMDG, 10 mM HEPES et 2 mM  $Ca(OH)_2$  pour le *gating*. Les solutions internes contiennent 115 mM NMDG (*gating*) ou 115 mM KOH (ionique), 10 mM HEPES et 2 mM EDTA. Pour les expériences menées avec le TEA ou le 4-AP, les solutions externes sont

faites de 20 mM TEA ou 20 mM de 4-AP, 95 mM NMDG, 10 mM HEPES et 2 mM  $\text{Ca(OH)}_2$ . Toutes les solutions sont ajustées à un pH de 7.2 avec l'acide méthylsulfonique (MES) et filtrées. Pour les mesures de *gating*, la compensation linéaire et la soustraction de la capacitance ont été utilisées. Le courant transitoire du condensateur créé par la membrane cellulaire, est compensé par un courant transit de signe opposé et de même amplitude émis à partir de l'électrode CC, placé dans la chambre supérieure. Un protocole P/4 consiste à 4 *pulses* totalisant la valeur du *pulse* émis lorsque qu'il n'y a encore aucun mouvement de charge dans le canal (entre -120 mV et -100 mV par exemple).

### 2.3 Analyse des données

---

Nous avons vu dans la section 1.3 comment se définissait la charge transportée lors des courants de *gating* (équation 1.3). En physique statistique, la fonction de partition Z est une grandeur fondamentale qui englobe les propriétés statistiques d'un système à l'équilibre thermodynamique. Nous pouvons définir comme la fonction de partition d'un ensemble canonique par (ceci peut être la charge  $Q_v$  ou la conductance  $G_v$ ):

$$Z = \sum_i e^{-\beta E_i} = \sum_{i=0}^N g_i e^{-E_i/(k_B T)} = 1 + g_1 e^{-E_1/(k_B T)} ; \text{pour } i = 1 ; E_0 = 0 \quad (2.2)$$

Avec,  $k_B$  : constante de Boltzmann et T : température.  $E_i$  : représente l'énergie du micro-état i et  $g_i$  est la dégénérescence du micro-état i. Pour simplifier le formalisme mathématique, nous considérons seulement deux états des canaux potassiques dépendant du voltage ( $i=1$ ) : ouverts et fermés.

Alors la distribution de la probabilité sera donné par (pour  $n=1$ ) :

$$N_i/N = P_o = g_i e^{-E_i/(k_B T)} / Z = 1 / (1 + g_1 e^{-E_1/(k_B T)}) \quad (2.3)$$

Si nous réécrivons l'équation 2.3 selon les termes qui nous intéressent sachant que la dégénérescence est 1 et que l'état d'énergie est la différence de l'état atteint par rapport à l'état d'équilibre on obtient :

$$Q_{v_i}/Q_{v_{max}} = 1 / (1 + e^{-(v-v_{1/2})/dV}) + cte \quad (1.6)$$

Avec cte : constante. La courbe expérimentale obtenue est alors lissée par l'équation 1.6 dans le logiciel Origin 8 (*Originlab*), tout dépendamment des résidus obtenus, nous pouvons utiliser une ou deux composantes. Si deux composantes sont présentes alors l'équation mathématique devient :

$$Q_{v_i}/Q_{v_{max}} = 1 / ((1 + e^{-(v-v'_{1/2})/dV'}) * (1 + e^{-(v-v_{1/2})/dV})) + cte \quad (1.7)$$

Avec  $dV = RT/zF = k_B T / z e_0$  : facteur d'inclinaison de la courbe;  $R = N_A * k_B$  : constante des gaz parfait;  $N_A$  : Nombre D'Avogadro;  $k_B$  : Constante de Boltzmann;  $F = e * N_A$  : constante de Faraday;  $e_0$  : charge élémentaire d'un électron et  $z$  : charge efficace.

Pour les courants ioniques, l'état d'équilibre est utilisé pour calculer la conductance :

$$G = \frac{I}{V_M - E_K} \quad (2.4)$$

Que l'on peut lisser par :

$$G_i / G_{max} = 1 / (1 + e^{-(v-v_{1/2})/dV}) + cte \quad (2.5)$$

Cette équation 2.5 nous permet de remplacer mathématiquement la courbe expérimentale et de trouver le  $V_{1/2}$  caractéristique ainsi que le  $dV$  (facteur d'inclinaison de la courbe) utilisés pour décrire le fonctionnement des canaux potassiques.

### 3 Résultats

---

#### 3.1 Mutations responsables de l'épisodique ataxie de type I

---

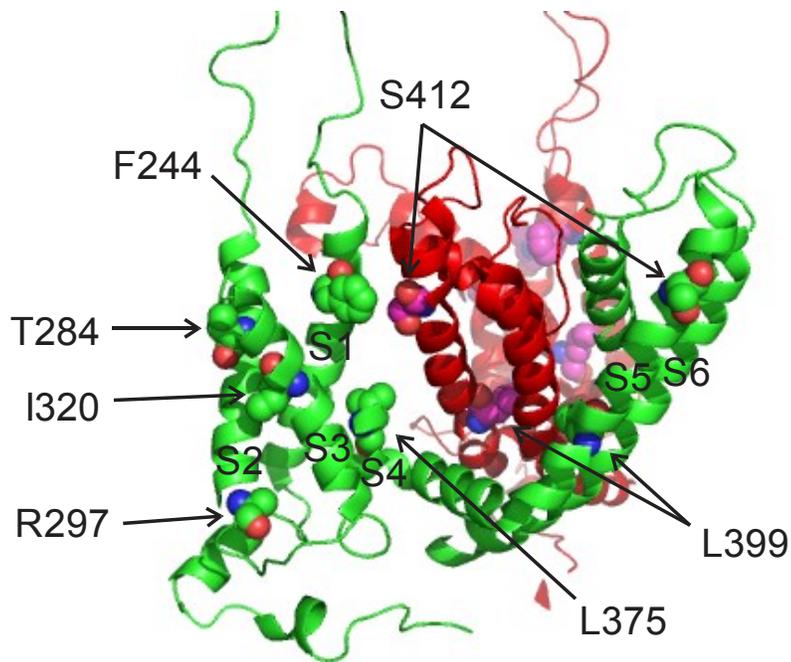
Dans cette première partie, sept mutations de l'épisodique ataxie ont été examinées. Selon la notation de la séquence du *Shaker*, nous avons expérimenté les mutations F244A/C/E/H/I/Y, T284A/M, R297K/Q/A/H, I320T, L375F, L399I et S412C/I<sup>1</sup>. La figure 3-1 montre la distribution des mutations sur le canal potassique. On peut remarquer que les mutations de l'EA-1 se retrouvent particulièrement dans la région se situant en haut du S4, incluant la mutation F244C que nous avons étudiée en détails, et dans la région située en bas du S4, le lien S4-S5 et le S6-C-terminal, les deux régions impliquées dans le couplage électromécanique. Pour une meilleure compréhension, le tableau 3-1 récapitule les mutations de l'EA-1 sur les canaux Kv1.1 avec les acides aminés correspondant testées sur le Shaker.

**Tableau 3-1** : Correspondance séquentielle entre les canaux potassiques de la famille Kv1.1 et la famille Shaker

<b>Kv1.1</b> <b>(mutations de l'EA-1)</b>	<b>Shaker</b> <b>(mutations testées)</b>	<b>Segments</b>
F184 <b>C</b>	F244 <b>C/Y/A/I/C/H/E</b>	S1
T226 <b>R/A/M/K</b>	T284 <b>A/M</b>	S2
R239 <b>S</b>	R297 <b>A/H/K</b>	S2
I262 <b>T</b>	I320 <b>T</b>	S3
L305 <b>F</b>	L375 <b>F</b>	S4
L329 <b>I</b>	L399 <b>I</b>	S45L/S5
S342 <b>I</b>	S412 <b>I/C</b>	S5

---

<sup>1</sup> Les résidus en gras représentent les mutations de l'EA-1 connues.



**Figure 3-1 : Localisation des mutations de l'EA-1 étudiées sur deux sous-unités.** Pour la clarté de la figure, le segment S4 a été presque totalement caché, seul l'acide aminé L375 persiste. Tiré de 3LUT.pdb.

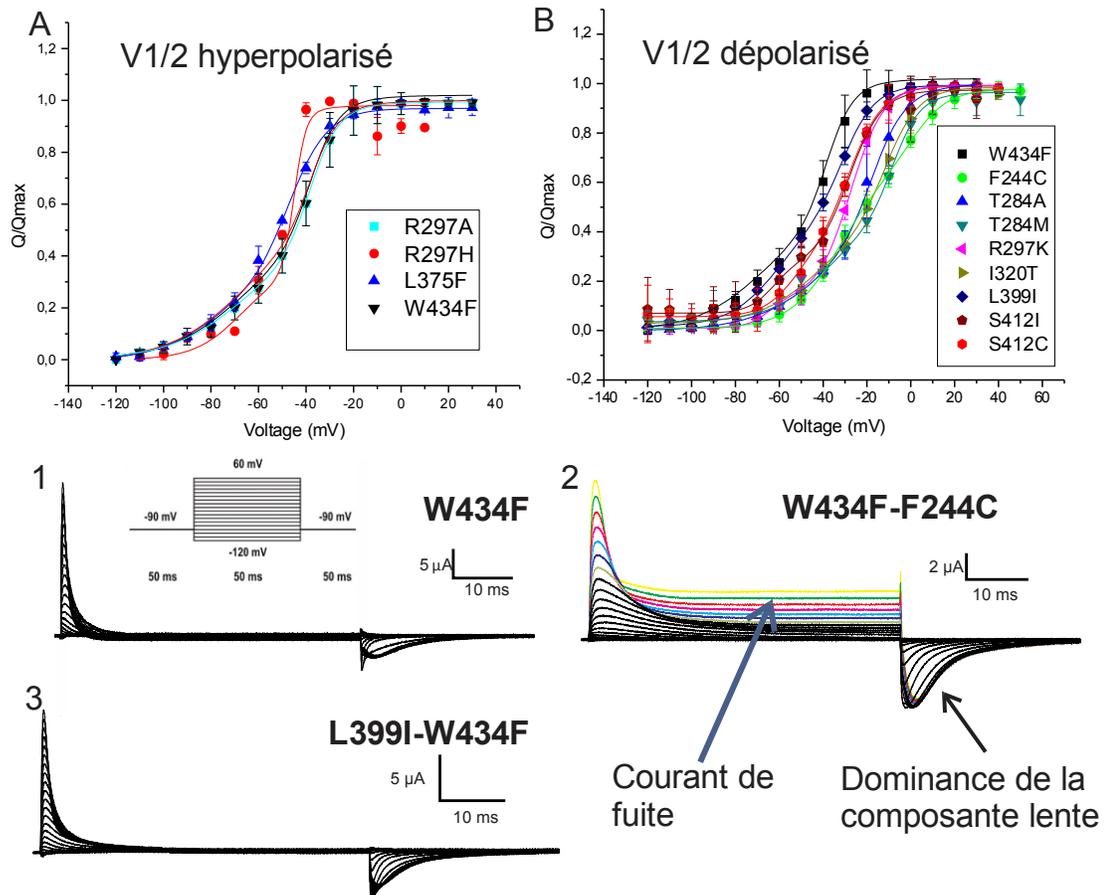
Il existe déjà des résultats publiés dans la littérature pour certaines mutations, mais aucune expérience par rapport aux courants transitoires des mutations de l'EA-1 n'a été faite. Nous nous intéressons à la relation des mutations de l'EA-1 avec le couplage électromécanique, qui s'observe sur les courants transitoires (QV) et ioniques (GV). Le tableau 3-2 résume les résultats publiés qui se base sur trois caractéristiques des canaux potassiques, l'amplitude des courants ioniques, la vitesse d'activation et de désactivation et le seuil d'ouverture du pore.

**Tableau 3-2 : Résumé des altérations fonctionnelles des mutations de l'EA-1 dans la littérature**

<b>Mutations (Segment)</b>	<b>Conséquences fonctionnelles</b>	<b>Références</b>
F184C (S1)	Altérations de la dépendance aux voltages, modification de la vitesse d'activation et réduction de l'amplitude des courants K+.	Adelam, Bond et al 1995 Zerr, Adelman et al. 1998
T226A (S2)	Profonde réduction de l'amplitude des courants K+. Ralentissement de la vitesse d'activation et de désactivation.	Zerr, Adelman et al. 1998
T226M (S2)	Réduction de l'amplitude des courants K+. Changement du seuil d'activation.	Zerr, Adelman et al. 1998
R239S (S2)	Minimum de courant K+	Adelamn, Bond et al 1995 Zerr, Adelman et al. 1998
I262T	Données non disponibles	
L329I	Données non disponibles	
S342I	Données non disponibles	

Afin d'analyser les courants transitoires des mutations de l'EA-1, nous allons nous baser sur l'étude de deux paramètres : la forme des courants transitoires et le déplacement vers des potentiels hyperpolarisés ou dépolarisés du  $V_{1/2}$  des courbes QV. Comme nous l'avons vu dans la section 1.4.2, nous pouvons séparer les courants transitoires en deux événements : le *ON-gating* qu'on nommera *Qon* et le *OFF-gating* appelé *Qoff*.

Pour toutes les expériences réalisées avec les courants transitoires, on utilise la mutation W434F afin d'induire immédiatement l'état non conducteur du canal (voir section 1.3 pour plus de détails). L'absence de courant ionique nous permet d'enregistrer le courant transitoire. Lors de l'observation des courants transitoires des mutations de l'EA-1, on a pu distinguer trois groupes. Le premier groupe est composé des mutations T284**A/M** qui possèdent des courants transitoires identiques aux courants transitoires de type sauvage (W434F) qui sont présentés en (1) de la figure 3-2. Le deuxième groupe comprend les mutations F244**C/Y/A/I/H/E**, I320**T**, R297**A** et L375**F**. Les courants transitoires du deuxième groupe sont certainement les courants les plus intéressants. Lorsque nous les comparons aux courants transitoires du premier groupe, nous pouvons voir un ralentissement de la vitesse d'activation ainsi que l'apparition d'un courant de fuite pour le *Q<sub>on</sub>* et la dominance de la composante lente pour le *Q<sub>off</sub>* (voir section 1.4.2 pour plus de détails). Un exemple du profil des courants transitoires du groupe 2 est présenté en (2) de la figure 3-2. Enfin, le troisième groupe s'identifie par l'absence de courant de fuite dans le *Q<sub>on</sub>* mais toujours avec la dominance de la composante lente dans le *Q<sub>off</sub>*. Les courants transitoires de ce groupe sont présentés en (3) de la figure 3-2 et comprend les mutations R297**K/H**, L399**I** et S412 **C/I**.



**Figure 3-2 : Courants transitoires des mutations de l'EA-1.** Les courbes QV du  $Q_{on}$  des mutations de l'EA-1 sont présentées en (A) avec des  $V_{1/2}$  décalé vers des potentiels hyperpolarisant et en (B) avec des  $V_{1/2}$  décalé vers des potentiels dépolarisants. (1) Trace des courants transitoires de la mutation W434F considérée comme le WT. (2) Exemple des courants transitoires obtenus pour les mutations F244C/Y/A/I/H/E, I320T, R297A et L375F, caractérisé par la dominance de la composante lente dans le  $Q_{off}$  et la présence d'un courant de fuite dans le  $Q_{on}$ . (3) Exemple des courants transitoires obtenus pour les mutations R297K/H, L399I et S412I/C, caractérisé seulement par la dominance de la composante lente dans le  $Q_{off}$ .

Nous allons maintenant nous intéresser aux effets des mutations de l'EA-1 sur le décalage du  $V_{1/2}$  des courbes QV du  $Q_{on}$ . Nous pouvons identifier deux groupes : un

décalage de  $V_{1/2}$  vers des potentiels hyperpolarisants et un décalage vers des potentiels dépolarisants par rapport aux  $V_{1/2}$  du WT. Toutes les courbes QV requièrent un lissage avec deux fonctions de Boltzmann (voir section 1.4.2 pour plus de détails) et sont présentées dans la figure 3-2 en (A) pour un décalage vers des potentiels hyperpolarisants et en (B) pour un décalage vers des potentiels dépolarisants. Toutes les valeurs des  $V_{1/2}$  sont résumées dans le tableau 3-3 et le décalage des  $V_{1/2}$  des mutations par rapport au WT est présenté dans la figure 3-3.

Lorsque la position R297 est mutée en Sérine, aucune expression du canal est possible mais lorsque cette mutation est co-exprimée avec le WT, l'amplitude du courant ionique est diminuée et il n'existe aucun décalage du  $V_{1/2}$  des courbes GV (Adelman, Bond et al. 1995, Zerr, Adelman et al. 1998). En ce qui concerne le senseur de voltage, nous pouvons observer que la mutation R297A n'a aucun effet sur celui-ci car le  $V_{1/2}$  des deux composantes, associées à la quantité de charge Q1 et Q2 (voir section 1.4.2 pour plus de détails), n'est pas changée par rapport aux WT malgré la présence d'un courant de fuite comme la mutation L375F (voir figure 3-3). Lorsque nous mutons cette position en His ou Lys, la composante Q2 du *ON-gating* (Q2 On) est décalée vers des potentiels hyperpolarisants pour la mutation R297H ou vers des potentiels dépolarisants pour la mutation R297K et la composante Q1 On est légèrement dépolarisée pour les deux. Cette modification dans la composante Q2 On semble suffire pour faire disparaître le courant de fuite présent dans les courants transitoires de la mutation R297A et faire apparaître une dominance de la composante lente dans le *Qoff*.

Les mutations T284A et T284M décale toutes les deux le  $V_{1/2}$  des courbes GV de +15 mV vers des potentiels dépolarisants et ralentissent la vitesse d'activation et de désactivation du canal potassique (Zerr, Adelman et al. 1998). L'étude du senseur de voltage par l'observation et l'analyse des courants transitoires montre aussi un décalage des  $V_{1/2}$  des deux composantes des courbes QV vers des potentiels dépolarisants (figure 3-3) mais avec une différence entre les deux mutations. Effectivement, la mutation T284M

est beaucoup plus décalée que la mutation T284A avec +31 mV et +18 mV, respectivement, pour les deux composantes. Les cinétiques semblent être affectées de manière différente pour les deux mutations mais la morphologie des courants transitoires est identique au WT.

Les mutations faisant parties du domaine du pore comme S412I/C et L399I décalent toutes les trois la deuxième composante, Q2 On, des courbes QV d'environ +10 mV vers des potentiels dépolarisants. Par contre elles possèdent un effet différent sur Q1 On en la décalant de + 14 mV pour les mutations S412C et L399I, tandis que la mutation S412I ne la décale que de 5.3 mV vers des potentiels dépolarisants (figure 3-3). En l'absence de données sur la modification des courants ioniques apportée par ces mutations, nous ne pouvons déterminer la relation entre les phénotypes de l'EA-1 et les caractéristiques des canaux potassiques.

Enfin, les mutations F244C et I320T présentent à la fois un décalage vers des potentiels dépolarisants et un courant de fuite. La mutation F244C décale Q1 On de +33.3 mV et Q2 On de +38.5 mV et possède la courbe QV la plus décalée vers les potentiels dépolarisants, tandis que la mutation I320T décale Q1 On de +22.7 mV et Q2 On de +26.6 mV (figure 3-3). Ces deux mutations ont le plus grand écart en voltage entre la composante Q1 On et Q2 On,  $\Delta=33.9$  mV pour I320T et  $\Delta=35.2$  mV pour F244C. Indiquant une possible stabilisation des charges lors de l'activation des canaux potassiques car plus les composantes des courbes QV sont éloignées en voltage entre elles, plus la probabilité de l'existence de la stabilisation du S4 dans un état intermédiaire est grande. De plus, la structure cristalline de l'état ouvert du canal Kv1.2 réunit ces deux mutations dans la même région mais la position F244 semble avoir un contact direct avec le pore.

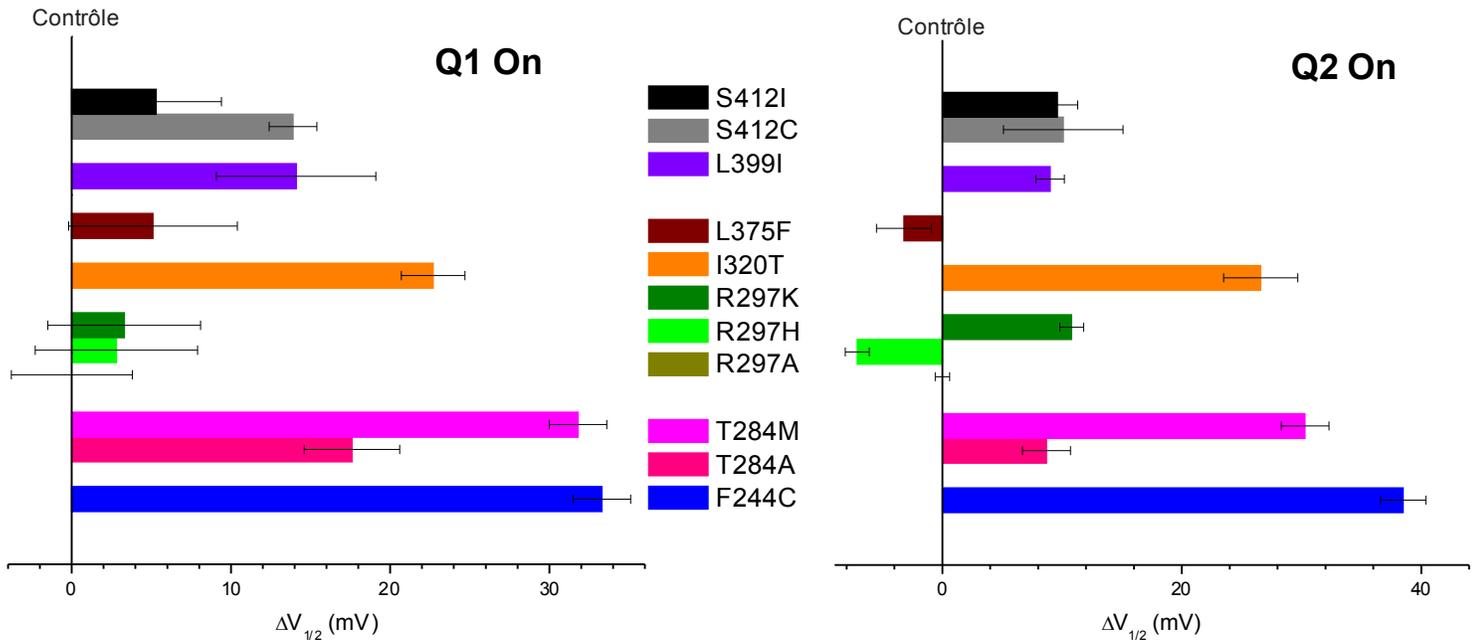
Il semblerait que le courant de fuite soit une caractéristique importante pour l'apparition de l'EA-1 car lorsqu'aucunes autres données ne sont modifiées par rapport au WT, seul le courant de fuite apparait. Il existe deux origines possibles pour l'apparition du courant de fuite, soit il provient du pore, soit du senseur de voltage. Un

courant de fuite provoqué par le pore entrainera un courant potassique persistant vers l'extérieur de la cellule, amplifiant le rôle inhibiteur des canaux. Depuis 2004, Starace et Bezanilla ont décrit l'existence d'un courant de fuite provenant du senseur de voltage, appelé courant *omega* (Starace and Bezanilla 2004). Depuis cette découverte, le courant *omega* a été observé dans les canaux sodiques et calciques et pourrait être responsable de l'épilepsie, du syndrome du QT long, la paramyotonie congénitale et la paralysie périodiques (Jurkat-Rott, Weber et al. 2009, Gosselin-Badaroudine, Delemotte et al. 2012, Jurkat-Rott, Groome et al. 2012). Nous allons discuter du courant de fuite plus en détails lors de l'analyse approfondie de la mutation F244C.

**Tableau 3-3** : Synthèse des résultats du lissage par deux fonctions de Boltzmann des courbes QV du Qon des mutations de l'EA-1

Mutations	Q1 On		Q2 On		n
	$V_{1/2}$	dV	$V_{1/2}$	dV	
	mV	mV	mV	mV	
WT	$-68,2 \pm 4,2$	$15,2 \pm 2,5$	$-38,2 \pm 1,6$	$5,9 \pm 0,8$	10
F244C	$-34,9 \pm 1,8$	$10,5 \pm 0,7$	$0,3 \pm 1,9$	$8,5 \pm 1$	8
T284A	$-50,6 \pm 3$	$16,4 \pm 6,3$	$-19,5 \pm 2$	$8,5 \pm 1,8$	6
T284M	$-36,4 \pm 1,8$	$12,5 \pm 3,9$	$-7,9 \pm 2$	$5,6 \pm 1,8$	3
R297A	$-68,2 \pm 6,8$	$15,2 \pm 2,5$	$-38,2 \pm 0,6$	$5,9 \pm 0,8$	3
R297H	$-65,4 \pm 5,1$	$11,5 \pm 2$	$-45,3 \pm 1$	$2,5 \pm 1,3$	3
R297K	$-64,9 \pm 4,8$	$5,2 \pm 1,4$	$-27,4 \pm 1$	$7,6 \pm 1,1$	4
I320T	$-45,5 \pm 2$	$13 \pm 6$	$-11,6 \pm 3,1$	$7,6 \pm 2$	4
L375F	$-63,1 \pm 5,3$	$12,6 \pm 1,9$	$-41,4 \pm 2,3$	$5,7 \pm 3$	4
L399I	$-54,1 \pm 5$	$13,5 \pm 1,6$	$-29,2 \pm 1,2$	$5,8 \pm 1,6$	4
S412C	$-54,3 \pm 1,5$	$7,4 \pm 1,6$	$-28,1 \pm 5$	$7,9 \pm 1,6$	4
S412I	$-62,9 \pm 4,1$	$7 \pm 1,1$	$-28,6 \pm 1,7$	$5 \pm 2,9$	4

dV est le facteur d'inclinaison de la courbe



**Figure 3-3 : Histogramme de la variation entre le  $V_{1/2}$  du WT et le  $V_{1/2}$  des mutations de l'EA-1.**

À droite est représenté la variation de la composante Q1 du *ON-gating*. À gauche est représenté la variation de la composante Q2 du *ON-gating*.

La position F244 semble jouer un rôle significatif pour le fonctionnement du canal. Une seule mutation sur le S1 décale les  $V_{1/2}$  des QV à plus de 30 mV (figure 3-3) et en même temps génère un courant de fuite, qui peut être causé par le senseur de voltage mais aussi par le pore. Pour cette raison, nous avons décidé d'investiguer cette position plus en détails. Nous allons tout d'abord confirmer les résultats publiés dans la littérature pour ensuite comprendre d'où provient le courant de fuite et l'existence ou pas de la stabilisation d'un état intermédiaire.

## 3.2 Mutation F244C

---

### 3.2.1 Effets des substitutions, au site F244, sur la probabilité d'ouverture :

---

D'après la littérature, la mutation F184C dans les canaux Kv1.1 (équivalent à la mutation F244C dans les canaux de la famille Shaker) décale le  $V_{1/2}$  des courbes GV d'environ +25 mV comparativement au WT ( $V_{1/2} = -22.3$  mV) et ralentit la vitesse d'activation, de deactivation des courants ioniques ainsi que l'inactivation de type C. L'amplitude des courants ioniques lors de l'expression d'homotétramères est diminuée d'environ 80 % par rapport au WT (Adelman, Bond et al. 1995, Zerr, Adelman et al. 1998).

L'acide aminé F244 est proche de l'acide aminé I241. Il a été prouvé que l'acide aminé I241 est en contact avec la crevasse du VSD du côté externe de la membrane car il peut générer un courant oméga à des potentiels hyperpolarisants quand on le remplace par une histidine (I241H). Si on le remplace par une cystéine (I241C), il peut alors former des ponts disulfures avec l'acide aminé muté R362C prouvant une proximité avec le S4 (Campos, Chanda et al. 2007). De plus, si un tryptophane est inséré à cette place, le VSD est stabilisé dans un état fermé intermédiaire potentiellement causé par une interaction hydrogène (Lacroix, Pless et al. 2012).

Pour investiguer la position F244, nous avons utilisé un large spectre d'acides aminés à cette position, afin de comprendre quelles pourraient être les caractéristiques du F244 affectant le VSD et le pore dans les canaux *Shaker*. Nous avons créé six mutations différentes en utilisant la technique de mutagenèse dirigée sur ce site :

- F244A : Relativement hydrophile et petit

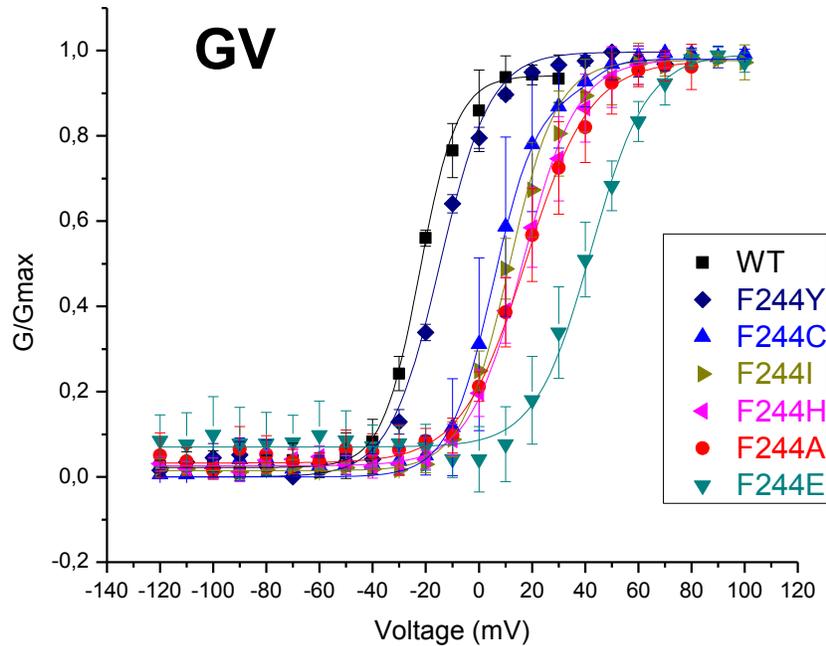
- F244C : Hydrophile et sulfuré (responsable des ponts disulfures et de l'EA-1)
- F244E : Acide (chargée négativement)
- F244H : Basique (chargée positivement)
- F244I : Hydrophobe
- F244Y : Hydrophobe et contient un cycle aromatique proche de la phénylalanine (potentiellement responsable de liaison  $\pi$ )

La figure 3.4 nous présente les courbes GV de ces six mutations. Nous pouvons observer que les courbes GV correspondant à toutes ces mutations sont déplacées vers les potentiels dépolarisant, indiquant que l'état fermé du canal est favorisé ou une déstabilisation de l'état ouvert. Toutes les courbes GV sont normalisées avec la valeur maximale de conductance observée pour chacune des mutations étudiée. Les valeurs du  $V_{1/2}$  des courbes GV sont présentées dans le tableau 3-4 ainsi que le facteur d'inclinaison  $dV$  et le nombre d'ovocyte utilisés pour déterminer la valeur moyenne de  $V_{1/2}$ .

Nous pouvons distinguer trois groupes :

- 1) Le premier groupe ne possède pas d'effet significatif sur la GV. Un acide aminé aromatique Y peut très bien se substituer au F du WT.
- 2) Le groupe du milieu, composé des mutations F244C, I, H et A possède un effet modéré mais pas insignifiant sur la GV. La perturbation de l'environnement naturel à cette position par ces mutations ne permet d'observer la réponse de la conductance au voltage qu'à partir de 0 mV.
- 3) Une charge négative (F244E) affecte le plus l'ouverture du canal, avec un déplacement du  $V_{1/2}$  par +64 mV. La conductance potassique n'est observable qu'au-dessus de 20 mV contrairement à -30 mV pour le WT.

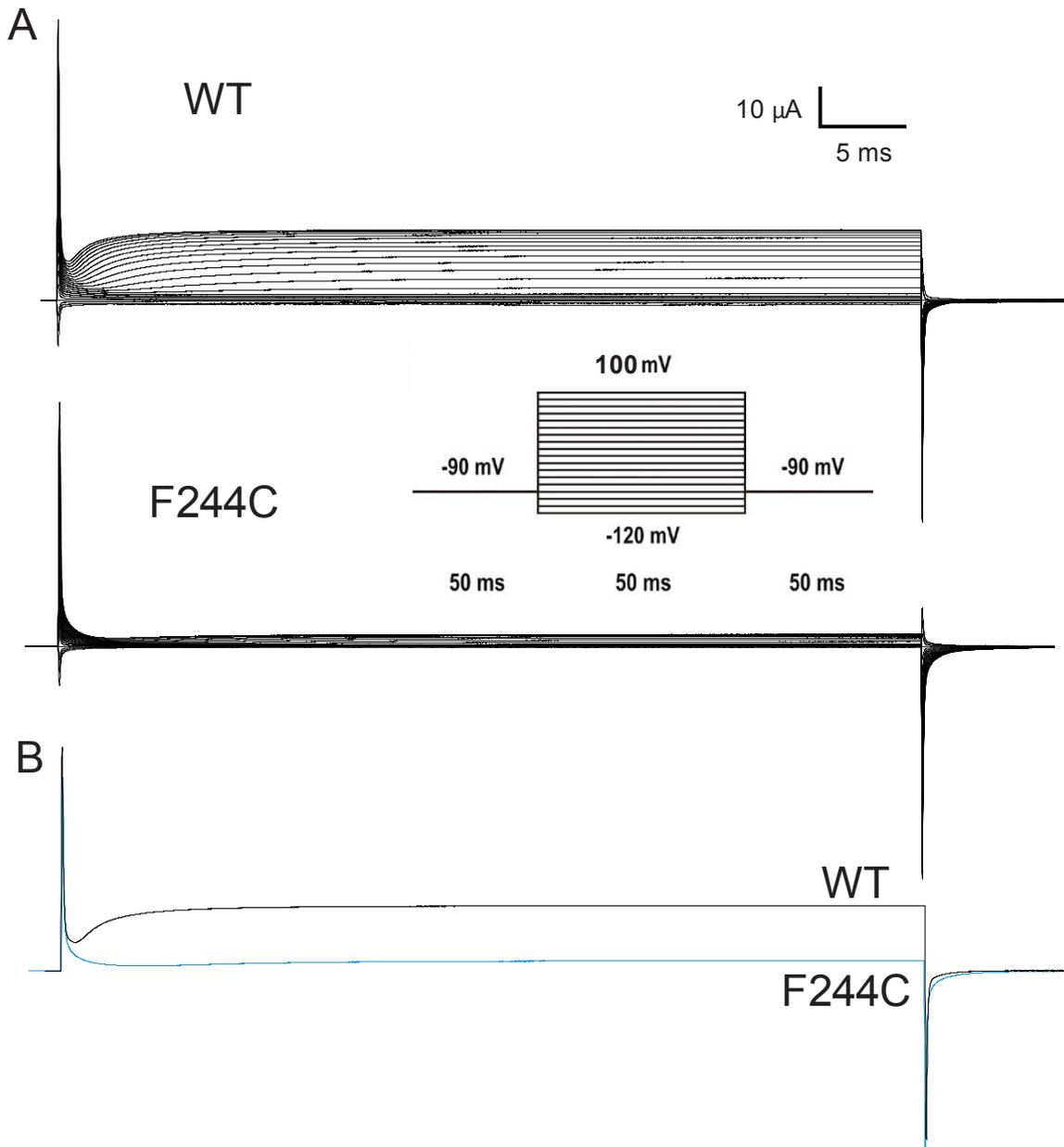
La mutation F244C exhibe un décalage d'environ 31,3 mV de  $V_{1/2}$  vers des potentiels dépolarisants, confirmant les résultats publiés par Adelman, Bond et al. en 1995 et Zerr, Adelman et al. en 1998.



**Figure 3-4 : Effet des mutations F244 sur la probabilité d'ouverture.** Courbe G-V des mutations à la position F244. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard.

Il a été mentionné plus haut pour la mutation F244C (ou F184C dans Kv1.1) que non seulement la dépendance en voltage de la courbe GV est décalée mais aussi que l'amplitude des courants ioniques lors de l'expression d'homotétramères est diminuée ainsi qu'un ralentissement de la cinétique d'activation et de désactivation des canaux potassiques. La figure 3-5 (A) compare le courant ionique du WT avec celui de la mutation F244C, leurs ARN est injectées à la même concentration, au même volume de 9.2 nl et mesurée 48 heures après. Nous observons une nette diminution de l'expression des homotrétamères mutés, qui selon les résultats de Zerr, Aldeman et al, serait due à un problème d'adressage des canaux à la membrane et non à un changement de la conductance unitaire. La figure 3-5 (B) montre la superposition des traces du courant

ionique du WT et de F244C au pulse de 60 mV. Nous pouvons observer un ralentissement de la vitesse d'activation de la mutation F244C ( $\tau_{act} = 2,9 \pm 0,5$  ms) par rapport au WT ( $\tau_{act} = 1,1 \pm 0,5$  ms) ainsi qu'un ralentissement de la vitesse de désactivation ( $\tau_{dea} = 2,3 \pm 0,8$  ms pour F244C et  $\tau_{dea} = 1,84 \pm 0,4$  ms pour le WT) suggérant une altération du fonctionnement du canal dont la nature sera précisée dans la suite de ce chapitre. La vitesse d'activation du WT et de F244C est lissée par deux exponentielles tandis que la vitesse de désactivation est lissée par une exponentielle pour le WT et par deux exponentielles pour F244C.



**Figure 3-5 : Effet de la mutation F244C sur les courants ioniques.** (A) Courants ioniques du WT et de la mutation F244C. Le protocole de pulse va de -120 mV à 100 mV par palier de 10 mV pendant 50 ms avec un potentiel de maintien de -90 mV. (B) Superposition de la trace du courant de WT et de la mutation F244C au pulse de 60 mV, ajusté au même pic.

**Tableau 3-4 : Synthèse des  $V_{1/2}$  de la GV des mutations sur le site F244**

Mutations	$V_{1/2}$ (mV)	dV	$\Delta V$ (mV)	n
WT	-22,3 ±0,3	7,1 ±0,4	0	10
F244Y	-14,1 ±0,5	8,3 ±0,5	8,2 ±0,5	4
F244C	9 ±1,9	10,7 ±0,9	31,3 ±1,9	4
F244I	+11,4 ±0,8	9 ±0,5	33,9 ±0,8	5
F244H	+16,5 ±0,9	10,2 ±0,6	38,3 ±0,9	5
F244A	+17,5 ±1,2	10,9 ±0,4	39,3 ±1,2	6
F244E	+42,2 ±0,9	10,5 ±0,8	64,5 ±0,9	5

dV est le facteur d'inclinaison de la courbe et  $\Delta V$  représente la différence de voltage entre le WT et la mutation

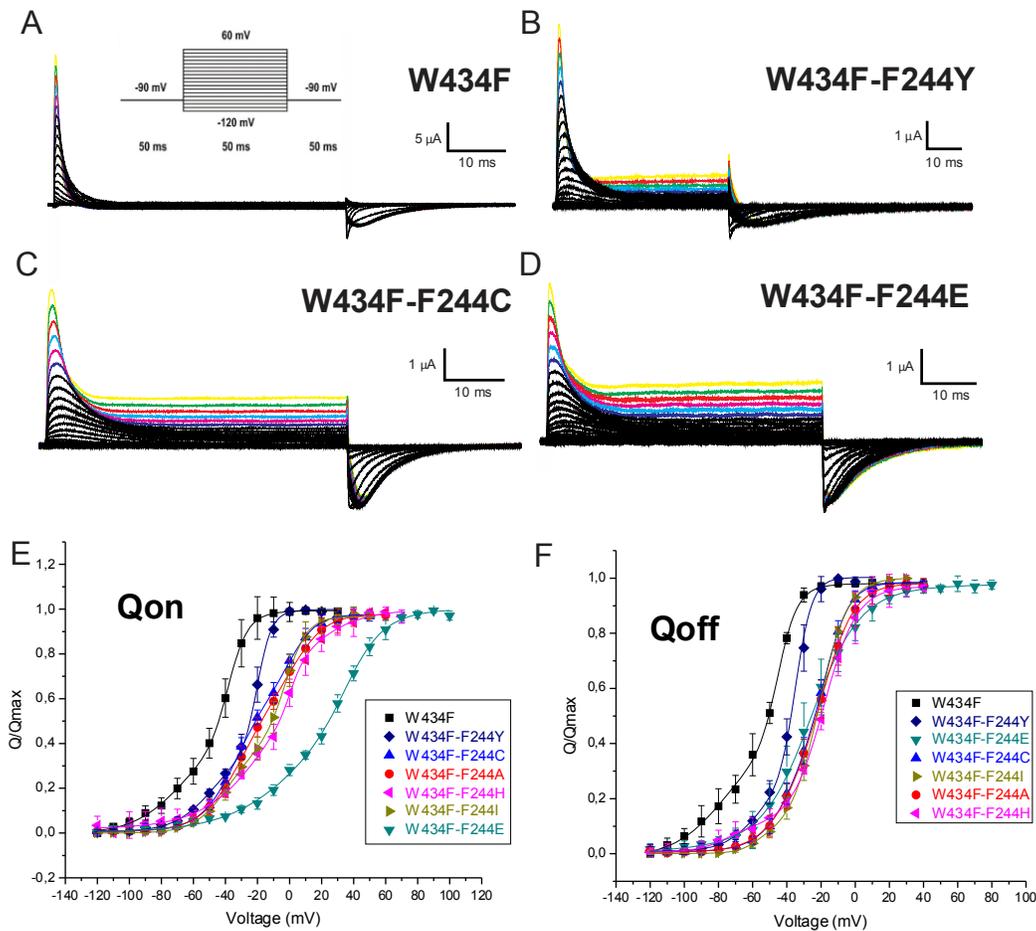
### 3.2.2 Les mutations F244 altèrent le mouvement du VSD :

Maintenant que nous avons pu confirmer la dominance négative et l'haploinsufisance de la mutation F244C grâce à l'observation des courants ioniques, nous allons investiguer plus profondément les origines moléculaires de ces mécanismes à l'aide de l'analyse des courants transitoires, représentatifs du fonctionnement du senseur de voltage.

La figure 3.6 (A-D) nous présente les courants de *gating* du WT et de trois mutations, F244C, F244E et F244Y, enregistrés grâce à un protocole d'activation classique. La mutation F244Y substitue bien le WT tandis que la mutation F244E affecte le plus la probabilité du canal d'après les courbes GV de la figure 3.4. Nous avons calculé le nombre de charges déplacées (Q) en fonction du voltage (V) par intégration de l'activation et de la réactivation des courants transitoires selon le temps pour ensuite

réaliser les courbes QV (figure 3.6 E-F), et nous retrouvons un déplacement vers les potentiels dépolarisants pour toutes les mutations, autant pour l'activation que la désactivation. Pour comprendre le lien entre le déplacement vers des potentiels dépolarisants des courbes GV et QV, on peut tracer les  $V_{1/2}$  des GV en fonction des  $V_{1/2}$  des QV de l'activation (voir Figure 3.7 A). On constate une corrélation linéaire entre les deux, ce qui nous permet de suggérer que le décalage des courbes QV est le seul mécanisme responsable du décalage des courbes GV, i.e. le mécanisme nécessaire pour altérer les courbes QV d'activation se reflète directement dans l'ouverture du pore.

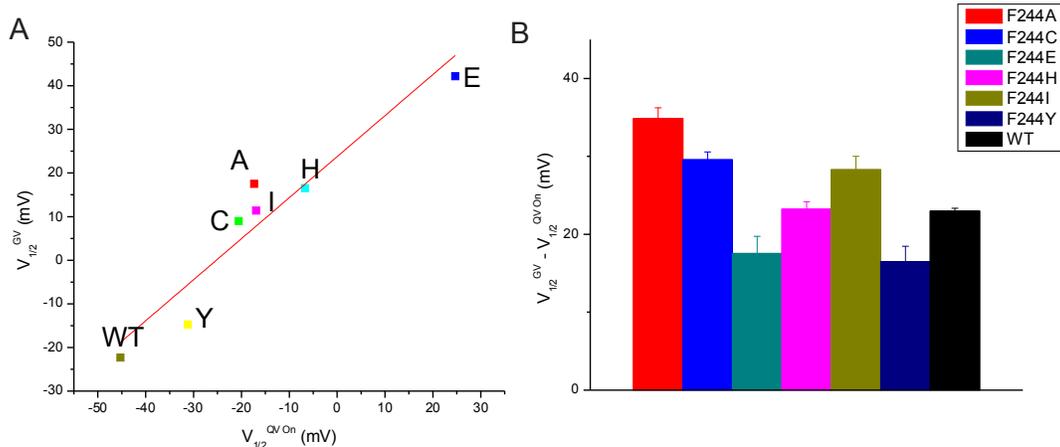
Nous avons pu lisser toutes les courbes QV avec une double sigmoïde, autant le  $Q_{on}$  que le  $Q_{off}$ , ceci est résumé dans le tableau 3-6, suggérant fortement une isolation du VSD dans un état intermédiaire comme il a été proposé dans l'article de Lacroix, Pless et al. 2012. La mutation F244W réalisée dans cet article, présente aussi un comportement bi-sigmoidale, apportant une preuve supplémentaire d'une isolation d'un état intermédiaire. Ce comportement est beaucoup plus prononcé lors de l'activation que lors de la désactivation et est aussi présent dans les courbes GV, les valeurs sont présentées dans le tableau 3-5.



**Figure 3-6 : Effets des mutations F244 sur les courants transitoires.** La figure montre les courants transitoires pour le WT Shaker (mutation W434F) (A), les mutations F244Y (B), F244C (C) et F244E (D) en utilisant le protocole indiqué avec une soustraction des courants capacitifs à -120 mV. (E) Courbes QV du  $Q_{on}$  des mutations F244. (F) Courbes QV du  $Q_{off}$  des mutations F244.

Les courants de *gating* des mutations F244 montrent une différence frappante par rapport à ceux du WT excepté le F244Y. Le *OFF-gating* du WT possède deux composantes, une rapide et une lente qui se développent lors de l'ouverture du pore, évidence claire d'une étape lente sur le chemin du retour des charges après activation (Perozo, Papazian et al. 1992). Lors de l'observation du *OFF-gating* des mutations F244, l'étape lente semble être la composante principale dont l'origine viendrait d'une

stabilisation de l'état ouvert du canal et provoqué par une interaction entre le lien S4-S5 et S6, l'interaction RELY (Perozo, MacKinnon et al. 1993, McCormack, Joiner et al. 1994, Batulan, Haddad et al. 2010). Or, nous avons vu précédemment que les mutations à la position F244 stabilisent l'état fermé, apparemment en contradiction avec l'hypothèse précédente. Mais il a été démontré par Haddad et Blunck en 2011 lors de la stabilisation dans un état activé du senseur de voltage découplé, la prévalence de la composante lente du *OFF-gating* (Haddad and Blunck 2011). Ceci suggère que la stabilisation du VSD découplé possède une origine différente de la stabilisation de l'état ouvert.



**Figure 3-7 : Couplage entre le pore et le VSD.** (A)  $V_{1/2}$  des GV en fonction des  $V_{1/2}$  des QV de l'activation. Corrélation linéaire entre le mouvement du VSD et celui du Pore. (B) Histogramme de la séparation entre les  $V_{1/2}$  des GV et les  $V_{1/2}$  des QV de l'activation après lissage avec une Boltzmann.

La figure 3.7 B nous présente la différence entre les  $V_{1/2}$  des GV et  $V_{1/2}$  du *Qon* obtenue après lissage avec une seule Boltzmann, nous permettant d'avoir une idée du couplage entre le VSD et le pore. Comme il a été mentionné précédemment, nous avons une dépendance linéaire entre le mouvement du senseur de voltage et l'ouverture du pore (figure 3-7 A). Nous pouvons ainsi déduire un couplage plus fort ou plus faible entre le

capteur et le pore selon une diminution ou une augmentation de la différence entre les  $V_{1/2}$  des GV et  $V_{1/2}$  du *Qon* par rapport au WT. Plus cette valeur diminue, plus le couplage est fort comme pour les mutations F244E et Y, et inversement, plus cette valeur augmente plus le capteur de tension et le pore sont découplés comme les mutations F244I, C et A. Seule la mutation F244H est identique au WT. Ces résultats hétérogènes nous révèlent un mécanisme parallèle au lien S4-S5 et S6 pour le couplage électromécanique car si ils étaient les seuls protagonistes (le lien S4-S5 et S6), la valeur de la différence entre les  $V_{1/2}$  des GV et  $V_{1/2}$  du *Qon* devrait être homogène, ce qui n'est pas le cas. L'existence d'un deuxième point d'ancrage du VSD avec le pore au niveau de la position F244 est à envisager.

**Tableau 3-5 :** Synthèse des  $V_{1/2}$  des deux composantes de la GV des mutations sur le site F244

Mutations	GV1		GV2		n
	$V_{1/2}$	dV	$V_{1/2}$	dV	
	mV	mV	mV	mV	
WT	-22,3±0,3	7,1±0,4			10
F244A	10,6 ±1,70	8,3 ±0,6	40,7 ±3,2	5,9 ±1,8	4
F244C	5,4 ±1,1	8,4 ±0,6	43,5 ±7	5 ±3,1	4
F244E	29,2 ±4,5	6 ±2,2	55,2 ±5,1	6,9 ±1,9	5
F244H	5,5 ±10,3	7,1 ±3,4	28,4 ±2,6	9,4 ±6,5	5
F244I	2,9 ±3,3	6 ±1,9	26,1 ±5,4	10,3 ±2,6	6
F244Y	-17,7 ±1,8	6,2 ±0,8	7,7 ±9,2	6,9 ±3,5	5

dV est le facteur d'inclinaison de la courbe. Le WT ne peut être simulé par deux composantes.

**Tableau 3-6 : Synthèse des  $V_{1/2}$  des deux composantes de  $Q_{on}$  des mutations sur le site F244**

Mutations	Q1 On			Q2 On			n
	$V_{1/2}$	dV	z	$V_{1/2}$	dV	z	
	mV	mV		mV	mV		
WT	-68,2 ±6,8	15,2 ±2,5	1,7 ±1,5	-38,2 ±1,6	5,9 ±0,8	4,3 ±0,8	10
F244A	-30,9 ±2,5	12,2 ±0,8	2,1 ±0,8	4 ±2,8	10,1 ±1,2	2,5 ±1,2	8
F244C	-34,9 ±1,8	10,5 ±0,7	2,4 ±0,7	0,3 ±1,9	8,5 ±1	3 ±1	8
F244E	4,1 ±4,7	23,4 ±5	1,1 ±2,1	36,3 ±5	10,8 ±3,9	2,3 ±1,9	5
F244H	-12 ±2,4	20,3 ±1,6	1,2 ±1,6	0,7 ±1,7	3,9 ±2,7	6,4 ±1,7	4
F244I	-39,2 ±1,8	9,9 ±0,9	2,5 ±0,9	-2,5 ±0,7	7,3 ±0,4	3,5 ±0,4	4
F244Y	-48,2 ±4,9	11,8 ±1,8	2,1 ±0,8	-20,2 ±0,5	5 ±0,5	5 ±0,5	4

dV est le facteur d'inclinaison de la courbe et z représente la valence de la charge se déplaçant dans tout le champ électrique (charge efficace)

Les mutations à la position F244 conduisent à deux effets sur le *ON-gating* : d'abord, la cinétique est accélérée par rapport au WT, et la seconde, le courant transitoire ne retourne pas à zéro mais un courant de fuite constant demeure. Ceci nous amène à

l'idée d'un courant de fuite provenant du VSD lui-même comme les courants '*omega*' ou provenant du pore.

### **3.2.3 Le phénotype des mutations F244 dépend des arginines sur le S4 :**

---

Comme il a été précisé dans le chapitre 3.2.1, la position F244 est très proche de la position F241, qui muté en tryptophane, provoque une stabilisation d'un état intermédiaire (Lacroix, Pless et al. 2012), en d'autre terme une interaction entre le S4 et son environnement ralentit son mouvement lors de la transition du senseur de voltage vers un état activé. Ainsi nous avons pu constater avec les mutations I320T et F244C dans le chapitre 3.1 et toutes les mutations de F244 dans le chapitre 3.2.2 que les courbes QV des courants de *gating* possédaient un comportement bi-sigmoïdale avec un grand écart entre Q1 On et Q2 On. Ce comportement de la courbe QV ainsi que cet écart est souvent révélateur de la stabilisation d'un état intermédiaire dans le modèle séquentiel.

Si un changement d'acide aminé à la position F244 stabilise un état intermédiaire dans les transitions du VSD, alors un mécanisme moléculaire possible peut être une interaction temporaire entre le résidu muté à la position F244 et un résidu proche du VSD. Il a été démontré que la mutation I241C peut former un pont disulfure avec la première arginine (R362 ou R1) du S4 mutée en cystéine à l'état de repos (Campos, Chanda et al. 2007). Les arginines du S4 semblent être de bons candidats pour établir ce genre d'interactions. Pour tester cette hypothèse, nous avons individuellement neutralisé les trois premières arginines (R362Q ou R1Q, R365Q ou R2Q et R368Q ou R3Q) en la présence de la mutation F244C (figure 3-8) et déterminé la dépendance en voltage des courbes QV (figure 3-9).

Nous allons tout d'abord nous intéresser aux différentes caractéristiques des courants de *gating*. Lors de la neutralisation d'une des trois premières arginines sur le S4 (figure

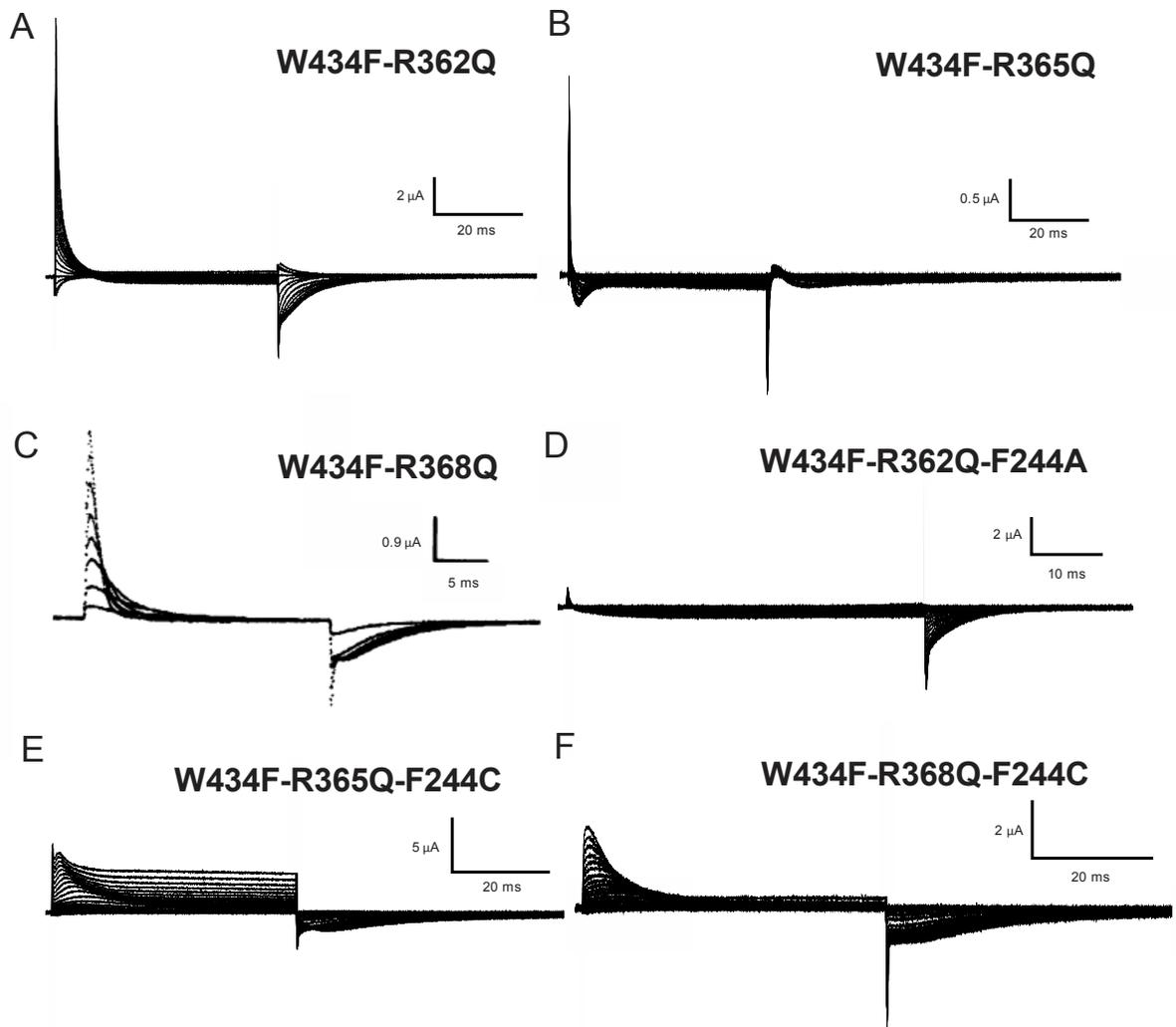
3-8 A-C), les courants de *gating* présentent une accélération du Qon et du Qoff, présentant seulement la composante rapide du Qoff pour R1Q et R2Q et un affaiblissement de la composante lente pour R3Q. La mutation R2Q présente aussi un courant rentrant sans doute de type protonique (Starace and Bezanilla 2004). Les triples mutations, composées des arginines neutralisées, de la mutation W434F et F244A ou F244C, montrent des courants transitoires totalement différents. La triple mutation W434F-R362Q-F244A (figure 3-8 D) accélère autant le Qon que le Qoff comme si la transition entre l'état de repos et d'activation était énergétiquement instable. Nous pouvons remarquer l'absence complète de courant de fuite. Par contraste, la mutation W434F-R365Q-F244C (figure 3-8 E) ralentit beaucoup le Qon et Qoff comme si la transition devenait énergétiquement plus stable entre les deux états et nous pouvons constater le retour en force du courant de fuite suggérant un lien moléculaire particulier entre la position F244 et R2. La dernière figure (figure 3-8 F) affiche un ralentissement du Qon et du Qoff pour la mutation W434F-R368Q-F244C, proche du phénotype des courants transitoires de la mutation F244C seule, suggérant un lien faible entre les deux acides aminés.

Pour approfondir les tendances observées sur les courants transitoires, c'est-à-dire une déstabilisation du mouvement du VSD pour la première triple mutation, une interaction possible entre F244 et R2 et enfin une implication nulle de R3, nous avons analysé la dépendance des charges selon le voltage (courbes QV) dans la figure 3-9. Les résultats des triples mutations montrent que W434F-R362Q-F244C et W434F-R365Q-F244C ont une grande différence entre les  $V_{1/2}$  des deux composantes du Qon (figure 3-9 A et B, courbes bleu) impliquant la stabilité d'un état transitoire, tandis que cette différence est pratiquement inexistante pour les mutations W434F-R362Q-F244A, W434F-R368Q-F244A (figure 3-9 A et C, courbes rouge) et W434F-R368Q-F244C (figure 3-9 C, courbe bleu).

La neutralisation des charges positives sur le S4 permet de faciliter une liaison possible entre F244 muté et une arginine, donnant deux candidats potentiels pour ce type

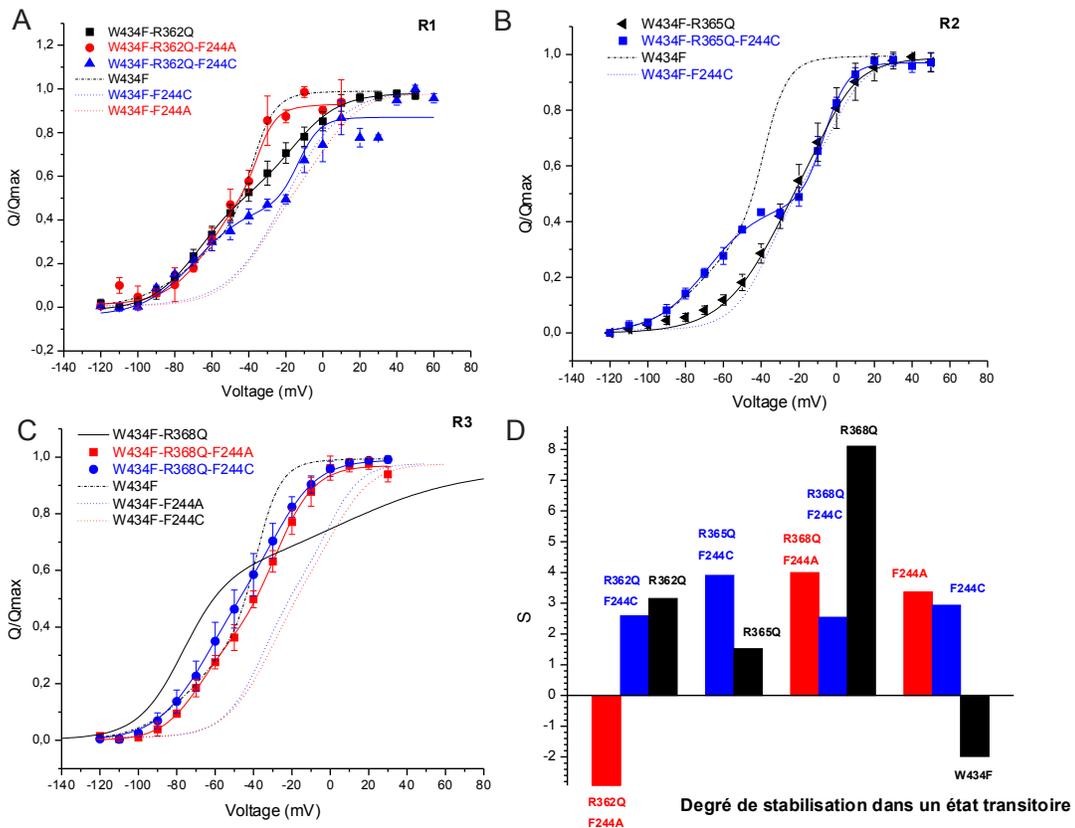
d'interaction : R1 et R2. Pour déterminer le degré d'implication de chaque arginine, nous avons étudié le facteur  $s$  ( $s = e_o(V_2/dV_2 - V_1/dV_1)$ ) qui, assumant un simple modèle à trois états, nous permet de quantifier la présence d'un état intermédiaire stable (voir l'appendice de l'article Lacroix, Pless et al 2012 pour plus de détails) seulement si  $s \geq 0$ . Nous avons calculé la valeur de  $s$  pour chaque mutant ainsi que pour les mutations W434F-F244A, W434F-F244C et le WT, pour estimer la présence d'un état intermédiaire stable (figure 3-9 D).

Naturellement, le WT est défavorable à cette stabilisation et, fait intéressant, la triple mutation W434F-R362Q-F244A l'est aussi, suscitant une meilleure compréhension des courants de *gating* de celle-ci. La mutation R3Q possède la plus grande valeur pour  $s$  en accord avec les précédentes études (Perozo, Santacruz-Tolozza et al. 1994) et exhibe, par le fait même, une impossibilité d'interaction avec F244 car les triples mutations diminuent cette valeur de moitié qui, de plus, sont proches des valeurs de  $s$  des mutations F244A et -C. Seule la mutation W434F-R365Q-F244C étale une ample augmentation de cette valeur, appuyant l'hypothèse d'une interaction entre R2 et F244 pour stabiliser un état intermédiaire. La mutation W434F-R362Q-F244C diminue la valeur de  $s$  par rapport à la mutation R1Q, indiquant juste un effet additif des caractéristiques séparées de R1Q et F244C. Ces résultats sont en accord avec ce de Lacroix, Pless et al. c'est-à-dire qu'il existe bien un état intermédiaire stabilisé par une interaction entre R2 et le haut du S1 mais ne nous permettent pas de déterminer l'action de R1 qui affiche un rôle certain dans le mouvement du VSD ainsi que la nature de l'interaction.



**Figure 3-8 : Effet de la neutralisation des trois premières arginines situées sur le S4 et l'incorporation de la mutation F244 A et C dans cette environnement.** Les figures A à C représentent les courants transitoires de la neutralisation de R1 (R362Q), de R2 (R365Q) et R3 (R368Q) respectivement. Les figures D à F représentent l'incorporation des mutations F244A sur R1 neutralisé (D) et de F244C sur R2 (E) et R3 (F) neutralisés. Les courants transitoires de la triple mutation W434F-R362Q-F244C ainsi que W434F-R368Q-F244A montrent les mêmes caractéristiques que celles ci-dessus. La figure 3-8 C est tiré de l'article de (Perozo, Santacruz-Toloz et al. 1994).

Nous allons maintenant jeter un coup d'œil aux comportements des composantes du  $Q_{on}$  et de leurs valences. Les charges positives portées par les arginines du S4 sont reconnues pour faire le lien entre le champ électrique membranaire et le mouvement du VSD lors de l'ouverture du canal. De part ce fait, une neutralisation de ces charges aura un effet négatif sur la deuxième composante du  $Q_{on}$ , reflet du mouvement du S4, la première composante étant reliée à la suppression des interactions stabilisant l'état de repos. C'est ce que l'on observe dans le tableau 3.7, la neutralisation des charges positives amènent une diminution de la valeur de  $Q_{2on}$  sans, toutefois, altérer la composante  $Q_{1on}$ . Seule R3Q augmente légèrement la première composante mais il a été prédit que cette effet serai dû à un manque d'énergie pour pouvoir réorienter le partenaire acide stabilisant R3 dans l'état de repos (Perozo, Santacruz-Tolozza et al. 1994). Si maintenant nous nous focalisons sur les charges déplacées dans le cas des triples mutations, nous pouvons observer que les  $Q_{1on}$  sont sensiblement de même valeurs que celle des arginines neutralisées. Excepté pour la mutation W434F-R362Q-F244A qui l'augmente pratiquement du double, évoquant une amplification de la barrière énergétique du passage de R1 au niveau de cette région. La deuxième composante est pour sa part toujours augmentée par les triples mutations, sans doute pour essayer de restaurer le mouvement initiale du VSD, impliquant un rôle primordiale de la position F244. Par exemple les mutations W434F-R368Q-F244A et -C rétablissent de moitié la charge déplacée par  $Q_{2on}$ . Les mutations W434F-R365Q-F244C et W434F-R362Q-F244C réhabilitent pratiquement la valeur  $Q_{2on}$  à sa valeur initiale portée par le WT. Encore une fois, la mutation W434F-R362Q-F244A se distingue en augmentant  $Q_{2on}$  au-dessus de la valeur de  $Q_{2on}$  WT.



**Figure 3-9 : Le phénotype des mutations F244A et C dépend des arginines sur le S4.** La figure montre les courbes QV mesurées durant un protocole de pulse d'activation pour les mutations R1Q (A, courbe noir), R2Q (B, courbe noir), R3Q (C, courbe noir) et les triples mutations W434F-R362Q-F244A (A, courbe rouge), W434F-R362Q-F244C (A, courbe bleu), W434F-R365Q-F244C (B, courbe bleu), W434F-R368Q-F244A (C, courbe rouge), W434F-R368Q-F244C (C, courbe bleu). Dans chaque graphique, les lignes en pointillées noires représentent la courbe QV On du WT, celle en rouge la courbe QV On du F244A et celle en bleu la courbe QV On du F244C. (D) Histogramme montrant les valeurs de  $s$  ( $s = e_0(V_2/dV_2 - V_1/dV_1)$ ) (voir tableau 3.7). Une valeur positive indique la présence de la stabilisation d'un état intermédiaire.

**Tableau 3-7 : Synthèse des  $V_{1/2}$  des deux composantes de Qon des neutralisations des arginines et des triples mutations**

Mutations	Q1 On		Q2 On		n
	$V_{1/2}$	dV	$V_{1/2}$	dV	
	mV	mV	mV	mV	
R362Q	-61,5 ±3,8	15,1 ±2,2	-10 ±4,1	10,9 ±2,3	4
R365Q	-29,4 ±9,4	16 ±2	-2,4 ±2,1	7,5 ±3,7	4
R368Q	-77 ±3,6	11,4 ±0,4	44 ±8,4	32,9 ±0,8	-
R362Q-F244A	-59,3 ±5,5	9 ±5,2	-34,7 ±4,4	4,5 ±4,1	2
R362Q-F244C	-68,8 ±2,5	14,3 ±6,3	-13,4 ±4,6	6 ±5,3	2
R365Q-F244C	-68,5 ±2,2	13,9 ±2,2	-6,5 ±0,9	6,4 ±0,8	4
R368Q-F244A	-68,7 ±6,2	10,1 ±3,3	-28,2 ±3,6	10 ±1,8	4
R368Q-F244C	-65,5 ±2,6	13,2 ±1,1	26,9 ±2,2	11,1 ±1	4

dV est le facteur d'inclinaison de la courbe et z représente la valence de la position de la mutation

### 3.2.4 Caractérisation du courant de fuite :

---

Non seulement la mutation F244C déplace les courbes QV et GV mais, également, donne naissance à un courant de fuite que nous étudierons plus en détail ici.

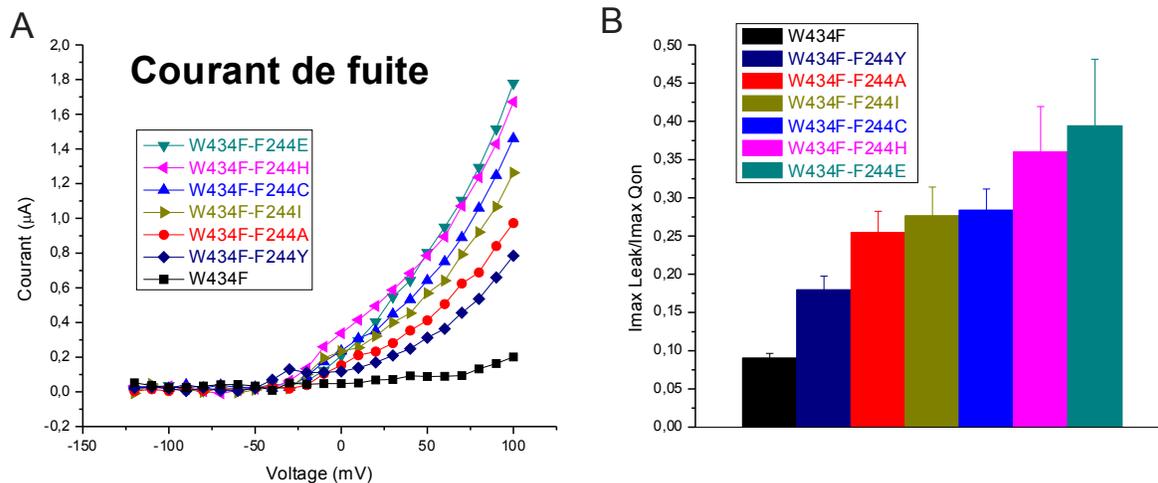
Si nous traçons le courant de fuite en fonction du voltage, nous pouvons observer le comportement global de ce courant. La figure 3-10 A, nous montrent un courant croissant avec le voltage suivant une fonction polynôme de puissance 2 et qui ne sature pas même à un voltage de +100 mV ou normalement les courbes GV ou QV le sont déjà. À ce stade, deux possibilités s'offrent à nous : soit le courant de fuite provient du VSD lui-même comme les courants 'omega', soit une perturbation permanente au niveau du pore génère un courant de fuite révélant un mécanisme parallèle au couplage électromécanique. Chaque valeur du courant de fuite présenté dans la figure 3-10 A a été mesurée 49 ms après le début du pulse d'une durée de 50 ms pour chaque voltage de chaque mutation. Afin de normaliser le courant de fuite, tous les courant transitoires ont été choisis avec une expression comparable, c'est-à-dire que  $I_{peak} = 4,6 \mu A \pm 0.3$  à 100 mV pour le *ON-gating*. Ainsi la quantité de protéine exprimée et sa relation avec le courant de fuite reste constant.

Nous pouvons aussi remarquer que ce ne sont pas les mutations décalant le plus le  $V_{1/2}$  des courbes GV (ou QV, linéairement corrélées) vers des potentiels dépolarisants qui produisent le plus grand courant de fuite, excepté pour les acides aminés chargés. Suggérant une indépendance du mécanisme produisant le courant de fuite par rapport à l'activation du VSD.

Nous allons maintenant examiner la déviation standard du ratio entre le courant de fuite maximum sur  $I_{peak}$  du *ON-gating* au pulse +60 mV avec n=10. Si la déviation standard de ce ratio est faible, nous pouvons en déduire que le courant de fuite est proportionnel aux nombres de canaux exprimés sur la surface de l'ovocyte et donc spécifique au canal. La figure 3-10 B montre l'histogramme de ce ratio et les barres

d'erreurs représente la déviation standard. On peut observer une hiérarchisation du courant de fuite selon les différentes mutations que l'on peut, encore une fois, diviser en trois groupes :

- Le F244Y provoque le plus petit courant de fuite, supportant l'idée qu'un hydrocarbure aromatique de type phénol remplace presque bien un benzène. Ce qui paraît logique étant donné que physiologiquement la tyrosine est issue de la phénylalanine.
- Le groupe du milieu composé du F244A, I et C, montre un courant de fuite intermédiaire. Le F244C se retrouve être le plus fuyant des trois.
- Le dernier groupe présentant le plus grand courant de fuite est composé des mutations F244H et E. Les acides aminés chargés semblent fortement perturber cette région du VSD et plus particulièrement le F244E comme vu avec l'analyse des GV.



**Figure 3-10 : Caractérisation du courant de fuite.** (A) Courbe I-V du courant de fuite des mutations F244 observée durant les courants transitoires. Toutes les courbes ont été produites avec la même expression :  $4.6 \mu\text{A} \pm 0.3$  et analysées à 49 ms après le début du pulse. (B) Histogramme montrant la spécificité du courant de fuite par le ratio du courant de fuite

maximum sur le courant maximum du  $Q_{on}$  à + 60 mV. Pour chaque mutation nous avons une valeur-p inférieur à 0.05.

Pour mieux comprendre ce courant de fuite lors de l'activation des canaux, nous avons besoin de l'isoler du courant de *gating*. Pour cela, nous faisons l'hypothèse que le nombre de charges totales déplacées lors de l'activation est identique aux charges de la réactivation:

$$Q_{on} = Q_{off} \quad (3.1)$$

Si nous reprenons la définition de la charge, l'équation 1.3 nous donne :

$$Q_{On}^{Apparent} = \int I_{g(V) On}^{Apparent}(t) dt = \int (I_{g(V) on} + I_{fuite})(t) dt \quad (3.2)$$

$$Q_{On}^{Apparent} = Q_{on} + I_{fuite} * \Delta t \quad (3.3)$$

Avec  $I_{fuite}$  : courant de fuite du  $Q_{on}$ . Si nous réorganisons les équations 3.3 et 3.1, nous pouvons exprimer la dépendance en voltage du courant de fuite comme :

$$Q_{On}^{Apparent} - Q_{off} = Q_{on} + I_{fuite} * \Delta t - Q_{off} = I_{fuite} * \Delta t \quad (3.4)$$

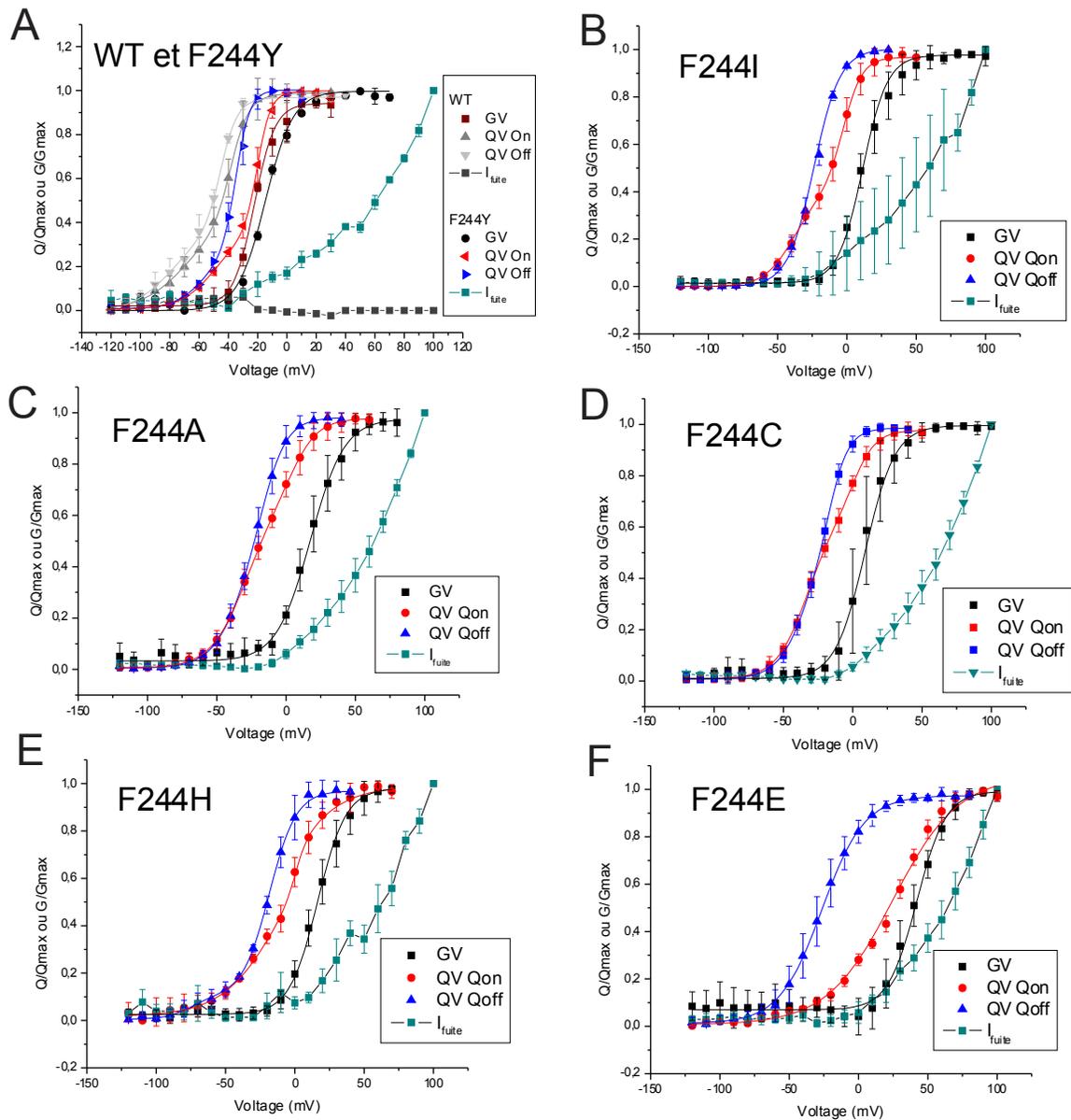
Avec cette formule, nous pouvons isoler le courant de fuite provenant du pore afin de déterminer sa dépendance en voltage, présenté dans les figures 3-11 pour chaque mutation. Pour une meilleure compréhension du courant de fuite, chaque figure compare ce courant avec la courbe GV liée au fonctionnement du pore et les courbes QV, révélatrice du mouvement du senseur de voltage. Comme nous l'avons vu dans la figure 3-10 (A) le courant de fuite ne sature pas et est décalé vers des potentiels dépolarisant.

Nous pouvons constater que pour toutes les mutations, le courant de fuite débute lorsque le pore commence à s'ouvrir et que le WT ne présente aucun courant de fuite (figure 3-11 A). Suggérant une possibilité du passage du courant de fuite au niveau du pore. D'un autre coté, nous pouvons remarquer que le courant de fuite concorde avec la

prédominance de la deuxième composante du Qon, particulièrement pour les mutations F244I (figure 3-11 B) et F244C (figure 3-11 D). Il a été démontré que cette deuxième composante est intimement liée à l'ouverture du pore (Perozo, Santacruz-Tolozza et al. 1994) et par conséquent est aussi reliée à l'apparition du courant de fuite. Donnant possiblement le senseur de voltage comme structure à l'origine du courant de fuite.

Fait intéressant, la première composante (correspondant aux mouvements de charge exclusivement entre les états fermés du canal) des courbes Qon et Qoff se superpose lors de la prédominance de celle-ci, pour ensuite se séparer lors de la prédominance de la seconde composante. Comme nous l'avons expliqué lors de l'étude des courants transitoires, pour obtenir la composante lente dans le *OFF-gating*, le senseur de voltage doit se stabiliser dans un état activé. Cette stabilisation produit un décalage entre les courbes Qon et Qoff (Haddad and Blunck 2011) que l'on peut observer avec le WT dans la figure 3-11 A. Si le senseur de voltage et le pore sont découplés, ce décalage disparaît, ce que l'on observe que lors des transitions entre les états fermés des mutations de la position F244, suggérant l'existence d'un découplage partiel et impliquant un deuxième point d'ancrage sur le pore pour le senseur de voltage.

Un problème se pose lors de l'observation de la figure 3-11 F, le Qon de la mutation F244E est largement séparé du Qoff de cette mutation. Pour comprendre cette différence de dépendance en voltage des courbes Qon et Qoff, se reporter à l'annexe de ce mémoire (chapitre 7) expliquant la méthode d'obtention de ces courbes. Cette différence est produite par la présence du courant de fuite dans le *ON-gating* de la mutation F244E et, par conséquence, seule une surestimation ou une sous-estimation de la dépendance des charges est possible. La figure 3-11 F est une surestimation de la dépendance en voltage des charges du *ON-gating* de la mutation F244E. Le Qoff est beaucoup plus fiable dans ce cas car le courant de fuite est négligeable en comparaison du Qon.



**Figure 3-11 : Dépendance en voltage du courant de fuite observé lors du Qon.** Une comparaison avec le Qon, le Qoff, la GV et le courant de fuite de la mutation est présenté dans les figures (A) WT et F244Y, (B) F244I, (C) F244A, (D) F244C, (E) F244H et (F) F244E. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard.

Même si nous avons pu caractériser le courant de fuite, nous ne pouvons toujours pas déterminer son origine. Comme nous l'avons mentionné dans le premier texte, la position F244 est proche de la position I241 montrant la présence de courant '*omega*' lors de sa mutation, mais la caractérisation du courant de fuite suggérerait plutôt un passage du courant de fuite par le pore. Afin d'affirmer cette hypothèse nous allons étudier les effets des agents bloquant comme le TEA et le 4-AP (voir chapitre 1.3) sur la mutation F244C.

### 3.2.5 Origine du courant de fuite

---

Les agents bloquants tels que le TEA ou le 4-AP ont la caractéristique commune de pouvoir bloquer le flux cationique traversant le pore. Si notre hypothèse est vraie c'est-à-dire un courant de fuite provenant du pore, ces agents bloquants seraient dans la possibilité de stopper le courant de fuite.

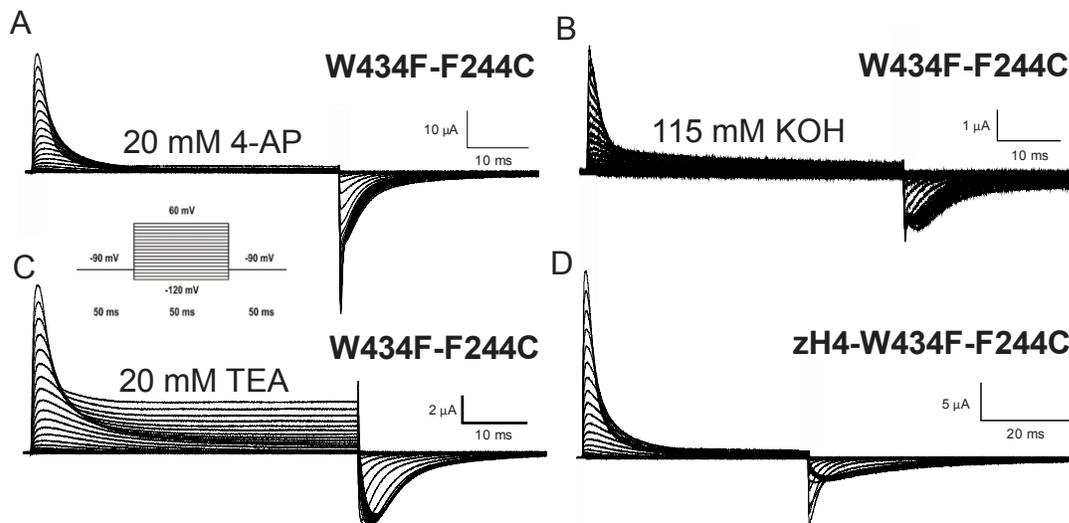
Les figures 3-12 A-D nous montrent les conséquences de l'application externe du 4-AP, du TEA et d'une grande concentration d'ion potassique respectivement sur les courants transitoires de la mutation F244C. Nous pouvons d'ores et déjà affirmer le rôle du pore à l'origine du courant de fuite grâce à l'atténuation totale du courant de fuite lors de l'application du 4-AP sur la mutation F244C, observée à la figure 3-12 A. La présence du 4-AP peut être confirmée sur les courants de *gating* grâce à la disparition de la composante lente du *Qoff*, caractéristique de l'activité du 4-AP. Étonnement, la composante lente du *Qoff* ne peut pas totalement disparaître même après l'application du 4-AP, comme si la dernière étape en concertation avec les 4 sous-unités était plus fortement présente qu'à l'ordinaire.

Une diminution majeure est aussi constatée après application d'une forte concentration externe d'ions potassiques d'après la figure 3-12 B sur la mutation F244C. Étant donné que les solutions utilisées pour enregistrer les courants transitoires ne possèdent pas

d'ions K<sup>+</sup>, la force électrochimique des ions potassiques sera dirigée vers l'intérieur de la cellule qui possède une concentration naturelle limitée d'ion K<sup>+</sup> à l'origine des courants de fuite. Ainsi lorsque le pore s'ouvre pour laisser passer les ions K<sup>+</sup>, la forte concentration de K<sup>+</sup> externe s'oppose au mouvement d'ion K<sup>+</sup> vers l'extérieur et empêche le courant de fuite de se développer.

La figure 3-12 C nous présente le courant transitoire de la mutation F244C en présence de TEA. Aucun effet majeur n'est observé, le courant de fuite est toujours présent et le *OFF-gating* est identique aux courants de *gating* en absence de TEA, ce qui est surprenant et contradictoire avec les autres résultats. Ceci pourrait être expliqué par une impossibilité de l'effet allostérique de l'agent inhibiteur. Plusieurs études montrant l'action du résidu T449 sur l'activité du TEA (MacKinnon and Yellen 1990, Gomez-Hernandez, Lorra et al. 1997) indiquant un emplacement potentiel pour cette drogue, ce qui impliquerait une désorganisation de cette région par la mutation F244C.

Une dernière expérience fut menée sur la mutation F244C pour sceller l'affirmation d'un courant de fuite de nature potassique provenant du pore. La figure 3-12 D nous dépeint une annihilation totale du courant de fuite grâce à la réintroduction de l'inactivation de type N (mécanisme *ball-and-chain*) dans le canal Shaker.



**Figure 3-12 : Flux potassique dans le pore provoquant un courant de fuite.** Effets de différents agents inhibiteurs des canaux potassiques sur la mutation F244C, tel que le 4-AP (A) et le TEA (C), tous deux à une concentration de 20 mM du côté externe. L'application externe d'une forte concentration de K<sup>+</sup> est présentée en B, toujours sur F244C et à une concentration de 115 mM. Pour réaffirmer un courant de fuite de nature potassique, l'inactivation de type N fut réintroduite sur le canal et présentée en D.

Une dernière question reste en suspens, est ce que le pore reste strictement sélectif aux ions K<sup>+</sup>? Pour vérifier la sélectivité du pore, nous avons changé la concentration et la nature ionique de la solution externe avec du NaMes, afin d'observer le comportement du potentiel d'inversion représentant le potentiel de membrane à laquelle une espèce ionique est en équilibre électroosmotique. Ce potentiel peut être calculé théoriquement par l'équation Goldman-Hodgkin-Katz lors de la présence de plusieurs espèces ioniques. Les résultats de l'expérience sont regroupés dans le tableau 3-8. Il n'y a aucun changement du potentiel d'inversion lors de l'application de différentes concentrations externe du NaMes, impliquant une sélectivité stricte aux ions K<sup>+</sup>.

**Tableau 3-8** : *Changement du potentiel d'inversion selon une variation de la concentration externe du NaMes.*

NaMes Concentration	Équation de Goldman- Hodgkin-Katz	WT	F244C	n
mM	mV	mV	mV	
11,5	-132,9	-87,4 ±1,4	-89,3 ±0,8	4
57,5	-92,5	-87,9 ±0,9	-88,7 ±0,9	4
115	-75,2	-88,8 ±0,5	-89,5 ±1,2	4

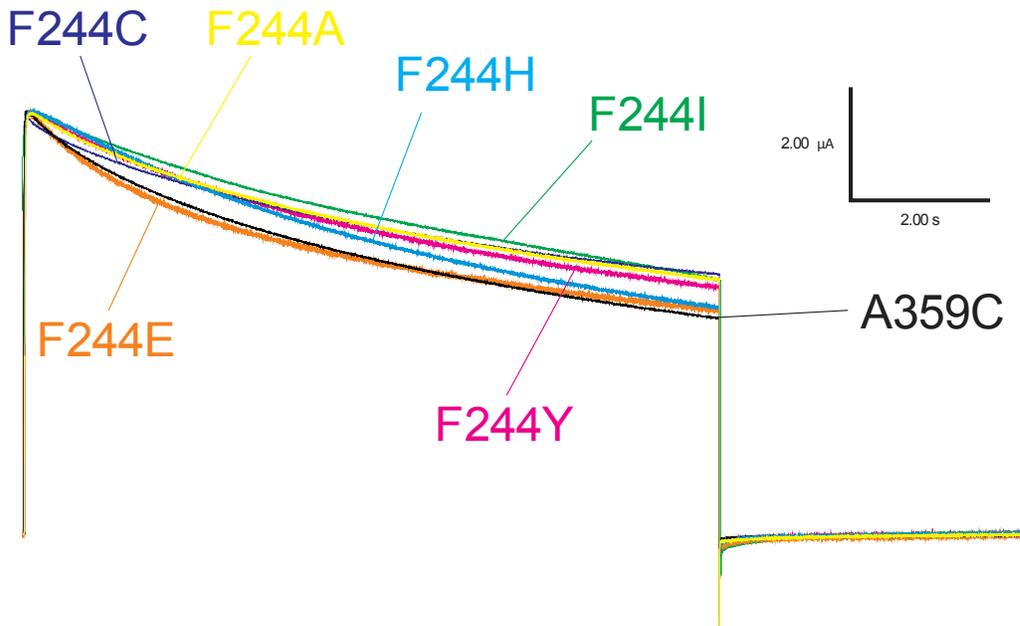
La solution interne reste la solution interne ionique décrite dans le chapitre 2.2.3 ainsi que la solution externe sauf que le KMes a été remplacé par du NaMes et la concentration de NMDG a été augmentée afin de garder une osmolarité constante. Le point d'abscisse zéro de la courbe IV (le courant ionique en fonction du voltage) a permis de déterminer le potentiel d'inversion.

### 3.2.6 Conséquence sur l'inactivation de type C :

La mutation W434F, nous permettant d'obtenir les courants de *gating*, à pour mécanisme de stabiliser l'état inactivé du canal (Yang, Yan et al. 1997). En d'autres termes, la mutation W434F est supposée immobiliser le canal dans l'état inactivé de type C. Mais comme nous l'avons vu dans les chapitres 3.2.3 et 3.2.4, un courant de fuite persiste lors de mutation à la position F244, impliquant une influence de l'inactivation de type C. Alors comment est-ce que la mutation F244C influence cette inactivation?

Après une dépolarisation prolongée vers de grand potentiel positif, les canaux s'activent rapidement, puis très lentement, se referment, ce qui est attribué à l'inactivation de

type C sans évidemment présence de l'inactivation de type N. Un pulse à + 60 mV pendant 10 s est appliqué pour pouvoir déterminer les constantes de temps d'inactivation. La mutation F184C dans les canaux Kv1.1 révèle une inactivation de type C non affecté ou légèrement plus lente que le WT (Adelman, Bond et al. 1995, Zerr, Adelman et al. 1998). Nous observons aussi deux composantes dans le développement de l'inactivation de type C.



**Figure 3-13 : Inactivation de type C des mutations F244 après un pulse de +60 mV pendant 10 s.** Les données sont récapitulées dans le tableau 3-9.

La première estimation que nous donne la simulation de l'inactivation de type C par une seule constante de temps est une accélération de celle-ci par la mutation F244E et un ralentissement très prononcé par la mutation F244A. L'observation de l'inactivation par deux constantes de temps nous permet de constater que toutes les constantes de temps  $\tau_2$  sont ralenties par les mutations à la position F244. Du côté de la constante de temps  $\tau_1$ , seul les mutations F244A et F244C la ralentissent tandis que toutes les autres

mutations accélèrent cette constante de temps. Nous avons vu dans la figure 3-10 que la mutation F244E présente le plus grand courant de fuite dans le *ON-gating* mais ne change pas profondément les cinétiques de l'inactivation de type C alors que la mutation F244H qui possède le deuxième plus grand courant de fuite dans le *ON-gating* présente une pente rapide de l'inactivation de type C (figure 3-13). La mutation F244C montre une pente très lente de l'inactivation de type C (figure 3-13) mais, autant la mutation F244H que la mutation F244C, change peu les constante de temps. À l'opposé, les mutations F244A, I et Y changent profondément les constantes de temps mais produisent un courant de fuite limité et une pente ralentie (figure 3-13). L'effet global est exactement opposé, plus le courant de fuite est présent moins les constante de temps sont modifiées et plus la pente est prononcée. Il existe un effet sur l'équilibre de l'inactivation de type C mais il n'est pas strictement relié au courant de fuite.

**Tableau 3-9 :** Synthèse des constantes de temps de l'inactivation de type C

Mutations	$\tau$ (s)	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)	n
WT	5,18±0,8	7,52±0,8	0,79±0,2	8
F244A	6,94±0,6	8,81±2,6	3,07±2,5	6
F244C	5,27±0,5	7,79±1,5	1.15±0,3	8
F244E	3,47±0,5	7,3±1,2	0,98±0,2	3
F244H	6,2±0,4	7,04±2	1,74±0,3	3
F244I	6,09±1,5	5,54±1,9	3,18±1,5	5
F244Y	5,12±0,8	6,24±2	3,09±2	3

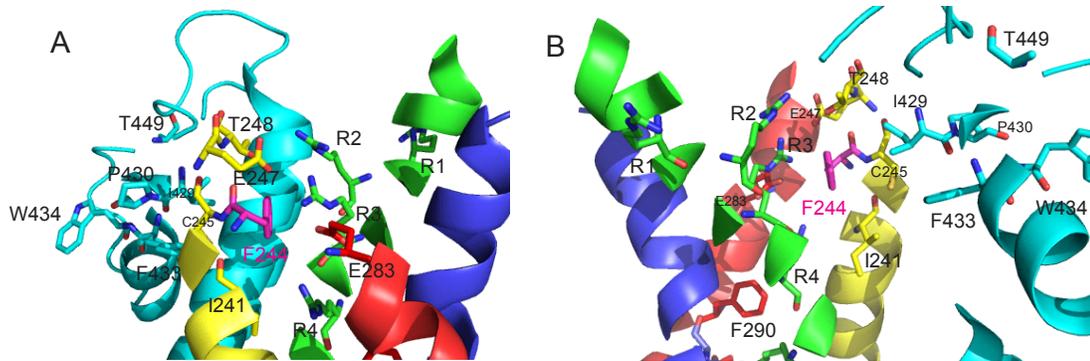
Finalement, même si les mutations F244 perturbent la prédisposition des canaux dans un état inactivé créé par la mutation W434F, l'inactivation de type C reste présente.

Comme les solutions des différentes expériences sont identiques, nous pouvons juste conclure que les mutations à la position F244 perturbent ces deux mécanismes (l'inactivation de type C et l'état inactivé avec la mutation W434F) de façon différente. Suggérant de multiples états pour l'inactivation de type C comme proposé dans des études antécédentes (Yang, Yan et al. 1997) et une explication moléculaire non restreinte à cette environnement.

## 4 Discussion

---

Pour résumer, les données appuient les conclusions suivantes : (i) la phénylalanine à la position 244 interagit directement avec les charges positives R1 et R2. (ii) Cette interaction stabilise un état intermédiaire lors du mouvement du VSD. (iii) L'état intermédiaire est stabilisé par une interaction entre F244 et R2 lors du mouvement du S4 et interagit avec par R1 dans l'état de repos. (iv) Étant donné que les mutations F244H et Y peuvent augmenter le nombre de charges totales et lequel peut être diminué par les mutations F244 E-I-A et C, nous proposons que la position F244 agit comme un centre catalytique pour abaisser l'énergie associée avec le transfert de chaque charge du VSD lorsqu'elles traversent le champ électrique. (v) La position F244 affecte aussi l'ouverture du pore. (vi) L'ouverture du pore est énergétiquement favorable à être dans un état ouvert. (vii) L'inactivation de type C est généralement ralentie.



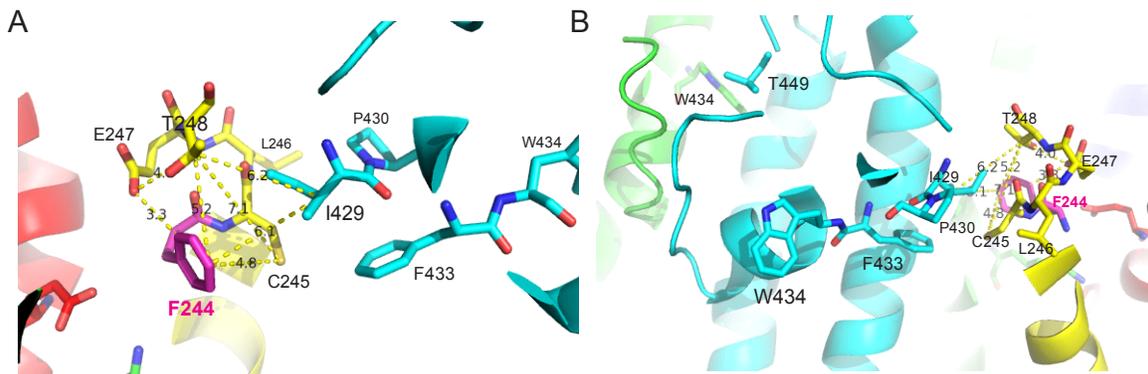
**Figure 4-1 : Vue d'ensemble de la région du VSD et des segments S5-S6 de la sous unité adjacente autour de la position F244 dans l'état ouvert.** (A) Vue du côté extérieur. Pour faciliter l'observation, le haut du segment S2 a été caché. (B) Vue du côté intérieur. Le segment S5 et S6 ont été partiellement rendu invisible afin d'aider la vision de cette région. Les segments S5-S6 de la sous-unité précédente sont colorés en cyan ainsi que leurs acides aminés respectifs. Le segment S1 est peint en jaune, le segment S2 est en rouge, le segment S3 en bleu et le segment S4 en vert. Chaque acide aminé est coloré selon leur segment respectif et se référer à la séquence du Shaker. F244 est situé sur le segment S1 et coloré en magenta. Tiré de 3LUT.pdb.

Une idée claire peut être dégagée des propositions présentées plus haut, la position F244 agit sur deux fronts : sur le mouvement du S4 et sur le pore. Pour mieux comprendre ces deux évènements nous allons discuter chacune des régions modifiées lors d'une mutation à cette position. La figure 4.1 A-B nous présente une vue d'ensemble de la région entourant la position F244. Nous pouvons très bien y distinguer la position singulière de F244 en magenta entre les acides aminés sensibles au champ électrique membranaire représentés en vert et les acides aminés formant un point de contact avec le pore colorés en jaune (faisant encore partie de la même sous unité) et en cyan (faisant partie de la sous-unité précédente).

#### **4.1 Un deuxième point d'ancrage entre le VSD et le pore :**

Il est bien établi que le segment S4-S5 permet de transmettre les mouvements du senseur de voltage sur le pore pour permettre son ouverture (voir section 1.3). Mais

depuis 2009, l'équipe de Mackinnon a révélé la possibilité de l'existence d'une deuxième région du VSD en contact physique avec le pore grâce à une analyse statistique du couplage de 360 canaux potassiques voltage dépendant ( $K_v$ ) (Lee, Banerjee et al. 2009). Ils ont pu déterminer deux effets majeurs de cette régions : la mutation E247W déplaçant la courbe GV vers des voltages dépolarisants et ils ont pu établir un pont disulfure entre les acides aminés T248C et I429C. La première expérience se déroule dans les ovocytes sur le canal Shaker avec la technique du deux électrodes, la deuxième expérience est établie par un système en bicouche avec le canal KvAP. Il est difficile d'exprimer des canaux Shaker avec une mutation à la position I429 (Hong and Miller 2000, Li-Smerin, Hackos et al. 2000). La mutation L246W a servi de contrôle pour la première car elle affecte peu les caractéristiques du canal (Hong and Miller 2000). Les positions I429, P430 et F433 ont été démontrées comme importantes dans le bon fonctionnement du canal, avec des effets importants lors de leurs mutations en tryptophane ou en alanine en stabilisant le canal dans l'état ouvert ou tout simplement en n'exprimant pas le canal (Li-Smerin, Hackos et al. 2000, Yifrach and MacKinnon 2002).



**Figure 4-2 : Agrandissement montrant les interactions possibles de la deuxième interface du VSD avec le pore dans un état ouvert.** Les acides aminés R2 et R3 sont cachés pour permettre une meilleure visibilité. Tous les acides aminés sont énumérés selon la séquence du Shaker, sauf T449 (Kv 1.2) qui correspond à V381 dans le Shaker. (A) Vue du côté extérieur. F244, C245, L246, E247 et T248 sont sur le segment S1. I429, P430, F433 et W434F sont sur le lien S5-S6. (B) Vue

du coté intérieur du pore. Les segments verts à gauche sont les segments S5-S6 de la même sous-unité que le F244. Tiré de 3LUT.pdb.

Maintenant que nous nous sommes familiarisés avec les études précédentes de cette région, nous allons pouvoir essayer de comprendre de quelle manière la position F244 provoque une perturbation des caractéristiques du WT. La figure 4.2 A-B nous permet de visualiser les différentes interactions possibles de F244. Un premier coup d'œil de la figure 4.2 A nous fait constater la proximité de notre position avec les acides aminés T248 et I429, formant un motif triangulaire chacun d'une distance approximativement identique. S'il est nécessaire d'avoir une distance de 6.2 Å entre T248C et I429C pour former un pont disulfure, nous constatons que F244 possède la même distance avec I429. F244 est même plus proche de T248 que d'I429. Seule l'orientation de l'acide aminé peut être différente. Cette première observation nous suggère fortement un rôle important sur l'ouverture du pore de la mutation F244.

Il a été proposé comme hypothèse que l'acide aminé T248 interagit avec C245 et T429 grâce à une liaison hydrogène, permettant de fortifier cette région afin d'avoir un transfert efficace de la force nécessaire pour l'ouverture des 'portes' par le VSD (Lee, Banerjee et al. 2009). Si nous admettons que cette hypothèse est vraie, la position F244 servirait sans doute de bouclier, grâce au cycle aromatique de la phénylalanine, pour éviter toute interaction de cette région avec le mouvement du S4. Cette hypothèse est appuyée par le courant de fuite observé lors de nos expériences. Si nous introduisons des acides aminés chargés, le courant de fuite en est grandement amplifié tandis que des acides aminés hydrophobes réduisent celui-ci et finalement un cycle aromatique permet un niveau minimum du courant de fuite. Mais il n'est pas possible d'avoir une atténuation totale du courant de fuite, suggérant un mode d'interaction requérant un ordre strict des chaînes latérales.

Par contre, le réarrangement produit par les mutations F244 sur la région du filtre de sélectivité reste incertain (figure 4.2 B). Nos expériences montrant que l'acide aminé

T449 (ou V381) n'était plus capable de se lier avec le TEA et que l'action de la mutation W434F était fortement réduite. En revanche, même si cette région est perturbée, le 4-AP possède toujours le même effet, suggérant un domaine d'interaction avec la protéine qui n'implique pas cette région.

Finalement ce qui serait intéressant d'expérimenter, serait de voir les effets des mutations F244 avec un découplage complet du lien S4-S5 grâce à une mutation sur la position I384 (Haddad and Blunck 2011) pour avoir une vue plus spécifique du changement apporté à cette région du canal. Par contre, une étude par double mutation de F244 et I429 n'est pas réalisable car nous avons testé les doubles mutations F244A-I429A et F244C-I429N et aucune expression n'était observable. La double mutation F244 et P430 possède peu de chance d'être réalisable avec le canal Shaker car la mutation P430A et P430W ne s'exprime pas (Li-Smerin, Hackos et al. 2000, Yifrach and MacKinnon 2002). Mais ces expériences pourraient être possibles avec le canal KvAP.

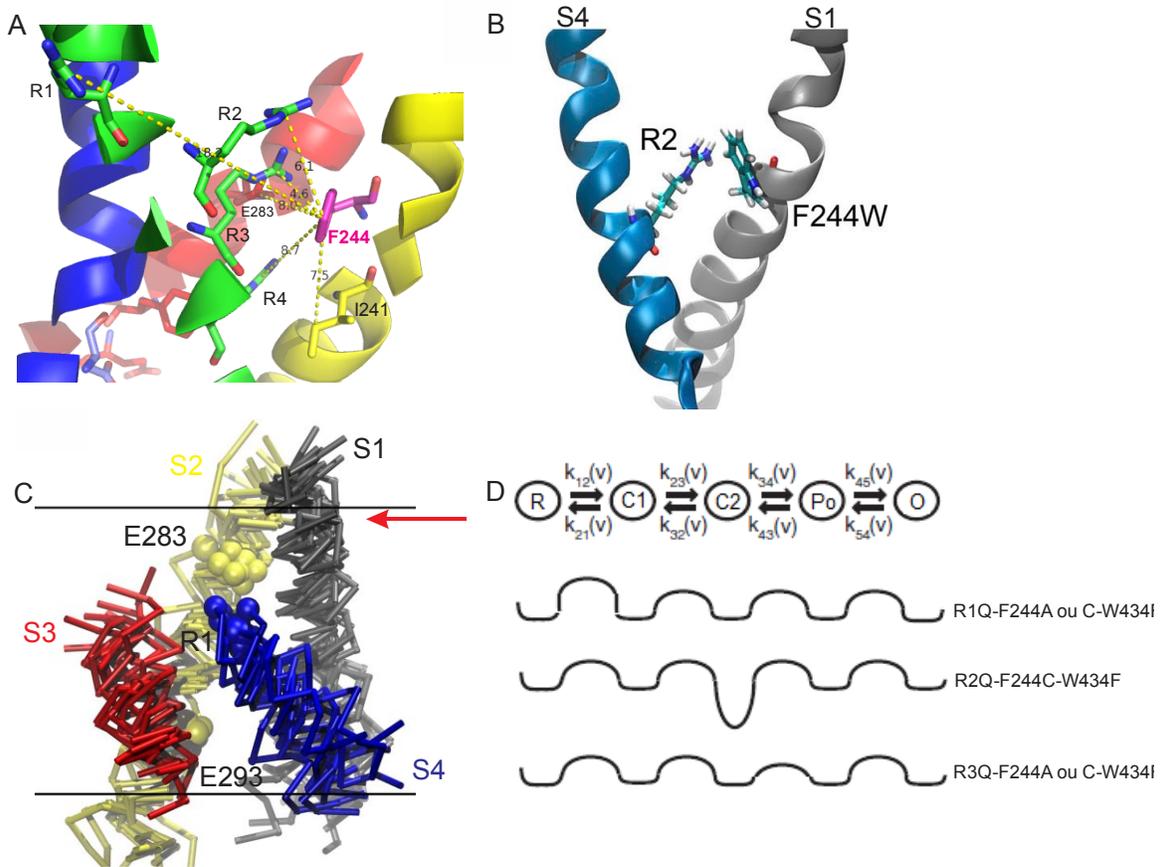
## **4.2 Stabilisation d'un état intermédiaire:**

---

Nos expériences montrent clairement une interaction avec R2 lors du mouvement du S4, confirmant les expériences de Lacroix, Pless et al 2012 et une interaction dans l'état de repos du canal avec R1. Les expériences de Campos, Chanda et al 2007 conclut à un passage obligatoire de R1 proche de F244 car la mutation I241C forme un pont disulfure avec R362C lors de l'état de repos. R3 montre une stabilité fortement réduite. Nous pouvons déjà affirmer que chaque arginine possède une orientation différente lors de leurs passages au niveau de la position F244.

Nous allons maintenant essayer de comprendre comment le mouvement du S4, censé être fluide entre l'état de repos et l'ouverture du canal, est perturbé lors de mutations aux niveaux du F244. Les figures 4.3 A-C présentent le positionnement relatif de S4 avec F244 dans l'état ouvert du canal (figure 4.3 A), lors de sa stabilisation avec R2 (figure 4.3

B) et hypothétiquement lors de l'état fermé du canal (figure 4.3 C). Nous pouvons déjà constater que F244 est plus proche de R3 quand le canal est dans son état ouvert avec une distance de 4.6 Å, mais il n'est pas non plus trop éloigné de R2 avec une distance de 6.1 Å tandis qu'il est complètement inaccessible par rapport à R1 avec une distance de 18.2 Å (figure 4.3 A). Les simulations de Lacroix, Pless et al 2012 montrent que R2 est potentiellement positionné pour permettre une interaction de type Van Der Waals avec F244 (figure 4.3 B). L'état fermé présenté à la figure 4.3 C est un consensus entre plusieurs simulations de la configuration de cet état avec une déviation standard < 3 Å, ceci nous permet une plus grande assurance pour développer des idées des positionnements des divers acides aminés dans l'état fermé. Sachant que les segments S1 et S2 sont relativement stable entre l'état de repos et l'état d'ouverture, nous observons une certaine proximité de R1 avec la position E283 qui se trouve à 8 Å de la position F244 (voir figure 4-3 A). Il semble raisonnable d'imaginer une possible interaction entre R1 et F244.



**Figure 4-3 : Positionnement de F244 par rapport au segment S4.** (A) Agrandissement montrant les interactions possibles de F244 avec le S4 dans l'état ouvert. Vue du coté intérieur du pore. Les acides aminés sont énumérés dans la séquence du Shaker et le haut du S1 ainsi que le pore a été camouflé pour une meilleure visibilité. Tiré de 3LUT.pdb (B) Positionnement intermédiaire possible entre F244W et R2 lors du mouvement de S4. Tiré de Lacroix, Pless et al 2012. (C) Superposition des modèles de la configuration de l'état fermé du VSD. La flèche rouge indique la localisation supposée de l'acide aminé F244. Tiré de (Vargas, Yarov-Yarovoy et al. 2012). (D) Modèle d'états des changements de conformations du VSD capturant qualitativement le comportement des charges du S4. Un simple modèle consiste en cinq états connectés par quatre transitions avant l'étape finale concertée de l'ouverture du pore. R représente l'état de repos, C1 à C2 indiquent des états fermés transitoires, Po est l'état de pré-activation et O est l'ouverture du canal. Le modèle est une représentation de l'énergie en fonction de la réaction du VSD pour les mutations indiquées à côté.

Nous pouvons résumer le mouvement du S4 par un simple modèle à cinq états représenté dans la figure 4.3 D. Chacun des cinq états, connectés par quatre transitions, correspond aux conformations d'un seul VSD. On débute par l'état de repos (R), puis le passage de R1 au niveau de F244, où l'on peut constater une augmentation de la barrière énergétique de cette transition (mutation R1Q-F244A ou C-W434F). Puis R2 arrive pour stabiliser un état intermédiaire représenté par un puits plus profond de l'état C2 (mutation R2Q-F244C-W434F) et enfin, la proximité de R3 favorisant l'état de pré-activation (Po) car le facteur  $s$  est diminué (mutation R3Q-F244A ou C-W434F).

Pour vraiment confirmer et ajuster ce modèle séquentielle du mouvement du S4 perturbé par les mutations F244, il faudrait reproduire les différents courants transitoires de nos expériences avec ce modèle simplifié, sachant qu'il faudrait aussi prendre en compte le courant de fuite développé lors de l'activation.

### **4.3 Éclaircissement des effets de la mutation original de l'EA-1 (F244C) :**

Les effets généraux des différentes mutations à la position F244 restent vrais pour la mutation F244C, c'est-à-dire un dérangement de la région du pore par le développement d'un courant de fuite lors de l'activation et la stabilisation d'un état intermédiaire grâce à une interaction avec R2.

Même si la cystéine est un acide aminé hydrophile, elle n'est que la troisième mutation la plus fuyante après les acides aminés chargés et très proche des acides aminés hydrophobes. Sa courbe GV est décalée de 20,8 mV vers des potentiels dépolarisant, représentant un tiers du décalage provoqué par la mutation F244E.

Elle stoppe le mouvement du S4, une fois que 50 % des charges se sont déplacées, un état intermédiaire est stabilisé pour ensuite redéployer 50 % de celle-ci. On peut très bien l'observer avec la valeur de la valence des deux composantes du Qon qui sont

pratiquement identiques ( $z_1= 2,39$  et  $z_2=2,95$ ), expliquant, en principe, le décalage prononcé des composantes de la courbe QV vers des potentiels dépolarisants.

Mais comment alors expliquer un décalage des courbes QV et des courbe GV vers des potentiels dépolarisants? Si nous regardons la Figure 4.2 A de plus près, nous pouvons voir la présence d'une deuxième cystéine à la position C245 éloigné d'une distance d'environ 5 Å. Un pont disulfure ne se forme pas entre les deux cystéines (des expériences avec l'addition de DTT dans la solution externe ont été testées mais aucun effet conséquent n'a pu être observé, données non présentées) mais nous savons que l'acide aminé C245 peut possiblement former un pont hydrogène avec l'acide aminé T248 et, déduisant un positionnement pratiquement symétrique par rapport à T248 de la mutation F244C, une interaction stabilisant, comme un pont hydrogène, entre les deux serait fortement envisageable. Ce qui permettrait le relais de la stabilisation d'un état intermédiaire au pore car la seconde interface avec le pore serait plus rigidement consolidée. Il reste que cette forte interaction rigidifie l'interface dans une position non naturellement présente et, par ce fait, crée un courant de fuite assez conséquent et un ralentissement de l'inactivation de type C.

Les patients atteints d'EA-1 avec la mutation F184C sur les canaux Kv1.1 répondent seulement partiellement à la phénytoïne. Nos expériences présentent une certaine efficacité du 4-Aminopyridine sur le courant de fuite. Il permet une disparition totale de celui-ci mais, en contrepartie, il bloque tous les courants potassiques provenant du pore, faisant de lui un traitement inefficace de l'EA-1 car nous recherchons à contrer l'effet d'haploinsuffisance de la mutation. Il serait intéressant d'observer les effets de la molécule Rétigabine sur les canaux potassiques avec la mutation F244C car elle permet d'activer les canaux Kv7 (Xiong, Gao et al. 2008), faisant de cette molécule un candidat potentiel pour contrer l'effet dominant négatif de la mutation F244C.

## 5 Conclusion

---

Dans cette étude nous avons exploré en détails les conséquences physiologiques des mutations à la position F244 et partiellement celles des mutations T284A/M, R297K/Q/A/H, I320T, L375F, L399I et S412C/I. Nous pouvons ainsi avec certitude énumérer, deux caractéristiques flagrantes de ces mutations : développement d'un courant de fuite et le décalage énergétique du VSD vers des potentiels dépolarisants engendré par une stabilisation d'un état intermédiaire. Le courant de fuite est créé par la déstabilisation du second point d'ancrage entre le VSD et le pore (Lee, Banerjee et al. 2009) et l'état intermédiaire est le contrecoup d'une interaction direct avec le segment S4 responsable de la sensibilité au potentiel membranaire (Aggarwal and MacKinnon 1996, Seoh, Sigg et al. 1996).

Ces grandes lignes se caractérisent par un délai dans l'activation des canaux potassiques pouvant mener à une perte de courant, se traduisant par une augmentation de l'amplitude du potentiel d'action pouvant atteindre l'équilibre de Nernst des ions Na<sup>+</sup> (à environ +51 mV au lieu de +40 mV) et une augmentation du temps de la période réfractaire. Si une deuxième impulsion est donnée avant le retour du potentiel membranaire à -90 mV, il sera plus facile de créer un second potentiel d'action. Cette dynamique résultera en une augmentation artificielle du seuil de déclenchement du potentiel d'action pouvant aller jusqu'au tétanos, responsable de la neuromyotonie et sans doute de l'épilepsie. Ainsi peut en être déduit le lien entre les mécanismes moléculaires et les phénotypes caractérisant l'EA-1.

Finalement si on veut guérir l'EA-1, l'action du traitement ne devra pas être dirigée sur le pore des canaux potassiques mais bien sur le senseur de voltage. Il faudrait réussir à bloquer l'interaction entre F244C et R2 afin de rétablir une sensibilité normale aux voltages et réadapter les contacts entre le VSD et le pore. C'est pratiquement impossible dans l'état actuel de la médecine car cela demanderait une action moléculaire du

traitement. Une solution plus simple serait d'accélérer l'ensemble du mécanisme du VSD grâce à des drogues tel que la rétigabine.

Il est clair maintenant qu'une des grandes voies vers laquelle doit se tourner la médecine contemporaine, est l'action de traitements efficaces sur le senseur de voltage des canaux membranaires.

## 6 Bibliographie

---

Adams, M. D., et al. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." Science **287**(5461): 2185-2195.

Adelman, J. P., et al. (1995). "Episodic ataxia results from voltage-dependent potassium channels with altered functions." Neuron **15**(6): 1449-1454.

Aggarwal, S. K. and R. MacKinnon (1996). "Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K<sup>+</sup> channel." Neuron **16**(6): 1169-1177.

Ahern, C. A. and R. Horn (2005). "Focused electric field across the voltage sensor of potassium channels." Neuron **48**(1): 25-29.

Armstrong, C. M. (1966). "Time course of TEA(+)-induced anomalous rectification in squid giant axons." J Gen Physiol **50**(2): 491-503.

Armstrong, C. M. (1981). "Sodium channels and gating currents." Physiol Rev **61**(3): 644-683.

Armstrong, C. M. and F. Bezanilla (1973). "Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels." Nature **242**(5398): 459-461.

Armstrong, C. M., et al. (1973). "Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase." J Gen Physiol **62**(4): 375-391.

Armstrong, C. M. and B. Hille (1972). "The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier." J Gen Physiol **59**(4): 388-400.

Asamoah, O. K., et al. (2003). "A fluorometric approach to local electric field measurements in a voltage-gated ion channel." Neuron **37**(1): 85-97.

Bagetta, G., et al. (1992). "Production of seizures and brain damage in rats by alpha-dendrotoxin, a selective K<sup>+</sup> channel blocker." Neurosci Lett **139**(1): 34-40.

Bain, P. G., et al. (1992). "Familial periodic cerebellar ataxia: a problem of cerebellar intracellular pH homeostasis." Ann Neurol **31**(2): 147-154.

Baker, O. S., et al. (1998). "Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K<sup>+</sup> channel gating." Neuron **20**(6): 1283-1294.

Barros, F., et al. (2012). "Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating." Front Pharmacol **3**(49): 23.

Batulan, Z., et al. (2010). "An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K<sup>+</sup> channels." J Biol Chem **285**(18): 14005-14019.

Benatar, M. (2000). "Neurological potassium channelopathies." Qjm **93**(12): 787-797.

Berneche, S. and B. Roux (2001). "Energetics of ion conduction through the K<sup>+</sup> channel." Nature **414**(6859): 73-77.

Bezanilla, F. (2000). "The voltage sensor in voltage-dependent ion channels." Physiol Rev **80**(2): 555-592.

Bezanilla, F. (2008). "How membrane proteins sense voltage." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(4): 323-332.

Bezanilla, F. and C. M. Armstrong (1974). "Gating currents of the sodium channels: three ways to block them." Science **183**(4126): 753-754.

Bezanilla, F., et al. (1994). "Gating of Shaker K<sup>+</sup> channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation." Biophys J **66**(4): 1011-1021.

Blunck, R., et al. (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**(5): 569-581.

Boel, M. and P. Casaer (1988). "Familial periodic ataxia responsive to flunarizine." Neuropediatrics **19**(4): 218-220.

Boland, L. M., et al. (1999). "Episodic ataxia/myokymia mutations functionally expressed in the Shaker potassium channel." Neuroscience **91**(4): 1557-1564.

Borjesson, S. I. and F. Elinder (2008). "Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels." Cell Biochem Biophys **52**(3): 149-174.

Broomand, A., et al. (2003). "Molecular movement of the voltage sensor in a K channel." J Gen Physiol **122**(6): 741-748.

Browne, D. L., et al. (1995). "Identification of two new KCNA1 mutations in episodic ataxia/myokymia families." Hum Mol Genet **4**(9): 1671-1672.

Browne, D. L., et al. (1994). "Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1." Nat Genet **8**(2): 136-140.

Brunt, E. R. and T. W. van Weerden (1990). "Familial paroxysmal kinesigenic ataxia and continuous myokymia." Brain **113**(Pt 5): 1361-1382.

Campos, F. V., et al. (2007). "Two atomic constraints unambiguously position the S4 segment relative to S1 and S2 segments in the closed state of Shaker K channel." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7904-7909.

Chakrapani, S., et al. (2007). "A quantitative description of KcsA gating I: macroscopic currents." J Gen Physiol **130**(5): 465-478.

Chakrapani, S., et al. (2007). "A quantitative description of KcsA gating II: single-channel currents." J Gen Physiol **130**(5): 479-496.

Chanda, B., et al. (2005). "Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement." Nature **436**(7052): 852-856.

Chen, H., et al. (2007). "Functional analysis of a novel potassium channel (KCNA1) mutation in hereditary myokymia." Neurogenetics **8**(2): 131-135.

Chen, X., et al. (2010). "Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(25): 11352-11357.

Choi, K. L., et al. (1991). "Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(12): 5092-5095.

Claydon, T. W., et al. (2007). "4-aminopyridine prevents the conformational changes associated with p/c-type inactivation in shaker channels." J Pharmacol Exp Ther **320**(1): 162-172.

Cordero-Morales, J. F., et al. (2006). "Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter." Nat Struct Mol Biol **13**(4): 319-322.

Cordero-Morales, J. F., et al. (2006). "Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter." Nat Struct Mol Biol **13**(4): 311-318.

Cox, D. H. and T. Hoshi (2011). Where's the gate? Gating in the deep pore of the BK(Ca) channel, J Gen Physiol. 2011 Aug;138(2):133-6. doi: 10.1085/jgp.2011110681. Epub 2011 Jul 11.

Cuello, L. G., et al. (2004). "Molecular architecture of the KvAP voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid bilayer." Science **306**(5695): 491-495.

Cuello, L. G., et al. (2010). "Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K(+) channels." Nature **466**(7303): 272-275.

Cuello, L. G., et al. (2010). "Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels." Nature **466**(7303): 203-208.

Cuello, L. G., et al. (1998). "pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> channel." Biochemistry **37**(10): 3229-3236.

D'Adamo, M. C., et al. (1998). "Episodic ataxia type-1 mutations in the hKv1.1 cytoplasmic pore region alter the gating properties of the channel." Embo J **17**(5): 1200-1207.

Dascal, N. (1987). "The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels." CRC Crit Rev Biochem **22**(4): 317-387.

Debanne, D., et al. (1997). "Action-potential propagation gated by an axonal I(A)-like K<sup>+</sup> conductance in hippocampus." Nature **389**(6648): 286-289.

Doyle, D. A., et al. (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity." Science **280**(5360): 69-77.

Elinder, F., et al. (2001). "S4 charges move close to residues in the pore domain during activation in a K channel." J Gen Physiol **118**(1): 1-10.

Elliott, D. J., et al. (2004). "Molecular mechanism of voltage sensor movements in a potassium channel." Embo J **23**(24): 4717-4726.

Eunson, L. H., et al. (2000). "Clinical, genetic, and expression studies of mutations in the potassium channel gene KCNA1 reveal new phenotypic variability." Ann Neurol **48**(4): 647-656.

Fedida, D. and J. C. Hesketh (2001). "Gating of voltage-dependent potassium channels." Prog Biophys Mol Biol **75**(3): 165-199.

Fournier, E., et al. (2004). "Electromyography guides toward subgroups of mutations in muscle channelopathies." Ann Neurol **56**(5): 650-661.

Fournier, E., et al. (2006). "Cold extends electromyography distinction between ion channel mutations causing myotonia." Ann Neurol **60**(3): 356-365.

Gancher, S. T. and J. G. Nutt (1986). "Autosomal dominant episodic ataxia: a heterogeneous syndrome." Mov Disord **1**(4): 239-253.

Gandhi, C. S., et al. (2003). "The orientation and molecular movement of a k(+) channel voltage-sensing domain." Neuron **40**(3): 515-525.

Gandhi, C. S. and E. Y. Isacoff (2002). "Molecular models of voltage sensing." J Gen Physiol **120**(4): 455-463.

Gola, M. and G. Romey (1971). "[Anomalous responses to subthreshold currents of certain somatic membranes (giant neurons of *Helix pomatia*). Voltage clamp analysis]." Pflugers Arch **327**(2): 105-131.

Goldstein, S. A. (1996). "A structural vignette common to voltage sensors and conduction pores: canaliculi." Neuron **16**(4): 717-722.

Gomez-Hernandez, J. M., et al. (1997). "Molecular basis for different pore properties of potassium channels from the rat brain Kv1 gene family." Pflugers Arch **434**(6): 661-668.

Gonzalez-Perez, V., et al. (2010). "Reduced voltage sensitivity in a K+-channel voltage sensor by electric field remodeling." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(11): 5178-5183.

Gosselin-Badaroudine, P., et al. (2012). "Gating pore currents and the resting state of Nav1.4 voltage sensor domains." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(47): 19250-19255.

Granger, P., et al. (1995). "Modulation of the gamma-aminobutyric acid type A receptor by the antiepileptic drugs carbamazepine and phenytoin." Mol Pharmacol **47**(6): 1189-1196.

Griggs, R. C., et al. (1978). "Hereditary paroxysmal ataxia: response to acetazolamide." Neurology **28**(12): 1259-1264.

Gu, C. and J. Barry (2011). "Function and mechanism of axonal targeting of voltage-sensitive potassium channels." Prog Neurobiol **94**(2): 115-132.

Gutman, G. A., et al. (2005). "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 473-508.

Haddad, G. A. and R. Blunck (2011). "Mode shift of the voltage sensors in Shaker K<sup>+</sup> channels is caused by energetic coupling to the pore domain." J Gen Physiol **137**(5): 455-472.

Hand, P. J., et al. (2001). "Clinical features of a large Australian pedigree with episodic ataxia type 1." Mov Disord **16**(5): 938-939.

Hanson, P. A., et al. (1977). "Contractures, continuous muscle discharges, and titubation." Ann Neurol **1**(2): 120-124.

Heginbotham, L., et al. (1992). "A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K<sup>+</sup> channels." Science **258**(5085): 1152-1155.

Heginbotham, L., et al. (1999). "Single streptomyces lividans K<sup>(+)</sup> channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation." J Gen Physiol **114**(4): 551-560.

Heginbotham, L., et al. (1994). "Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence." Biophys J **66**(4): 1061-1067.

Heginbotham, L. and R. MacKinnon (1992). "The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels." Neuron **8**(3): 483-491.

Herson, P. S., et al. (2003). "A mouse model of episodic ataxia type-1." Nat Neurosci **6**(4): 378-383.

Hille, B. (1967). "The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion." J Gen Physiol **50**(5): 1287-1302.

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo." J Physiol **116**(4): 449-472.

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

Hoffman, D. A., et al. (1997). "K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons." Nature **387**(6636): 869-875.

Hong, K. H. and C. Miller (2000). "The lipid-protein interface of a Shaker K<sup>(+)</sup> channel." J Gen Physiol **115**(1): 51-58.

Hoshi, T., et al. (1990). "Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation." Science **250**(4980): 533-538.

Hoshi, T., et al. (1991). "Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region." Neuron **7**(4): 547-556.

Imbrici, P., et al. (2003). "Functional characterization of an episodic ataxia type-1 mutation occurring in the S1 segment of hKv1.1 channels." Pflugers Arch **446**(3): 373-379.

Imbrici, P., et al. (2006). "Episodic ataxia type 1 mutations in the KCNA1 gene impair the fast inactivation properties of the human potassium channels Kv1.4-1.1/Kvbeta1.1 and Kv1.4-1.1/Kvbeta1.2." Eur J Neurosci **24**(11): 3073-3083.

Islas, L. D. and F. J. Sigworth (2001). "Electrostatics and the gating pore of Shaker potassium channels." J Gen Physiol **117**(1): 69-89.

Jen, J. C., et al. (2007). "Primary episodic ataxias: diagnosis, pathogenesis and treatment." Brain **130**(Pt 10): 2484-2493.

Jiang, Y., et al. (2003). "X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel." Nature **423**(6935): 33-41.

Jogini, V. and B. Roux (2007). "Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K<sup>+</sup> channel in a membrane environment." Biophys J **93**(9): 3070-3082.

Jouveneau, A., et al. (2001). "Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel." Lancet **358**(9284): 801-807.

Juhng, K. N., et al. (1999). "Induction of seizures by the potent K<sup>+</sup> channel-blocking scorpion venom peptide toxins tityustoxin-K(alpha) and pandinustoxin-K(alpha)." Epilepsy Res **34**(2-3): 177-186.

Jurkat-Rott, K., et al. (2012). "Pathophysiological role of omega pore current in channelopathies." Front Pharmacol **3**(112): 11.

Jurkat-Rott, K., et al. (2009). "K<sup>+</sup>-dependent paradoxical membrane depolarization and Na<sup>+</sup> overload, major and reversible contributors to weakness by ion channel leaks." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(10): 4036-4041.

Kavanaugh, M. P., et al. (1991). "Interaction between tetraethylammonium and amino acid residues in the pore of cloned voltage-dependent potassium channels." J Biol Chem **266**(12): 7583-7587.

Keynes, R. D. and F. Elinder (1999). "The screw-helical voltage gating of ion channels." Proc Biol Sci **266**(1421): 843-852.

Khalili-Araghi, F., et al. (2010). "Calculation of the gating charge for the Kv1.2 voltage-activated potassium channel." Biophys J **98**(10): 2189-2198.

Kinali, M., et al. (2004). "Expanding the phenotype of potassium channelopathy: severe neuromyotonia and skeletal deformities without prominent Episodic Ataxia." Neuromuscul Disord **14**(10): 689-693.

Kirsch, G. E., et al. (1991). "Internal and external TEA block in single cloned K<sup>+</sup> channels." Am J Physiol **261**(4 Pt 1): C583-590.

Klein, A., et al. (2004). "Episodic ataxia type 1 with distal weakness: a novel manifestation of a potassium channelopathy." Neuropediatrics **35**(2): 147-149.

Kobertz, W. R. and C. Miller (1999). "K<sup>+</sup> channels lacking the 'tetramerization' domain: implications for pore structure." Nat Struct Biol **6**(12): 1122-1125.

Kohout, S. C., et al. (2010). "Electrochemical coupling in the voltage-dependent phosphatase Ci-VSP." Nat Chem Biol **6**(5): 369-375.

Kubo, Y., et al. (1993). "Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel." Nature **364**(6440): 802-806.

Kumanovics, A., et al. (2002). "Family ties of gated pores: evolution of the sensor module." Faseb J **16**(12): 1623-1629.

Lacroix, J. J., et al. (2012). "Intermediate state trapping of a voltage sensor." J Gen Physiol **140**(6): 635-652.

Laine, M., et al. (2003). "Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels." Neuron **39**(3): 467-481.

Larsson, H. P., et al. (1996). "Transmembrane movement of the shaker K<sup>+</sup> channel S4." Neuron **16**(2): 387-397.

Lee, H., et al. (2004). "A novel mutation in KCNA1 causes episodic ataxia without myokymia." Hum Mutat **24**(6): 536.

Lee, S. Y., et al. (2009). "Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K<sup>(+)</sup> channels." PLoS Biol **7**(3): 1000047.

Li-Smerin, Y., et al. (2000). "A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K<sup>+</sup> channel." Neuron **25**(2): 411-423.

Litt, M., et al. (1994). "A gene for episodic ataxia/myokymia maps to chromosome 12p13." Am J Hum Genet **55**(4): 702-709.

Loboda, A. and C. M. Armstrong (2001). "Resolving the gating charge movement associated with late transitions in K channel activation." Biophys J **81**(2): 905-916.

Long, S. B., et al. (2005). "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel." Science **309**(5736): 897-903.

Long, S. B., et al. (2007). "Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment." Nature **450**(7168): 376-382.

Lubbers, W. J., et al. (1995). "Hereditary myokymia and paroxysmal ataxia linked to chromosome 12 is responsive to acetazolamide." J Neurol Neurosurg Psychiatry **59**(4): 400-405.

MacKinnon, R. and G. Yellen (1990). "Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K<sup>+</sup> channels." Science **250**(4978): 276-279.

Maylie, B., et al. (2002). "Episodic ataxia type 1 mutations in the human Kv1.1 potassium channel alter hKvbeta 1-induced N-type inactivation." J Neurosci **22**(12): 4786-4793.

McCormack, K., et al. (1994). "A characterization of the activating structural rearrangements in voltage-dependent Shaker K<sup>+</sup> channels." Neuron **12**(2): 301-315.

McManis, P. G., et al. (1986). "The exercise test in periodic paralysis." Muscle Nerve **9**(8): 704-710.

Meuser, D., et al. (1999). "Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*." FEBS Lett **462**(3): 447-452.

Michel, P., et al. (2007). "Comparative efficacy of repetitive nerve stimulation, exercise, and cold in differentiating myotonic disorders." Muscle Nerve **36**(5): 643-650.

Milescu, M., et al. (2009). "Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins." Nat Struct Mol Biol **16**(10): 1080-1085.

Morais-Cabral, J. H., et al. (2001). "Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter." Nature **414**(6859): 37-42.

Murata, Y., et al. (2005). "Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor." Nature **435**(7046): 1239-1243.

Murata, Y. and Y. Okamura (2007). "Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in *Xenopus* oocytes coexpressing sensors of PIP<sub>2</sub>." J Physiol **583**(Pt 3): 875-889.

Newsom-Davis, J. and K. R. Mills (1993). "Immunological associations of acquired neuromyotonia (Isaacs' syndrome). Report of five cases and literature review." Brain **116**(Pt 2): 453-469.

Noda, M., et al. (1984). "Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence." Nature **312**(5990): 121-127.

Olcese, R., et al. (1997). "Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels." J Gen Physiol **110**(5): 579-589.

Ophoff, R. A., et al. (1996). "Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4." Cell **87**(3): 543-552.

Papazian, D. M., et al. (1995). "Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K<sup>+</sup> channel." Neuron **14**(6): 1293-1301.

Papazian, D. M., et al. (2002). "Structural organization of the voltage sensor in voltage-dependent potassium channels." Novartis Found Symp **245**: 178-190.

Papazian, D. M., et al. (1991). "Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence." Nature **349**(6307): 305-310.

Perozo, E., et al. (1993). "Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K<sup>+</sup> channels." Neuron **11**(2): 353-358.

Perozo, E., et al. (1992). "Gating currents in Shaker K<sup>+</sup> channels. Implications for activation and inactivation models." Biophys J **62**(1): 160-168.

Perozo, E., et al. (1994). "S4 mutations alter gating currents of Shaker K channels." Biophys J **66**(2 Pt 1): 345-354.

Piskorowski, R. A. and R. W. Aldrich (2006). "Relationship between pore occupancy and gating in BK potassium channels." J Gen Physiol **127**(5): 557-576.

Plant, L. D., et al. (2005). "K2P channels and their protein partners." Curr Opin Neurobiol **15**(3): 326-333.

Ragsdale, D. S., et al. (1991). "Frequency and voltage-dependent inhibition of type IIA Na<sup>+</sup> channels, expressed in a mammalian cell line, by local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant drugs." Mol Pharmacol **40**(5): 756-765.

Rajakulendran, S., et al. (2007). "Episodic ataxia type 1: a neuronal potassium channelopathy." Neurotherapeutics **4**(2): 258-266.

Ramu, Y., et al. (2006). "Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels." Nature **442**(7103): 696-699.

Rea, R., et al. (2002). "Variable K(+) channel subunit dysfunction in inherited mutations of KCNA1." J Physiol **538**(Pt 1): 5-23.

Roux, B., et al. (2000). "Ion channels, permeation, and electrostatics: insight into the function of KcsA." Biochemistry **39**(44): 13295-13306.

Salkoff, L., et al. (2005). "Potassium channels in *C. elegans*." WormBook **30**: 1-15.

Sappey-Marinier, D., et al. (1999). "Phosphorus and proton magnetic resonance spectroscopy in episodic ataxia type 2." Ann Neurol **46**(2): 256-259.

Schmidt, D., et al. (2006). "Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors." Nature **444**(7120): 775-779.

Schönherr, R., et al. (2002). "Conformational switch between slow and fast gating modes: allosteric regulation of voltage sensor mobility in the EAG K<sup>+</sup> channel." Neuron **35**(5): 935-949.

Schoppa, N. E., et al. (1992). "The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels." Science **255**(5052): 1712-1715.

Schrempf, H., et al. (1995). "A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*." Embo J **14**(21): 5170-5178.

Schulte, U., et al. (2006). "The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1." Neuron **49**(5): 697-706.

Seoh, S. A., et al. (1996). "Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K<sup>+</sup> channel." Neuron **16**(6): 1159-1167.

Shieh, C. C., et al. (2000). "Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities." Pharmacol Rev **52**(4): 557-594.

Smart, S. L., et al. (1998). "Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice." Neuron **20**(4): 809-819.

Starace, D. M. and F. Bezanilla (2001). "Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the shaker k<sup>+</sup> channel." J Gen Physiol **117**(5): 469-490.

Starace, D. M. and F. Bezanilla (2004). "A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field." Nature **427**(6974): 548-553.

Starace, D. M., et al. (1997). "Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K<sup>+</sup> channel." Neuron **19**(6): 1319-1327.

Stefani, E. and F. Bezanilla (1998). "Cut-open oocyte voltage-clamp technique." Methods Enzymol **293**: 300-318.

Stefani, E., et al. (1994). "Gating of Shaker K<sup>+</sup> channels: I. Ionic and gating currents." Biophys J **66**(4): 996-1010.

Strupp, M., et al. (2004). "Treatment of episodic ataxia type 2 with the potassium channel blocker 4-aminopyridine." Neurology **62**(9): 1623-1625.

Strupp, M., et al. (2008). "Aminopyridines for the treatment of cerebellar and ocular motor disorders." Prog Brain Res **171**: 535-541.

Strupp, M., et al. (2007). "Episodic ataxia type 2." Neurotherapeutics **4**(2): 267-273.

Swartz, K. J. (2008). "Sensing voltage across lipid membranes." Nature **456**(7224): 891-897.

Taglialatela, M., et al. (1992). "Gating currents from a delayed rectifier K<sup>+</sup> channel with altered pore structure and function." Biophys J **62**(1): 34-36.

Taglialatela, M., et al. (1992). "Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in *Xenopus* oocytes." Biophys J **61**(1): 78-82.

Tempel, B. L., et al. (1987). "Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*." Science **237**(4816): 770-775.

Thompson, J. and T. Begenisich (2003). "External TEA block of shaker K<sup>+</sup> channels is coupled to the movement of K<sup>+</sup> ions within the selectivity filter." J Gen Physiol **122**(2): 239-246.

Tiwari-Woodruff, S. K., et al. (2000). "Voltage-dependent structural interactions in the Shaker K<sup>(+)</sup> channel." J Gen Physiol **115**(2): 123-138.

- Tombola, F., et al. (2005). "Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores." Neuron **45**(3): 379-388.
- Tombola, F., et al. (2006). "How does voltage open an ion channel?" Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 23-52.
- Tomlinson, S. E., et al. (2009). "Clinical neurophysiology of the episodic ataxias: insights into ion channel dysfunction in vivo." Clin Neurophysiol **120**(10): 1768-1776.
- Trimmer, J. S. and K. J. Rhodes (2004). "Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain." Annu Rev Physiol **66**: 477-519.
- Vaamonde, J., et al. (1991). "Hereditary paroxysmal ataxia with neuromyotonia." Mov Disord **6**(2): 180-182.
- Vacher, H., et al. (2008). "Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons." Physiol Rev **88**(4): 1407-1447.
- VanDyke, D. H., et al. (1975). "Hereditary myokymia and periodic ataxia." J Neurol Sci **25**(1): 109-118.
- Vargas, E., et al. (2012). "An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations." J Gen Physiol **140**(6): 587-594.
- Wallner, M., et al. (1996). "Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K<sup>+</sup> channels: an additional transmembrane region at the N terminus." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14922-14927.
- Wang, M. H., et al. (1999). "Effect of cysteine substitutions on the topology of the S4 segment of the Shaker potassium channel: implications for molecular models of gating." J Physiol **2**: 315-326.
- Xiong, Q., et al. (2008). "Activation of Kv7 (KCNQ) voltage-gated potassium channels by synthetic compounds." Trends Pharmacol Sci **29**(2): 99-107.
- Xu, Y., et al. (2008). "Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K<sup>+</sup> channels." Nature **451**(7180): 826-829.

Yang, N., et al. (1996). "Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels." Neuron **16**(1): 113-122.

Yang, Y., et al. (1997). "How does the W434F mutation block current in Shaker potassium channels?" J Gen Physiol **109**(6): 779-789.

Yifrach, O. and R. MacKinnon (2002). "Energetics of pore opening in a voltage-gated K(+) channel." Cell **111**(2): 231-239.

Yu, F. H., et al. (2005). "Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily." Pharmacol Rev **57**(4): 387-395.

Yuan, P., et al. (2010). "Structure of the human BK channel Ca<sup>2+</sup>-activation apparatus at 3.0 Å resolution." Science **329**(5988): 182-186.

Yusaf, S. P., et al. (1996). "Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel." Pflugers Arch **433**(1-2): 91-97.

Zagotta, W. N., et al. (1990). "Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB." Science **250**(4980): 568-571.

Zerr, P., et al. (1998). "Characterization of three episodic ataxia mutations in the human Kv1.1 potassium channel." FEBS Lett **431**(3): 461-464.

Zerr, P., et al. (1998). "Episodic ataxia mutations in Kv1.1 alter potassium channel function by dominant negative effects or haploinsufficiency." J Neurosci **18**(8): 2842-2848.

Zhang, C. L., et al. (1999). "Specific alteration of spontaneous GABAergic inhibition in cerebellar purkinje cells in mice lacking the potassium channel Kv1. 1." J Neurosci **19**(8): 2852-2864.

Zhou, Y., et al. (2001). "Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution." Nature **414**(6859): 43-48.

Zuberi, S. M., et al. (1999). "A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy." Brain **122**(Pt 5): 817-825.

## 7 Annexe

---

Le courant de fuite possède un impact sur l'analyse de la dépendance en voltage des charges du VSD car il est présent lors de l'enregistrement des courants de *gating* (chapitre 3). Cette annexe présente les problèmes de la présence du courant de fuite sur les méthodes d'analyses des courants de *gating* ainsi que leurs interprétations (chapitre 3.2.4).

L'équation 1.2 du chapitre 1.3 de ce mémoire, définit la charge totale transportée à la surface de l'ovocyte  $Q(V)$  comme l'intégrale sur le temps du courant de *gating* pour un voltage spécifique. Ainsi, afin de déterminer la dépendance en voltage de  $Q(V)$ , nous devons calculer la surface de l'espace délimité par la représentation graphique du courant obtenu de manière empirique.

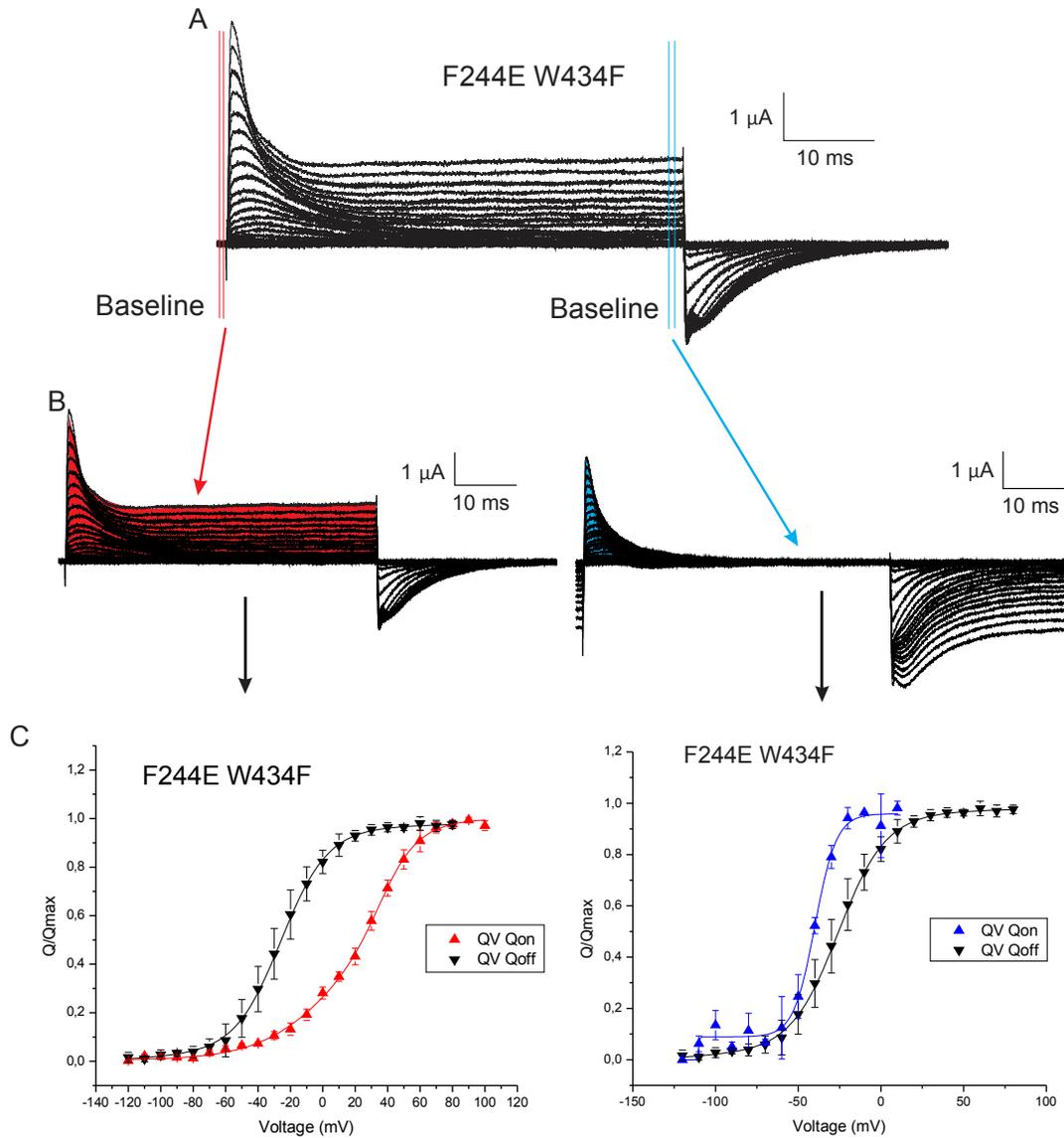
Il est évident qu'avant de procéder à ce calcul, nous devons déterminer une ligne de référence appelé ligne de base, pour permettre une comparaison exacte de la surface de l'espace délimité par le courant de *gating* à chaque voltage. Par convention, la ligne de base est défini lorsque  $Q(V)$  est dans un état stable, c'est-à-dire à la fin du pulse (trait bleu de la figure 7.1 A), lorsque toutes les charges se sont déplacées. Ainsi nous pouvons déterminer la dépendance en voltage de  $Q(V)$ .

Mais cette méthode ne peut s'appliquer pour la mutation F244E car un courant secondaire, le courant de fuite, est présent dans le *ON-gating* des courants de *gating* de cette mutation de façon trop importante. Ainsi, si nous procédons normalement, la dépendance en voltage du  $Q_{on}$  est située avant la dépendance en voltage du  $Q_{off}$  (figure 7.1 C à droite), ce qui est impossible aux vues des mécanismes déjà bien établis du senseur de voltage dans la littérature (Bezanilla 2008, Batulan, Haddad et al. 2010, Haddad and Blunck 2011). Il ne peut pas y avoir moins de charge au retour du senseur de voltage dans l'état inactivé que dans l'état activé. Ce résultat est dû a une sous-

estimation de la surface de l'espace délimité par les courants de *gating* provoqué par le choix de la ligne de base.

Pour obtenir un résultats plus proche de la réalité, nous devons changer la ligne de base. Ainsi, pour déterminer un nouvelle la ligne de base, nous devons obligatoirement garder le principe d'une ligne de référence située en dehors du mouvement des charges pour ne pas piper le résultat. Pour ce faire, nous avons choisi une ligne de base avant le début du pulse (trait rouge de la figure 7.1 A). Et nous obtenons une dépendance en voltage de  $Q_{on}$  située après celle de  $Q_{off}$  (figure 7.1 C à gauche).

Même si nous retrouvons un résultat physiquement possible, le décalage entre le  $Q_{on}$  et le  $Q_{off}$  est beaucoup trop prononcé. Ceci résulte du fait de la présence totale du courant de fuite lors du calcul de la surface de l'espace délimité par le courant de *gating*. Lorsque nous utilisons la première méthode pour définir la ligne de base, nous faisons ainsi disparaître la surface de l'espace appartenant au courant de fuite. Mais le courant de fuite est trop important pour la mutation F244E et la première méthode sous-estime l'intégrale de cette mutation mais, avec la deuxième méthode, nous sur-estimons cette surface. Ainsi, nous ne pouvons pas obtenir une dépendance en voltage de  $Q(V)$  sans problème pour la mutation F244E et pour éviter un résultat impossible, nous avons choisis de présenter le  $Q_{on}$  déterminé par la deuxième méthode dans la figure 3-11 de la section 3.2.4 des résultats de ce mémoire.



**Figure 7-1 : Méthode de détermination de la dépendance en voltage de la charge totale transposée à la surface de l'ovocyte  $Q(V)$ .** (A) Courant de gating de la mutation F244E. De manière de faire le baseline sont possibles, avant le pulse (trait en rouge) et avant la fin du pulse (trait en bleu). (B) Représentation des courants de gating de la mutation F244E après application du baseline. Avant le pulse : à gauche et avant la fin du pulse : à droite. (C) Détermination de la dépendance de la charge totale en fonction du voltage selon les deux méthodes de baseline, avant le pulse : à gauche et avant la fin du pulse : à droite.