

Université de Montréal

Caractérisation moléculaire de la région responsable  
de l'affinité et de la perméabilité du canal calcique ECaC1 (TRPV5)

par  
Karine JEAN

Département de physiologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences  
en Physiologie  
option Physiologie et Biophysique Moléculaires

Mai, 2003

© Karine Jean, 2003



W

4

U58

2003

v.127

## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation moléculaire de la région responsable  
de l'affinité et de la perméabilité du canal calcique ECaC1 (TRPV5)

présenté par :

Karine Jean

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Christiane Malo**  
\_\_\_\_\_  
président-rapporteur

**Lucie Parent**  
\_\_\_\_\_  
directrice de recherche

**Josette Noël**  
\_\_\_\_\_  
membre du jury

## RÉSUMÉ

---

Les parties distales du néphron jouent un rôle vital dans l'homéostasie calcique. Le calcium est réabsorbé via un processus transcellulaire qui est sous le contrôle de trois hormones calciotropes et qui s'effectue en trois étapes : entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  à la membrane apicale, diffusion cytosolique du  $\text{Ca}^{2+}$  et extrusion de  $\text{Ca}^{2+}$  à la membrane basale. Le canal calcique épithélial (ECaC1) récemment cloné dans la partie distale du rein de lapin est le principal candidat pour cette entrée apicale de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'affinité et la perméabilité calciques de ECaC1 ont été étudiées suite à l'expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. Le canal ECaC1 démontre des effets de fraction molaire anormale. Les ions extracellulaires  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  inhibent de façon réversible les courants  $\text{Li}^+$  de ECaC1, en configuration cellule entière avec un  $\text{IC}_{50}$  de  $2,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$  ( $n = 9$ ) et  $235 \pm 35 \mu\text{M}$  ( $n = 10$ ) respectivement. La comparaison de ces valeurs avec celles obtenues pour le canal  $\text{Ca}^{2+}$  de type-L dépendant du voltage ( $\text{Ca}_v1.2$ ) sous les mêmes conditions, suggère que la haute affinité calcique est une caractéristique bien conservée des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  épithélial et dépendant du voltage. Le rôle de certains résidus acides dans l'affinité et la perméabilité de ECaC1 a été étudié. La neutralisation des résidus chargés négativement E535 et D550 dans la région du pore n'entraîne pas d'effet significatif sur les affinités  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . Par contre, la neutralisation du résidu D542 entraîne une diminution significative de l'affinité  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{IC}_{50} = 1,1 \pm 0,2 \text{ mM}$ ,  $n = 6$ ) et de l'affinité  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{IC}_{50} > 25 \pm 3 \text{ mM}$ ,  $n = 4$ ). Malgré une diminution d'un facteur 1 000 de l'affinité  $\text{Ca}^{2+}$  du canal muté D542N, les propriétés de perméabilité et le rapport de conductance  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$  demeurent comparables aux valeurs obtenues pour le canal ECaC1 de type sauvage. Ainsi, nos observations suggèrent que le résidu D542 joue un rôle critique dans l'affinité calcique du canal ECaC1, mais pas dans la perméabilité calcique de ce canal épithélial.

**Mots clés :** ovocytes de *Xenopus* ; relation structure-fonction ; mutagenèse dirigée ; canal unitaire ; tubule distal ; rein ; sélectivité ; calcium ; magnésium.

## ABSTRACT

---

The distal part of the nephron is critically important for the maintenance of overall  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. In these segments,  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption is regulated by calciotropic hormones and occurs through a transcellular pathway envisaged as a three-step process: entry of  $\text{Ca}^{2+}$  across the apical membrane, cytosolic diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  and extrusion of  $\text{Ca}^{2+}$  at the basolateral membrane. The epithelial calcium channel (ECaC1), which was recently cloned from rabbit kidney, appears to be the prime candidate for this apical  $\text{Ca}^{2+}$  influx. The permeation properties of the ECaC1 channel cloned from purified distal tubules were investigated after heterologous expression in *Xenopus* oocytes. Large whole-cell inwardly rectifying currents ( $> 50 \mu\text{A}$ ) were recorded in the presence of either 120 mM  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , or  $\text{K}^+$  solutions (0  $\text{Ca}^{2+}$ ). ECaC1 displayed anomalous mole-fraction effects (AMFE). Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  reversibly inhibited whole-cell  $\text{Li}^+$  currents with  $\text{IC}_{50} = 2,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$  ( $n = 9$ ) and  $235 \pm 35 \mu\text{M}$  ( $n = 10$ ) respectively. These values compare well with the  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of the L-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) channel measured under the same conditions, suggesting that high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  binding is a well-conserved feature of epithelial and voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. By homology to voltage-gated L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, the role of acidic residues in ECaC1 permeation was investigated. Neutralization of the negatively charged residues E535 and D550 in the pore region had no significant effect on  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  affinities. In contrast, neutralization of D542 significantly decreased  $\text{Ca}^{2+}$  affinity ( $\text{IC}_{50} = 1,1 \pm 0,2 \text{ mM}$ ,  $n = 6$ ) and  $\text{Mg}^{2+}$  affinity ( $\text{IC}_{50} > 25 \pm 3 \text{ mM}$ ,  $n = 4$ ). Despite a 1 000-fold decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  affinity in D542N,  $\text{Ca}^{2+}$  permeation properties and the  $\text{Ca}^{2+}$ -to- $\text{Ba}^{2+}$  conductance ratio remained comparable to values for wild-type ECaC1. Together, our observations suggest that D542 plays a critical role in  $\text{Ca}^{2+}$  affinity but not in  $\text{Ca}^{2+}$  permeation in ECaC1.

**Key words :** *Xenopus* oocytes ; structure function ; site-directed mutagenesis ; single channel ; distal tubule ; kidney ; selectivity ; calcium ; magnesium.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	ix
REMERCIEMENTS .....	xv
<b>1- INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 L'IMPORTANCE DE L'ION CALCIUM .....	2
1.2 L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE .....	4
1.3 L'IMPLICATION DES DIFFÉRENTES HORMONES CALCIOTROPES .....	6
1.3.1 L'hormone parathyroïdienne.....	6
1.3.2 La calcitonine.....	8
1.3.3 La 1,25-dihydroxyvitamine D <sub>3</sub> .....	9
1.3.4 Le mode d'action de ces hormones.....	10
1.4 LE TRANSPORT DU Ca <sup>2+</sup> DANS LES DIFFÉRENTS SEGMENTS DU NÉPHRON .....	11
1.5 LA RÉABSORPTION DU CALCIUM VIA LA VOIE TRANSCELLULAIRE .....	13
1.5.1 Entrée apicale du Ca <sup>2+</sup> .....	14
1.5.2 Diffusion cytosolique du Ca <sup>2+</sup> .....	14
1.5.3 Sortie basolatérale du Ca <sup>2+</sup> .....	15
1.6 ECAC1 : CLONAGE ET EXPRESSION FONCTIONNELLE .....	15
1.7 ECAC EST UN CANAL DE LA FAMILLE DES TRP .....	17
1.8 AFFINITÉ ET PERMÉABILITÉ DES CANAUX Ca <sup>2+</sup> : CONCEPTS DE BASE .....	22
1.8.1 Les canaux calciques dépendants du voltage .....	22
1.8.2 Les différentes techniques électrophysiologiques.....	24
1.8.3 Les propriétés de perméabilité et d'affinité.....	25
1.8.4 Les modèles moléculaires associés aux canaux Ca <sup>2+</sup> .....	27
1.8.5 Les déterminants moléculaires de l'affinité du canal Ca <sub>v1.2</sub> .....	28
1.9 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	29
<b>2- MÉTHODOLOGIE .....</b>	<b>30</b>
2.1 CLONAGE ET MUTAGENÈSE DIRIGÉE DU CANAL ECAC1 DU TUBULE DISTAL DU REIN DE LAPIN..	31
2.2 EXPRESSION DU CANAL ECAC1 DE TYPE SAUVAGE ET DES MUTANTS DANS LES OVOCYTES DE XENOPUS LAEVIS.....	32
2.3 ENREGISTREMENTS EN CONFIGURATION CELLULE ENTIÈRE (« WHOLE-CELL »).....	32
<b>3- ARTICLE .....</b>	<b>35</b>

<b>4- DISCUSSION .....</b>	<b>62</b>
4.1 PRINCIPALES OBSERVATIONS ET CONCLUSIONS DÉCOULANT DE L'ÉTUDE .....	63
4.2 ECAC1 EST UN CANAL CALCIQUE À HAUTE AFFINITÉ .....	64
4.3 L'AFFINITÉ CALCIQUE DE ECAC1 EST MÉDIÉE PAR UN SIMPLE RÉSIDU ACIDE.....	67
4.4 ANALYSES DES MUTATIONS DU RÉSIDU D542 : RÔLE DE LA CHAÎNE LATÉRALE.....	75
4.5 PERMÉABILITÉ DES CATIONS DIVALENTS À TRAVERS LE CANAL MUTÉ D542N.....	81
<b>5- CONCLUSION .....</b>	<b>86</b>
<b>6- LISTE DES RÉFÉRENCES .....</b>	<b>90</b>
<b>7- ANNEXES .....</b>	<b>98</b>
ANNEXE 1.....	99
ANNEXE 2.....	101
ANNEXE 3.....	103



## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	PRÉSENTATION DES PROPRIÉTÉS BIOPHYSIQUES ET PHARMACOLOGIQUES AINSI QUE DES FONCTIONS ASSOCIÉES AUX DIFFÉRENTS TYPES DE CANAUX $Ca^{2+}$ DÉPENDANTS DU VOLTAGE .....	23
TABLEAU II	VALEURS DE L’AFFINITÉ CALCIQUE POUR DIFFÉRENTS CANAUX $Ca^{2+}$ DÉPENDANTS OU NON DU VOLTAGE MEMBRANAIRE .....	66
TABLEAU III	TABLEAU SYNTHÈSE PRÉSENTANT L’AFFINITÉ ( $IC_{50}$ ) POUR LES CATIONS $Ca^{2+}$ ET $Mg^{2+}$ DU CANAL ECAC1 DE TYPE SAUVAGE ET CEUX PORTANT DIVERSES MUTATIONS .....	72
TABLEAU IV	TABLEAU SYNTHÈSE PRÉSENTANT L’AFFINITÉ CALCIQUE DU CANAL ECAC1 DE TYPE SAUVAGE ET DE CEUX PORTANT DIVERSES MUTATIONS .....	80

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 :	BOUCLE DE RÉGULATION HORMONALE DE L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE .....	7
FIGURE 1.2 :	VOIES PARACELLULAIRE ET TRANSCELLULAIRE POUR LA RÉABSORPTION DE CALCIUM AU NIVEAU DES CELLULES ÉPITHÉLIALES.....	13
FIGURE 1.3 :	MODÈLE PROPOSÉ POUR LA RÉABSORPTION TRANSCELLULAIRE. ....	13
FIGURE 1.4 :	REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE PROPOSÉE POUR LE CANAL CALCIQUE ÉPITHÉLIAL ECAC. ....	17
FIGURE 1.5 :	ARBRE PHYLOGÉNIQUE DE LA SUPER FAMILLE DES TRP.....	19
FIGURE 1.6 :	SÉQUENCES DES ACIDES AMINÉS DE LA RÉGION DU PORE DE TROIS CANAUX DE LA FAMILLE TRP .....	21
FIGURE 1.7 :	COURBES DE RELATION COURANT-VOLTAGE ET DOSE-RÉPONSE.....	26
FIGURE 3.1 :	HIGH-AFFINITY CALCIUM BINDING SITES IN ECAC1.....	52
FIGURE 3.2 :	PUTATIVE MODEL OF THE SECONDARY STRUCTURE OF THE EPITHELIAL ECAC1 $Ca^{2+}$ CHANNEL.....	53
FIGURE 3.3 :	RESIDUE D542 PARTICIPATES TO HIGH-AFFINITY $Ca^{2+}$ BINDING IN ECAC1. ....	54
FIGURE 3.4 :	RESIDUE D542 ALTERS $Mg^{2+}$ INHIBITION IN ECAC1.....	55
FIGURE 3.5 :	MUTATIONAL ANALYSIS AT POSITION D542.....	56
FIGURE 3.6 :	$Ca^{2+}$ PERMEATION IN ECAC1 WILD-TYPE, E535Q, D542N, AND D550N CHANNELS.....	57
FIGURE 4.1 :	NEUTRALISATION DES RÉSIDUS CHARGÉS NÉGATIVEMENT RETROUVÉS DANS LA RÉGION PRÉSUMÉE DU PORE DU CANAL ECAC1 .....	69
FIGURE 4.2 :	STRUCTURE TÉTRAMÉRIQUE PRÉSUMÉE POUR LE CANAL CALCIQUE ÉPITHÉLIAL ECAC1 .....	75
FIGURE 4.3 :	STRUCTURE DE LA CHAÎNE LATÉRALE DE DIFFÉRENTS ACIDES AMINÉS.....	77

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\Delta \Psi$	Différence de potentiel membranaire
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentration de calcium intracellulaire
$[\text{Ca}^{2+}]_o$	Concentration de calcium extracellulaire
$\omega$ -CTX-GVIA	Toxine peptidique isolée d'un escargot marin ( <i>Conus geographicus</i> ), $\omega$ -conotoxine GVIA
$[\text{Na}^+]_i$	Concentration de sodium intracellulaire
$[\text{Na}^+]_o$	Concentration de sodium extracellulaire
$^{\circ}\text{C}$	Degré celcius
1,25(OH) $_2$ D $_3$	1,25-dihydroxyvitamine D $_3$ ou calcitriol
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
Ala (A)	Acide aminé alanine
AMFE	Effet de fraction molaire anormale (« anomalous mole fraction effects »)
AMPC	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
Arg (R)	Acide aminé arginine
ARNc	Acide ribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asn (N)	Acide aminé asparagine
Asp (D)	Acide aminé aspartate ou acide aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
Ba $^{2+}$	Baryum

<b>BAPTA</b>	Acide 1,2-bis (2-aminophenoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>Ca<sup>2+</sup>-ATPase</b>	Protéine transmembranaire qui hydrolyse l'ATP (adénosine triphosphate) et transporte activement des cations Ca <sup>2+</sup>
<b>Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH</b>	Hydroxyapatite, principal constituant de l'os
<b>CaBP</b>	Protéine de transport de calcium (« Calcium Binding Protein »)
<b>CaTx</b>	Transporteur de Ca <sup>2+</sup> (« Calcium Transporter »)
<b>Ca<sub>v</sub>x</b>	Canal calcique dépendant du voltage membranaire
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Chlore
<b>Cl(Ca)</b>	Canal chlorure activé par le Ca <sup>2+</sup> intracellulaire
<b>Cs<sup>+</sup></b>	Césium
<b>DBP</b>	Protéine plasmatique qui transporte la vitamine D <sub>3</sub> (« vitamin D-Binding Protein »)
<b>DHP</b>	Dihydropyridine
<b>ECaCx</b>	Canal calcique épithélial («Epithelial Calcium Channel»)
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétraacétique
<b>EGTA</b>	Acide éthylène glycol-O,O'-bis-[2-aminoéthyl]-N,N,N',N'-tétraacétique
<b>ENaC</b>	Canal sodique épithélial (« Epithelial sodium (Na <sup>+</sup> ) Channel »)
<b>E<sub>rev</sub></b>	Potentiel d'inversion
<b>g</b>	Gramme
<b>G</b>	Conductance
<b>Gln (Q)</b>	Acide aminé glutamine
<b>Glu (E)</b>	Acide aminé glutamate ou acide glutamique
<b>Gly (G)</b>	Acide aminé glycine
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau
<b>HEPES</b>	Acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonique]
<b>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Phosphate

<b>I</b>	Courant
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration de cations divalents qui correspond à 50% de l'inhibition des courants Li <sup>+</sup>
<b>InsP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5-triphosphate
<b>K<sup>+</sup></b>	Potassium
<b>K<sub>a</sub></b>	Constante d'acidité
<b>kb</b>	Kilobase (1 000 paires de bases)
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de dissociation
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>kHz</b>	KiloHertz
<b>Li<sup>+</sup></b>	Lithium
<b>L-type</b>	Courant calcique de type L (« long lasting »)
<b>Lys (K)</b>	Acide aminé lysine
<b>M</b>	Molaire
<b>MeS</b>	Acide méthanesulfonique
<b>mg</b>	Milligramme
<b>mg/dl</b>	Milligramme / décilitre
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnésium
<b>min</b>	Minute
<b>ml/min</b>	Millilitre / minute
<b>mM</b>	Millimolaire
<b>mmol</b>	Millimole
<b>mmol/L</b>	Millimole / litre
<b>mV</b>	Millivolt
<b>mV/ms</b>	Millivolt / milliseconde
<b>MΩ</b>	Mégaohm
<b>n</b>	Nombre d'échantillonnage, nombre de fois que l'expérience électrophysiologique a été répétée

<b>nA</b>	Nanoampère
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodium
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase</b>	Protéine transmembranaire qui hydrolyse l'ATP (adénosine triphosphate) et transporte activement des cations sodium (Na <sup>+</sup> ) et potassium (K <sup>+</sup> )
<b>NCX</b>	Échangeur Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
<b>ng</b>	Nanogramme
<b>nl</b>	Nanolitre
<b>nt</b>	Nucléotide
<b>N-type</b>	Courant calcique de type N (« neuronal »)
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>OTRPCx</b>	Protéine TRP (« Transient Receptor Potential ») nommée ainsi dû à sa ressemblance avec la protéine <i>osm-9</i> clonée chez <i>C. elegans</i>
<b>pCa</b>	$-\log[\text{Ca}^{2+}]$
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne par la polymérase (« Polymerase Chain Reaction »)
<b>pH</b>	$-\log[\text{H}^+]$
<b>PDZ</b>	Domaine protéique formé d'une séquence de 80-90 acides aminés. Il doit son nom aux trois premières protéines découvertes qui étaient pourvues du même motif d'acides aminés : PSD95 (« postsynaptic density ») intervenant dans la synapse, <i>dlg</i> suppresseur de tumeur chez <i>Drosophila</i> et ZO-1 protéine de jonction de la membrane plasmique.
<b>Phe (F)</b>	Acide aminé phénylalanine
<b>Pi</b>	Phosphate inorganique
<b>PKA</b>	Protéine kinase A
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PMCA</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPase
<b>PTH</b>	Parathormone («ParaThyroid Hormone»)
<b>P-type</b>	Courant calcique de type P (« Purkinje »)
<b>Q-type</b>	Courant calcique de type Q

<b>rbECaCx</b>	Canal calcique épithelial cloné à partir du lapin (rb = rabbit)
<b>rCaT1</b>	Transporteur de calcium cloné à partir du rat (r = rat)
<b>R-type</b>	Courant calcique de type R
<b>s</b>	Seconde
<b>S1-S6</b>	Segments transmembranaires 1 à 6
<b>SE</b>	Écart-type
<b>Ser (S)</b>	Acide aminé sérine
<b>TRP</b>	Récepteur transitoire potentiel (« <b>Transient Receptor Potential</b> »)
<b>Trp (W)</b>	Acide aminé tryptophane
<b>TRPCx</b>	Protéine TRP (« <b>Transient Receptor Potential</b> ») de type « canonique »
<b>TRPMx</b>	Protéine TRP (« <b>Transient Receptor Potential</b> ») de type « mélastatine »
<b>TRPVx</b>	Protéine TRP (« <b>Transient Receptor Potential</b> ») de type « vanilloïde »
<b>T-type</b>	Courant calcique de type T (« transient »)
<b>Tyr (Y)</b>	Acide aminé tyrosine
<b>UV</b>	Ultra-violet
<b>V</b>	Voltage
<b>V<sub>m</sub></b>	Voltage membranaire
<b>VR1</b>	Récepteur vanilloïde (« <b>Vanilloid Receptor</b> »)
<b>VRL1</b>	Protéine apparentée au récepteur vanilloïde (« <b>Vanilloid Receptor-Like protein</b> »)
<b>VR-OAC</b>	Récepteur vanilloïde activé par la pression osmotique (« <b>Vanilloid Receptor-related Osmotically Activated Channel</b> »)
<b>μA</b>	Microampère
<b>μM</b>	Micromolaire

À mes chers parents qui, de part leurs chemins de vie parfois  
sinueux, m'ont appris le vrai sens des mots courage,  
persévérance et accomplissement...

À toi Éric, l'homme de ma vie, qui m'apporte amour, paix et  
bonheur....Merci d'être là pour moi, merci simplement d'être toi  
pour moi.

À vous trois que j'aime énormément, je dédie ce mémoire.



## REMERCIEMENTS

---

La réalisation de ce projet de recherche et de ce travail de rédaction n'aurait été possible sans la collaboration de plusieurs personnes engagées sous diverses fonctions.

Je tiens à remercier tout spécialement ma directrice de recherche Dr Lucie Parent, Ph.D. et professeure agrégée au département de physiologie de l'Université de Montréal, qui m'a épaulée tout au long de ce travail. De par son assistance, sa très grande disponibilité et ses judicieux conseils, elle a su me transmettre une partie de ses connaissances et de son expérience en tant que chercheuse de manière à me donner la meilleure formation technique et académique possible. Sa motivation, son dynamisme contagieux ainsi que sa passion pour la recherche m'ont stimulée à approfondir mes recherches en laboratoire et mes connaissances. Malgré la distance qui nous séparait lors du travail de rédaction, ses judicieux commentaires ainsi que ses mots d'encouragement dans les moments plus difficiles m'ont permis de mener à terme ce travail.....Merci Lucie!

Je tiens aussi à remercier les gens qui étaient présents lors de mon court passage dans le laboratoire du Dr Lucie Parent et qui, grâce à leurs connaissances scientifiques et leur personnalité, ont rendu ces moments inoubliables. Je remercie Gérald Bernatchez, à ce moment agent de recherche au laboratoire du Dr Parent, qui m'a beaucoup aidé à développer mes habiletés techniques et qui a contribué à cette recherche en validant des données. Je tiens aussi à remercier Laurent Berrou pour son soutien, son aide technique ainsi que pour les discussions scientifiques (et autres) très stimulantes.

J'aimerais également remercier les gens rencontrés au GRTM et avec qui une profonde amitié est née. Pierrette, ma seconde maman et mon amie....Merci pour ton soutien, ton écoute attentive et tes judicieux conseils. Tu sais apporter un rayon de soleil aux journées les plus grises! Yolaine et Joe, mes deux grands amis de « bureau » avec qui j'ai partagé devoirs, discussions, inquiétudes, frustrations, joies....Merci à vous deux que j'aime et apprécie énormément et meilleures des chances dans tous vos projets futurs! En espérant vous revoir bientôt.....

Je profite de l'occasion pour remercier mes parents et amis pour leur soutien moral, leurs encouragements et leur patience....C'est enfin fini!

Enfin, un merci particulier va à mon copain Éric qui a toujours cru en moi et en mes capacités, qui m'a soutenue et endurée dans les moments les plus difficiles, qui m'a toujours encouragée, même lorsque je croyais que tout était impossible et qui ne cesse d'être fier de moi. Sans toi, ce travail ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui!

# **1 - INTRODUCTION**

### 1.1 *L'importance de l'ion calcium*

Le calcium est le cation le plus abondant à l'intérieur du corps humain (65). La majeure partie de tout ce calcium, soit plus de 99 %, se retrouve dans les os et les dents combiné avec des phosphates afin de former un réseau cristallin de sels minéraux, alors que la balance, soit un peu moins de 1 %, est présente dans le milieu extracellulaire sous différentes formes (38).

Le calcium retrouvé dans le milieu extracellulaire circule sous trois formes différentes : la **forme ionisée**, la **forme liée à des protéines** et la **forme liée à des anions**. La **forme ionisée** (ou libre) implique que les ions calcium circulent librement dans le liquide extracellulaire. Le calcium ionisé est filtré par les glomérules rénaux et, une fois réabsorbé, peut alors être utilisé afin d'accomplir les différentes fonctions biologiques qui lui sont associées. Cette forme de calcium représente la fraction biologique la plus importante présente dans le milieu extracellulaire et s'élève à environ 50 % de tout le calcium retrouvé dans ce milieu. La **forme liée à des protéines** implique que le calcium est uni par une liaison à différentes protéines macromoléculaires telles que l'albumine et parfois les globulines. Cette forme représente quant à elle, une fraction d'environ 40 % de tout le calcium retrouvé dans le milieu extracellulaire et l'ion est, dans ce cas-ci non filtré par les glomérules rénaux, bien qu'il demeure dans la circulation sanguine et ainsi disponible pour les fonctions biologiques associées. Finalement, la **forme liée à des anions** représente environ 10 % de la quantité totale de calcium. Sous cette forme, le calcium se retrouve en étroite relation avec des petits anions tels que le bicarbonate, le citrate, le sulfate, le phosphate et le lactate. Cette fraction du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire est également filtrée par les glomérules rénaux (15, 28, 71).

Les concentrations extracellulaires de calcium ionisé (libre) sont équivalentes à environ 1,2 mM (27, 71) tandis que les concentrations de calcium libre retrouvées dans le milieu intracellulaire s'élèvent à peine à 0,1  $\mu\text{M}$  (27); la concentration cytosolique en ions calcium est ainsi inférieure de quatre ordres de grandeur à celle du milieu extracellulaire. Cette différence extrême entre les concentrations intra- et extracellulaires impose plusieurs demandes et contraintes aux protéines membranaires afin de sauvegarder l'intégrité du milieu intracellulaire (28). En fait, ce fort gradient de concentration est maintenu par le

transport actif de  $\text{Ca}^{2+}$  qui s'effectue au niveau de la membrane plasmique (13), du réticulum endoplasmique et de la membrane interne mitochondriale (76). Ces différentes membranes contiennent une  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, c'est-à-dire une pompe à  $\text{Ca}^{2+}$  qui est dépendante de l'ATP et qui a pour fonction d'acheminer de façon continue les ions calciques hors du cytosol (76). Ainsi grâce à ces pompes, la majorité du calcium intracellulaire est séquestrée à l'intérieur des mitochondries et du réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique dépendamment du type cellulaire (76). De plus, afin de maintenir une concentration intracellulaire de calcium qui ne soit pas toxique, il existe différentes protéines de liaison qui jouent un rôle de tampon cytosolique (84).

Ces concentrations de calcium qui se répartissent inégalement de part et d'autre de la membrane cellulaire génèrent un gradient électrochimique qui détermine le sens de la diffusion des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (12). En fait, ce gradient est composé de deux éléments bien distincts : un **gradient chimique** qui est fonction de la concentration des ions de part et d'autre de la membrane cellulaire, et un **gradient électrique** qui est fonction de la charge électrique de la cellule, négative à l'état de repos (65). Ce gradient électrochimique permet aux ions calciques de traverser la membrane plasmique de façon passive à travers des protéines spécialisées appelées canaux ioniques, sans utilisation d'énergie, et ainsi d'atteindre le milieu intracellulaire où ces ions essentiels peuvent alors accomplir leurs multiples fonctions physiologiques et biochimiques.

En plus d'être le composant majeur de la phase minérale des os et des dents (64), l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  est un second messenger ubiquitaire et un régulateur de très nombreuses fonctions métaboliques (58). Puisque cet ion se retrouve dans la majorité des tissus de l'organisme, il peut accomplir ses multiples fonctions physiologiques sur différents types cellulaires. Ces ions calcium sont donc impliqués dans l'activation et la régulation de nombreux processus et réactions cellulaires tels, entre autres, le couplage excitation-contraction musculaire, la libération d'hormones ou de neurotransmetteurs (exocytose), l'activation d'enzymes, l'expression de certains gènes, la coagulation sanguine et l'excitabilité des tissus nerveux (58, 84).

En fait, la majorité des fonctions cellulaires attribuables aux ions calciques dépendent de la gamme des changements des concentrations intracellulaires de calcium

( $[Ca^{2+}]_i$ ) (76). Comme l'indique Wasserman (84), il existe plusieurs conditions afin d'obtenir une réponse modulée par le  $Ca^{2+}$  : (i) une concentration extracellulaire de  $Ca^{2+}$  ionique de  $10^{-3}$  M; (ii) des mécanismes cellulaires qui maintiennent la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  ionique à  $10^{-7}$  M ou moins à l'état de repos; (iii) une augmentation de l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol suite à une stimulation, ce qui élève la concentration intracellulaire à  $10^{-6} - 10^{-5}$  M; (iv) une protéine intracellulaire qui lie le calcium libre durant la stimulation; (v) un retour rapide de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  à  $\leq 10^{-7}$  M suite à la stimulation.

### **1.2. L'homéostasie calcique**

Puisque le calcium exerce différentes fonctions physiologiques cruciales pour le bon fonctionnement de l'organisme, il apparaît évident que toute altération de son homéostasie, intra- ou extracellulaire, va engendrer en retour des situations pathologiques pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire (58). Afin d'éviter ces situations pathologiques, il existe à l'intérieur de l'organisme différents mécanismes de régulation qui maintiennent les concentrations de calcium à un niveau d'équilibre, ce qui fait de l'ion  $Ca^{2+}$  un des électrolytes le plus précisément contrôlé à l'intérieur de l'organisme (51 et 64). La basse concentration de calcium intracellulaire est maintenue grâce à l'action de la  $Ca^{2+}$ -ATPase, tel que décrit dans la section précédente. Quant aux concentrations sanguines et extracellulaires de calcium, elles sont maintenues à un niveau d'équilibre grâce à l'action de trois organes qui agissent de façon concertée : l'intestin, les reins et les os (8). En fait, les concentrations de  $Ca^{2+}$  sont étroitement contrôlées par le transport continu des ions calciques via l'absorption intestinale, la réabsorption rénale ainsi que la formation et la résorption osseuse (64).

La disponibilité du calcium ingéré quotidiennement est un élément déterminant de l'homéostasie calcique (65). En fait, des études ont démontré que l'alimentation quotidienne d'un être humain apporte entre 500 et 1 000 mg de calcium. De ce calcium ingéré à chaque jour, environ 30% est absorbé par les cellules endothéliales au niveau de l'intestin pour atteindre la circulation sanguine, alors que la balance des ions calciques non absorbés par les cellules intestinales sont éliminés dans les selles (38, 65). Ces ions  $Ca^{2+}$

ionisés nouvellement absorbés s'ajoutent aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  déjà présents dans la circulation sanguine, d'où ils seront acheminés jusqu'aux reins. Il a été estimé que, sur une base quotidienne, la quantité de calcium ultrafiltré par les glomérules se situe entre 8 000 et 10 000 mg (40). Seule la fraction ultrafiltrable du calcium plasmatique total, c'est-à-dire le  $\text{Ca}^{2+}$  ionisé ainsi que le  $\text{Ca}^{2+}$  lié aux anions, passe la barrière glomérulaire (69). Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ayant été filtrés par le glomérule se retrouvent alors en contact avec les cellules épithéliales des néphrons afin d'être réabsorbés presque en totalité et d'accomplir leurs différentes fonctions vitales (38). Afin d'assurer l'homéostasie calcique de l'organisme, au-delà de 98 % du calcium filtré au niveau du glomérule rénal doit être réabsorbé le long du néphron (42). Ainsi, les reins ne réabsorbent pas un maximum de 2 % de tout le calcium filtré quotidiennement, calcium qui est éliminé dans les urines. Cependant, les reins adaptent l'élimination urinaire du  $\text{Ca}^{2+}$  aux besoins de l'organisme de façon extrêmement précise. Une surcharge calcique va se solder par une calciurie et réciproquement, démontrant ainsi le rôle crucial des reins dans la régulation du calcium (8).

Les ions calciques peuvent donc être absorbés ou réabsorbés, tout dépendant de l'organe dans lequel ils se retrouvent. Au niveau de l'intestin, les ions sont absorbés, c'est-à-dire qu'ils traversent la muqueuse intestinale afin d'atteindre la circulation sanguine. Alors qu'au niveau des tubules rénaux les ions calciques sont réabsorbés, c'est-à-dire qu'une fois parvenus au filtrat glomérulaire, ils traversent les cellules épithéliales vers la circulation sanguine des capillaires péri-tubulaires, en réponse aux besoins spécifiques de l'organisme. Ainsi, qu'ils se retrouvent au niveau de l'intestin ou bien des reins, les ions calciques sont en contact direct avec des cellules épithéliales qu'ils doivent traverser afin de pouvoir être disponibles pour les besoins de l'organisme. L'absorption de ces ions au niveau intestinal s'effectue par un processus actif, c'est-à-dire que les ions doivent vaincre le gradient électrochimique, alors que la réabsorption rénale se fait selon deux processus distincts, passif et actif, tout dépendant de la partie du néphron où ils se retrouvent.

Les os semblent être les organes les plus inertes de tout l'organisme, mais en réalité ils sont très actifs et dynamiques d'un point de vue métabolique. Ils sont continuellement en renouvellement grâce à l'action de deux types de cellules osseuses : les **ostéoblastes** qui synthétisent les fibrilles de collagène qui forment la majeure partie de la matrice osseuse et sur laquelle est déposée la phase minérale du calcium, et les **ostéoclastes** qui participent à

la résorption osseuse (83). Il a été démontré que les ostéoblastes jouent un rôle central dans la régulation du métabolisme osseux et de l'homéostasie calcique puisqu'ils sont responsables de la formation des os et qu'ils modulent la résorption osseuse via les ostéoclastes (6). Ainsi, grâce à ces deux types de cellules osseuses, il peut entrer ou sortir d'un squelette adulte en santé jusqu'à 500 mg de calcium par jour alors que la masse osseuse demeure constante. C'est ce qu'on appelle le « turnover » de la masse osseuse, où il n'y a aucun gain et aucune perte de calcium (38). Dans l'homéostasie calcique, la masse osseuse joue un rôle de tampon de la concentration de calcium sanguin. En fait, étant donné leur composition très riche en calcium, les os vont libérer des ions calciques lorsque la concentration sanguine de  $\text{Ca}^{2+}$  diminue de façon prolongée et, à l'inverse, en reprendre en cas d'excès (75). Ainsi, le squelette constitue un réservoir dynamique de sels de phosphate de calcium où l'organisme peut puiser ou emmagasiner des ions calcium selon le besoin, échanges qui sont régulés par différentes hormones (51).

### ***1.3 L'implication des différentes hormones calciotropes***

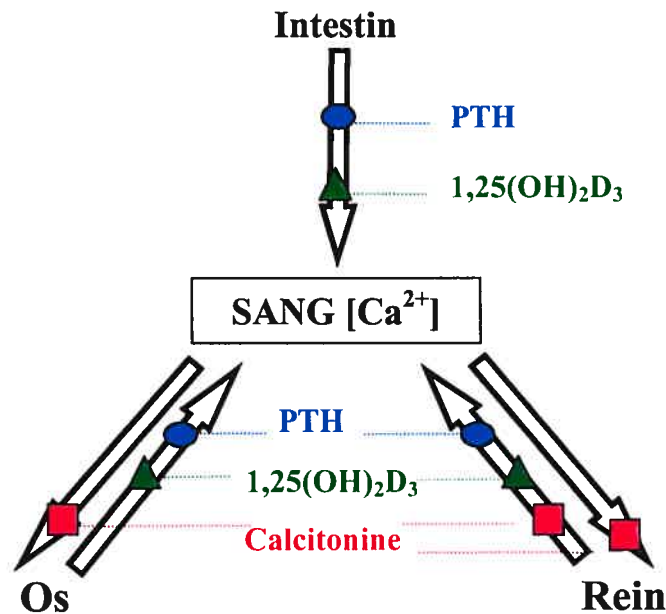
Tout dépendant des tissus, le transport de calcium est régulé par l'action d'hormones calciotropes qui agissent à court ou à long terme afin de maintenir l'homéostasie calcique, et ce bien souvent au détriment de la matrice osseuse qui représente la principale source de calcium à l'intérieur de l'organisme (75). Trois hormones en particulier ont été identifiées pour leur implication dans la régulation du transport de  $\text{Ca}^{2+}$  : la parathormone (PTH, « parathyroïde hormone »), la calcitonine et la 1,25-dihydroxyvitamine  $\text{D}_3$  [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] ou calcitriol (15, 42, 60) (figure 1.1). En fait, la boucle de régulation hormonale maintient normalement la concentration de calcium sérique dans un intervalle très étroit situé entre 2,1 et 2,6 mmol par litre de sang (83).

#### ***1.3.1 L'hormone parathyroïdienne***

L'**hormone parathyroïdienne** est un polypeptide formé de 84 acides aminés. Cette hormone est produite par les cellules principales des glandes parathyroïdiennes en réponse à un taux de calcium sanguin faible (hypocalcémie). La PTH est la principale hormone qui régule les concentrations extracellulaires de calcium chez les mammifères (4, 29). Lorsque



sécritée, cette hormone agit sur les trois organes cibles (os, reins et intestin) afin d'augmenter la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  sérique.



\* Adaptée de Voet et al. 1995

**Figure 1.1 : Boucle de régulation hormonale de l'homéostasie calcique**

Cette figure décrit l'implication des trois hormones calciotropes (PTH, calcitonine et  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) dans le contrôle du métabolisme du  $\text{Ca}^{2+}$ . Les flèches qui sont orientées à partir de l'un des trois organes cibles (os, rein, intestin) vers le sang indiquent que l'hormone agit sur cet organe afin d'augmenter la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  ionisé dans le sang; et l'inverse, les flèches orientées du sang vers un des organes indique que l'hormone agit sur le tissu afin de diminuer les concentrations sanguines de calcium.

L'hormone parathyroïdienne agit initialement sur les segments rénaux en réponse à une diminution de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  ionisé. En fait, cette hormone augmente la vitesse à laquelle le rein réabsorbe le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) du filtrat glomérulaire pour le retourner dans le sang. Cependant, cet effet de la PTH est limité à certains segments du néphron qui seront précisés ultérieurement (28).

Ensuite, lorsque la diminution des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  ionisé est soutenue, l'hormone parathyroïdienne stimule la production rénale de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  qui agit au niveau des cellules de la muqueuse intestinale en augmentant l'absorption de calcium. En fait, la PTH permet l'activation de la 25-hydroxyvitamine  $\text{D}_3$  1 $\alpha$ -hydroxylase (1 $\alpha$ -hydroxylase), enzyme rénale qui permet la transformation de la vitamine  $\text{D}_3$  en sa forme active, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (29). L'action de la PTH sur les cellules intestinales est donc indirecte et se fait via la forme active de la vitamine D.

Finalement, la PTH agit sur la masse osseuse lorsque la diminution de l'activité et des concentrations de calcium ionisé est sévèrement prolongée. En fait, la PTH augmente la vitesse d'excrétion rénale du phosphate, qui est le contre-ion du calcium dans l'os. La diminution de la concentration de phosphate sérique qui en découle entraîne, par loi d'action de masse, une fuite de  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  de l'os, ce qui augmente la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  ionisé. De plus, l'hormone parathyroïdienne stimule la résorption osseuse en augmentant le nombre et l'activité des ostéoclastes, cellules responsables de la résorption osseuse (6). Il en résulte une dégradation plus poussée de la matrice osseuse, ce qui libère du calcium ionique ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et du phosphate ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) dans le sang (15).

### ***1.3.2 La calcitonine***

La **calcitonine** a essentiellement un effet opposé à celui de la PTH puisqu'elle abaisse la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  ionisé; on dit alors que c'est un antagoniste de l'hormone parathyroïdienne. Cette hormone polypeptidique de 33 acides aminés est synthétisée par les cellules parafolliculaires, ou cellules C, de la glande thyroïde (74). Elle réduit la quantité de calcium et de phosphate sanguin en inhibant la résorption osseuse et la libération de calcium ionique de la matrice osseuse d'une part, et en stimulant le captage de  $\text{Ca}^{2+}$  et son incorporation à la matrice osseuse d'autre part (31). Cependant, le rôle précis de la calcitonine sur la régulation du transport de calcium au niveau des reins est controversé et encore incertain. En fait, certaines études indiquent que la calcitonine à des concentrations physiologiques ( $[\text{calcitonine}] \sim 5 \times 10^{-11} \text{ M}$ ) stimule la réabsorption rénale de calcium, au même titre que l'hormone parathyroïdienne (31). Par contre, des concentrations pharmacologiques de calcitonine ( $[\text{calcitonine}] > 10^{-9} \text{ M}$ ) entraînent un effet opposé, c'est-à-dire une inhibition de la réabsorption de  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui engendre une augmentation de l'excrétion de cet ion dans l'urine et ainsi une diminution de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  ionisé (31, 67). Dans le même sens, les observations de Gesek et *al* indiquent que la calcitonine participe à la régulation homéostatique de l'absorption rénale de  $\text{Ca}^{2+}$  dans des conditions physiologiques (31).

### 1.3.3 La 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>

Les **vitamines D** sont dérivées des stérols dans lesquels le noyau B de leur structure chimique est rompu au niveau de la liaison carbone-carbone 9,10. Il existe deux formes naturelles de cette vitamine : D<sub>3</sub> et D<sub>2</sub>. La vitamine D<sub>3</sub> est formée par l'action photolytique de la lumière UV sur le 7-déhydro-cholestérol qui est retrouvé dans la peau ou l'épiderme de la plupart des animaux supérieurs, tandis que la vitamine D<sub>2</sub> est formée par l'irradiation UV de l'ergostérol, stérol présent chez les plantes. Ainsi, la vitamine D<sub>3</sub> peut être produite de façon endogène par l'organisme, et ce, aussi longtemps qu'il a accès sur une base régulière à la lumière du soleil. Par contre, si une carence survient, celle-ci peut être comblée par l'ingestion quotidienne de vitamine D<sub>2</sub> provenant de source végétale ou encore de vitamine D<sub>3</sub> provenant de source animale. Qu'elle soit formée à l'intérieur de l'organisme suite à divers processus photochimiques ou bien ingérée, la vitamine D<sub>3</sub> est prise en charge par une protéine plasmatique de transport, la « vitamin D-binding protein » (DBP) qui la transporte jusqu'aux différents organes cibles (83).

La vitamine D<sub>3</sub> ne possède pas d'action hormonale à proprement parler, mais elle acquiert son activité biologique par deux hydroxylations séquentielles ultérieures à sa formation (ou ingestion), d'abord dans le foie puis dans les reins (25). En fait, la vitamine D<sub>3</sub> (forme inactive) est hydroxylée dans le foie en 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub>, en présence d'O<sub>2</sub> et de l'enzyme 25-hydroxylase. Puis, la 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub> est transportée vers le rein, où elle est à nouveau hydroxylée, cette fois par une oxygénase mitochondriale, la 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase (1 $\alpha$ -hydroxylase), ce qui conduit à la 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] ou le calcitriol, qui est la forme hormonale active de la vitamine D<sub>3</sub> (25). L'activité de la 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub> 1- $\alpha$ -hydroxylase au niveau rénal est régulée par la PTH, tel que décrit précédemment.

Tout comme pour la production de la PTH et de la calcitonine, la production de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> est modulée en fonction des niveaux de calcium sérique; une baisse de la concentration de calcium sérique en deçà de sa limite normale de concentration qui se situe entre 8,5 et 11 mg/dl (2,1-2,6 mmol/L) (74) entraîne la libération de la PTH par les glandes parathyroïdiennes. La PTH permet l'activation de l'enzyme rénale 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase (1 $\alpha$ -hydroxylase) qui favorise la seconde hydroxylation de la vitamine D<sub>3</sub>,

conduisant ainsi à la forme active de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Ainsi, parallèlement à l'action de la PTH, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  joue un rôle déterminant dans l'homéostasie calcique en provoquant l'augmentation du calcium sérique, et ce, via une action sur les trois organes cibles (16). Sur le tissu osseux, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  favorise la résorption osseuse ce qui entraîne la libération de calcium dans le sang (9, 15). Au niveau intestinal, cette hormone permet l'augmentation de l'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$  circulant alors qu'au niveau rénal, elle stimule la réabsorption calcique (5, 16, 78, 84).

#### *1.3.4 Le mode d'action de ces hormones*

Ces hormones, qui contrôlent le transport de calcium transcellulaire, agissent à deux niveaux : au **niveau génomique** en modifiant le taux de transcription de certaines protéines de transport ou encore au **niveau des protéines de transport** elles-mêmes en altérant leur activité ou en facilitant leur insertion à la membrane plasmique ou leur recapture. La vitesse d'action d'une hormone calciotrope, c'est-à-dire le temps que prend cette hormone pour exercer son effet de régulation sur le calcium, permet de déterminer à quel niveau elle agit. Ainsi, le début d'action relativement lent de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  représente une indication que cette hormone agit au niveau génomique, et inversement, l'action presque instantanée de la PTH et de la calcitonine permet de supposer que toutes deux agissent sur une protéine de transport de  $\text{Ca}^{2+}$  déjà existante (42). Bien que des études démontrent que la calcitonine agit plus rapidement que la PTH sur le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  (calcitonine = 2 min vs PTH > 8 min), ces deux hormones calciotropes sont considérées comme ayant un temps d'action rapide (31).

Des études récentes démontrent que la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , qui par son temps d'action lent semble agir au niveau génomique, augmente les quantités d'ARNm de certaines protéines impliquées dans l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ , soit un canal calcique épithélial (ECaC) ainsi qu'une protéine de transport de  $\text{Ca}^{2+}$  (CaBP) qui est retrouvée dans le cytosol des cellules épithéliales. Ces résultats suggèrent que la transcription de ces protéines de transport est régulée à la hausse par la forme active de la vitamine  $\text{D}_3$  (16, 40, 42). Le rôle et le mode de fonctionnement de ces protéines seront décrits ultérieurement.

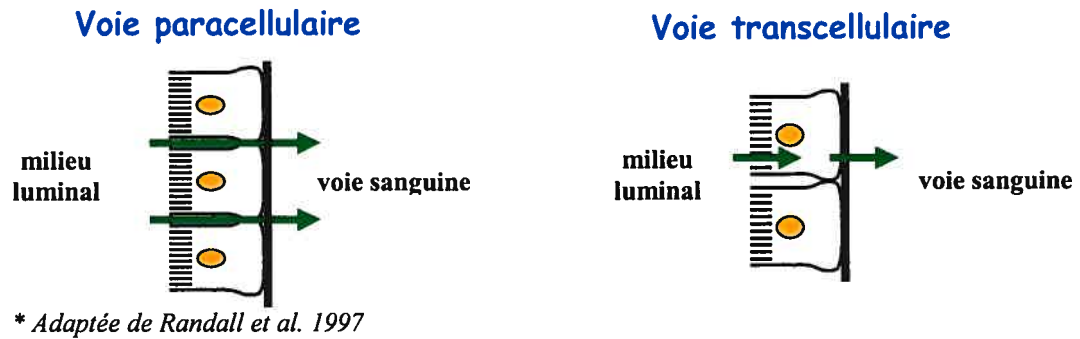
Contrairement à la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , l'action de la PTH et de la calcitonine semble s'effectuer directement sur les protéines impliquées dans le transport transcellulaire. Ainsi, leur action sur ces protéines responsables de la réabsorption calcique est médiée via la stimulation de l'adénylate cyclase (AC), l'accumulation de l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPC) et une activation subséquente de la protéine kinase A (PKA) (9, 28). En fait, certaines études démontrent qu'une augmentation de la réabsorption de  $\text{Ca}^{2+}$  est observée lorsque des cellules épithéliales sont traitées avec des analogues de l'AMPC ou la forskoline, qui sont perméables à la membrane plasmique. De plus, une augmentation marquée de l'activité de l'adénylate cyclase accompagne l'augmentation du transport de calcium provoquée par les hormones PTH et calcitonine (42). Bien que l'adénylate cyclase apparaît à première vue comme étant une voie de signalisation importante pour les hormones calciotropes à action rapide, des études menées par Hoenderop et *al* démontrent que le transport de calcium n'est pas altéré lorsque l'augmentation de l'AMPC intracellulaire est freinée par un inhibiteur de l'adénylate cyclase, le 2',5'-didéoxyadénosine (42). Des études subséquentes ont permis de démontrer que d'autres voies de signalisation sont possiblement empruntées par la PTH et la calcitonine dans la réabsorption calcique (29, 42). Ainsi, des données expérimentales suggèrent que la PTH est capable d'activer deux cascades de signalisation : la première est celle de l'adénylate cyclase précédemment décrite, et la seconde est celle impliquant la phospholipase C qui entraîne une accumulation de l'Inositol-1,4,5-triphosphate ( $\text{InsP}_3$ ) et du diacylglycérol, suivie d'une activation de la protéine kinase C (PKC) (10, 29, 40). De façon similaire, des études menées par Poujeol et *al* démontrent une implication directe de la phospholipase C (PLC) dans l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$  lorsqu'il y a une stimulation par la calcitonine (67).

#### **1.4 Le transport du $\text{Ca}^{2+}$ dans les différents segments du néphron**

Les reins ont une fonction essentielle au maintien de l'homéostasie du milieu extracellulaire : ils règlent le volume, la composition ionique, le pH, l'osmolalité ainsi que le contenu en divers solutés. Ces organes vitaux, au nombre de deux, sont formés de trois parties distinctes : le cortex qui constitue la couche externe, la médulla qui représente la partie interne et le bassinnet ou pelvis rénal. Chaque rein contient plus d'un million de

néphrons qui sont situés dans le cortex et s'enfoncent jusque dans la médulla. Chaque néphron est constitué d'un **corpuscule rénal** qui filtre le liquide et qui se compose d'un glomérule entouré d'une structure épithéliale appelée capsule de Bowman. Ce corpuscule est suivi par un **tubule rénal** qui se sépare en une partie proximale et une partie distale. La partie proximale est formée du tubule contourné proximal et de l'anse de Henlé alors que la partie distale du néphron est formée du tubule contourné distal, du tubule connecteur et de la portion initiale du tube collecteur cortical (67).

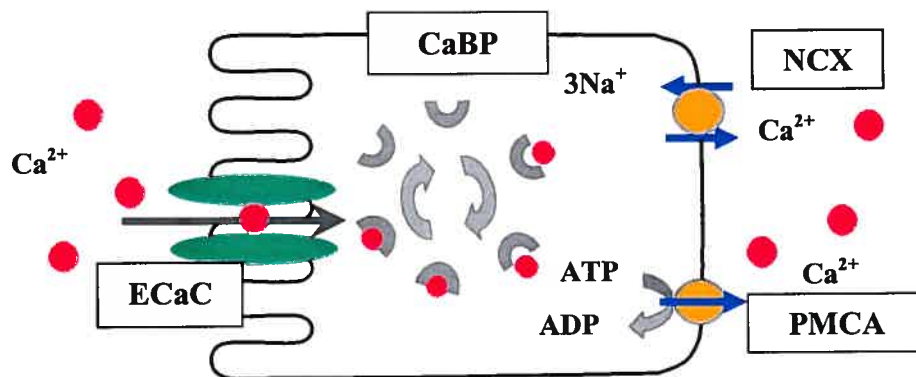
Le calcium qui est filtré au niveau du glomérule, soit environ 8 g de  $\text{Ca}^{2+}$  par jour, circule à travers les différents segments du tubule rénal où il est réabsorbé en fonction de la composition cellulaire de chaque segment. La majeure partie de la réabsorption calcique se fait à l'intérieur du tubule contourné proximal et dans la branche large de l'anse ascendante de Henlé par voie paracellulaire. Cette réabsorption **paracellulaire** est un processus passif, c'est-à-dire qu'elle se fait d'une zone de forte concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  (milieu luminal) vers une zone où la concentration calcique est plus faible (voie sanguine). Ce gradient électrochimique transépithélial est généré grâce à la réabsorption de sodium et d'eau (40). Cette diffusion passive du calcium vers la circulation sanguine est un processus non-saturable qui se fait entre les cellules épithéliales des différents segments impliqués puisque la jonction qui unit ces cellules est de type lâche. La réabsorption du  $\text{Ca}^{2+}$  se poursuit dans la partie distale du néphron pour des quantités d'environ 15% à 20% de la charge de  $\text{Ca}^{2+}$  filtrée (40, 42). La haute résistance transépithéliale présente au niveau de ces segments du néphron ne permet plus le passage des ions calciques via la voie paracellulaire, mais favorise plutôt l'apparition d'un mécanisme transcellulaire qui est sous le contrôle des hormones calciotropes précédemment décrites (40, 42, 67). Cette réabsorption de  $\text{Ca}^{2+}$  par voie **transcellulaire** est, quant à elle, un processus saturable qui s'effectue en trois étapes. Tout d'abord, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  diffusent à travers la membrane apicale pour atteindre le milieu intracellulaire selon le gradient de concentration, sans utilisation d'énergie. Les ions sont ensuite pris en charge par des protéines de liaison qui facilitent leur diffusion cytosolique jusqu'à la membrane basolatérale. Cependant, l'extrusion de ces cations à travers la membrane basolatérale jusque dans la voie sanguine se fait contre un gradient électrochimique ce qui nécessite l'utilisation d'énergie (ATP). Les ions calciques atteignent donc la circulation sanguine en traversant les cellules épithéliales puisque celles-ci sont reliées entre elles par des jonctions de type serré (65) (figure 1.2).



**Figure 1.2 :** Voies paracellulaire et transcellulaire pour la réabsorption de calcium au niveau des cellules épithéliales.

### 1.5 La réabsorption du calcium via la voie transcellulaire

Le mouvement transcellulaire du calcium à travers les cellules épithéliales des néphrons est un processus très complexe (28). Au niveau cellulaire, la réabsorption transcellulaire de calcium est généralement décrite comme un processus en trois étapes consistant en 1) une **entrée passive** du  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane apicale selon un gradient de concentration, 2) une **diffusion cytosolique** du  $\text{Ca}^{2+}$  facilitée par les protéines de liaison du calcium dépendante de la vitamine D, les « calbindines » et 3) une **sortie active** du  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane basolatérale contre un gradient de concentration via un échangeur sodium-calcium et/ou une pompe à haute affinité  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (38, 42, 60, 73, 81) (figure 1.3).



\* Adaptée de Hoenderop et al. 2000 (ref.42)

**Figure 1.3 :** Modèle proposé pour la réabsorption transcellulaire.

À la membrane apicale, la présence du canal ECaC permet l'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (points rouges). Une fois dans le milieu intracellulaire, ces ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont pris en charge par des protéines de liaison, les CaBP, qui permettent le transport du calcium de la face apicale jusqu'à la face basolatérale. À la membrane basolatérale se retrouvent deux protéines membranaires, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) et la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) qui permettent l'extrusion des ions  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule.

### 1.5.1 Entrée apicale du $\text{Ca}^{2+}$

Le passage du  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la double couche lipidique pour atteindre le cytoplasme est un processus passif en ce sens que ce mouvement n'entraîne aucune dépense d'énergie. Cependant, et ce même si le gradient électrochimique est élevé ( $10^{-3}$  M  $\text{Ca}^{2+}_{\text{ext}} \rightarrow 10^{-7}$  M  $\text{Ca}^{2+}_{\text{int}}$ ;  $\Delta \Psi \approx 30$  mV, intérieur négatif) et favorise la diffusion simple des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , l'influx de calcium à l'intérieur des cellules requiert la participation d'une protéine « facilitatrice » qui permet le passage d'ions à travers une membrane phospholipidique et hydrophobe (28, 84). L'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à la membrane apicale s'avère être l'étape limitante dans ce processus transépithélial puisque l'entrée détermine la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) et ainsi le nombre d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  disponibles pour la sortie à la membrane basale (68).

### 1.5.2 Diffusion cytosolique du $\text{Ca}^{2+}$

Au niveau des reins, on retrouve la calbindine- $\text{D}_{28\text{K}}$  qui est exclusivement localisée à l'intérieur des cellules du tubule contourné distal, du tubule connecteur et de la portion initiale du tube collecteur cortical (73). C'est d'ailleurs dans ces segments distaux du néphron que s'effectue la réabsorption transcellulaire des ions calcium (33). Cette protéine de liaison est uniformément distribuée dans le cytosol et à l'intérieur du noyau. Le calcium se lie aux quatre sites actifs de liaison de la calbindine- $\text{D}_{28\text{K}}$  avec une très haute affinité ( $K_a 2,1 \times 10^6$  M) (33). Ainsi, la calbindine- $\text{D}_{28\text{K}}$  est décrite comme étant une protéine de transport qui facilite la diffusion cytosolique du  $\text{Ca}^{2+}$  et, par conséquent, permet une augmentation du flux calcique de la face apicale à la face basolatérale (25, 47). De plus, cette protéine agit comme un tampon intracellulaire afin de maintenir de faibles concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  libre durant le transport transcellulaire ce qui permet de maintenir le gradient électrochimique (33, 42, 47). Certaines données expérimentales suggèrent que la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimule la réabsorption de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau rénal en augmentant l'expression de la calbindine- $\text{D}_{28\text{K}}$  (8, 47, 65, 78).



### 1.5.3 *Sortie basolatérale du Ca<sup>2+</sup>*

L'extrusion du Ca<sup>2+</sup> à travers la membrane basolatérale des cellules polarisées de la partie distale du néphron se fait contre un gradient électrochimique considérable ce qui nécessite l'utilisation d'énergie (68). Afin de permettre cette sortie active, deux protéines de transport de Ca<sup>2+</sup> se retrouvent à la membrane basale : un échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) et une pompe à haute affinité Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) (11, 42). L'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, qui est une protéine membranaire intrinsèque (50), représente le principal mécanisme pour la sortie active de Ca<sup>2+</sup> à travers la membrane basale. Bien que différentes stœchiométries aient été décrites pour cet échangeur (3:2, 4:1) (22, 26, 52), il semble que l'échange généré par cette protéine soit généralement de 3:1, c'est-à-dire qu'elle permet l'entrée de trois ions Na<sup>+</sup> couplée à la sortie d'un seul ion Ca<sup>2+</sup> (11, 42, 70, 84, 86). L'activité de cet échangeur nécessite l'existence d'un gradient de sodium ( $[Na^+]_o \gg [Na^+]_i$ ) qui est produit grâce à la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase qui permet la sortie des ions sodium par transport actif primaire suite à l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> est un système de transport actif secondaire (26). Cependant, l'action de cette protéine est insuffisante pour assurer une sortie en assez grande quantité de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, ce qui suggère l'existence d'un second mécanisme d'extrusion calcique (40). Il a été démontré que la pompe Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) joue un rôle important, quoique secondaire, dans l'extrusion de calcium (11, 40). Afin de pomper les ions Ca<sup>2+</sup> vers l'extérieur des cellules épithéliales rénales, la Ca<sup>2+</sup>-ATPase utilise le transport actif primaire suite à l'hydrolyse de l'ATP ( $ATP + H_2O \rightarrow ADP + Pi$ ). Ainsi, pour une molécule d'ATP hydrolysée, un ion Ca<sup>2+</sup> est expulsé hors de la cellule (83). L'activité de cette protéine est présente dans chaque segment du néphron, mais cette activité est plus marquée dans les segments où se produit la réabsorption transcellulaire (28).

### 1.6 *ECaC1 : clonage et expression fonctionnelle*

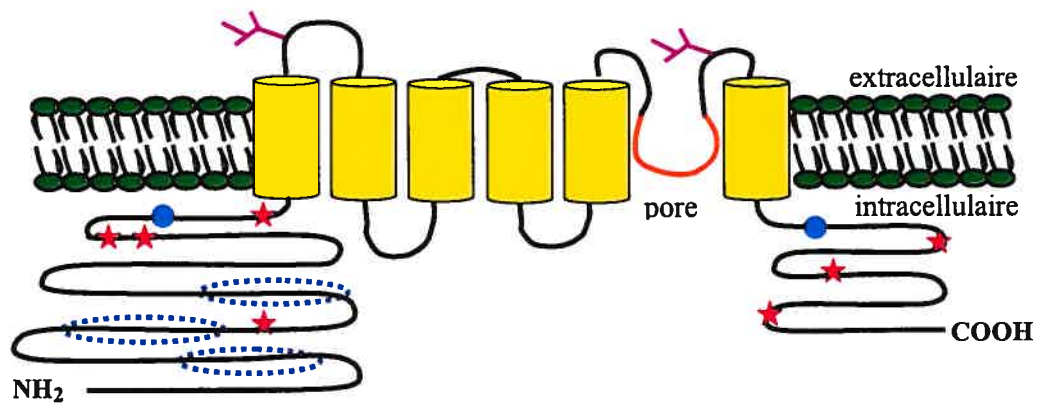
C'est en 1999 que Hoenderop et ses collègues ont identifié une protéine responsable de l'entrée apicale de Ca<sup>2+</sup> : le canal calcique épithélial (ECaC1) cloné à partir du tubule connecteur d'un rein de lapin (38). Des analyses fonctionnelles et morphologiques effectuées par Hoenderop et ses collègues (37) suite au clonage de ECaC1 révèlent que ce

canal calcique épithélial, nommé ainsi par analogie avec le canal sodique épithélial récemment cloné (ENaC) (38), possède toutes les propriétés requises pour être la porte d'entrée du transport transcellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, l'identification de ce canal calcique fournit de nouvelles opportunités pour l'étude du transport transcellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur des cellules polarisées. Cette entrée apicale de calcium se produit uniquement dans les épithélia sensibles à la 1,25-dihydroxyvitamine  $\text{D}_3$  c'est-à-dire les reins, l'intestin grêle et le placenta (37). Par immunohistochimie, Hoenderop et al. ont fourni des preuves permettant de démontrer le rôle de ECaC comme porte d'entrée de la réabsorption active de  $\text{Ca}^{2+}$  : 1) ECaC est présent dans les segments rénaux impliqués dans la réabsorption de  $\text{Ca}^{2+}$ , 2) ECaC est toujours localisé à la membrane apicale, 3) ECaC est colocalisé avec les protéines de transport de  $\text{Ca}^{2+}$  associées, c'est-à-dire, la calbindine- $\text{D}_{28\text{K}}$ , l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; il complète donc la famille de protéines impliquées dans le transport calcique transépithélial à l'intérieur des reins (37). De plus, le canal calcique ECaC s'avère être la cible principale pour la régulation hormonale du flux actif de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir de la membrane apicale jusque dans le compartiment sanguin ce qui signifie que cette protéine représente l'étape limitante dans ce processus de transport (40).

L'ADN complémentaire du canal ECaC du lapin contient 2 190 nucléotides qui codent une protéine de 730 acides aminés avec une masse moléculaire correspondant environ à 83 kDa (38, 40, 57). Des analyses d'hydrophobicité suggèrent une topologie de six segments transmembranaires (S1-S6), incluant deux sites de N-glycosylation ainsi qu'une région hydrophobe entre les segments S5 et S6, région putative du pore (figure 1.4).

Des analyses laissent supposer que, afin de constituer un canal cationique fonctionnel qui permet un influx d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la cellule, quatre domaines s'unissent pour créer une structure tétramérique (40). Chacun de ces domaines est formé de six segments transmembranaires (S1-S6) et de deux extrémités hydrophiles : une extrémité amino-terminale constituée de 327 acides aminés contenant trois domaines d'attache (« ankyrin repeat ») et une extrémité carboxy-terminale formée de 151 acides aminés. Chacune des extrémités possède des domaines potentiels de régulation, incluant des sites de phosphorylation à la protéine kinase C (PKC) et à la protéine kinase A (PKA) ainsi que des motifs PDZ (38, 40). Les **domaines d'attache** sont des séquences de protéines responsables d'interactions avec des protéines impliquées dans l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  telles

que les récepteurs d'inositol triphosphate (InsP<sub>3</sub>) ainsi que les récepteurs à la ryanodine. Des études indiquent que les isoformes de la PKC jouent un rôle important de régulation dans la stimulation hormonale de la réabsorption transcellulaire de Ca<sup>2+</sup> (23, 42). Il est ainsi possible que la PKC phosphoryle directement le canal ECaC afin de réguler son activité. Les motifs PDZ sont, quant à eux, des séquences d'acides aminés formées de 80 à 90 résidus. Le rôle attribué à ces motifs PDZ est de permettre des interactions entre différentes protéines ce qui facilite divers processus cellulaires (liaison du canal au cytosquelette, phosphorylation). Bien que les études démontrent la présence de ces sites de régulation dans la structure du canal ECaC, leurs rôles restent à déterminer (40).



\* Adaptée de Hoenderop et al. 2000 (ref.42)

**Figure 1.4 :** Représentation schématique de la structure secondaire proposée pour le canal calcique épithélial ECaC.

Les *cylindres jaunes* représentent les segments transmembranaires (S1-S6), la *boucle orange* représente la région putative du pore, les *branches roses* les sites de N-glycosylation, les *points bleus* les motifs PDZ, les *étoiles rouges* les sites de phosphorylation à la PKC et les *cercles pointillés bleus* représentent les domaines d'attache.

### 1.7 ECaC est un canal de la famille des TRP

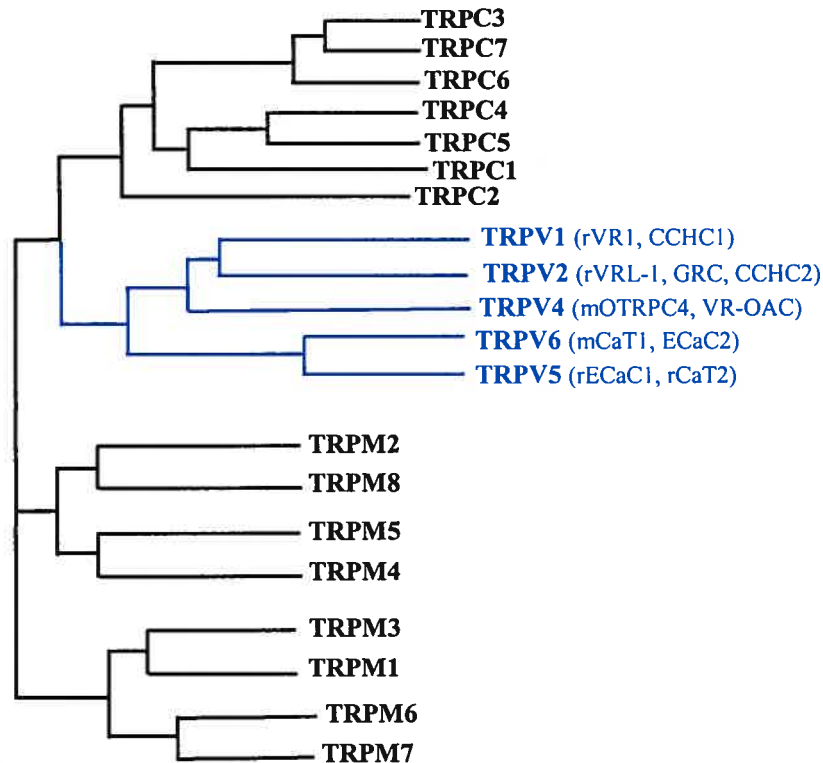
De par sa structure secondaire constituée de six segments transmembranaires (S1-S6) et de deux extrémités intracellulaires (amino-terminale et carboxy-terminale), le canal ECaC s'intègre dans la super famille des canaux TRP (« transient receptor potential »). En fait, les membres de cette super famille partagent plusieurs séquences homologues à l'intérieur de leur structure primaire et possèdent plusieurs similarités au niveau de leur structure secondaire (55). La super famille des TRP inclut une diversité de canaux

cationiques qui ne dépendent pas du voltage membranaire pour leur activation et qui possèdent une perméabilité pour les cations monovalents ainsi que pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (39, 55). Cette super famille de canaux ioniques est, à ce jour, constituée de 20 protéines mammaliennes qui sont homologues au canal archétypal TRP initialement identifié à l'intérieur des photorécepteurs de *Drosophila melanogaster* (18, 32, 89). Ces protéines sont largement distribuées à l'intérieur de différents organes de mammifères tels le cerveau, le cœur, les reins, le foie, l'intestin et la prostate (54). Bien que certaines études suggèrent que l'activation ou la modulation de certains canaux TRP se fasse via la cascade de signalisation du phosphatidylinositol (12, 14, 18), il s'est avéré que la sélectivité et le mode d'activation des canaux TRP soient très variables d'une protéine à l'autre (39, 55).

La super famille des canaux TRP peut être divisée, selon la séquence d'acides aminés homologues à l'intérieur de leur structure primaire, en trois sous-familles désignées selon Harteneck (32) par « short » (TRPCx où C indique « canonique »), « osm-9-like » ou « vanilloïde » (TRPVx) et « long » ou « mélastatine » (TRPMx) (figure 1.5) (18, 39, 55). Ainsi, bien que la fonction physiologique spécifique associée à chacun de ces canaux demeure inconnue, la classification, basée sur une homologie de séquences, suggère un rôle potentiel commun (32).

Les segments transmembranaires S1-S6 ainsi que la région putative du pore située entre les segments S5 et S6 représentent les structures les plus importantes des protéines TRP. La présence de cette région du pore qui est semi-transmembranaire, c'est-à-dire qu'elle ne traverse pas la membrane, rappelle vaguement la région du pore des canaux cationiques et suggère que les protéines TRP fonctionnent comme des canaux. De plus, certaines parties de cette structure s'avèrent être les régions les plus conservées parmi les différentes familles de ces protéines. L'extrémité amino-terminale de chacune de ces protéines TRP contient trois ou quatre domaines d'attache qui sont hautement conservés à travers l'évolution, ce qui laisse croire à un rôle essentiel associé à ces domaines, bien qu'il soit encore inconnu (54). Parmi les trois sous-familles (TRPCx, TRPVx, TRPMx), la région qui est la plus conservée, dite région TRP, se situe à la partie proximale de l'extrémité carboxyle, tout près du segment S6. Cette région comprend 25 acides aminés, dont six d'entre eux (Glu-Trp-Lys-Phe-Ala-Arg) représentent la « boîte TRP » qui a été nommée ainsi puisque la séquence des acides aminés est invariable d'une protéine TRP à

l'autre (18, 54). Bien que la fonction précise de cette région unique soit encore inconnue, il semble que celle-ci joue un rôle essentiel dans la détermination des propriétés d'ouverture et de fermeture (« gating ») du canal (18). Le segment le plus distinctif de ces protéines est localisé à la partie distale de l'extrémité carboxyle (18). Bien que peu homologues d'une protéine à l'autre, ce segment contient un domaine riche en proline (18).



*\*Tirée de Clapham et al. 2001*

**Figure 1.5 : Arbre phylogénétique de la super famille des TRP**

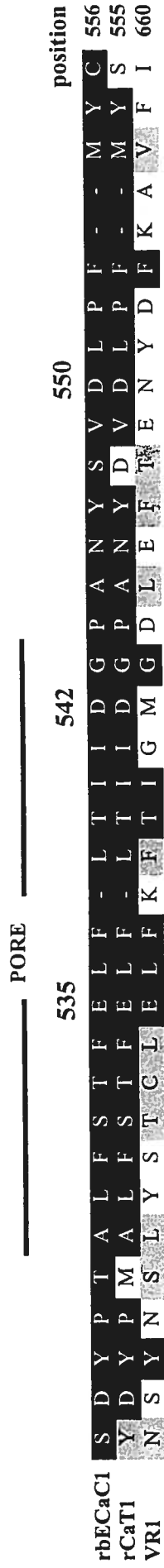
Arbre phylogénétique représentant les distances évolutives entre les différentes protéines regroupées à l'intérieur de la super famille des TRP.

Le canal ECaC se retrouve dans la sous-famille des TRPV qui compte cinq membres groupés à l'intérieur de trois groupes distincts. TRPV1 et TRPV2 représentent les récepteurs vanilloïdes VR-1 et VRL-1 qui sont des canaux cationiques non-sélectifs avec une perméabilité calcique élevée et qui sont impliqués dans la transduction des stimuli reliés à la douleur et la chaleur (18, 30, 32). Le groupe TRPV4 inclut les protéines OTRPC4 et VR-OAC qui sont activées par des stimuli physique ou chimique, ou encore par des stress osmotique ou mécanique (32). Les groupes TRPV5 et TRPV6 sont composés de canaux sélectifs au  $\text{Ca}^{2+}$  et comprennent respectivement les canaux ECaC1/CaT2 (canal calcique épithélial / transporteur de calcium) et ECaC2, aussi appelés CaT1 (18).

Ainsi, le canal calcique épithélial ECaC1 cloné à partir du rein de lapin appartient au groupe TRPV5. ECaC1 possède seulement 30 % d'homologie avec les récepteurs vanilloïdes (groupe TRPV1), mais il est similaire avec 66 % d'homologie aux canaux ECaC2 et CaT1 du groupe TRPV6 qui ont été clonés à partir du duodénum de rat (18) (figure 1.6).

En fait, des analyses génomiques démontrent que les canaux calciques ECaC1 et ECaC2 originent de deux gènes juxtaposés sur le chromosome 6 de la souris de même que sur le chromosome humain 7q35 avec une distance approximative de 50 kb, ce qui suggère une duplication de ces gènes au cours de l'évolution (39, 43, 44, 56, 85).

Le pourcentage élevé d'homologie entre les groupes TRPV5 et 6 permet de supposer une fonction physiologique similaire pour ces protéines. En effet, des études démontrent que le rôle possible associé aux canaux calciques ECaC1 et ECaC2 (CaT1) est de permettre l'absorption transcellulaire de calcium à l'intérieur des cellules épithéliales de différents tissus (reins, duodénum, placenta) (40, 85, 88). Ainsi, ECaC1 et ECaC2 sont des canaux homologues avec une région du pore presque identique qui jouent un rôle primordial dans l'homéostasie calcique (39, 43).



\* Adaptée de Hoenderop et al. 2001 (ref.43) et Garcia-Martinez et al. 2000

**Figure 1.6 :** Séquences des acides aminés de la région du pore de trois canaux de la famille TRP

Cette figure présente la séquence des acides aminés retrouvés dans la région présumée du pore du récepteur vanilloïde VR1 (GenBank accession no. AF029310), ainsi que celle des canaux calciques épithéliaux ECaC1 du lapin (GenBank accession no. AJ133128) et ECaC2 (CaT1) du rat (GenBank accession no. AF160798). Les résidus identiques apparaissent dans les boîtes noires, les résidus conservés par une substitution sont retrouvés dans les boîtes grises et les acides aminés non conservés sont dans les boîtes blanches. La séquence des acides aminés où se situe la région présumée du pore est également identifiée. Les résidus glutamate (E) à la position 535 et aspartate (D) aux positions 542 et 550 retrouvés sur le canal rbECaC1 sont identifiés.

## 1.8 Affinité et perméabilité des canaux $Ca^{2+}$ : concepts de base

### 1.8.1 Les canaux calciques dépendants du voltage

Les **canaux calciques dépendants du voltage** sont des protéines intrinsèques de la membrane plasmique de différents types de cellules excitables qui permettent l'entrée rapide des ions  $Ca^{2+}$  à l'intérieur des cellules en réponse à une dépolarisation membranaire (77). Ainsi, l'ouverture de ces canaux se fait suite à une modification directe du potentiel de membrane. Au cours des dernières décennies, les canaux calciques dépendants du voltage ont été largement étudiés ce qui a permis de révéler la grande diversité de ces protéines membranaires. Ces découvertes ont permis de faire une classification de ces canaux beaucoup plus juste et détaillée que celle présentée pour la super famille des canaux TRP qui sont non dépendants du potentiel membranaire. L'électrophysiologie cellulaire permet une approche fonctionnelle de l'activité des canaux calciques par la mesure directe du courant transmembranaire généré par le passage des ions  $Ca^{2+}$  (58). En effet, les études électrophysiologiques de ces protéines dépendantes du potentiel membranaire ont permis de révéler différents courants  $Ca^{2+}$  désignés par L-, N-, P-, Q-, R- et T-type et qui possèdent chacun différentes propriétés physiologiques et pharmacologiques (tableau I) (17, 58, 66). La diversité des canaux calciques a pu être établie grâce au développement de différentes techniques électrophysiologiques, le *voltage-clamp* et le *patch-clamp*, qui permettent la mesure de courant transitoire au niveau d'une cellule isolée ou encore d'un canal unique (58).



**Tableau I** Présentation des propriétés biophysiques et pharmacologiques ainsi que des fonctions associées aux différents types de canaux  $Ca^{2+}$  dépendants du voltage

Canal $Ca^{2+}$	Type de courant $Ca^{2+}$	Activation/ Inactivation	Bloqueur spécifique	Distribution principale	Fonctions
<b>Cav1.1</b>	L		DHP	Muscle squelettique	Couplage excitation/contraction Homéostasie $Ca^{2+}$ Régulation de l'expression de gènes
<b>Cav1.2</b>	L	haut seuil (- 20 mV) / lente	DHP	Muscle cardiaque Cellules endocrines Neurones	Couplage excitation/contraction Sécrétion hormonale Régulation de l'expression de gènes
<b>Cav1.3</b>	L		DHP	Cellules endocrines Neurones	Sécrétion hormonale Régulation de l'expression de gènes
<b>Cav1.4</b>	L		-	Rétine	Relargage de neurotransmetteur
<b>Cav2.1</b>	P/Q	haut seuil / modérée	$\omega$ -agatoxine	Nerfs terminaux Dendrites	Relargage de neurotransmetteur $\uparrow Ca^{2+}$ dendritique transitoire
<b>Cav2.2</b>	N	haut seuil (- 30 mV) / modérée	$\omega$ -CTX-GVIA	Nerfs terminaux Dendrites	Relargage de neurotransmetteur $\uparrow Ca^{2+}$ dendritique transitoire
<b>Cav2.3</b>	R	haut seuil / rapide	$\omega$ -agatoxine	Corps cellulaires Dendrites Nerfs terminaux	Potentiel d'action dépendant du $Ca^{2+}$ Relâchement de neurotransmetteur
<b>Cav3.1</b>	T		Aucun	Muscle cardiaque Muscle squelettique Neurones	Activité « pacemaker »
<b>Cav3.2</b>	T	bas seuil (- 70 mV) / rapide	Aucun	Muscle cardiaque Neurones	Activité « pacemaker »
<b>Cav3.3</b>	T		Aucun	Neurones	Activité « pacemaker »

\* Adapté de Catterall 2000 et Nargeot et al. 1994.

### 1.8.2 Les différentes techniques électrophysiologiques

C'est au début des années 50 que Hodgkin et Huxley ont développé une ingénieuse technique permettant de mesurer les courants électriques, la technique du *voltage imposé* (voltage-clamp), et ont par la suite et grâce à cette technique, publié une étude portant sur la cinétique des changements de perméabilité. La technique du voltage imposé, initialement expérimentée sur l'axone du calmar géant, utilise un amplificateur de rétroaction qui permet de modifier le  $V_m$  (voltage membranaire) brusquement et, par la suite, de le maintenir à une valeur prédéterminée. Le  $V_m$  maintenu constant, la cinétique des courants ioniques transmembranaires qui sont engendrés par cette modification du voltage peut ainsi être mesurée (69). Au cours d'une expérience en voltage imposée, deux électrodes de verre de faible diamètre ( $< 1,0 \mu\text{m}$ ) sont insérées à l'intérieur de la cellule : une permettant de maintenir le voltage membranaire présélectionné constant et la seconde permettant l'enregistrement des courants ioniques intracellulaires (entrant ou sortant) générés par ce voltage, reflétant ainsi les propriétés de conductance membranaire. En fait, le courant enregistré par cette électrode représente le courant qui doit être injecté afin de maintenir le  $V_m$  sélectionné. Afin de caractériser les courants ioniques, plusieurs techniques de voltage imposé ont été développées. En 1981, Neher et Sackmann ont mis au point la méthode du « patch-clamp », une variante de la méthode du voltage imposé à deux électrodes. Dans cette approche, une seule électrode « collée » à la membrane cellulaire impose le voltage et mesure les courants. Une technique fréquemment utilisée est la configuration *cellule entière* (whole-cell) qui permet d'enregistrer l'activité électrique de l'ensemble de la membrane cellulaire, c'est-à-dire le courant à travers l'ensemble des canaux retrouvés à la membrane cellulaire (58, 69). L'enregistrement de courants provenant d'un seul type de canal est possible en injectant de l'ARNc de ce canal à l'intérieur d'un système d'expression qui, suite à une période d'incubation plus ou moins longue, permet au canal de s'exprimer à la membrane. De part leur grosse taille ( $\sim 1,0 \text{ mm}$ ) qui facilite les manipulations en laboratoire, les ovocytes de *Xenopus laevis* représentent un des systèmes d'expression le plus couramment utilisé en électrophysiologie (69). La présence de canaux  $\text{Cl}(\text{Ca})$  endogènes représente un des principaux problèmes rencontrés lorsque les ovocytes de Xénope sont utilisés pour l'expression de canaux ioniques (6). Ce problème s'avère encore plus délicat lors de l'expression de canaux calciques puisque l'expression de ces derniers favorise l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui stimule davantage l'entrée d'ions  $\text{Cl}^-$ . Ainsi, afin de

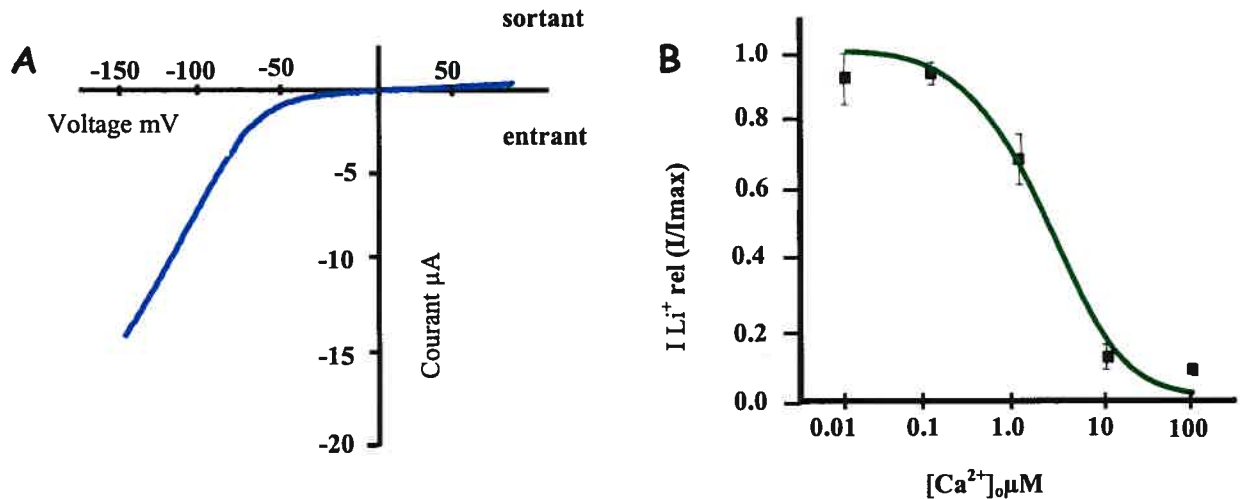
s'assurer que l'enregistrement correspond uniquement aux courants générés par le canal exogène, l'activation des conductances endogènes de  $\text{Cl}^-$  doit être inhibée soit par l'addition dans le bain d'un inhibiteur de canaux  $\text{Cl}^-$  tel que l'acide niflumique, soit en injectant les ovocytes avec des agents chélateurs de  $\text{Ca}^{2+}$ , tels que l'EGTA ou le BAPTA (6).

### *1.8.3 Les propriétés de perméabilité et d'affinité*

Actuellement, différents types d'expériences développées en électrophysiologie permettent de déterminer les propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux. Tout d'abord, en imposant à la membrane différents potentiels électriques, une courbe de **relation courant-voltage** (figure 1.7a) peut être tracée démontrant ainsi les changements des courants ioniques en fonction du voltage membranaire. Cette courbe permet de déterminer la perméabilité du canal. La propriété de **perméabilité** d'un canal calcique fait référence au flux généré par le passage des ions  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur du pore du canal. Cette propriété est mesurée par la conductance du canal ( $G=I/V$ , où  $G$ =conductance,  $I$ =courant et  $V$ =voltage). De plus, la relation courant-voltage permet de déterminer s'il existe une rectification des courants, c'est-à-dire un voltage où le courant (entrant ou sortant) ne s'écoule plus aussi facilement à l'intérieur du pore du canal.

Une seconde expérience couramment réalisée en électrophysiologie afin d'étudier les propriétés de perméabilité d'un canal est la fraction molaire anormale et les effets qui lui sont associés (« anomalous mole fraction effects » ou AMFE) (49). L'AMFE d'un canal se détermine à partir de mesures de la conductance du canal à l'état ouvert dans des solutions mixtes de deux électrolytes qui sont perméables dans le canal à l'étude (61). Il a été démontré que la majorité des canaux ioniques placés dans des solutions mixtes de deux électrolytes perméables conduisent moins de courant que lorsqu'ils baignent dans une solution pure de l'un ou l'autre des électrolytes (61). Ainsi, l'AMFE se définit comme étant un comportement où la conductance ( $G$ ) ou le potentiel d'inversion ( $E_{rev}$ ) du canal à l'étude passe par un minimum ou un maximum, et ce, en fonction du rapport des concentrations ioniques (36). Afin de déterminer l'AMFE des canaux calciques (dépendants ou non du voltage), les chercheurs utilisent des cations monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ) qui engendrent des courants entrants importants à travers les canaux calciques en absence de divalents, qui eux sont plus perméables que les cations monovalents (35).

Ainsi, l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire à des concentrations variables inhibe graduellement, et ce en fonction de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  ajoutée à la solution initiale de cations, les courants entrants de monovalents. Les données amassées permettent alors de tracer une **courbe dose-réponse** (figure 1.7b).



**Figure 1.7 :** Courbes de relation courant-voltage et dose-réponse.

Sur la courbe de relation courant-voltage de la **figure A**, la pente représente la conductance membranaire. Par convention, les *courants entrants* d'ions chargés positivement dans la cellule sont négatifs alors que les *courants sortants* d'ions chargés positivement sont positifs. Lorsque les courants sont équivalents à  $0 \mu\text{A}$ , c'est-à-dire qu'aucun ion ne traverse le canal, et que la courbe croise l'abscisse, ceci correspond au *potentiel d'inversion* ( $V_{\text{rev}}$ ) de la membrane. La courbe de relation dose-réponse présentée à la **figure B** représente les courants relatifs d'ions monovalents ( $\text{Li}^+$ ) en fonction des concentrations croissantes de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans le milieu extracellulaire.

C'est uniquement lorsque les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  atteignent l'ordre du millimolaire (mM) que les courants entrants, cette fois engendrés par les ions calciques, peuvent à nouveau être enregistrés (36). Ce résultat où une inhibition des courants entrants est observée lorsque la solution est mixte s'explique de façon très simple par le fait que deux ions, un cation monovalent et un ion  $\text{Ca}^{2+}$ , interagissent et se lient simultanément à l'intérieur du canal calcique (49). Cette technique permet ainsi d'évaluer l'affinité du canal à l'étude pour différents cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ). La **sélectivité** d'un canal ionique correspond à sa capacité de séparer et sélectionner les différents types d'ions qui peuvent varier par leur charge, leur grosseur, leur degré d'hydratation et leur coordination chimique. Cette sélectivité ionique se produit via un mécanisme d'**affinité** qui permet au canal de sélectionner les ions désirés grâce à différents résidus situés à l'intérieur du pore du canal qui ont la capacité d'attirer et de fixer les ions en question (77).

Ainsi, il est connu que les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage sont perméables aux cations monovalents en absence d'ions divalents tels le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant, Hess et ses collaborateurs ont démontré que la présence d'un seul ion  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur du pore est suffisante pour bloquer le passage des ions monovalents tels que le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{Li}^+$  (35). Des recherches expérimentales faites sur les canaux calciques dépendants du voltage révèlent qu'une augmentation des concentrations extracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibe graduellement, et ce en fonction de la  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ , les courants entrants de cations monovalents, avec un  $\text{IC}_{50} \approx 1 \mu\text{M}$  (2, 34, 35, 62). Ces études démontrent donc que ces canaux calciques possèdent des sites à haute affinité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur du pore qui expliqueraient le mécanisme de sélectivité calcique du canal (62). De plus, il semble que ces canaux génèrent des flux importants de  $\text{Ca}^{2+}$  (de l'ordre de  $10^6$  ions  $\text{s}^{-1}$ ) en conditions expérimentales, démontrant ainsi une perméabilité calcique élevée (19, 77). Cependant, un point crucial dans l'étude et l'analyse des mécanismes de perméabilité et de sélectivité est de comprendre comment les canaux calciques peuvent être hautement sélectifs pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  tout en laissant passer des millions de cations par seconde (53).

#### 1.8.4 Les modèles moléculaires associés aux canaux $\text{Ca}^{2+}$

Depuis les 20 dernières années, plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer les mécanismes de sélectivité et de perméabilité associés aux canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage. Le modèle le plus largement connu pour ces canaux calciques propose l'existence de deux sites de liaison qui lient les ions  $\text{Ca}^{2+}$  avec une haute affinité ( $K_d \sim 1 \mu\text{M}$ ) et qui permettent le passage en simple file de ces ions à l'intérieur du pore (20, 34). Ce modèle à « deux sites » suggère que, dans des conditions physiologiques, le canal soit continuellement occupé par un ou plusieurs ion(s)  $\text{Ca}^{2+}$  qui, grâce à des répulsions électrostatiques, empêche la perméabilité d'autres types d'ions à l'intérieur du pore (48). De plus, lorsque les concentrations extracellulaires de calcium passent du micromolaire au millimolaire, les flux élevés des ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont possibles grâce à l'existence d'une forte répulsion électrique entre les cations (34). Un second modèle à avoir été décrit est celui à « un site » qui propose l'existence d'un seul site de liaison chargé négativement ( $-2e$ ) qui lie les ions  $\text{Ca}^{2+}$  avec une haute affinité et pour lequel les cations rivalisent (3). La perméabilité calcique à travers les canaux calciques présentant ce modèle du site unique s'explique par un « *knock-on* » où le passage d'un ion à l'intérieur du pore entraîne la sortie

d'un autre ion déjà présent dans le pore, ou encore un échange ionique entre les cations. Récemment, le modèle du site unique a été revu afin d'inclure des sites de liaison à plus faible affinité qui se retrouvent de part et d'autre du site à haute affinité calcique. Ces sites à faible affinité semblent faciliter la sortie des ions  $\text{Ca}^{2+}$  du canal (20, 53).

### *1.8.5 Les déterminants moléculaires de l'affinité du canal $\text{Ca}_v1.2$*

Plusieurs recherches expérimentales ont permis de déterminer les sites à haute affinité intervenant dans le mécanisme de la sélectivité calcique associé aux canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage. En fait, ces résidus responsables de la liaison des ions  $\text{Ca}^{2+}$  avec une haute affinité ont été localisés à l'intérieur des régions bordant le pore entre les segments S5 et S6 de chacun des quatre domaines formant le canal (87). Les quatre résidus glutamate chargés négativement identifiés sur le canal calcique  $\text{Ca}_v1.2$  de type-L (E393, E736, E1145 et E1446) semblent être conservés parmi les canaux  $\text{Ca}_v1$  et  $\text{Ca}_v2$  qui tous sont dépendants du voltage (87). Étant donné la structure pseudo-tétramérique des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du potentiel membranaire, il a été démontré que la neutralisation de l'un ou l'autre de ces quatre résidus glutamate entraîne la diminution de l'affinité  $\text{Ca}^{2+}$  du canal de type-L d'un facteur 10. Afin de déterminer l'importance de la chaîne latérale négative au site de liaison à haute affinité, des mutations ont été effectuées sur le résidu glutamate impliqué dans le mécanisme de sélectivité calcique. Les mutations du résidu glutamate par un résidu aspartate (Glu  $\rightarrow$  Asp) qui permettent de conserver la charge négative, démontrent que l'affinité calcique à l'intérieur du pore implique des interactions électrostatiques (62, 87). Le remplacement en paire des quatre résidus glutamate permet d'exclure l'hypothèse que ces résidus situés à l'intérieur du pore forment deux sites indépendants à haute affinité (23). De plus, une quadruple mutation de cet anneau de glutamate annule complètement l'affinité  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui suggère qu'il n'existe aucun site de liaison additionnel (23). Des mutations subséquentes sur l'anneau de glutamate des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage confèrent un nouvel intérêt au modèle du site unique qui suggère la présence d'un seul site de liaison à haute affinité et qui est chargé négativement (-2e) (3, 20).

### 1.9 Objectifs de la recherche

Bien que la topologie prédite des canaux TRPV5-6 qui est constituée de six segments transmembranaires soit relativement identique à celle des canaux calciques dépendants du voltage, il semble que la structure primaire de ces deux types de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  présente peu d'homologie (40, 41). Malgré cette distance évolutive majeure entre les canaux TRPV5-6 et les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du potentiel membranaire, la perméabilité des ions calciques à travers ces protéines apparaît comme une propriété fondamentale de ces canaux. Tout comme les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage (62, 87), les canaux TRPV5-6 conduisent les ions calcium avec une perméabilité élevée (2, 35, 80). Jusqu'à présent, les expériences et analyses électrophysiologiques effectuées sur le canal ECaC1 démontrent que la perméabilité pour les cations divalents et monovalents à travers ce canal est apparentée à celle observée à travers les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage de type-L, ce qui laisse supposer des mécanismes de perméabilité relativement analogues (80).

La présente recherche a donc pour objectif principal la caractérisation à un niveau moléculaire des propriétés de sélectivité et de perméabilité de la région du pore du canal calcique ECaC1 (TRPV5) du rein de lapin. L'affinité du canal ECaC1 sera évaluée pour deux cations divalents :  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . De plus, la contribution des résidus acides situés dans la région présumée du pore dans le processus de sélectivité sera analysée. Les données amassées sur ces processus de sélectivité et de perméabilité relatifs au canal ECaC1 seront mises en parallèle avec celles obtenues pour les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage.

## **2- MÉTHODOLOGIE**



## 2.1 Clonage et mutagenèse dirigée du canal ECaC1 du tubule distal du rein de lapin

Le canal ECaC1 de type sauvage (GenBank accession no. AJ133128) a été cloné à partir de tubules distaux purifiés de lapin par le Dr Hélène Klein (Université de Montréal, Groupe de recherche en transport membranaire). La séquence en nucléotides de l'ADN ainsi obtenu présente une séquence essentiellement identique à celle publiée par Hoenderop et ses collègues (38). Brièvement, les tubules distaux de lapin ont été préparés et purifiés sur un gradient de Percoll, selon la technique décrite précédemment (82). L'ARNm total, extrait à l'aide du réactif TRIzol (Canadian Life Technologies, Mississauga, ON, Canada), a subi une transcription inverse, et l'ADNc ainsi obtenu a été amplifié en utilisant la trousse de synthèse d'ADNc « SMART PCR » (Clontech, Palo Alto, CA). L'ADNc du canal ECaC1 de lapin a été obtenu par PCR grâce à la trousse « ADNc Advantage » (Clontech) avec des amorces spécifiques (de nt +99 à +134 et de nt +2 256 à +2 291). Les oligonucléotides synthétiques (Canadian Life Technologies) ont été conçus afin d'inclure les sites de restriction *Bgl*III et *Spe*I présents dans le vecteur pT7TS (généreusement fourni par Dr Paul A. Krieg, Université du Texas à Austin) (46). Le vecteur pT7TS est une copie modifiée du vecteur pGEM-4Z (Clontech) qui contient les régions non transcrites 5' et 3' de l'ARNm de la  $\beta$ -globine de *Xenopus laevis*, lequel assure une expression optimale de la protéine dans les ovocytes de *Xenopus*. La séquence des nucléotides de toute la région clonée a été analysée de façon bidirectionnelle à l'aide d'un séquençage automatique (BioST, Lachine, Québec, QC, Canada) et s'est révélée être identique à plus de 99% à la séquence AJ133128-1 retrouvée dans GenBank.

Des mutations ponctuelles sur le canal ECaC1 de type sauvage ont été effectuées sur différents résidus : D542A, D542E, D542G, D542K, D542N, D542Q, D550N et E535Q. Ces mutations ont été faites avec des oligonucléotides synthétiques de 25-mer en utilisant la trousse de mutagenèse « Quick-Change XL » (Stratagene, La Jolla, CA). Après 1-5 jours d'expression dans les ovocytes de *Xenopus*, les mutants D542Q et D542K ne présentent pas de courants  $\text{Li}^+$  >50 nA à -150 mV, lors d'enregistrement en cellule entière (« whole cell »). La séquence des nucléotides des régions mutées (>500 pb) a été analysée de façon bidirectionnelle à l'aide d'un séquençage automatique par BioST.

Les constructions d'ADN ont été linéarisées par digestion avec *Bam*HI à l'extrémité 3'. Les produits de la transcription ont été préparés en utilisant une coiffe méthylée analogue m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G et une T7 ARN polymérase avec la trousse de transcription « mMessage mMachine » (Ambion, Austin, TX).

## 2.2 *Expression du canal ECaC1 de type sauvage et des mutants dans les ovocytes de Xenopus laevis*

Les grenouilles femelles *Xenopus laevis* (Nasco, Fort Atkinson, WI) sont anesthésiées par immersion dans une solution d'acide éthyl ester 3-aminobenzoïque (MS-222, Sigma, Oakville, ON, Canada) en présence de tricaine 0,1% pour une durée de 15 minutes précédant la chirurgie telle que décrite précédemment (62). L'ARNc est ensuite injecté dans les ovocytes à des concentrations variant entre 0,5-5 ng/ovocyte, avec les concentrations plus élevées pour les mutants. Les ovocytes injectés avec l'ARNc du canal ECaC1 sont incubés à 18°C pendant moins de 24 heures dans une solution Barth exempte de Ca<sup>2+</sup>, de EGTA et de sérum. Le canal ECaC1 de type sauvage a été exprimé dans plus de 25 différents groupes d'ovocytes, alors que les canaux mutants ont été analysés suite à 6-11 séries d'injection indépendantes.

## 2.3 *Enregistrements en configuration cellule entière (« whole-cell »)*

Les courants du canal ECaC1 en configuration cellule entière ont été mesurés à la température ambiante à l'aide d'une technique à deux électrodes utilisant un amplificateur de voltage imposé (modèle OC-725, Warner Instruments). Les électrodes de courant et de voltage (résistance de 1- à 2-MΩ) ont été remplies avec une solution contenant 3 M KCl, 1 mM EGTA et 10 mM HEPES (pH 7.4). Tout d'abord, les électrodes sont insérées dans les ovocytes alors qu'ils baignent dans une solution de Ringer modifiée (en mM : 96 NaOH, 2 KOH, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> et 10 HEPES) titrée à pH 7.4 avec l'acide méthanesulfonique (MeS); la solution du bain est ensuite changée par les solutions tests appropriées (voir ci-dessous). Les expériences ont d'emblée été effectuées après l'injection de 20 nl de 50 mM EGTA ou 25 mM d'acide 1,2-bis (2-aminophenoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique

(BAPTA), lesquels donnent une concentration finale de 2 mM EGTA ou 1 mM BAPTA, avec un volume présumé de 500 nl/ovocyte. Il a été prouvé que l'injection de EGTA ou de BAPTA dans les ovocytes permet de minimiser l'activation par le  $\text{Ca}^{2+}$  des courants  $\text{Cl}^-$  endogènes (7). Les ovocytes sont perfusés par gravité à une vitesse de 10 ml/min. Dans les figures finales de l'article, les courants capacitifs ont été soustraits des courbes de courants en fonction du temps. Afin de comptabiliser et d'analyser les données recueillies, le logiciel Clampex 6.1 (Axon Instruments, Foster City, CA) a été utilisé. Les données ont été échantillonnées à 10 kHz et filtrées à 5 kHz en utilisant le filtre incorporé à l'amplificateur.

L'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  des canaux  $\text{ECaCl}$  de types sauvage et mutant a été évaluée à partir de l'inhibition par le  $\text{Ca}^{2+}$  des courants  $\text{Li}^+$  en cellule entière. Des études antérieures ont démontré que le  $\text{Li}^+$  est préféré aux autres cations monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) puisque cet ion génère des courants plus stables dans les œufs de *Xenopus* (62). Les relations courant-voltage instantanées ont été mesurées en utilisant des rampes de voltage de +80 à -150 mV à un taux de 0,5 mV/ms appliqué à chaque 20 s à partir d'un potentiel de -50 mV. Les courbes courant-voltage en configuration cellule entière ont d'abord été mesurées en conditions témoins, c'est-à-dire en présence de la solution de  $\text{Li}^+$  exempte de  $\text{Ca}^{2+}$  (en mM : 120 LiOH, 5 EGTA, 2 KOH et 20 HEPES) titrée à un pH de 7.35 avec le MeS. Le  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a ensuite été ajouté à cette solution afin d'obtenir des solutions contenant différents niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Les constantes de stabilité utilisées afin de calculer la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  présente dans chacune des solutions ont été tirées de Fabiato et Fabiato (24). Dans toutes les expériences rapportées dans cette recherche, l'inhibition du courant  $\text{Ca}^{2+}$  était réversible à >90 %. L'amplitude des courants relative à la valeur témoin a été rapportée en fonction de la valeur du pCa. La même approche a été utilisée afin de quantifier l'affinité des canaux pour le  $\text{Mg}^{2+}$ , à la seule différence que dans les solutions de  $\text{Li}^+$ , l'EGTA a été substitué par l'EDTA et le  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  par le  $\text{MgCl}_2$  en utilisant les constantes de stabilité appropriées. Toutes les données recueillies pour chacune des concentrations extracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  libres ont été groupées et rapportées afin d'établir une moyenne  $\pm$  SE. Les courbes moyennes ont ainsi été ajustées à l'équation suivante :

$$\frac{i}{I_{max}} = \frac{1}{1 + \frac{[x]}{IC_{50}}}$$

où  $i$  représente le courant maximal de  $Li^+$  mesuré à une concentration donnée de  $Ca^{2+}$  ou de  $Mg^{2+}$ ,  $I_{max}$  est le courant maximal enregistré dans une solution de  $Li^+$  exempte de  $Ca^{2+}$ ,  $[x]$  représente la concentration de  $Ca^{2+}$  ou de  $Mg^{2+}$  libre, et  $IC_{50}$  représente la concentration de cation divalent qui correspond à 50% de l'inhibition des courants  $Li^+$ .

Pour l'expérience décrite à la figure 3.6 de l'article, les ovocytes sont maintenus à un voltage constant de  $-50$  mV dans une solution de  $120$  LiMeS +  $100$   $\mu$ M  $Ca^{2+}$  (voir les descriptions précédentes). Les courants du canal ECaC1 ont ensuite été mesurés avec une solution de  $10$  mM  $Ba^{2+}$  contenant (en mM)  $10$  Ba(OH)<sub>2</sub>,  $110$  NaOH,  $1$  KOH et  $20$  HEPES, titrée à pH  $7.3$  avec le MeS, ou une solution  $10$  mM CaMeS dans laquelle le Ca(OH)<sub>2</sub> remplace le Ba(OH)<sub>2</sub> de façon équimolaire. Les courants en configuration cellule entière ont été enregistrés durant  $15$  secondes. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Origin 6.1 (OriginLab, Northampton, MA). Les valeurs ont été réunies afin d'établir une moyenne  $\pm$  SE. Afin de faire une comparaison statistique, un  $t$ -test de Student a été utilisé.

Certaines données d'électrophysiologie amassées au cours de ce travail de recherche ont été vérifiées et validées par Gérald Bernatchez, à ce moment agent de recherche au laboratoire du Dr Lucie Parent (Université de Montréal).

**3- ARTICLE**

**THE ROLE OF ASPARTATE RESIDUES IN  
Ca<sup>2+</sup> AFFINITY AND PERMEATION  
OF THE DISTAL ECaC1 CHANNEL**

Running title: D542 in ECaC1 affinity and permeation

K. Jean, G. Bernatchez, H. Klein,  
L. Garneau, R. Sauvé, L. Parent\*

Département de Physiologie  
Groupe de Recherche en Transport Membranaire  
Université de Montréal  
P.O. Box 6128, Downtown Station  
Montréal, Qué, H3C 3J7  
Canada

\* corresponding author.

Phone: (514) 343-6673

Fax: (514) 343-7146

e-mail: [REDACTED]

**Key words: *Xenopus* oocytes, Structure-function, Site-directed mutagenesis,  
Single-channel, Distal tubule, Kidney, Selectivity**

**ABSTRACT**

The  $\text{Ca}^{2+}$  -affinity and -permeation of the ECaC1 channel were investigated after expression in *Xenopus* oocytes. ECaC1 displayed anomalous mole-fraction effects. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  reversibly inhibited ECaC1 whole-cell  $\text{Li}^+$  currents with  $\text{IC}_{50} = 2.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$  ( $n = 9$ ) and  $235 \pm 35 \mu\text{M}$  ( $n = 10$ ) respectively. These values compare well to the  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of  $\text{Ca}_v1.2$  measured under the same conditions suggesting that high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  binding is a well-conserved feature of epithelial and voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Neutralization of D550 and E535 in the pore region had no significant effect on  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  affinities. In contrast, neutralization of D542 significantly decreased  $\text{Ca}^{2+}$  - affinity with  $\text{IC}_{50} = 1.1 \pm 0.2 \text{ mM}$  ( $n = 6$ ) and  $\text{Mg}^{2+}$ -affinity with  $\text{IC}_{50} > 25 \pm 3 \text{ mM}$  ( $n = 4$ ). Despite a 1000-fold decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  affinity in D542N channels,  $\text{Ca}^{2+}$  permeation properties and the  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$  conductance ratio remained comparable to the wild-type ECaC1. Altogether, our observations suggest that D542 plays a critical role in  $\text{Ca}^{2+}$  -affinity but not in  $\text{Ca}^{2+}$  -permeation in ECaC1.

## INTRODUCTION

The fine tuning of  $\text{Ca}^{2+}$  excretion in the kidney takes place in the distal nephron, which consists of the distal convoluted tubule, the connecting tubule, and the initial portion of the cortical collecting duct. In these segments,  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption is hormonally regulated and occurs through a transcellular pathway involving a passive  $\text{Ca}^{2+}$  influx at the apical membrane and active  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion at the basolateral pole. While the functional features of this apical  $\text{Ca}^{2+}$  pathway have been well characterized over the years through radiolabelled calcium uptake studies, its molecular identity has eluded many investigators long after the primary sequences of most voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels have been published. One of the major problems in this case was probably related to the difficulty of reliably characterizing single-channel events in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  in differentiated epithelial cells (21;22;24). This led some investigators to believe that the apical  $\text{Ca}^{2+}$  influx could be mediated through a transporter rather than an ion channel.

An epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel (ECaC1) (9) has been recently cloned from rabbit tissue. The resulting protein is a member of the extended TRP channel family (see (6) for review) and as such comprises 730 amino acids with a topology of six transmembrane segments (S1-S6) with a pore region predicted to lay between S5 and S6. The rabbit ECaC1 was shown to be expressed in proximal small intestine, the distal part of the nephron, and the placenta. Highly homologous proteins, ECaC2 (CaT1) and CaT2, were also cloned from rat epithelial tissues with respectively 73.4% and 84.2% amino acid identities to ECaC1 (19;20). In addition, the family of epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channels includes CaT-L which was cloned from human placenta but is also expressed in pancreatic acinar cells and salivary glands (29).

It has been recently proposed that ECaC1 could exhibit a higher  $\text{Ca}^{2+}$  affinity than L-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels ( $\text{Ca}_v1.2$ ) (27).  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of voltage-gated channels has been estimated from the  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition of monovalent cation ( $\text{Na}^+$  or  $\text{Li}^+$ ) whole-cell currents. Raising the external  $\text{Ca}^{2+}$  concentration dose-dependently inhibits monovalent cation inward currents through voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels with a  $\text{IC}_{50} \approx 1 \mu\text{M}$  (1;7;12;17;18). In these channels,  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity is conferred by a conserved ring of negatively charged glutamate residues (4;17;30). We thus aimed to characterize the  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity and



permeation properties of ECaC1 at the molecular level by investigating the role of acidic pore residues in these processes.

Our results indicate that  $\text{Ca}^{2+}$ -affinities are similar between ECaC1 and  $\text{Ca}_v1.2$  whereas divalent cation permeation properties appear to differ considerably. In ECaC1,  $\text{Ca}^{2+}$  permeation was significantly higher than  $\text{Ba}^{2+}$  whereas the reverse observation is reported in  $\text{Ca}_v1.2$  channels (8). At the molecular level, the negatively charged aspartate residue D542 was found to confer high- $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  affinity to ECaC1. Significant  $\text{Ca}^{2+}$  inward currents could be recorded through D542N channels despite a 1000-fold decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  affinity. The  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$  whole-cell conductance ratio remained similar to the wild-type channel. We conclude that the negatively charged aspartate residue D542 plays a critical role in  $\text{Ca}^{2+}$  affinity but is not a critical determinant of  $\text{Ca}^{2+}$  permeation in ECaC1.

## MATERIALS AND METHODS

**Cloning and site-directed mutagenesis of the rabbit distal ECaC1.** The wild-type ECaC1 (Genbank AJ133128) was cloned from purified distal tubules from rabbit and was found to be essentially identical to the sequence published by Bindels and coll. (9). Briefly, rabbit distal tubules were prepared and purified on Percoll-gradient as previously described (28). Total mRNA, extracted with the TRIzol Reagent (Canadian Life Technologies, Mississauga, Ontario), was reverse-transcribed and the cDNA was then amplified using the SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech, Palo Alto, CA). The rabbit ECaC1 cDNA was obtained by hot-start PCR with the Advantage cDNA PCR polymerase (Clontech) with specific primers (from nt +99 to nt +134 and from nt +2256 to nt + 2291). The synthetic oligos (Canadian Life Technologies) were designed to include the *Bgl II* and the *Spe I* restriction sites to subclone into the restriction sites of the pT7TS vector (generously provided by Dr Paul A. Krieg, University of Texas) using exonuclease III (10). The pT7TS vector contained the 5' and 3' untranslated regions of *Xenopus laevis*  $\alpha$ -globin mRNA inserted into pGEM-4Z which ensure optimal protein expression in *Xenopus laevis* oocytes. The nucleotide sequence of the full-length clone region was bi-directionally analysed by automatic sequencing (BioST, Lachine, Qué) and was found to be > 99% identical to the Genbank sequence AJ133128-1.

Point mutations D542A, D542E, D542G, D542K, D542N, D542Q, D550N, E535Q were performed with 25-mer synthetic oligos into the wild-type ECaC1 using the Quick-Change™ XL-mutagenesis kit (Stratagene, LaJolla, CA). The D542Q and D542K mutants failed to yield  $Li^+$  whole-cell currents above 50 nA at -150 mV after 1-5 days expression in *Xenopus* oocytes. The nucleotide sequence of the mutated region (over 500 bp) was bi-directionally analysed using automatic sequencing by BioST (Lachine, Qué).

DNA constructs were linearized at the 3' end by *BamHI* digestion. Run-off transcripts were prepared using methylated cap analog  $m^7G(5')ppp(5')G$  and T7 RNA polymerase with the mMessage mMachine® transcription kit (Ambion, Austin, TX).

**Expression of ECaC1 wild-type and mutants in *Xenopus* oocytes.** Female *Xenopus laevis* clawed frog (Nasco, Fort Atkinson, WI) were anesthetized by immersion in 0.1 %

tricaine or MS-222 (3-aminobenzoic acid ethyl ester, Sigma, Oakville, Ontario) for 15 minutes before surgery as detailed before (3;17;18). cRNA was injected at a concentration of 0.5 to 5 ng per oocyte depending upon the channel (wild-type or mutant) being expressed. ECaC1-injected oocytes were incubated at 18°C in a calcium-free, EGTA-free, and serum-free Barth's solution for < 24 hrs before experiments. The wild-type ECaC1 channel was expressed in > 25 different oocyte batches whereas mutant channels were analyzed in 6-11 independent series of injections.

**Whole-cell Recordings.** Whole-cell ECaC1 currents were measured at room temperature with a two-electrode voltage-clamp amplifier (OC-725, Warner Instruments). Voltage and current electrodes (1-2 MΩ tip resistance) were filled with 3 M KCl; 1 mM EGTA; 10 mM HEPES (pH 7.4). Oocytes were first impaled in a modified Ringer solution (in mM): 96 NaOH; 2 KOH; 1.8 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES titrated to pH 7.4 with methanesulfonic acid (MeS), then the bath solution was exchanged with the appropriate test solution (see below). Experiments were routinely performed after the injection of 20 nl of either EGTA (50 mM) or Bapta (25 mM) which is expected to yield a final concentration of 1 mM Bapta or 2 mM EGTA assuming a volume of 500 nl per oocyte. This measure has been found to effectively minimize the activation of endogenous Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> currents (3;18). Oocytes were superfused by gravity flow at a rate of 10 ml/min. Capacitive transients were subtracted in the final figures. PClamp software Clampex 8 (Axon Instruments, Foster City, CA) was used for on-line data acquisition and analysis. Unless stated otherwise, data were sampled at 10 kHz and low pass filtered at 5 kHz using the amplifier built-in filter.

ECaC1 wild-type and mutant channel affinity for Ca<sup>2+</sup> ions was assessed from the calcium block of whole-cell Li<sup>+</sup> currents as described previously (17;18). Instantaneous current – voltage relationships were measured using voltage ramps from +80 to –150 mV at a rate of 0.5 mV/ms applied every 20 s from a holding potential of –50 mV. Whole-cell current-voltage curves (I-V) were first measured under control conditions in the presence of the nominally calcium-free Li<sup>+</sup> solution (in mM): 120 LiOH; 5 EGTA; 2 KOH; 20 HEPES titrated to pH 7.35 with methane sulfonic acid. Ca(OH)<sub>2</sub> was added to the solution to obtain the desired level of free calcium. The stability constants used to calculate the free calcium concentration were taken from Fabiato and Fabiato (5). Ca<sup>2+</sup> block was reversible at > 90% in all experiments reported here. The current amplitude relative to the control value was plotted

against pCa ( $-\log [\text{Ca}^{2+}]_o$ ). The same approach was used to quantify the channel affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  inhibition curves with the only difference being that EDTA was substituted for EGTA and  $\text{MgCl}_2$  replaced  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . All data collected for each free  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  or  $[\text{Mg}^{2+}]_o$  concentration were pooled and reported as the mean  $\pm$  SEM. The mean curves were then fitted to the following equation:

$$\frac{i}{I_{\max}} = \frac{1}{1 + \frac{[x]}{IC_{50}}} \quad (1)$$

where  $i$  is the peak  $\text{Li}^+$  current measured at a given  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  concentration,  $I_{\max}$  is the peak current measured in nominally calcium-free  $\text{Li}^+$  solutions,  $[x]$  is the free  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  concentration, and  $IC_{50}$  is the divalent cation concentration corresponding to 50% inhibition.

For the experiment described in Fig 6, oocytes were first clamped in the 120 LiMeS + 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  solution (see above). ECaCl currents were then measured either with a 10  $\text{Ba}^{2+}$  solution (in mM): 10  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; 110 NaOH; 1 KOH; 20 HEPES titrated to pH 7.3 with MeS or a 10 CaMeS solution where  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  replaced  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  equimolarly. Oocytes were maintained at a holding potential of  $-50$  mV while the appropriate solution was perfused in the bath. Whole-cell currents were recorded for 15 s. Data were analyzed using Origin 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA) software. Results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Unpaired Student's t-test was used for statistical comparison.

## RESULTS

### High-Ca<sup>2+</sup> affinity in ECaC1

ECaC1 is a non-voltage-gated calcium channel presumably involved in the hormone-regulated calcium influx in kidney cells. The molecular mechanism of Ca<sup>2+</sup> permeation in ECaC1 channels was first investigated by quantifying the Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> inhibition of whole-cell Li<sup>+</sup> currents. Whole-cell currents for ECaC1 (Fig 1A, 1C) were recorded in the presence of 120 mM Li<sup>+</sup> as the charge carrier since previous experiments have shown that whole-cell currents are more stable when Li<sup>+</sup> rather than Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> was used as the permeant ion in the absence of divalent cations (17).

As seen, injection of mRNA coding for the wild-type ECaC1 channel yielded large inward monovalent currents ( $\approx$  30-50  $\mu$ A at -150 mV) within 20 to 36 hrs incubation. The instantaneous current-voltage relationships obtained from voltage ramps typically showed a strong rectification at positive voltages that prevented the accurate determination of the reversal potential under all experimental conditions. Whole-cell current rectification was not affected by the injection of 50 mM EDTA in the oocyte 1-2 hours prior to the experiments suggesting that rectification was not primarily caused by cytoplasmic Mg<sup>2+</sup>. This strong current rectification was also observed at the single-channel level in cell-attached recordings (*results not shown*). Addition of external Ca<sup>2+</sup> from 0.01 to 100  $\mu$ M (Fig 1A) or Mg<sup>2+</sup> from 0.01  $\mu$ M to 10 mM (Fig 1C) dose-dependently inhibited Li<sup>+</sup> whole-cell currents at all membrane potentials tested between -150 and -75 mV without any apparent voltage-dependence within that voltage range (*results not shown*).

The channel's affinity for either Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> ions was estimated from the dose-response curves (Fig 1B-D). Fractional Li<sup>+</sup> currents measured at -150 mV were fitted to equation 1 which yielded IC<sub>50</sub> = 2.1  $\pm$  0.4  $\mu$ M (n = 7) for Ca<sup>2+</sup> and IC<sub>50</sub> = 235  $\pm$  35  $\mu$ M (n = 10) for Mg<sup>2+</sup>. As expected for a Ca<sup>2+</sup> selective channel, ECaC1 exhibited a 100-fold greater affinity for Ca<sup>2+</sup> than for Mg<sup>2+</sup> ions.

### Ca<sup>2+</sup> affinity is mediated by D542 in ECaC1

Negatively charged glutamate residues compose the molecular motif required for Ca<sup>2+</sup> selectivity in voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels (17;30). Mutational analyses of these Ca<sup>2+</sup>

channels have shown that electrostatic interactions were a critical determinant of high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  binding (4;17) suggesting that negative residues could behave as surrogate water molecules to facilitate the passage of dehydrated  $\text{Ca}^{2+}$  ions through the hydrophobic plasma membrane.

On the basis of these findings, the molecular determinants of  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity in ECaC1 were investigated by targeting the negatively charged residues in the putative pore region. There are 3 conserved negatively charged residues, E535, D542, and D550, in the region between S5 and S6 in ECaC1, CaT-1, CaT-2, and CaT-L channels (Fig 2). Each of these negatively charged residues was neutralized yielding E535Q, D542N, and D550N mutant channels.  $\text{Ca}^{2+}$  affinity was estimated as described before. Typical results are shown in Fig 3. As seen, D550N and E535Q channels exhibited the typical rectification and the high  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of the wild-type channel with  $\text{IC}_{50} = 1.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ) and  $\text{IC}_{50} = 5 \pm 3 \mu\text{M}$  ( $n = 4$ ) respectively. As for the wild-type channel,  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition of D550N and E535Q channels was not significantly dependent upon the membrane potential in the  $-150$  to  $-75$  mV voltage range (*results not shown*). Last, D550N and E535Q channels exhibited the typical anomalous mole-fraction behavior with significant inward  $\text{Ca}^{2+}$  currents at external  $[\text{Ca}^{2+}] > 1$  mM.

In contrast, the  $\text{Ca}^{2+}$  affinity was non-equivocally decreased in the D542N mutant with a  $\text{IC}_{50} = 1.1 \pm 0.2$  mM ( $n = 6$ ), representing a 1000-fold diminution of the channel  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity (Fig 3C-D).  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition was not significantly voltage-dependent between  $-150$  and  $-75$  mV (*results not shown*). The rectification of the D542N channel was also significantly decreased and outward currents could be recorded at positive membrane potentials. As seen, monovalent currents through D542N could never be completely inhibited by external  $\text{Ca}^{2+}$  even in the mM range. It appears that significant  $\text{Ca}^{2+}$  permeation occurs in that range (see later Fig 6C). Although the role of D542 in  $\text{Ca}^{2+}$  affinity has been inferred before from the extrapolation of reversal potentials (16), this is the first measure of  $\text{Ca}^{2+}$  affinity in the pore region of ECaC1.

#### **$\text{Ca}^{2+}$ and $\text{Mg}^{2+}$ affinities are determined by the same locus in ECaC1**

To evaluate the possibility that  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  bind to the same locus in ECaC1, the  $\text{Mg}^{2+}$  affinity of E535Q, D542N, and D550N was characterized (Fig 4). As seen, the  $\text{Mg}^{2+}$

affinity of D550N and E535Q was not significantly different than the wild-type channel with  $IC_{50} = 327 \pm 41 \mu\text{M}$  ( $n = 4$ ) for D550N and  $IC_{50} = 278 \pm 53 \mu\text{M}$  ( $n = 4$ ) for E535Q as compared to  $IC_{50} = 235 \pm 35 \mu\text{M}$  ( $n = 10$ ) for ECaC1 wt.

Not surprisingly, the larger effects were observed with the D542N mutant (Fig 4C) which exhibited a significant decrease in  $Mg^{2+}$  affinity. In average, 10 mM  $Mg^{2+}$  blocked about  $43 \pm 3 \%$  ( $n = 4$ ) of the  $Li^+$  currents. Higher  $Mg^{2+}$  concentrations ( $> 100 \text{ mM}$ ) yielded solutions with significant hyperosmolarity ( $> 500 \text{ mOsm}$ ). Hence, within the limits of our experiments, the  $IC_{50}$  was estimated to be  $> 25 \pm 3 \text{ mM}$  ( $n = 4$ ) a 100-fold increase of the  $IC_{50}$  value measured for the wild-type channel. Altogether,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  affinities appear to be modulated by the same locus in ECaC1.

### **Electrostatic interactions are critical to ensure high $Ca^{2+}$ affinity in ECaC1**

In voltage-gated  $Ca_v1.2$  channels, the importance of electrostatic interactions in conferring calcium selectivity was underscored by numerous mutational analyses of the glutamate ring (17). The following series of experiments was undertaken to investigate the contribution of electrostatic interactions to the  $Ca^{2+}$  affinity of ECaC1 (Fig 5). Although the presence of a negatively charged residue at position 542 appears to be essential, the D542E channel (Fig 5A) exhibited a lower  $Ca^{2+}$  affinity with  $IC_{50} = 11 \pm 3 \mu\text{M}$  ( $n = 6$ ) indicating that preserving the negative charge was not sufficient to account for the high  $Ca^{2+}$  affinity in ECaC1 ( $p < 0.001$  at  $1 \mu\text{M}$  and  $10 \mu\text{M}$   $Ca^{2+}$ ). The  $Li^+$  whole-cell currents from D542E were not inhibited by increasing external  $Ca^{2+}$  to  $1000 \mu\text{M}$  in contrast to the wild-type channel.

The D542G and D542A channels were the least sensitive to  $Ca^{2+}$  inhibition (Fig 5B-C). As seen, the D542N channel which bears a neutral polar residue achieved a higher  $Ca^{2+}$  affinity with  $IC_{50} = 1.1 \pm 0.2 \text{ mM}$  ( $n = 6$ ) than the smaller hydrophobic residues D542G with  $IC_{50} = 3.0 \pm 0.1 \text{ mM}$  ( $n = 4$ ) and D542A with  $IC_{50} = 6.7 \pm 0.2 \text{ mM}$  ( $n = 4$ ). Inhibition of  $Li^+$  currents by  $10 \mu\text{M}$   $Ca^{2+}$  was significantly stronger in D542N than in these two mutants ( $p < 0.01$ ) (Fig 5D).

### **Ca<sup>2+</sup> permeation is preserved in D542N channels**

The last series of experiments was undertaken to assess the role of pore residues in Ca<sup>2+</sup> permeation of ECaC1. Whereas Ba<sup>2+</sup> permeation could be quite large in high-voltage activated Ca<sup>2+</sup> channels, it was found to be nearly non-existent in ECaC1. As seen in Fig 6A, exposure to a 10 mM Ba<sup>2+</sup> solution elicited inward currents of less than 300 nA in the wild-type ECaC1 channel whereas 10 mM Ca<sup>2+</sup> elicited 20-fold larger inward currents. The Ca<sup>2+</sup>/Ba<sup>2+</sup> conductance ratio remained very high in E535Q and D550N channels (Fig 6B-D). Moreover, large inward Ca<sup>2+</sup> currents were recorded through D542N channels despite its decreased Ca<sup>2+</sup> affinity. In all cases, whole-cell currents measured in the presence of 10 mM Ca<sup>2+</sup> inactivated faster than whole-cell Li<sup>+</sup> currents (*results not shown*) although the time course of inactivation in the presence of Ca<sup>2+</sup> was found to vary somewhat between experiments. Current decay in the presence of external Ca<sup>2+</sup> was not significantly altered by injecting higher concentrations of either EGTA or BAPTA.



## DISCUSSION

### **ECaC1 is a high-affinity $\text{Ca}^{2+}$ channel**

The present study characterized the pore properties of the rabbit distal ECaC1 channels expressed in *Xenopus* oocytes. ECaC1 clearly exhibits archetypal properties of  $\text{Ca}^{2+}$ -selective channels namely a high  $\text{Ca}^{2+}$ -affinity; a moderate inhibition of monovalent currents by  $\text{Mg}^{2+}$ ; anomalous mole fraction effect of  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Li}^+$  solutions;  $\text{Ca}^{2+}$  permeation; large single-channel conductance in the presence of monovalent cations. It has been recently proposed that ECaCs display a higher  $\text{Ca}^{2+}$  affinity than voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (27). Herein we showed that our estimation of  $\text{Ca}^{2+}$  affinity in ECaC1 is similar to the values reported for ECaC2 (CaT1) expressed in CHO cells (31) as well as for voltage-gated  $\text{Ca}_v1.2$  (17) and  $\text{Ca}_v2.3$  (18) although it is 10-fold higher than reported elsewhere for ECaC1 (26;27). As expected for a  $\text{Ca}^{2+}$ -selective channel,  $\text{Ca}^{2+}$  affinity in ECaC1 was 100-fold higher than  $\text{Mg}^{2+}$  affinity. Altogether, our experiments strongly suggest that  $\approx \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  binding sites could be universally featured in non- and voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

### **$\text{Ca}^{2+}$ -affinity is mediated by a single acidic residue in ECaC1**

Pore D542 residue plays a critical role into conferring high- $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  affinities. Substitution of the acidic residues E535 and D550 had no significant effect on the  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$  affinity of ECaC1. Our data thus agree with a previous report where  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity had been inferred from the reversal potential of whole-cell currents (16).

At the molecular level, the pore regions of the recently cloned ECaC2 (CaT1) and CaT2 channels exhibit more than 95% homology with ECaC1 and the negatively charged D542 residue is remarkably conserved among these channels. CaT-1 displays  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  affinity (31), suggesting a functional homology with ECaC1. It remains to be seen whether the same aspartate residue (D541 in CaT-1) confers high- $\text{Ca}^{2+}$  affinity especially considering that ECaC2 (CaT1) contains an additional aspartate residue D547 between D541 and D549.

The role of negatively charged residues in conferring  $\text{Ca}^{2+}$  affinity was not unexpected as four conserved glutamate residues form the high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  binding site in  $\text{Ca}_v1.2$  (4). Neutralization of the negatively charged residue D542 in the putative pore

region decreased  $\approx 1000$ -fold the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  affinity of ECaC1. In contrast, neutralization of single glutamate residues typically produced  $\approx 10$ -fold diminution of the  $\text{Ca}^{2+}$  affinity in  $\text{Ca}_v1.2$  channels (17). Thousand-fold shifts could only be observed following the simultaneous mutations of the four glutamate residues (4). It is hence tempting to suggest that the ECaC protein functions as a tetramer similarly to the voltage-gated  $\text{K}^+$  channels.

#### **Mutational analysis of D542: role of the side-chain**

The mutational analysis of D542 suggests that electrostatic interactions are a critical factor in conferring calcium selectivity in ECaC1. Although the presence of a negatively charged residue at position 542 appears to be essential, the D542E channel exhibited a lower  $\text{Ca}^{2+}$  affinity than the wild-type ECaC1 channel. Hence optimum coordination of incoming  $\text{Ca}^{2+}$  ions appears to be volume- as well as charge-sensitive with the longer side-chain of glutamate residues possibly crowding  $\text{Ca}^{2+}$  ions. The newly cloned T-type  $\text{Ca}_v3.1$  to  $\text{Ca}_v3.3$  channels possess aspartate residues in pores III and IV and it has been suggested that the shorter side-chain could account for some of their distinct permeation properties (23).

The small and neutral Glycine and Alanine residues produced channels with the poorest  $\text{Ca}^{2+}$  affinity. The neutral but polar residue Asparagine yielded channels with intermediate  $\text{Ca}^{2+}$  affinity. Similar observations were reported for  $\text{Ca}_v1.2$  channels (17).

#### **Divalent cation permeation through D542N channels**

ECaC1 (our data) (15) and ECaC2 (CaT1) (31) exhibited a higher whole-cell conductance for  $\text{Ca}^{2+}$  than for  $\text{Ba}^{2+}$  with a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$  conductance ratio  $> 20$ . The larger  $\text{Ca}^{2+}$  to  $\text{Ba}^{2+}$  conductance ratio appears to be a typical feature of ECaC channels with the striking exception being CaT-L which displayed a high whole-cell  $\text{Ba}^{2+}$  conductance (13). Neutralization of E535, D542 and D550 residues yielded channels with  $\text{Ca}^{2+}$  permeation identical to the wild-type channel. Hence  $\text{Ca}^{2+}$  permeation was not eliminated in the low- $\text{Ca}^{2+}$  affinity D542N channel. This observation was unexpected as it has been reported that  $\text{Ca}^{2+}$  permeation could not be measured after mutation of the D542 residue (14). Furthermore, the large  $\text{Ca}^{2+} / \text{Ba}^{2+}$  conductance ratio was preserved in D542N channels

suggesting that the structural determinants of  $\text{Ca}^{2+}$  permeation are not completely accounted for by D542.

In summary, ECaC1 clearly exhibits archetypal properties of  $\text{Ca}^{2+}$ -selective channels namely a high  $\text{Ca}^{2+}$ - affinity; a moderate inhibition of monovalent currents by  $\text{Mg}^{2+}$ ; anomalous mole fraction effect of  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Li}^+$  solutions;  $\text{Ca}^{2+}$  permeation; large single-channel conductance in the presence of monovalent cations. It remains to be seen whether ECaC1 could be responsible for transcellular PTH-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption in kidney distal tubule(2;11;25).

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Julie Verner and Bernadette Wallendorf for dedicated oocyte culture; Michel Brunette for expert technical assistance; Claude Gauthier for artwork, and Laurent Berrou for discussions. L.P. is a *Senior* scholar from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec". This work was completed with a joint grant from the Kidney Foundation of Canada to R.S. and L.P. and with grant MT 13390 from the Canadian Institutes of Health Research to L.P.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 3.1 : High-affinity calcium binding sites in ECaC1.** ECaC1 was expressed in *Xenopus* oocytes. Instantaneous current-voltage relationships were obtained using voltage ramps applied at a rate of 0.5 V/s. **Top panel A-B.** Channel's affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  ions was assessed from the  $\text{Ca}^{2+}$  block of whole-cell lithium currents (120 mM LiMeS  $\pm$  EGTA) before and after the addition of 0.01, 0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{M}$  free- $\text{Ca}^{2+}$ . Addition of  $\text{Ca}^{2+}$  dose-dependently inhibited  $\text{Li}^+$  currents with  $\text{IC}_{50} = 2.1 \pm 0.4 \mu\text{M}$  ( $n = 7$ ). Averaged fractional currents  $\pm$  S.E.M. measured at  $-150$  mV were plotted as a function of the external free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and shown in the dose-response curve on the accompanying panel B. **Bottom panel C-D.** Channel's affinity for  $\text{Mg}^{2+}$  ions was assessed from the  $\text{Mg}^{2+}$  block of whole-cell lithium currents (120 mM LiMeS  $\pm$  EDTA) before and after the addition of 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$ , and 1 mM free- $\text{Mg}^{2+}$ . Addition of  $\text{Mg}^{2+}$  dose-dependently inhibited whole-cell currents with  $\text{IC}_{50} = 235 \pm 35 \mu\text{M}$  ( $n = 10$ ). The corresponding dose-response curve is shown on panel D.

**Figure 3.2 : Putative model of the secondary structure of the epithelial ECaC1  $\text{Ca}^{2+}$  channel.** ECaC1 (Genbank AJ133128) is composed of six transmembrane regions and contains a SS1-SS2 region analogous to that of voltage-gated  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels. The approximate location of negatively charged residues E535, D542, and D550 targeted in this study are shown. The primary sequences of related CaT-2 (Genbank AF209196), CaT-1 (Genbank AF304463), and CaT-L (Genbank AJ243500) channels are extremely well conserved in the putative pore region. The isoleucine doublet is also found in htrp8B (Genbank AJ243501) a splice variant of CaT-L.

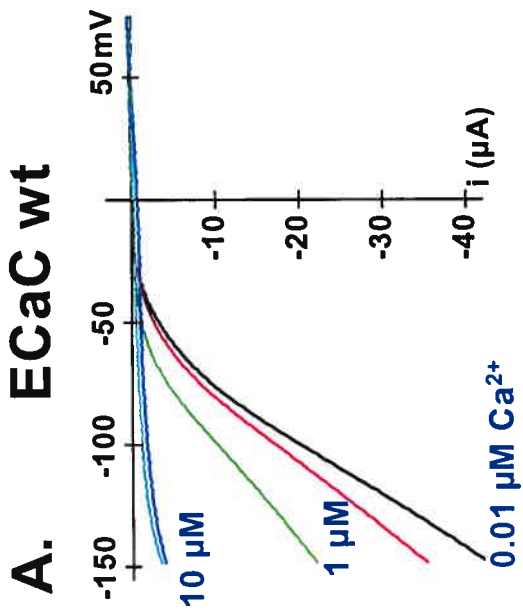
**Figure 3.3 : Residue D542 participates to high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  binding in ECaC1.** ECaC1 mutants were expressed in *Xenopus* oocytes. Recording conditions were identical as in figure 3.1. **Panels A-C.** Channel's affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  ions was assessed from the  $\text{Ca}^{2+}$  block of whole-cell lithium currents (120 mM LiMeS  $\pm$  EGTA). Currents for D550N (A), E535Q (B), and D542N (C) channels are shown before and after the addition of 0.01, 0.1, 1, 10, 100, and 1000  $\mu\text{M}$  free- $\text{Ca}^{2+}$ . **Panel D.** Addition of  $\text{Ca}^{2+}$  dose-dependently inhibited whole-cell currents with  $\text{IC}_{50} = 1.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ) for D550N;  $\text{IC}_{50} = 5 \pm 3 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ) for E535Q; and  $\text{IC}_{50} =$

$1.1 \pm 0.2$  mM ( $n = 6$ ) for D542N. At  $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ , inhibition was significantly decreased in D542N with  $p < 10^{-4}$  as compared to the wild-type channel. Averaged fractional currents  $\pm$  S.E.M. measured at  $V_m = -150$  mV were plotted as a function of the external free  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

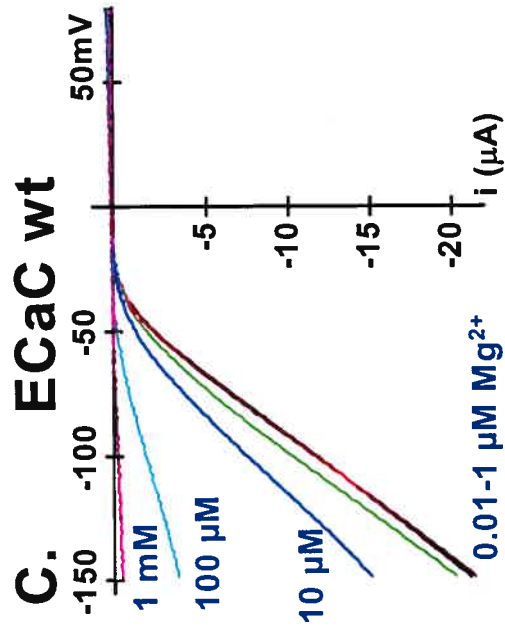
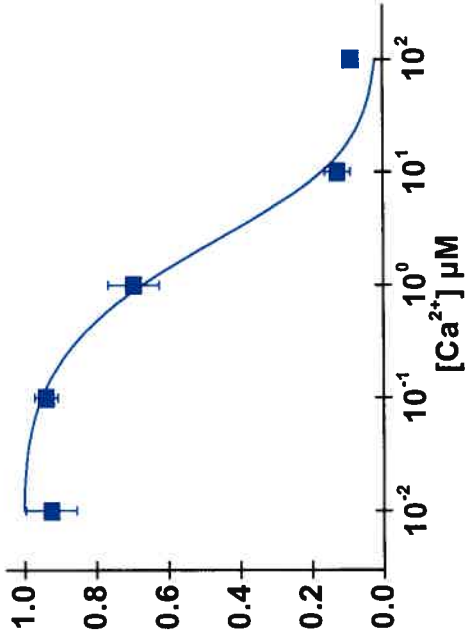
**Figure 3.4 :** Residue D542 alters  $\text{Mg}^{2+}$  inhibition in ECaC1. Panels A-C. Channel's affinity for  $\text{Mg}^{2+}$  ions was assessed from the  $\text{Mg}^{2+}$  block of whole-cell lithium currents ( $120$  mM LiMeS  $\pm$  EDTA). Currents for D550N (A), E535Q (B), and D542N (C) channels are shown before and after the addition of free- $\text{Mg}^{2+}$  at the indicated concentrations. Panel D. Addition of  $\text{Mg}^{2+}$  dose-dependently inhibited whole-cell currents with  $\text{IC}_{50} = 327 \pm 41 \mu\text{M}$  ( $n = 4$ ) for D550N and  $\text{IC}_{50} = 278 \pm 23 \mu\text{M}$  ( $n = 4$ ) for E535Q as compared to  $\text{IC}_{50} = 235 \pm 35 \mu\text{M}$  ( $n = 10$ ) for ECaC1 wt. Within the limits of our experimental conditions, the  $\text{IC}_{50}$  was estimated to be  $25 \pm 3$  mM ( $n = 4$ ) for D542N. Inhibition caused by  $1$  mM  $\text{Mg}^{2+}$  in D542N channels was significantly lower as compared to the wild-type ECaC1 channel ( $p < 10^{-6}$ ). Averaged fractional currents  $\pm$  S.E.M. measured at  $V_m = -150$  mV were plotted as a function of the external free  $\text{Mg}^{2+}$  concentration.

**Figure 3.5 :** Mutational analysis at position D542. ECaC1 D542 mutants were expressed in *Xenopus* oocytes. Panels A-C. Channel's affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  ions was assessed from the  $\text{Ca}^{2+}$  block of whole-cell lithium currents ( $120$  mM LiMeS  $\pm$  EGTA). Currents for D542E (A), D542G (B), and D542A (C) channels are shown before and after the addition of  $0.01$ ,  $0.1$ ,  $1$ ,  $10$ ,  $100 \mu\text{M}$  and  $1$ ,  $10$  mM free- $\text{Ca}^{2+}$ . Panel D. Addition of  $\text{Ca}^{2+}$  dose-dependently inhibited whole-cell currents with  $\text{IC}_{50} = 11 \pm 3 \mu\text{M}$  ( $n = 6$ ) for D542E;  $\text{IC}_{50} = 3.0 \pm 0.1$  mM ( $n = 4$ ) for D542G; and  $\text{IC}_{50} = 6.7 \pm 0.2$  mM ( $n = 4$ ) for D542A. Current inhibition caused by  $100 \mu\text{M Ca}^{2+}$  in D542G and D542A channels was significantly smaller than in the wild-type ECaC1 channel ( $p < 10^{-7}$ ). Averaged fractional currents  $\pm$  S.E.M. measured at  $V_m = -150$  mV were plotted as a function of the external free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.

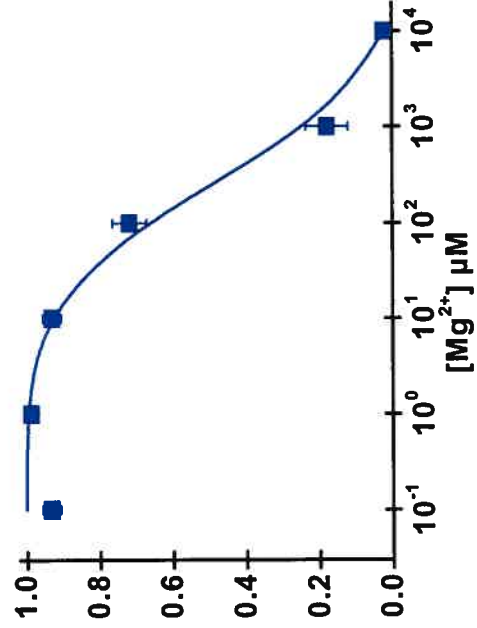
**Figure 3.6 :**  $\text{Ca}^{2+}$  permeation in ECaC1 wild-type, E535Q, D542N, and D550N channels. Whole-cell currents for the wild-type ECaC1 (A), E535Q (B), D542N (C), and D550N (D) channels were recorded following the addition of  $10$  mM  $\text{Ba}^{2+}$  (upper trace) or  $10$  mM  $\text{Ca}^{2+}$  (lower trace) to the bath. The ratio of whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$  to  $\text{Ba}^{2+}$  conductance at the same concentrations was estimated to be  $> 20$ . The arrow denotes the beginning of the bath perfusion with either  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Ba}^{2+}$ . The holding potential was  $-50$  mV throughout.



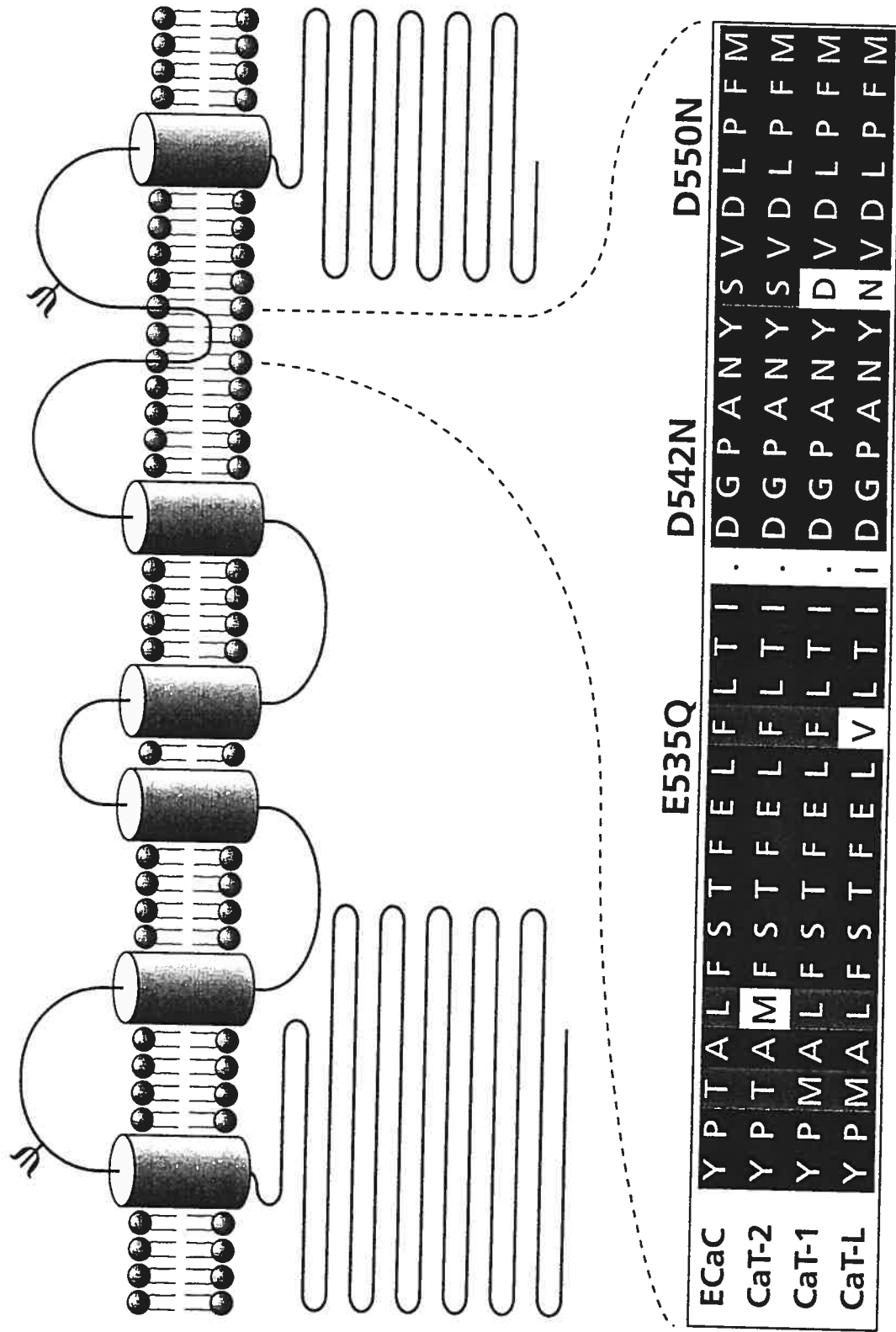
**B.  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition**



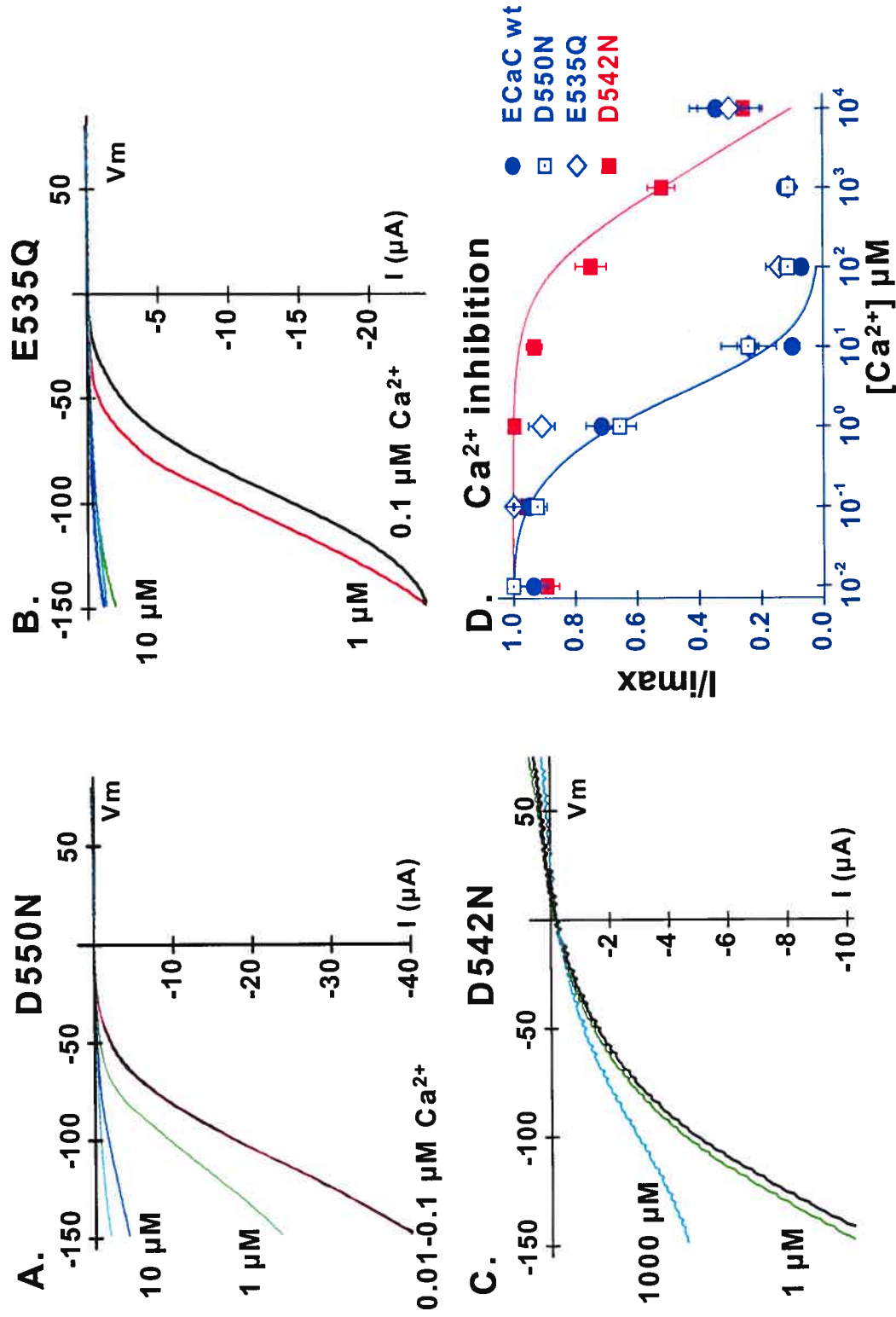
**D.  $\text{Mg}^{2+}$  inhibition**



**Figure 3.1 : High-affinity calcium binding sites in ECaC1.**

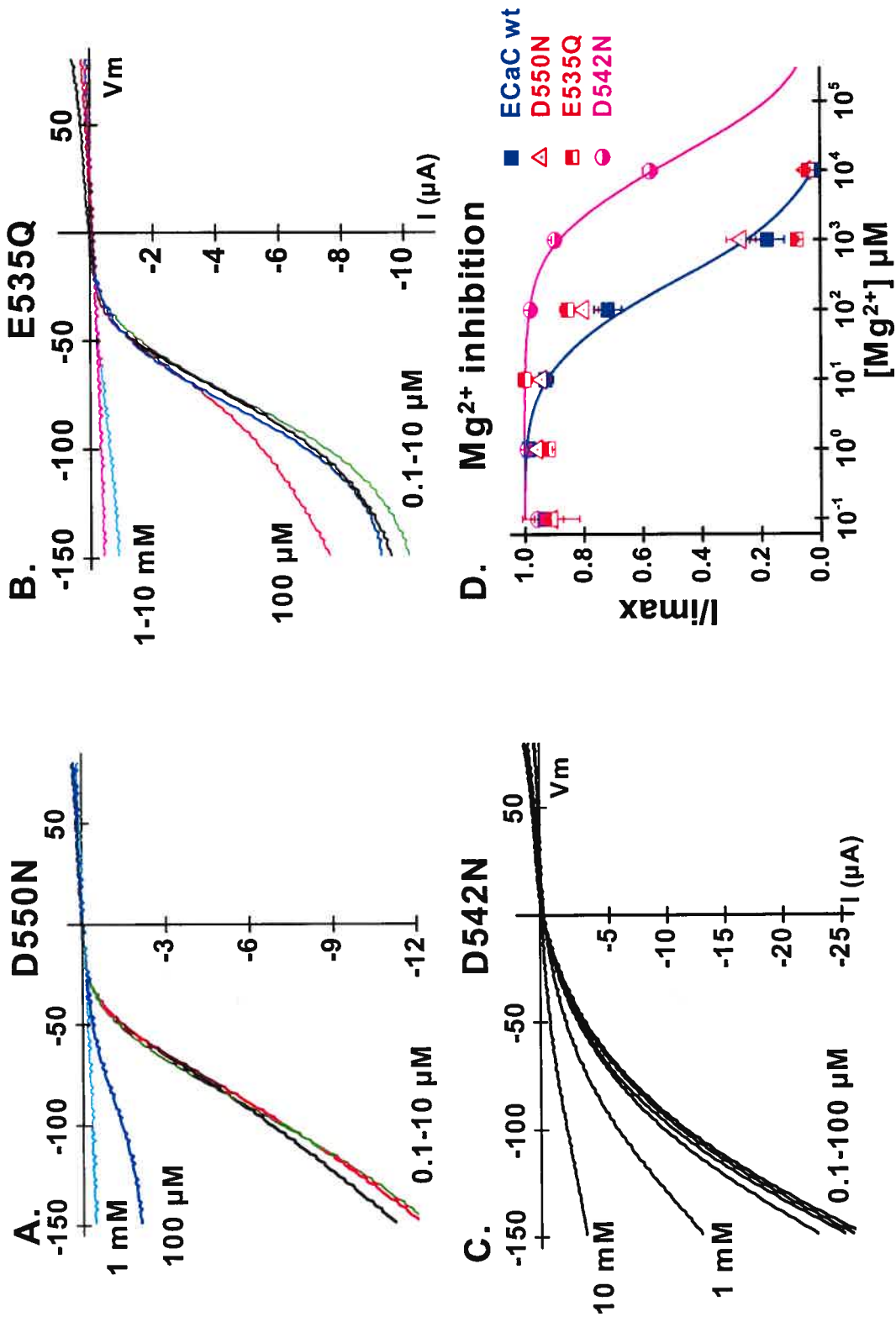


**Figure 3.2** : Putative model of the secondary structure of the epithelial ECaC1 Ca<sup>2+</sup> channel.

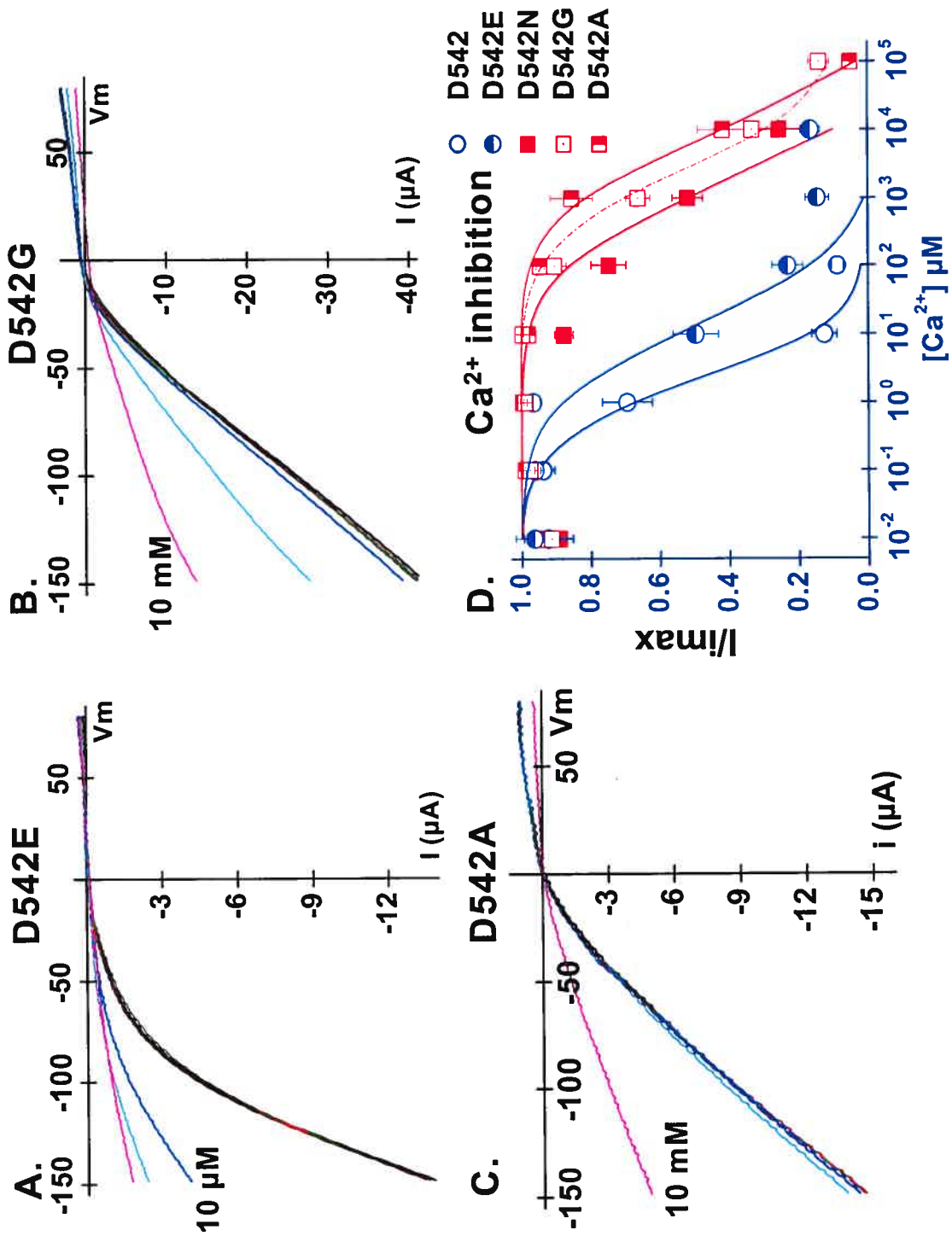


**Figure 3.3 : Residue D542 participates to high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  binding in ECaC1.**

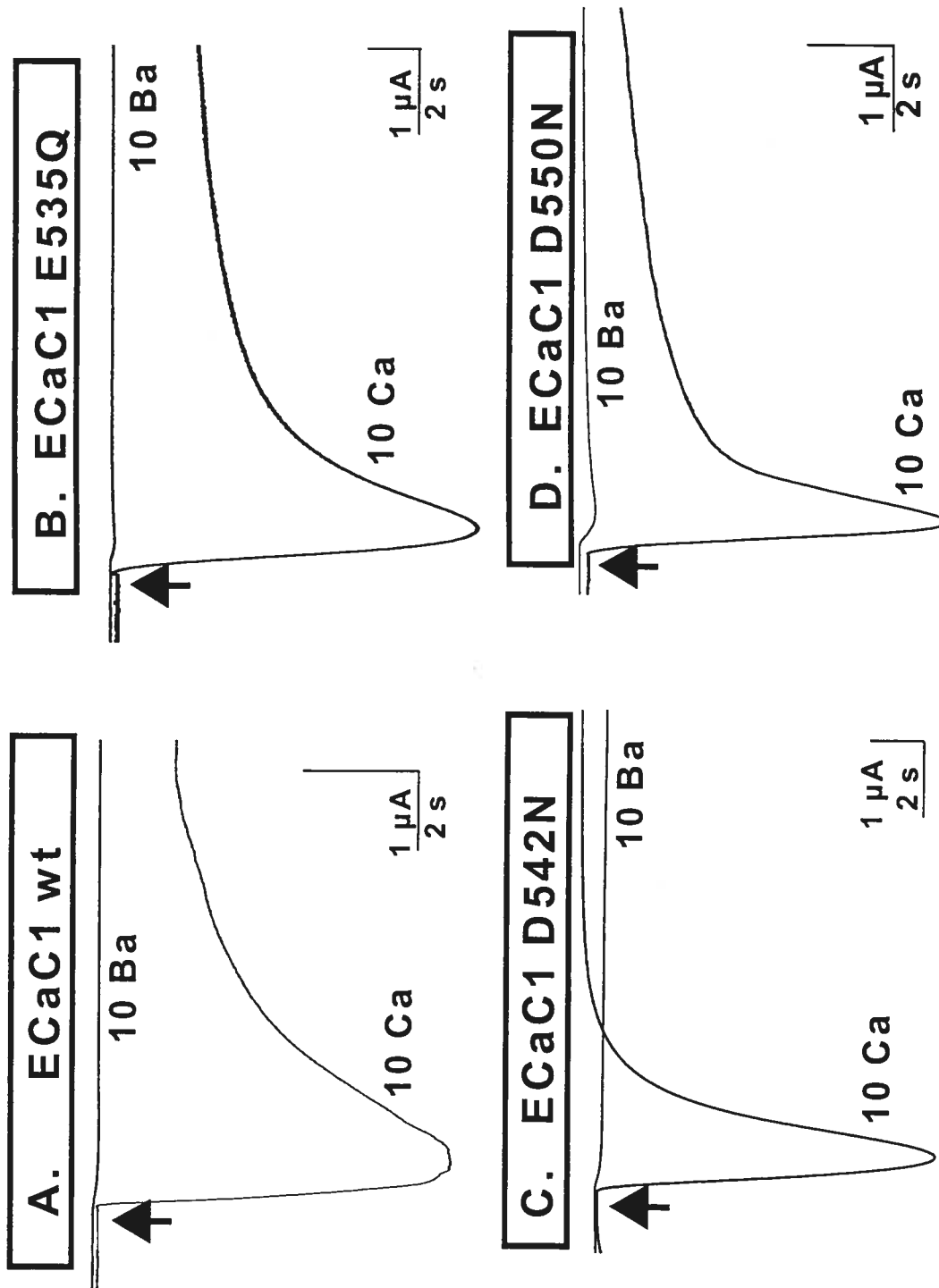




**Figure 3.4** : Residue D542 alters  $\text{Mg}^{2+}$  inhibition in ECaC1.



**Figure 3.5 : Mutational analysis at position D542.**



**Figure 3.6** :  $\text{Ca}^{2+}$  permeation in ECaC1 wild-type, E535Q, D542N, and D550N channels.

## REFERENCE LIST

1. Almers, W. and E. W. McCleskey. Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore. *J.Physiol.* 353: 585-608, 1984.
2. Bacskai, B. J. and P. A. Friedman. Activation of latent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in renal epithelial cells by parathyroid hormone. *Nature* 347: 388-391, 1990.
3. Bernatchez, G., D. Talwar, and L. Parent. Mutations in the EF-hand motif of the cardiac  $\alpha_{1C}$  calcium channel impair the inactivation of barium currents. *Biophys.J.* 75: 1727-1739, 1998.
4. Ellinor, P. T., J. Yang, W. A. Sather, J. F. Zhang, and R. W. Tsien.  $\text{Ca}^{2+}$  channel selectivity at a single locus for high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  interactions. *Neuron* 15: 1121-1132, 1995.
5. Fabiato, A. and F. Fabiato. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J.Physiol.(Paris.)* 75: 463-505, 1979.
6. Harteneck, C., T. D. Plant, and G. Schultz. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* 23: 159-166, 2000.
7. Hess, P. and R. W. Tsien. Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* 309: 453-456, 1984.
8. Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland MA, Sinauer Associates. 2001, 1-814.
9. Hoenderop, J. G., van der Kemp AW, A. Hartog, van de Graaf SF, O. C. van, P. H. Willems, and R. J. Bindels. Molecular identification of the apical  $\text{Ca}^{2+}$  channel in 1,25- dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$ -responsive epithelia. *J.Biol.Chem.* 274: 8375-8378, 1999.

10. Kaluz, S., K. Kolble, and K. B. Reid. Directional cloning of PCR products using exonuclease III. *Nucleic.Acids.Res.* 20: 4369-4370, 1992.
11. Lajeunesse, D., I. Bouhtiauy, and M. G. Brunette. Parathyroid hormone and hydrochlorothiazide increase calcium transport by the luminal membrane of rabbit distal nephron through different pathways. *Endocrinology* 134: 35-41, 1994.
12. Lux, H. D., E. Carbone, and H. Zucker. Na<sup>+</sup> currents through low-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels of chick sensory neurones: block by external Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *J.Physiol.* 430: 159-188, 1990.
13. Niemeyer, B. A., C. Bergs, U. Wissenbach, V. Flockerzi, and C. Trost. Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca<sup>2+</sup> entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98: 3600-3605, 2001.
14. Nilius, B., J. Prenen, R. Vennekens, J. G. Hoenderop, R. J. Bindels, and G. Droogmans. Modulation of the epithelial calcium channel, ECaC, by intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium* 29: 417-428, 2001.
15. Nilius, B., R. Vennekens, J. Prenen, J. G. Hoenderop, R. J. Bindels, and G. Droogmans. Whole-cell and single channel monovalent cation currents through the novel rabbit epithelial Ca<sup>2+</sup> channel ECaC. *J.Physiol.* 527: 239-248, 2000.
16. Nilius, B., R. Vennekens, J. Prenen, J. G. Hoenderop, G. Droogmans, and R. J. Bindels. The Single Pore Residue Asp542 Determines Ca<sup>2+</sup> Permeation and Mg<sup>2+</sup> Block of the Epithelial Ca<sup>2+</sup> Channel. *J.Biol.Chem* 276: 1020-1025, 2001.
17. Parent, L. and M. Gopalakrishnan. Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca<sup>2+</sup> channel. *Biophysical Journal* 69: 1801-1813, 1995.

18. Parent, L., T. Schneider, C. P. Moore, and D. Talwar. Subunit regulation of the human brain  $\alpha_{1E}$  calcium channel. *Journal of Membrane Biology* 160: 127-140, 1997.
19. Peng, J. B., X. Z. Chen, U. V. Berger, P. M. Vassilev, E. M. Brown, and M. A. Hediger. A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *J.Biol.Chem.* 275: 28186-28194, 2000.
20. Peng, J. B., X. Z. Chen, U. V. Berger, P. M. Vassilev, H. Tsukaguchi, E. M. Brown, and M. A. Hediger. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J.Biol.Chem.* 274: 22739-22746, 1999.
21. Poncet, V., J. Merot, and P. Poujeol. A calcium-permeable channel in the apical membrane of primary cultures of rabbit distal bright convoluted tubule. *Pflügers Arch.* 422: 112-119, 1992.
22. Poujeol, P., M. Bidet, and M. Tauc. Calcium transport in rabbit distal cells. *Kidney International* 48: 1102-1110, 1995.
23. Talavera, K., Staes, M., Janssens, A., Klugbauer, N., Droogmans, G., Hofmann, F., and Nilius, B. Aspartate residues of the EEDD pore locus control selectivity and permeation of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_{1G}$ . *J. Biol. Chem.* . In Press
24. Tan, S. and K. Lau. Patch-Clamp evidence for calcium channels in apical membranes of rabbit kidney connecting tubules. *J.Clin.Invest.* 92: 2731-2736, 1993.
25. Valencia, L., M. Bidet, S. Martial, E. Sanchez, E. Melendez, M. Tauc, C. Poujeol, D. Martin, M. D. Namorado, J. L. Reyes, and P. Poujeol. Nifedipine-activated  $\text{Ca}^{2+}$  permeability in newborn rat cortical collecting duct cells in primary culture. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 280: C1193-C1203, 2001.

26. Vennekens, R., J. Prenen, J. G. Hoenderop, R. J. Bindels, G. Droogmans, and B. Nilius. Modulation of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel ECaC by extracellular pH. *Pflugers Arch.* 442: 237-242, 2001.
27. Vennekens, R., J. Prenen, J. G. Hoenderop, R. J. Bindels, G. Droogmans, and B. Nilius. Pore properties and ionic block of the rabbit epithelial calcium channel expressed in HEK 293 cells. *J.Physiol.* 530: 183-191, 2001.
28. Vinay, P., A. Gougoux, and G. Lemieux. Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am.J.Physiol.* 241: F403-F411, 1981.
29. Wissenbach, U., B. A. Niemeyer, T. Fixemer, A. Schneidewind, C. Trost, A. Cavalie, K. Reus, E. Meese, H. Bonkhoff, and V. Flockerzi. Expression of CaT-Like, a novel calcium selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J.Biol.Chem* 276: 19461-19468, 2001.
30. Yang, J., P. T. Ellinor, W. A. Sather, J. F. Zhang, and R. W. Tsien. Molecular determinants of  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity and ion permeation in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Nature* 366: 158-161, 1993.
31. Yue, L., J. B. Peng, M. A. Hediger, and D. E. Clapham. CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* 410: 705-709, 2001.

## 4- DISCUSSION



#### 4.1 Principales observations et conclusions découlant de l'étude

La présente étude visait la caractérisation moléculaire de la région responsable de l'affinité et de la perméabilité du canal calcique ECaC1 (TRPV5) cloné à partir de la portion distale du rein de lapin et exprimé dans des ovocytes de *Xenopus laevis*. De plus, l'étude voulait établir un parallèle entre les résultats obtenus sur ce canal calcique épithélial et ceux obtenus lors de diverses études sur les canaux calciques dépendants du voltage membranaire (Cav).

Les résultats obtenus indiquent que l'affinité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  est similaire pour le canal ECaC1 (figure 3.1) et le canal calcique dépendant du voltage Cav1.2 de type-L. Cependant, les résultats indiquent que le profil de perméabilité cationique diffère considérablement pour ces deux types de canaux. En fait, les expériences faites en configuration cellule entière sur les ovocytes exprimant le canal ECaC1 de type sauvage démontrent que ce canal possède une plus grande perméabilité pour les cations  $\text{Ca}^{2+}$  que pour les cations  $\text{Ba}^{2+}$  (figure 3.6A), alors que le canal Cav1.2 possède une plus grande perméabilité pour le  $\text{Ba}^{2+}$  (36).

Au niveau moléculaire, les expériences démontrent que le résidu aspartate (D) chargé négativement retrouvé à la position 542 du canal ECaC1 apparaît comme le résidu responsable de l'affinité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (figures 3.3 et 3.4). Comparativement au canal ECaC1 de type sauvage, l'affinité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  du canal portant la mutation D542N est grandement diminuée, bien que les enregistrements effectués démontrent la présence de courants entrants d'ions calciques à travers ce canal (figure 3.3C). De plus, les diverses mutations effectuées sur le résidu aspartate à la position 542 (D542E, D542A et D542G) entraînent des modifications de l'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (figure 3.5), démontrant ainsi que le volume, la charge, de même que la polarité de la chaîne latérale du résidu sont des caractéristiques déterminantes dans le mécanisme de sélectivité calcique du canal ECaC1. Les mutations effectuées sur le canal ECaC1 de type sauvage n'affectent pas le rapport  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$  qui demeure similaire à celui enregistré pour le canal de type sauvage (figure 3.6).

#### 4.2 *ECaC1 est un canal calcique à haute affinité*

Les expériences électrophysiologiques effectuées tout au long de la présente étude ont d'abord évalué la perméabilité et l'affinité calciques associées au canal ECaC1 du rein de lapin. Pour ce faire, les effets de la fraction molaire anormale (AMFE) des ions divalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  dans des solutions d'ions monovalents  $\text{Li}^+$  ont été évalués. Ainsi, l'inhibition des courants lithium ( $\text{Li}^+$ ) par l'addition de cations divalents, soit le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$ , a été mesurée en configuration cellule entière. À tour de rôle, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$  ont graduellement été ajoutés par gravité dans le milieu extracellulaire (bain) des ovocytes de *Xenopus* exprimant le canal ECaC1 de type sauvage.

Nos résultats ont été obtenus à partir de courbes courant-voltage instantanées qui démontrent une rectification des courants entrants de cations monovalents ( $\text{Li}^+$ ) à des voltages positifs, c'est-à-dire qu'aucun courant ne s'écoule à travers le canal ionique même si ce dernier est toujours à l'état ouvert. Des courants importants de  $\text{Li}^+$  ont été enregistrés, et ce même en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le bain à des concentrations variant entre 0,01  $\mu\text{M}$  et 1,0  $\mu\text{M}$ . Cependant, lorsque les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire ont atteint des valeurs entre 10 et 100  $\mu\text{M}$ , les courants entrants de  $\text{Li}^+$  ont dramatiquement diminués, étant presque inhibés, démontrant ainsi un effet de fraction molaire anormale (AMFE) du  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur d'une solution de  $\text{Li}^+$  pour le canal ECaC1 (figure 3.1A). Des résultats similaires ont été obtenus par l'addition de  $\text{Mg}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire, mais des concentrations de ces cations divalents de 100  $\mu\text{M}$  sont requises avant de déceler une diminution significative des courants  $\text{Li}^+$ , démontrant ainsi une inhibition plus modérée des courants  $\text{Li}^+$  par le  $\text{Mg}^{2+}$  (figure 3.1C). Tel que mentionné précédemment, la propriété de perméabilité d'un canal se mesure par la conductance ( $G = I/V$ ) qui peut être estimée par le calcul de la pente d'une courbe courant-voltage. De ce fait, il apparaît évident que la conductance du canal ECaC1 pour les cations monovalents ( $\text{Li}^+$ ), donc sa perméabilité, est grandement diminuée lorsque les concentrations de cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire atteignent des valeurs élevées puisque la pente des courbes à ces concentrations est très faible.

D'après Hille (36), les effets associés à la fraction molaire anormale mettent en évidence l'existence d'au moins deux sites de liaison à l'intérieur du pore du canal calcique

de type-L qui sont occupés par des ions perméables se déplaçant en file indienne à travers le canal. Ainsi, en absence de cations divalents dans les solutions extracellulaires, le pore du canal est perméable aux ions monovalents  $\text{Li}^+$ . Cependant, les résultats obtenus au cours des présentes expériences indiquent que le canal ECaC1 présente des effets de la fraction molaire anormale lorsque les solutions extracellulaires deviennent mixtes ( $\text{Li}^+ / \text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Li}^+ / \text{Mg}^{2+}$ ). Ces effets démontrent donc que, lorsque les concentrations extracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  augmentent, ces cations divalents et le  $\text{Li}^+$  interagissent et se lient simultanément aux sites de liaison situés à l'intérieur du pore du canal ECaC1 inhibant alors pratiquement tous les courants entrants. Ainsi, en présence de  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  ou de  $[\text{Mg}^{2+}]_o$ , les sites de liaison situés à l'intérieur du pore du canal ECaC1 vont préférentiellement lier les cations divalents démontrant ainsi une plus grande affinité de ces sites de liaison pour les ions divalents que pour les monovalents. Les résultats obtenus indiquent qu'une plus grande concentration extracellulaire de  $\text{Mg}^{2+}$  est nécessaire afin d'entraîner une diminution de la perméabilité des ions  $\text{Li}^+$ , ce qui traduit un effet de fraction molaire anormale plus modéré. Cet AMFE moins prononcé dans le cas du  $\text{Li}^+ / \text{Mg}^{2+}$  nous indique que l'affinité du  $\text{Mg}^{2+}$  pour le canal ECaC1 est moins importante que pour le  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ainsi, ces expériences démontrent que la perméabilité du canal ECaC1 pour les cations monovalents  $\text{Li}^+$  est élevée lorsque les solutions externes de  $\text{Li}^+$  sont exemptes de cations divalents, mais que cette perméabilité diminue progressivement, en fonction de la dose, par l'addition de cations divalents ( $[\text{Ca}^{2+}] = 0,01-100 \mu\text{M}$  ou  $[\text{Mg}^{2+}] = 0,01 \mu\text{M}-10 \text{mM}$ ) dans la solution initiale, et ce, à chacun des potentiels membranaires testés entre  $-150$  et  $-75 \text{mV}$ .

À partir de ces résultats obtenus par l'inhibition des courants  $\text{Li}^+$  après l'addition de cations divalents, des courbes dose-réponse ont ensuite été construites afin de déterminer l'affinité du canal ECaC1 pour les cations  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (figures 3.1B et D). Les courants entrants de  $\text{Li}^+$  enregistrés au voltage membranaire de  $-150 \text{mV}$  ont été ajustés à l'équation présentée dans la section « Méthodologie » afin d'obtenir le  $\text{IC}_{50}$  pour chacun des cations divalents à l'étude, soit le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$ . Le  $\text{IC}_{50}$  calculé pour le  $\text{Ca}^{2+}$  correspond à une valeur de  $2,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$  ( $n = 9$ ) alors que celui pour le  $\text{Mg}^{2+}$  est équivalent à  $235 \pm 35 \mu\text{M}$  ( $n = 10$ ). Ces valeurs indiquent clairement qu'une plus faible concentration de calcium est requise afin d'inhiber de 50 % les courants entrants de lithium, comparativement au

magnésium, puisque le  $IC_{50}$  pour le  $Ca^{2+}$  est plus petit que celui du  $Mg^{2+}$  d'un facteur 100. Ainsi, et tel que prévu pour un canal sélectif aux ions  $Ca^{2+}$ , le canal ECaC1 présente une plus grande affinité pour le  $Ca^{2+}$  que pour le  $Mg^{2+}$ .

Ces résultats qui démontrent une haute affinité pour les cations divalents  $Ca^{2+}$  se rapprochent considérablement des valeurs rapportées pour différents canaux calciques précédemment étudiés. En fait, comme l'indique le tableau II, les résultats obtenus au cours de cette étude sont similaires à ceux observés pour le canal ECaC2 (TRPV6) exprimé dans des cellules ovariennes de hamster chinois (88), de même que ceux estimés pour le canal calcique dépendant du voltage  $Ca_v1.2$  (62). Cependant, nos résultats diffèrent quelque peu de ceux de Vennekens et ses collègues qui obtiennent une affinité calcique en valeur absolue pour le canal ECaC1 supérieure d'un facteur 10 (79, 80). Cette différence est tout à fait compatible avec les variations expérimentales puisqu'il n'existe aucune méthode expérimentale qui permette de déterminer avec exactitude les concentrations absolues de  $Ca^{2+}$  libre à des valeurs inférieures à  $10 \mu M$ .

**Tableau II** Valeurs de l'affinité calcique pour différents canaux  $Ca^{2+}$  dépendants ou non du voltage membranaire

Canal	Dépendance au voltage	Affinité $Ca^{2+}$	Référence
ECaC1 (TRPV5)	Non dépendant du voltage	$2,2 \pm 0,4 \mu M$ (n = 10)	45
ECaC1 (TRPV5)	Non dépendant du voltage	$0,2 \pm 0,03 \mu M$ (n = 8)	79, 80
ECaC2 (TRPV6)	Non dépendant du voltage	$2,9 \pm 0,6 \mu M$ (n = 6)	88
$Ca_v1.2$	Dépendant du voltage	$1,7 \pm 0,7 \mu M$ (n = 5)	62

Bien que le canal ECaC1 ne dépende pas du voltage membranaire pour son activation, il apparaît évident que les propriétés de perméabilité et d'affinité pour ce canal calcique présentent des similarités avec celles des canaux  $Ca^{2+}$  dépendant du voltage. Ainsi, à la lumière des résultats expérimentaux obtenus pour cette première partie de l'étude, il est possible d'affirmer que le canal ECaC1 présente toutes les propriétés archétypiques des canaux sélectifs au  $Ca^{2+}$  qui ont été largement étudiés au cours des

dernières décennies : une haute affinité pour les cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$ , une inhibition modérée des courants d'ions monovalents  $\text{Li}^+$  par le  $\text{Mg}^{2+}$ , un effet de fraction molaire anormale (AMFE) du  $\text{Ca}^{2+}$  dans des solutions de  $\text{Li}^+$ , et une perméabilité calcique.

#### 4.3 *L'affinité calcique de ECaC1 est médiée par un simple résidu acide*

La première partie de l'étude a permis de démontrer une haute affinité du canal ECaC1 pour les cations divalents, et plus particulièrement pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Suite à l'obtention de ces résultats concluants, les expériences électrophysiologiques qui ont suivi se sont précisées et se sont orientées vers la recherche des déterminants moléculaires responsables de cette sélectivité calcique.

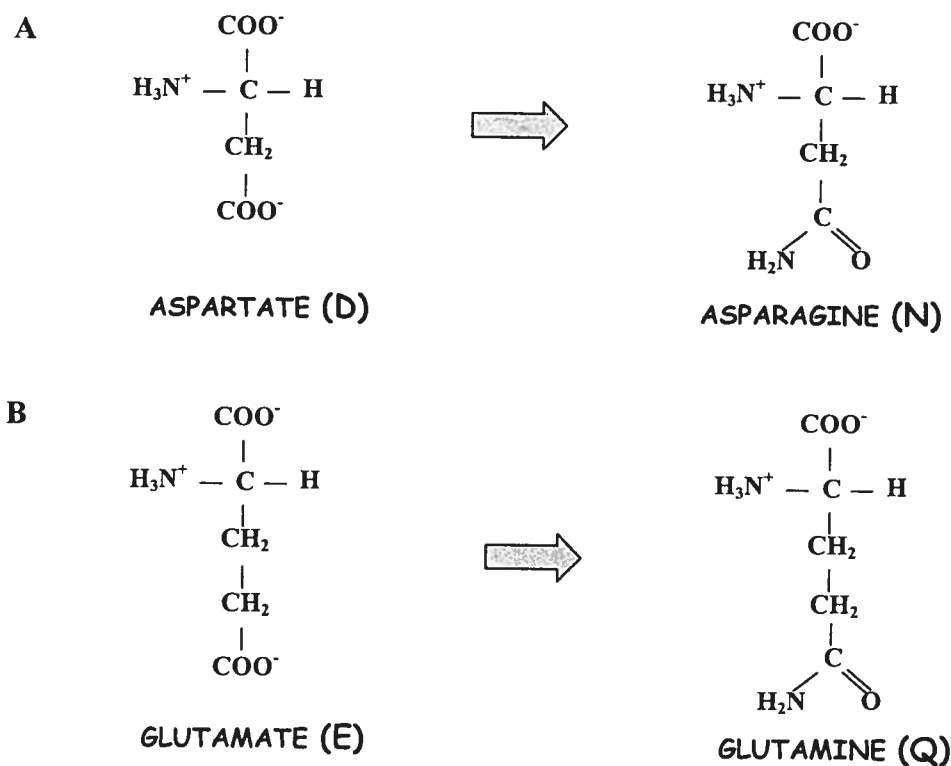
Depuis quelques années, plusieurs expériences effectuées par divers groupes de chercheurs sur les différents canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage membranaire ont permis de démontrer que des résidus glutamate chargés négativement composent le motif moléculaire responsable de la sélectivité calcique de ces canaux (62, 87). En fait, ces recherches suggèrent que la liaison des ions  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la région présumée du pore des canaux calciques dépendants du voltage soit possible grâce à la présence de quatre résidus glutamate (Glu ou E). Ces résidus sont conservés à travers les différents types de canaux calciques dépendants du voltage et se retrouvent à des positions équivalentes sur chacun des quatre domaines répétés (I à IV) de la sous-unité  $\alpha_1$  qui constitue la principale sous-unité de ces canaux  $\text{Ca}^{2+}$ . Cet anneau de glutamate (EEEE) à l'intérieur du pore forme un petit rassemblement de groupements carboxyles qui est capable de lier au moins un cation divalent avec une haute affinité. Afin de déterminer l'implication de chacun de ces résidus glutamate dans le mécanisme de sélectivité calcique des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage, diverses mutations ont été effectuées sur ces canaux. Bien que les quatre résidus glutamate ne contribuent pas également à la liaison du calcium à l'intérieur de la région présumée du pore, les analyses démontrent que les interactions électrostatiques qui se forment entre chacun de ces résidus et les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont déterminantes pour la sélectivité calcique du canal (62). En fait, des recherches ont démontré que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont entourés par des molécules d'eau lorsqu'ils se retrouvent dans les solutions aqueuses des milieux intra- et extracellulaires (69). Comme le diamètre de la région présumée du pore des

canaux calciques est trop petit pour permettre le passage des cations divalents hydratés, ces derniers perdent les molécules d'eau qui les entourent pour ensuite pénétrer à l'intérieur du pore. La déshydratation des ions constitue la plus haute barrière d'énergie que doivent surmonter les ions pour diffuser dans un canal ionique (63). Des résidus hydrophiles sont présents à l'intérieur du pore du canal, résidus qui permettent d'hydrater les ions qui s'y retrouvent, contribuant ainsi à diminuer l'énergie libre des ions afin de faciliter leur passage d'une extrémité à l'autre du pore. L'hypothèse veut donc que le filtre de sélectivité présent à l'intérieur du pore des canaux calciques et qui semble avoir une grande affinité pour ces cations, agit comme des molécules d'eau et facilite le passage des ions  $\text{Ca}^{2+}$  déshydratés à travers la membrane plasmique hydrophobe.

Sur la base de ces découvertes sur les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage, les déterminants moléculaires responsables de la sélectivité calcique du canal ECaC1 ont été étudiés et analysés en effectuant des mutations ponctuelles sur certains des résidus chargés négativement retrouvés à l'intérieur de la région présumée du pore de ce canal. Bien que plusieurs résidus acides résident dans la région présumée du pore du canal ECaC1, nous nous sommes attardés à seulement trois résidus négatifs, soit le glutamate (Glu ou E) retrouvé à la position 535 ainsi que les deux résidus aspartate (Asp ou D) retrouvés aux positions 542 et 550. De plus, des analyses d'homologie de la région présumée du pore entre les segments S5 et S6 des canaux calciques TRPV5 et TRPV6 indiquent que ces résidus acides sont conservés d'un canal à l'autre, ce qui laisse supposer une implication importante de l'un ou l'autre de ces trois résidus dans les propriétés de sélectivité du canal (figure 1.6). Chacun de ces trois résidus chargés négativement a simplement été neutralisé pour ainsi obtenir les canaux ECaC1 portant les mutations E535Q, D542N et D550N. Cette simple mutation qui annule la charge négative de l'acide aminé permet de conserver le volume du résidu (figure 4.1). Suite à ces mutations ponctuelles, l'implication de chacun de ces trois résidus acides (E535, D542 et D550) dans le mécanisme d'affinité  $\text{Ca}^{2+}$  a été évalué tel que décrit dans la section précédente, à l'aide d'expériences électrophysiologiques permettant de tracer des courbes courant-voltage instantanées ainsi que des courbes dose-réponse.

Les résultats obtenus pour les canaux ECaC1 portant les mutations E535Q et D550N sont similaires à ceux décrits précédemment pour le canal de type sauvage (figures

3.3A et B). Tout d'abord, une rectification des courants entrants de cations monovalents  $\text{Li}^+$  est observée lorsque les voltages deviennent positifs, et ce pour les deux canaux mutés. De plus, l'addition de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire inhibe graduellement, et ce en fonction des concentrations, les courants entrants de monovalents. Tout comme pour le canal ECaC1 de type sauvage, l'augmentation des concentrations extracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  au-delà de  $1,0 \mu\text{M}$  entraîne une diminution marquée des courants entrants de  $\text{Li}^+$ . En fait, d'après les courbes dose-réponse tracées suite à ces mesures électrophysiologiques, le  $\text{IC}_{50}$



\* Adaptée de Voet et al. 1995.

**Figure 4.1 :** Neutralisation des résidus chargés négativement retrouvés dans la région présumée du pore du canal ECaC1

**A)** Acide aminé aspartate (D) retrouvé aux positions 542 et 550, neutralisé en asparagine (N). **B)** Acide aminé glutamate (E) retrouvé à la position 535, neutralisé en glutamine (Q).

calculé pour le canal muté E535Q est de  $5,0 \pm 3,0 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ) alors que celui pour le canal muté D550N est équivalent à  $1,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ), résultats qui se rapprochent considérablement de celui calculé pour le canal ECaC1 de type sauvage (figure 3.3D). De plus, les canaux mutés E535Q et D550N présentent des effets de fraction molaire anormale. En effet, il est évident que lorsque des ions  $\text{Ca}^{2+}$  s'ajoutent dans le milieu extracellulaire, ces cations divalents interagissent avec les cations monovalents  $\text{Li}^+$  pour se lier à l'intérieur

du pore, empêchant ainsi le passage des ions  $\text{Li}^+$ . Cependant, lorsque les concentrations extracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  augmentent considérablement pour atteindre des valeurs de l'ordre du mM, des courants entrants peuvent à nouveau être enregistrés en configuration cellule entière, mais cette fois ces courants impliquent les cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$ ; étant plus nombreux que les ions monovalents  $\text{Li}^+$ , ils sont préférentiellement liés à l'intérieur de la région présumée du pore. Ces résultats démontrent que l'affinité calcique pour ces deux canaux ECaC1 mutés est similaire à celle observée pour le canal de type sauvage, ce qui indique que la neutralisation des résidus glutamate à la position 535 et aspartate à la position 550 ne modifie pas l'affinité du canal ECaC1 pour les cations  $\text{Ca}^{2+}$ .

Contrairement aux résultats observés pour les deux canaux mutés E535Q et D550N, le canal ECaC1 portant la mutation D542N présente des résultats électrophysiologiques diamétralement opposés à ceux obtenus pour le canal ECaC1 de type sauvage (figure 3.3C). Tout d'abord, la rectification de ce canal a été diminuée de sorte que des courants sortants de cations ont été enregistrés à des voltages membranaires positifs. Ceci indique que même à des voltages membranaires positifs, le canal demeure à l'état ouvert, laissant ainsi sortir les charges positives qui se sont accumulées dans le milieu intracellulaire des ovocytes afin de permettre le retour à un voltage membranaire de repos. Ensuite, l'addition d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire ne diminue pratiquement pas les courants entrants générés par les ions monovalents  $\text{Li}^+$ . Même à des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  aussi élevées que 1 000  $\mu\text{M}$  (1,0 mM), les courants de cations monovalents  $\text{Li}^+$  ne sont jamais complètement inhibés. Le  $\text{IC}_{50}$  calculé pour le canal ECaC1 portant la mutation D542N s'élève à  $1,1 \pm 0,2$  mM ( $n = 6$ ), démontrant ainsi une augmentation d'un facteur 1 000 pour le  $\text{IC}_{50}$  comparativement à celui du canal ECaC1 de type sauvage (figure 3.3D). Cette valeur élevée du  $\text{IC}_{50}$  pour le canal muté indique qu'une plus grande concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  est nécessaire dans le milieu extracellulaire des ovocytes afin d'inhiber de 50 % les courants entrants de  $\text{Li}^+$ . Ces résultats démontrent clairement que l'affinité calcique du canal ECaC1 est grandement diminuée lorsque le résidu aspartate (D) à la position 542 est neutralisé en résidu asparagine (N).

Afin d'évaluer si le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$  se lient au même résidu à l'intérieur de la région présumée du pore du canal ECaC1, les mêmes expériences électrophysiologiques ont été effectuées, mais cette fois en ajoutant les cations divalents  $\text{Mg}^{2+}$  dans les solutions initiales



de  $\text{Li}^+$ . Les résultats obtenus avec les canaux portant les mutations simples E535Q et D550N sont similaires à ceux précédemment observés et décrits pour le canal ECaC1 de type sauvage (figures 3.4A et B). Tout d'abord, la rectification entrante est préservée pour ces canaux ECaC1 mutés. De plus, l'addition de concentrations croissantes de  $\text{Mg}^{2+}$  dans le bain des ovocytes entraîne une diminution rapide des courants entrants de monovalents  $\text{Li}^+$ . Les concentrations de plus de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Mg}^{2+}$  diminuent considérablement les courants. Ces résultats ont permis de calculer les  $\text{IC}_{50}$  pour chacun des canaux mutés (figure 3.4D). Ainsi, le  $\text{IC}_{50}$  pour le canal portant la mutation E535Q s'élève à  $278 \pm 23 \mu\text{M}$  ( $n = 4$ ) alors que celui pour le canal portant la mutation D550N est de  $327 \pm 41 \mu\text{M}$  ( $n = 4$ ), valeurs qui se rapprochent considérablement de celle calculée pour le canal ECaC1 de type sauvage qui est de  $235 \pm 35 \mu\text{M}$  ( $n = 10$ ) (figure 3.4D). Une fois de plus, ces résultats démontrent que la neutralisation des charges négatives aux positions 535 et 550 n'affecte pratiquement pas la sélectivité du canal pour les cations  $\text{Mg}^{2+}$ .

Tout comme lors des expériences faites avec l'addition des cations  $\text{Ca}^{2+}$ , la neutralisation du résidu acide aspartate à la position 542 entraîne une diminution significative de l'affinité du canal ECaC1 avec l'utilisation des cations divalents  $\text{Mg}^{2+}$  (figure 3.4C). Dans ce cas-ci, les concentrations extracellulaires de  $\text{Mg}^{2+}$  ont été augmentées jusqu'à atteindre des valeurs de 10 mM, sans toutefois inhiber complètement les courants engendrés par les cations monovalents  $\text{Li}^+$ . En moyenne, il a été estimé que cette concentration élevée de  $\text{Mg}^{2+}$  inhibe environ  $43 \pm 3\%$  ( $n = 4$ ) des courants monovalents. Des concentrations supérieures à 100 mM de  $\text{Mg}^{2+}$  conduisent à des solutions hyperosmolaires ce qui signifie que la concentration totale des particules de soluté présentes dans cette solution extracellulaire est plus importante que celle dans le milieu intracellulaire des ovocytes, entraînant alors une sortie importante d'eau des ovocytes (51). Ainsi, et à la limite des résultats obtenus au cours de cette expérimentation, le  $\text{IC}_{50}$  pour le canal portant la mutation D542N a été estimé comme étant supérieur à  $25 \pm 3 \text{ mM}$  ( $n = 4$ ), ce qui correspond à une valeur supérieure d'un facteur 100 au  $\text{IC}_{50}$  calculé pour le canal ECaC1 de type sauvage (figure 3.4D).

À la lumière des résultats obtenus au cours de cette étude et présentés dans le tableau synthèse III, il apparaît évident que la neutralisation du résidu glutamate retrouvé à la position 535 de même que du résidu aspartate retrouvé à la position 550, tous deux

chargés négativement, n'entraîne pas de changement significatif quant à l'affinité des cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  du canal ECaC1. Tout comme pour le canal ECaC1 de type sauvage, lorsque présents dans le milieu extracellulaire des ovocytes exprimant les canaux ECaC1 portant les mutations E535Q ou D550N, les cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sont préférés aux cations monovalents  $\text{Li}^+$  pour la liaison à l'intérieur du pore du canal. Cependant, il en est tout autrement en ce qui concerne le canal ECaC1 portant la mutation D542N. En effet, les résultats obtenus indiquent que la neutralisation du résidu acide aspartate retrouvé à la position 542 modifie considérablement l'affinité du canal calcique pour les cations  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , démontrant ainsi que ce résidu représente un déterminant moléculaire crucial pour l'affinité au calcium et au magnésium du canal ECaC1. En fait, cette mutation empêche les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  de se lier aux sites à haute affinité situés à l'intérieur de la région présumée du pore, laissant l'entrée libre pour le passage des ions  $\text{Li}^+$  qui continuent à générer les courants entrants. Ainsi, bien que la mutation D542N entraîne des changements importants au niveau de l'affinité des cations divalents, et par le fait même de leur perméabilité à travers le canal ECaC1, le canal muté permet tout de même le passage des cations monovalents  $\text{Li}^+$ , ce qui suppose l'implication probable d'un autre déterminant moléculaire pour l'affinité et la perméabilité de ces cations. Ainsi, l'affinité du canal ECaC1 pour les cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  semblent être déterminée par le même acide aminé situé à l'intérieur de la région présumée du pore du canal.

**Tableau III** Tableau synthèse présentant l'affinité ( $\text{IC}_{50}$ ) pour les cations  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  du canal ECaC1 de type sauvage et ceux portant diverses mutations

Cation divalent ajouté au milieu extracellulaire	Mutations sur le canal ECaC1			
	Type sauvage	D550N	E535Q	D542N
$\text{Ca}^{2+}$	$2,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (n = 9)	$1,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (n = 5)	$5,0 \pm 3,0 \mu\text{M}$ (n = 5)	$1,1 \pm 0,2 \text{ mM}$ (n = 6)
$\text{Mg}^{2+}$	$235 \pm 35 \mu\text{M}$ (n = 10)	$327 \pm 41 \mu\text{M}$ (n = 4)	$278 \pm 23 \mu\text{M}$ (n = 4)	$> 25 \pm 3 \text{ mM}$ (n = 4)

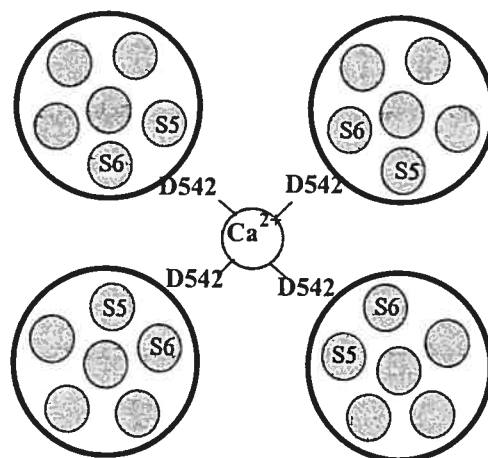
Les résultats de la présente étude sont en accord avec ceux obtenus par Nilius et ses collègues (59) qui avaient identifié le résidu aspartate à la position 542 comme étant un déterminant de la sélectivité calcique et de l'inhibition au  $Mg^{2+}$  du canal épithélial ECaC1. Bien que l'étude menée par Nilius n'ait alors pas démontré directement à l'aide d'expériences électrophysiologiques l'implication de ce résidu acide dans le mécanisme d'affinité calcique du canal, les chercheurs se sont basés sur les potentiels d'inversion ( $E_{rev}$ ) des courants enregistrés en configuration cellule entière pour affirmer que ce résidu chargé négativement constituait un déterminant moléculaire important dans la sélectivité calcique.

Des analyses de séquences d'acides aminés démontrent que le canal ECaC1 présente un haut pourcentage d'homologie avec le canal ECaC2 (CaT1), surtout dans la région présumée du pore. De plus, le résidu acide aspartate présent dans le pore est conservé pour chacun de ces deux canaux calciques épithéliaux. En fait, ce résidu se retrouve à la position 542 pour le canal ECaC1, alors que pour le canal ECaC2 (CaT1) il se retrouve à la position 541. De récentes études menées par Yue et ses collaborateurs (88) sur le canal ECaC2 (CaT1) indiquent que ce canal a une affinité pour le  $Ca^{2+}$  de l'ordre du micromolaire ( $\mu M$ ), tout comme la présente étude l'indique pour le canal ECaC1, ce qui laisse présumer un rôle fonctionnel homologue pour ces deux canaux. À ce jour, aucune étude des mutations n'a été effectuée sur les résidus aspartate retrouvés aux positions 541 et 549 de même que sur le résidu glutamate à la position 534 du canal ECaC2 afin de déterminer quel résidu acide confère à ce canal sa haute affinité calcique. Cependant, l'alignement de la région du pore de ces canaux calciques épithéliaux ECaC1 et ECaC2 révèle la présence d'une charge négative additionnelle à l'intérieur du pore du canal ECaC2. En fait, ce canal possède un résidu aspartate supplémentaire retrouvé à la position 547, alors que le canal ECaC1 présente à la position correspondante un résidu sérine (S548). Hoenderop et ses collègues (43) ont effectué la simple mutation du résidu sérine de ECaC1 en résidu aspartate (S548D), et l'inverse sur le canal ECaC2, soit la simple mutation du résidu aspartate en sérine (D547S). Ces mutations n'entraînent aucun effet marqué sur les courants  $Ca^{2+}$ . Sur la base de ces résultats, il est peu probable que cet acide aminé joue un rôle déterminant dans les différentes propriétés du pore du canal ECaC2 (43). Ainsi, les déterminants moléculaires responsables de la sélectivité aux cations divalents du canal ECaC2 (CaT1) sont possiblement associés à un, ou plusieurs, des trois résidus chargés négativement E534, D541 et D549, résidus qui sont homologues à ceux identifiés à

l'intérieur du pore du canal ECaC1 (E535, D542 et D550). Nos résultats obtenus avec le canal ECaC1 qui indiquent un rôle déterminant du résidu D542 dans l'affinité du canal laissent présumer un rôle potentiel du résidu D541 pour le canal ECaC2 (CaT1).

Contrairement aux canaux calciques épithéliaux qui sont encore peu étudiés, diverses études ont été effectuées sur les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage. Les présents résultats démontrent que la neutralisation d'un simple résidu acide situé à l'intérieur du pore du canal ECaC1 à la position 542 entraîne une diminution drastique d'un facteur 1 000 de l'affinité du canal pour les cations  $\text{Ca}^{2+}$  et d'un facteur 100 pour les ions  $\text{Mg}^{2+}$ . Par contre, les expériences électrophysiologiques faites sur le canal  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant du voltage membranaire  $\text{Ca}_v1.2$  indiquent que la neutralisation d'un seul résidu glutamate (E) sur l'un ou l'autre des quatre domaines (I à IV) à l'intérieur du pore entraîne une diminution de l'affinité calcique seulement d'un facteur 10 par rapport au canal de type sauvage (62), ce qui représente une baisse d'affinité beaucoup moins marquée que celle engendrée par la simple mutation D542N sur le canal ECaC1. Afin de diminuer l'affinité calcique du canal  $\text{Ca}_v1.2$  d'un facteur 1 000, quatre mutations simultanées doivent être effectuées sur les quatre résidus formant l'anneau glutamate (EEEE) situés sur chacun un domaine (I-IV) (E393, E736, E1145 et E1446) (23).

De ce fait, il devient tentant de suggérer que le canal ECaC1 est une protéine qui fonctionne comme un tétramère, de façon similaire aux canaux potassiques ( $\text{K}^+$ ) dépendants du voltage membranaire. Le filtre de sélectivité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur du pore du canal consisterait en un anneau formé de quatre résidus aspartate chargés négativement, tout comme pour l'anneau glutamate formant le filtre de sélectivité des canaux calciques dépendants du voltage. Tout récemment, Hoenderop et ses collègues (44) ont démontré que le canal ECaC1 (TRPV5) possède une stoïchiométrie tétramérique. Ainsi, cette structure de tétramère implique que quatre protéines homologues s'assemblent pour former une structure moléculaire : le canal. Chacune de ces protéines (ou sous-unité) ayant une région s'orientant une face à l'autre pour former la région présumée du pore du canal, avec ainsi quatre résidus aspartate situés à la position 542 s'orientant vers l'intérieur de ce pore pour former le filtre de sélectivité pour les cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (figure 4.2).



\* Adaptée de Hoenderop et al. 2000 (ref.42)

**Figure 4.2 : Structure tétramérique présumée pour le canal calcique épithélial ECaC1**

Le canal ECaC1 serait possiblement formé par l'assemblage de quatre protéines identiques, chacune composée de six segments transmembranaires. Entre les segments S5 et S6 se retrouve la région présumée du pore comprenant les résidus aspartate à la position 542 qui compose possiblement le filtre de sélectivité du canal pour les cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ .

**4.4 Analyses des mutations du résidu D542 : rôle de la chaîne latérale**

Suite à ces résultats qui démontrent l'importance du résidu aspartate situé à la position 542 à l'intérieur de la région présumée du pore du canal épithélial ECaC1 dans le mécanisme de sélectivité des cations  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , les expériences se sont orientées afin de déterminer la contribution et l'importance des interactions électrostatiques de ce résidu dans l'affinité calcique du canal ECaC1.

Les protéines sont toutes constituées de petites molécules appelées acides aminés ou résidus. Il existe 20 acides aminés importants, tous dotés de deux groupements fonctionnels : un groupement amine ( $-\text{NH}_2$ ) et un groupement acide organique ou carboxyle ( $-\text{COOH}$ ), qui sont tous deux portés par le même atome central de carbone. En fait, seule la structure atomique de leur troisième groupement lié au carbone central, appelé radical R ou chaîne latérale, les distingue les uns des autres. Chaque acide aminé doit son comportement chimique particulier de même que son acidité ou son alcalinité relative aux particularités de l'arrangement des atomes de sa chaîne latérale (51). Ainsi, les acides aminés sont classés selon la polarité de leurs chaînes latérales. D'après ce mode de

classification, il existe trois types principaux d'acides aminés : 1) à chaîne latérale non polaire, 2) à chaîne latérale polaire non chargée, et 3) à chaîne latérale polaire chargée (83). La polarité d'un résidu correspond à la distribution des charges positives et négatives à l'intérieur de sa structure atomique. En fait, bien que la charge nette de ce résidu soit neutre, c'est-à-dire qu'il possède le même nombre d'électrons et de protons, les électrons sont distribués de façon asymétrique. Un résidu polaire est hydrophile, ce qui signifie qu'il est relativement soluble dans l'eau, formant ainsi facilement des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau. À l'opposé, un résidu non polaire est hydrophobe, donc totalement insoluble dans l'eau (1).

Essentiellement, les différentes protéines qui constituent le canal ECaC1 ont une tendance naturelle à se replier pour prendre leurs conformations natives. En fait, elles tendent naturellement à éloigner leurs chaînes latérales hydrophobes du contact de l'eau et à hydrater leurs chaînes latérales hydrophiles. De ce fait, l'intérieur du pore des différents canaux ioniques est un milieu hydrophile comportant les trois principaux types d'acides aminés, chacun avec leurs chaînes latérales (polaires ou non) pointant vers l'intérieur ou vers l'extérieur du pore. Il semble que les acides aminés qui se retrouvent dans ce milieu et portant des chaînes latérales orientées vers l'intérieur de la région présumée du pore possèdent une fonction chimique bien particulière : participer à la liaison d'ion (83). Des études faites sur le canal potassique KcsA indiquent que la région du filtre de sélectivité à l'intérieur du pore possède non seulement des dimensions qui lui permettent d'accueillir parfaitement un ion potassique déshydraté, mais que la projection des groupes carbonyles des acides aminés GYG (glycine-tyrosine-glycine) vers le milieu du canal confère à la région du pore une électronégativité nette qui stabilise les ions  $K^+$  positifs (63). Ainsi, l'orientation des chaînes latérales à l'intérieur de la région du pore des différents canaux ioniques de même que la charge portée par chacun d'eux, apparaissent comme étant des facteurs qui déterminent la sélectivité propre à chaque type de canal ionique.

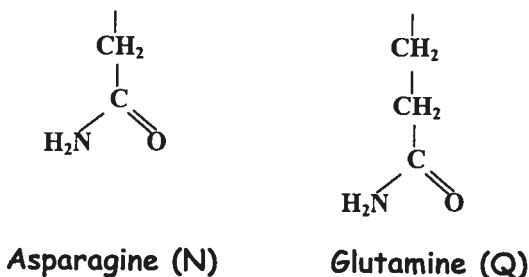
Les mutations qui ont suivi au cours de cette étude se sont donc concentrées sur le résidu aspartate situé à la position 542 du canal ECaC1, acide aminé portant une chaîne latérale polaire chargée négativement. Six mutations ponctuelles ont donc été effectuées sur ce résidu acide en utilisant six résidus différents afin de modifier la charge, la longueur et/ou la polarité de la chaîne latérale (figure 4.3). Les six acides aminés utilisés pour

remplacer le résidu aspartate (D) sont : l'alanine (Ala ou A), le glutamate (Glu ou E), la glycine (Gly ou G), la lysine (Lys ou K), l'asparagine (Asn ou N) et la glutamine (Gln ou Q).

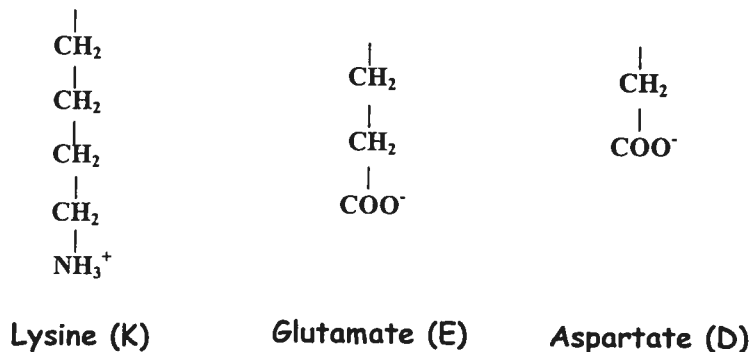
A) Acides aminés à chaîne latérale non polaire



B) Acides aminés à chaîne latérale polaire non chargée



C) Acides aminés à chaîne latérale polaire chargée



\* Adaptée de Voet et al. 1995.

**Figure 4.3 : Structure de la chaîne latérale de différents acides aminés**

Cette figure présente la chaîne latérale de chacun des acides aminés qui se retrouvent à la position 542 à l'intérieur de la région présumée du pore du canal ECaC1, de façon naturelle ou suite à une mutation ponctuelle. À noter que cette chaîne latérale se lie à un atome de carbone central, qui porte deux autres groupements ( $-\text{NH}_2$  et  $-\text{COOH}$ ), structures qui n'apparaissent pas sur cette figure. Sont regroupés en **A)** les résidus glycine et alanine ayant une chaîne latérale non polaire (hydrophobe), en **B)** les résidus asparagine et glutamine ayant une chaîne latérale polaire (hydrophile) non chargée, et en **C)** les résidus lysine, glutamate et aspartate qui ont une chaîne latérale polaire (hydrophile) chargée.

Suite à la construction de ces six canaux ECaC1, des expériences électrophysiologiques ont été effectuées sur les ovocytes de *Xenopus laevis* tel que décrit précédemment. Tel que

mentionné dans la section « Méthodologie », après 1 à 5 jours d'expression dans les ovocytes, les deux canaux ECaC1 portant les mutations D542K et D542Q ne conduisent pas de courant entrant de  $\text{Li}^+$  au-delà de 50 nA à un voltage membranaire de  $-150$  mV en configuration cellule entière, ce qui n'est pas suffisant pour effectuer les analyses électrophysiologiques. Étant donné ces enregistrements de courants  $\text{Li}^+$  trop faibles, ces deux canaux mutés ont donc été mis de côté pour le reste de l'étude. Tel que décrit dans la section précédente, le canal ECaC1 portant la mutation D542N, mutation qui a pour effet de neutraliser la charge négative du résidu tout en conservant la longueur de la chaîne latérale, démontre une augmentation d'un facteur 1 000 de son  $\text{IC}_{50}$  comparativement à celui du canal de type sauvage ce qui se traduit en une diminution importante de l'affinité du canal pour les cations  $\text{Ca}^{2+}$  (figure 3.3D).

Bien que le résidu glutamate (E) et le résidu aspartate (D) soient deux acides aminés similaires en ce sens que leur chaîne latérale respective est polaire et chargée négativement, la chaîne latérale du résidu glutamate (E) est plus longue que celle de l'aspartate car elle possède un groupement  $-\text{CH}_2$  supplémentaire. Les expériences électrophysiologiques faites sur les ovocytes exprimant le canal ECaC1 portant la mutation D542E indiquent que l'addition de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire inhibe graduellement les courants entrants de  $\text{Li}^+$  (figure 3.5A). En fait, des  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  supérieures à  $10 \mu\text{M}$  entraînent une diminution marquée des courants de monovalents. Le  $\text{IC}_{50}$  calculé pour ce canal muté s'élève à  $11 \pm 3 \mu\text{M}$  ( $n = 6$ ), ce qui est légèrement supérieur à celui obtenu pour le canal ECaC1 de type sauvage (figure 3.5D). De plus, les courants  $\text{Li}^+$  enregistrés en configuration cellule entière à partir du canal muté D542E ne sont pas inhibés par des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire aussi élevées que  $1\,000 \mu\text{M}$ , contrairement au canal ECaC1 de type sauvage. Ces résultats obtenus avec le canal muté D542E démontrent que la conservation de la charge négative de la chaîne latérale n'est pas suffisante pour assurer l'affinité calcique du canal ECaC1, bien que la présence d'un résidu chargé négativement à la position 542 semble essentielle pour cette affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ .

Les résidus alanine (A) et glycine (G) sont tous deux des acides aminés portant une chaîne latérale non polaire. Les expériences électrophysiologiques menées avec les canaux ECaC1 portant les mutations simples D542A et D542G démontrent que les courants entrants de  $\text{Li}^+$  sont inhibés par la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire, mais à



des concentrations beaucoup plus élevées que le canal de type sauvage et même le canal ECaC1 portant la mutation D542N qui porte un résidu polaire neutre (figures 3.5B et C). En fait, le  $IC_{50}$  calculé pour les canaux mutés avec ces deux petits résidus hydrophobes est de  $6,7 \pm 0,2$  mM ( $n = 4$ ) pour le canal D542A, et de  $3,0 \pm 0,1$  mM ( $n = 4$ ) pour le canal D542G (figure 3.5D). L'inhibition des courants monovalents  $Li^+$  par l'addition de  $10 \mu M$  de  $Ca^{2+}$  dans le milieu extracellulaire est plus marquée pour le canal portant la mutation D542N que pour ces deux canaux mutés D542A et D542G. Ces résultats indiquent que les deux canaux portant chacun les mutations simples D542A et D542G sont moins sensibles à l'inhibition calcique que le canal muté D542N, et qu'ils possèdent donc une plus faible affinité pour les ions calciques.

Les résultats présentés dans le tableau synthèse IV, obtenus suite à ces expériences mutationnelles effectuées sur le résidu aspartate situé à la position 542 à l'intérieur de la région présumée du pore du canal ECaC1, indiquent clairement que la chaîne latérale du résidu à cette position joue un rôle prépondérant dans le mécanisme de sélectivité calcique. Tout d'abord, la mutation du résidu aspartate (D) à la position 542 du canal ECaC1 en résidu asparagine (N) indique que la neutralité de la chaîne latérale du résidu asparagine ( $-CONH_2$ ) ne peut substituer la charge négative portée par le résidu aspartate ( $-COO^-$ ) et la fonction attribuée à l'électronégativité de cette chaîne latérale. En effet, la charge négative portée par l'acide aminé D542 est primordiale pour l'affinité calcique puisque le canal portant la mutation D542N démontre une augmentation considérable de son  $IC_{50}$  par rapport au canal de type sauvage. Ainsi, il est évident que les interactions électrostatiques à l'intérieur du pore entre le résidu acide D542 et les ions  $Ca^{2+}$  représentent un facteur important de la sélectivité  $Ca^{2+}$ . Ces interactions électrostatiques entre le site de liaison des ions, soit le résidu à la position 542, et les cations  $Ca^{2+}$  reposent sur des attractions entre ces deux charges électriques opposées, tout comme le principe d'interactions entre les anions et les cations dans une solution libre (69). Ensuite, la mutation de ce résidu aspartate (D) à la position 542 en résidu glutamate (E) (D542E) indique que, mis à part la charge négative, un autre facteur stérique contrôlé par la longueur de la chaîne latérale est important pour la sélectivité calcique. En effet, les résultats obtenus avec le canal ECaC1 portant la mutation D542E démontrent, par une valeur du  $IC_{50}$  légèrement supérieure à celle du canal de type sauvage, que l'affinité calcique est diminuée par ce changement de résidu. Tout comme pour le résidu aspartate (D), la chaîne latérale du résidu glutamate (E) est polaire

(hydrophile) et porte une charge négative. Cependant, la chaîne latérale de ce résidu glutamate est plus longue que celle de l'aspartate, comportant un groupement  $-CH_2$  supplémentaire (figure 4.3). Finalement, les résultats indiquent que les mutations D542A et D542G faites sur le canal ECaC1 entraînent une diminution marquée de la sélectivité calcique du canal épithélial. Comparativement au canal ECaC1 de type sauvage et aux canaux mutés D542N et D542E, les canaux portant les mutations D542A et D542G sont les moins sensibles à l'inhibition  $Ca^{2+}$ . Ces résidus alanine (A) et glycine (G) possèdent une chaîne latérale non polaire, donc hydrophobe, qui est très courte.

**Tableau IV** Tableau synthèse présentant l'affinité calcique du canal ECaC1 de type sauvage et de ceux portant diverses mutations

Mutants	Affinité calcique	n	Caractéristiques de la chaîne latérale du résidu
Type sauvage	$2,2 \pm 0,4 \mu M$	10	- Polaire - Chargée négativement
D542N	$1,1 \pm 0,2 mM$	6	- Polaire - Neutre
D542E	$11 \pm 3 \mu M$	6	- Polaire - Chargée négativement
D542A	$6,7 \pm 0,2 mM$	4	- Non polaire
D542G	$3,0 \pm 0,1 mM$	4	- Non polaire

Ces résultats démontrent qu'en plus de l'importance de la charge et de la longueur de la chaîne latérale, la polarité de cette chaîne latérale semble jouer un rôle prépondérant dans le mécanisme de sélectivité calcique. Ainsi, afin de lier avec une haute affinité les cations  $Ca^{2+}$  et de permettre la perméabilité calcique, le résidu situé à la position 542 à l'intérieur de la région présumée du pore du canal ECaC1 doit posséder une chaîne latérale polaire, chargée négativement et composée de deux groupements, caractéristiques qui sont associées au résidu aspartate (D).

L'importance des interactions électrostatiques dans le mécanisme de sélectivité calcique des canaux  $Ca_v1.2$  a été démontrée grâce à plusieurs mutations faites sur l'anneau glutamate (EEEE) (62). En effet, les études démontrent que, tout comme pour le canal

calcique épithélial, la charge négative de même que la polarité de la chaîne latérale des quatre résidus glutamate situés à l'intérieur du pore du canal  $Ca_v1.2$ , représentent des caractéristiques essentielles pour assurer la sélectivité calcique du canal. Des mutations qui entraînent une neutralisation d'un des résidus glutamate ou encore un changement de polarité de la chaîne latérale d'un de ces résidus entraînent une diminution de l'affinité calcique. Jusqu'ici, les études effectuées sur les canaux calciques dépendants du voltage ont démontré que le mécanisme de sélectivité était dépendant de la charge et également du volume du résidu, et que la longueur des quatre résidus glutamate situés à l'intérieur du pore du canal permettaient la liaison des cations  $Ca^{2+}$ . Cependant, la différence du filtre de sélectivité des canaux  $Ca_v3.1$  à  $Ca_v3.3$  de type-T récemment clonés soulève des interrogations quant à l'importance de la longueur de la chaîne latérale. En fait, ces canaux possèdent des résidus aspartate (D) à l'intérieur du pore sur les domaines III et IV de la sous-unité  $\alpha_1$ , donc un anneau EEDD comparativement à EEEE pour les autres canaux  $Ca^{2+}$  dépendants du voltage. Talavera et ses collègues (72) suggèrent que la présence de ces deux résidus portant des chaînes latérales plus courtes que celles des résidus sur les domaines I et II, soit responsable des propriétés de sélectivité et de perméabilité qui distinguent ces nouveaux canaux.

#### **4.5 Perméabilité des cations divalents à travers le canal muté D542N**

Les différentes expériences électrophysiologiques réalisées au cours de cette étude et jusqu'à ce point discutées, concernaient l'affinité du canal ECaC1, c'est-à-dire le mécanisme qui permet au canal de sélectionner les ions désirés grâce à différents résidus situés à l'intérieur du pore du canal, résidus qui ont la capacité d'attirer et de fixer les ions. Cependant, la propriété de perméabilité de ce canal épithélial, c'est-à-dire le flux généré par le passage des ions à l'intérieur du pore du canal, n'a pas encore été discutée. De ce fait, la dernière série d'expériences électrophysiologiques réalisées au cours de cette étude et discutée dans cette section ciblera le rôle des résidus situés à l'intérieur de la région du pore du canal épithélial ECaC1 dans le mécanisme de perméabilité calcique, mécanisme qui se réfère à la conductance du canal, soit le courant ionique en fonction du voltage membranaire ( $G=I/V$ ).

Les résultats obtenus suite aux enregistrements en configuration cellule entière avec le canal ECaC1 de type sauvage (figure 3.6A), indiquent que l'exposition de ce canal à une solution de 10 mM  $Ba^{2+}$  entraîne des courants entrants inférieurs à 300 nA, alors qu'une solution de 10 mM  $Ca^{2+}$  entraîne des courants entrants 20 fois supérieurs, et ce, à l'intérieur du même canal de type sauvage. Le rapport de conductance  $Ca^{2+}/Ba^{2+}$  pour le canal ECaC1 à l'étude est donc estimé comme étant supérieur à 20. Ces résultats indiquent que le canal ECaC1 est beaucoup plus perméable aux cations divalents  $Ca^{2+}$  qu'il peut l'être aux cations  $Ba^{2+}$  ( $Ca^{2+} \gg Ba^{2+}$ ).

D'autres études effectuées sur le canal ECaC1 ont démontré que cette séquence de perméabilité pour les cations divalents ( $Ca^{2+} \gg Ba^{2+}$ ) est similaire à celle du canal ECaC2 (CaT1), bien que les résultats de ces études indiquent que le canal ECaC1 semble plus perméable aux cations divalents  $Ba^{2+}$  comparativement au canal ECaC2 (43, 60, 88). Par contre, les études menées sur le canal calcique dépendant du voltage membranaire  $Ca_v1.2$  démontrent que ce canal possède une perméabilité plus élevée aux cations  $Ba^{2+}$  qu'aux cations  $Ca^{2+}$  ( $Ba^{2+} > Ca^{2+}$ ), présentant ainsi un rapport de conductance  $Ca^{2+}/Ba^{2+}$  beaucoup plus faible qui est estimé comme étant inférieur à 1 (62). De ce fait, il apparaît évident que le rapport de conductance  $Ca^{2+}/Ba^{2+}$  élevé déterminé pour les canaux ECaC1 et ECaC2 soit une caractéristique propre aux canaux calciques épithéliaux. Cette différence entre le canal ECaC1 et le canal  $Ca_v1.2$  dans leur séquence de perméabilité des cations divalents est probablement attribuable aux résidus différents qui se retrouvent dans la région présumée du pore de chacun de ces canaux calciques.

Les mêmes mesures électrophysiologiques en configuration cellule entière ont été faites avec les canaux ECaC1 portant les mutations simples E535Q, D550N et D542N suite à l'ajout de 10 mM de  $Ba^{2+}$  et de 10 mM de  $Ca^{2+}$  dans le milieu extracellulaire (figures 3.6B, C et D). Les résultats indiquent que le rapport de conductance  $Ca^{2+}/Ba^{2+}$  demeure élevé avec les trois canaux portant les trois mutations ponctuelles. Ainsi, la neutralisation des résidus chargés négativement E535, D542 et D550 situés à l'intérieur de la région présumée du pore du canal ECaC1 n'entraîne pas de modification de la perméabilité des ions calciques qui demeure similaire à celle enregistrée pour le canal de type sauvage. Il a été précédemment démontré au cours de cette étude que l'affinité calcique était grandement diminuée lorsque le canal ECaC1 portait la mutation D542N,

résidu qui apparaît comme un déterminant moléculaire important pour assurer l'affinité calcique de ce canal épithélial. Cependant, les présents résultats indiquent que la perméabilité calcique n'est pas éliminée à l'intérieur de ce canal à faible affinité D542N. Ces observations sont d'autant plus inattendues puisque Nilius et ses collaborateurs (59) ont rapporté que la perméabilité calcique n'a pu être mesurée suite aux différentes mutations effectuées sur le résidu acide D542 dans le canal ECaC1 (D542A, D542E, D542K, D542M et D542N). La préservation de ce rapport de conductance  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$  élevé dans le canal ECaC1 portant la mutation D542N suggère que les déterminants structuraux de la perméabilité calcique ne soient pas complètement expliqués par le résidu aspartate à la position 542 à l'intérieur du pore du canal, résidu acide qui apparaît comme un déterminant moléculaire primordial pour l'affinité calcique du canal ECaC1. Il est ainsi fort probable que d'autres déterminants moléculaires soient impliqués dans le mécanisme de perméabilité calcique du canal calcique épithélial ECaC1.

Les présents résultats obtenus, sur la perméabilité du canal ECaC1 sont conséquents avec ceux précédemment obtenus au cours de cette étude et qui révélaient que ce canal épithélial présentait des effets de fraction molaire anormale (AMFE). Tel que mentionné à la section 4.2 du présent document, l'observation des effets de fraction molaire anormale pour un canal donné est généralement une indication que le pore du canal contient plusieurs sites de liaison qui sont occupés par des ions perméables qui se déplacent en file indienne à travers le canal (36). Ainsi, le fait que le passage des cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$  soit encore possible même lorsque le canal ECaC1 porte la mutation D542N, résidu qui semble impliqué dans la sélectivité des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , indique qu'il doit exister au moins un autre site de liaison pour ces cations, site de liaison qui ne serait pas impliqué pour la sélectivité. De ce fait, il est probable que le canal ECaC1 obéisse au modèle à « un site », modèle qui permettrait d'expliquer les mécanismes de sélectivité et de perméabilité associés à ce canal calcique épithélial. Tel que décrit précédemment, ce modèle propose l'existence d'un seul site de liaison chargé négativement qui lie les ions  $\text{Ca}^{2+}$  avec une haute affinité, site qui serait probablement associé au résidu aspartate retrouvé à la position 542 à l'intérieur du pore du canal. Cependant, la présence possible d'un second site de liaison à plus faible affinité permettrait d'expliquer que le canal soit encore perméable aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  même lorsque ce résidu acide D542 est neutralisé en résidu asparagine. Tel que décrit par Dang et McCleskey (20), ces sites de liaison à plus faible affinité se retrouvent de part et d'autre du

site à haute affinité calcique. Des mutations supplémentaires effectuées sur d'autres résidus situés dans la région présumée du pore du canal ECaC1 pourraient permettre de déterminer le résidu, autre que les acides aminés E535, D542 et D550, qui assure une fonction secondaire dans le mécanisme de perméabilité calcique.

Un des problèmes fondamentaux associés aux canaux ioniques et qui ont fait l'objet de recherches intensives au cours des dernières décennies, consiste à déterminer les propriétés moléculaires qui permettent de réconcilier sélectivité et conductance, qui sont à la base deux propriétés contradictoires. Des recherches intensives faites sur le canal potassique KcsA, canal présent dans la bactérie *Streptomyces lividans*, au cours des dernières années ont permis quelque peu de clarifier ce problème. En fait, bien que des études de mutagenèse dirigée aient précédemment permis d'identifier les acides aminés GYG (glycine-tyrosine-glycine) comme responsables de la sélectivité  $K^+$  du canal, aucune donnée ne permettait de connaître la géométrie du pore ainsi que le nombre de sites de liaison s'y retrouvant. C'est en 1998 que le groupe de MacKinnon (21) a, grâce à la cristallisation du canal KscA, permis de visualiser l'interaction entre les ions  $K^+$ , les molécules d'eau et les résidus carbonyles des acides aminés GYG. Les études menées par ce groupe de chercheurs ont permis d'identifier sept sites distincts de liaison pour les ions  $K^+$  le long du pore du canal. Le premier site se trouve dans la cavité du canal et possède un ion  $K^+$  en permanence qui est entouré de huit molécules d'eau. Le filtre de sélectivité contient quatre sites de liaison distincts, mais seuls deux de ces sites sont occupés simultanément puisque les ions  $K^+$  sont toujours séparés par un site libre, site occupé par une molécule d'eau qui permet de minimiser la répulsion ion-ion dans le canal. De plus, deux sites extracellulaires de liaison pour les ions  $K^+$  ont été identifiés juste à la sortie du filtre de sélectivité. D'après l'analyse du groupe de MacKinnon, la diffusion des ions se produit sans grande dépense énergétique, à une vitesse proche de la simple diffusion dans l'eau grâce à la présence de ces sept sites de liaison qui stabilisent le passage d'ions chargés dans une membrane lipidique hydrophobe. Cette diffusion des ions potassiques dans le filtre s'effectuerait par le mécanisme de « knock-on » où l'entrée d'un ion dans le filtre de sélectivité entraîne la sortie d'un des ions déjà présents (63). Ces forces de répulsion entre les ions  $K^+$  contribuent activement à la propriété de conduction rapide à l'intérieur du canal potassique. Ainsi, les acides aminés qui composent le filtre de sélectivité du canal permettent d'attirer les cations  $K^+$  à l'intérieur du pore contribuant au mécanisme de

sélectivité du canal, alors que la présence de plus d'un site de liaison dans le pore, et donc de plus d'un ion potassium permet une répulsion entre les ions contribuant au mécanisme de perméabilité du canal KcsA.

Les canaux calciques n'échappent pas à cette problématique majeure. Malgré le fait que ces protéines membranaires soient hautement sélectives aux cations  $\text{Ca}^{2+}$ , elles permettent le passage de millions d'ions calciques par seconde. Il est donc tentant de croire qu'une géométrie similaire à celle présentée pour le canal potassique KcsA, prévaut à l'intérieur du pore du canal calcique épithélial ECaC1, ce qui permettrait d'expliquer la coexistence de ces deux propriétés de base que sont l'affinité et la perméabilité calcique de ce canal.

## 5- CONCLUSION



Diverses études menées sur les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage membranaire ont permis de déterminer que ces canaux représentent les transducteurs qui permettent de convertir les signaux électriques reçus à la membrane cellulaire des cellules excitables (muscle squelettique, cœur, neurones) en une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Le  $\text{Ca}^{2+}$  qui entre à l'intérieur de ces cellules excitables par les canaux calciques de type-L est un second messenger qui permet d'initier divers processus intracellulaires tels que la contraction, la sécrétion, la transmission synaptique, la régulation d'activités enzymatiques et l'expression de gènes (77). Les canaux calciques dépendants du voltage membranaire sont presque exclusivement présents dans les cellules excitables conférant ainsi à ces cellules la propriété d'*excitabilité*, soit la capacité de réagir à certains stimuli provenant du milieu interne et de l'environnement (51). À l'opposé, l'entrée de calcium à l'intérieur des cellules non-excitables, comme par exemple les cellules épithéliales de différents tissus (rein, intestin), se fait surtout à travers les canaux de type TRP tel que le canal calcique épithélial ECaC1. Le rôle de ce canal calcique ECaC1 est de permettre la réabsorption active de calcium dans les cellules polarisées, réabsorption qui se fait selon un processus transcellulaire. Des analyses de relation phylogénétique faites entre le canal ECaC1 de la super famille des TRP et les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage révèlent qu'il existe une distance évolutive significative entre ces deux types de canaux calciques (42). Malgré la distance évolutive qui les sépare et leur fonction physiologique distincte, le canal ECaC1 et les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type-L dépendants du voltage membranaire présentent des caractéristiques électrophysiologiques similaires.

Le principal objectif du présent travail de recherche consistait à caractériser au niveau moléculaire les propriétés de sélectivité et de perméabilité de la région du pore du canal ECaC1, et de faire le parallèle entre ces données et celles obtenues pour les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage membranaire ( $\text{Ca}_v$ ).

Nos résultats obtenus suite à la caractérisation électrophysiologique du canal calcique épithélial ECaC1 exprimé dans des ovocytes de *Xenopus laevis* indiquent que ce canal présente une très haute affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et une affinité plus faible pour le  $\text{Mg}^{2+}$ . Cette sélectivité élevée pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , comparativement à celle pour les cations monovalents, semble être déterminée par un simple résidu chargé négativement, l'acide aminé aspartate (D), retrouvé à la position 542 à l'intérieur de la région présumée du pore du canal. Suite

aux diverses expériences effectuées sur ce résidu acide, nous en sommes venus à la conclusion que ce résidu doit posséder certaines caractéristiques afin de permettre la liaison des ions  $\text{Ca}^{2+}$  avec une haute affinité : une chaîne latérale polaire, chargée négativement et qui porte deux groupements, soit un groupement méthyle ( $-\text{CH}_3$ ) et un groupement carbonyle ( $-\text{COOH}$ ). De façon similaire, le canal  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant du voltage membranaire  $\text{Ca}_v1.2$  présente une sélectivité calcique élevée, propriété qui semble déterminée par la présence de quatre résidus glutamate (E) chargés négativement, retrouvés à l'intérieur de la région du pore, qui forment un anneau (EEEE) de sélectivité. Ainsi, les déterminants moléculaires de la sélectivité pour le calcium et le magnésium du canal  $\text{ECaC1}$  semblent reposer sur un simple résidu aspartate (D) situé à l'intérieur de la région présumée du pore, un rôle qui est joué par quatre résidus glutamate dans le cas des canaux calciques dépendants du voltage membranaire. Étant donné que la structure secondaire du canal  $\text{ECaC1}$  est similaire à celle proposée pour les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage avec six segments transmembranaires (S1 à S6) incluant une courte région hydrophobe entre les segments S5-S6 correspondant à la région présumée du pore, il est alors tentant de spéculer que le filtre de sélectivité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  dans le canal  $\text{ECaC1}$  est également constitué d'un anneau formé de quatre résidus chargés négativement, dans une structure tétramérique.

Nos résultats indiquent que la perméabilité calcique de même que le rapport de conductance  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$  élevé ( $\text{Ca}^{2+} \gg \text{Ba}^{2+}$ ) ne sont pas affectés par la neutralisation du résidu aspartate (D542N) qui apparaît comme un déterminant moléculaire essentiel dans le mécanisme de sélectivité calcique du canal  $\text{ECaC1}$ . Le canal  $\text{Ca}_v1.2$  présente, au contraire, un faible rapport de conductance  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$  ( $\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ ), démontrant ainsi une plus grande perméabilité pour les cations  $\text{Ba}^{2+}$  que  $\text{Ca}^{2+}$ , à l'opposé du canal  $\text{ECaC1}$  qui présente une perméabilité préférentielle pour les cations  $\text{Ca}^{2+}$ .

Sur la base de ces résultats électrophysiologiques, nous pouvons conclure que le canal  $\text{ECaC1}$  présente des propriétés d'affinité similaires à celles du canal  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant du voltage  $\text{Ca}_v1.2$ , la principale différence entre ces deux canaux résidant dans leur propriété de perméabilité aux ions divalents.

À la lumière des résultats de la présente recherche, il est évident que des mutations simples dans la région du pore du canal ECaC1 vont entraîner un dysfonctionnement du canal qui, conséquemment, entraînera différents désordres physiologiques liés au calcium. L'identification du canal ECaC1 et de ses principaux déterminants moléculaires pourrait permettre de faire la lumière sur certains désordres liés à l'homéostasie calcique, tels que l'hypercalciurie idiopathique, l'ostéoporose et la malabsorption du  $\text{Ca}^{2+}$  reliée à l'âge. En fait, le rôle central du canal ECaC1, en combinaison avec l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, dans la réabsorption active de  $\text{Ca}^{2+}$  fait de ce canal calcique une cible première pour la manipulation pharmacologique, et ainsi le traitement des différents désordres liés à l'homéostasie calcique.

Plusieurs interrogations à propos de ce canal  $\text{Ca}^{2+}$  épithélial demeurent jusqu'à aujourd'hui sans réponse. Par exemple, quelles sont les protéines de régulation qui interagissent avec le canal ECaC1 et contrôlent son fonctionnement ? Quelles sont les implications physiologique et clinique du canal ECaC1 dans l'homéostasie calcique ? Est-ce que certaines drogues peuvent être développées pour réguler directement l'activité du canal ECaC1 afin de prévenir efficacement certains désordres physiologiques liés à l'homéostasie calcique ? De futures analyses détaillées de ce canal  $\text{Ca}^{2+}$  épithélial ECaC1, telles que l'identification des sites moléculaires responsables de la régulation de ce canal par la PKA et la PKC ainsi que la caractérisation de la régulation de ce canal par la PTH, vont certainement permettre une meilleure compréhension de l'homéostasie calcique chez les mammifères et ainsi cibler les approches pharmacologiques qui permettront de corriger les désordres intestinal et rénal de l'absorption calcique.

## 6- LISTE DES RÉFÉRENCES

- 1 **Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, et J.D. Watson.** Biologie moléculaire de la cellule. 2<sup>ème</sup> édition, Flammarion Médecine-Sciences. 1-1219, 1989.
- 2 **Almers, W., and E.W. McCleskey.** Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore. *J. Physiol.* **353**, 585-608, 1984.
- 3 **Armstrong, C.M., and J. Neyton.** Ion permeation through calcium channels. A one-site model. *Ann. NY Acad. Sci.* **635**, 18-25, 1991.
- 4 **Bacskai, B.J., and P.A. Friedman.** Activation of latent Ca<sup>2+</sup> channels in renal epithelial cells by parathyroid hormone. *Nature* **347**, 388-391, 1990.
- 5 **Barley, N.F., A. Howard, D. O'Callaghan, S. Legon, and J.R.F. Walters.** Epithelial calcium transporter expression in human duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G285-G290, 2001.
- 6 **Barry, E.L.R., F.A. Gesek, S.C. Froehner, and P.A. Friedman.** Multiple calcium channel transcripts in rat osteosarcoma cells: selective activation of  $\alpha_{1D}$  isoform by parathyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 10914-10918, 1995.
- 7 **Bernatchez, G., D. Talwar, and L. Parent.** Mutations in the EF-hand motif of the cardiac  $\alpha_{1C}$  calcium channel impair the inactivation of barium currents. *Biophys. J.* **75**, 1727-1739, 1998.
- 8 **Bindels, R.J.M.** Calcium handling by the mammalian kidney. *J. exp. Biol.* **184**, 89-104, 1993.
- 9 **Bindels, R.J.M., A. Hartog, J. Timmermans, and C.H. van Os.** Active Ca<sup>2+</sup> transport in primary cultures of rabbit kidney CCD: stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and PTH. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **261**, F799-F807, 1991.
- 10 **Bindels, R.J.M., J.A. Dempster, P.L.M. Ramakers, P.H.G.M. Willems, and C.H. van Os.** Effect of protein kinase C activation and down-regulation on active calcium transport. *Kidney Int.* **43**, 295-300, 1993.
- 11 **Bindels, R.J.M., P.L.M. Ramakers, J.A. Dempster, A. Hartog, and C.H. van Os.** Role of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in transcellular Ca<sup>2+</sup> transport across primary cultures of rabbit kidney collecting system. *Pflügers Arch* **420**, 566-572, 1992.
- 12 **Birnbaumer, L., X. Zhu, M. Jiang, G. Boulay, M. Peyton, B. Vannier, D. Brown, D. Platano, H. Sadeghi, E. Stefani, and M. Birnbaumer.** On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15195-15202, 1996.

- 13 **Borke, J.L., A. Caride, A.K. Verma, J.T. Penniston, and R. Kumar.** Plasma membrane calcium pump and 28-kDa calcium binding protein in cells of rat kidney distal tubules. *Am. J. Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **257**, F842-F849, 1989.
- 14 **Boulay, G., D.M. Brown, N. Qin, M. Jiang, A. Dietrich, M. Xi Zhu, Z. Chen, M. Birnbaumer, K. Mikoshiba, and L. Birnbaumer.** Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *PNAS* **96**, 14955-14960, 1999.
- 15 **Bushinsky, D.A., and R.D. Monk.** Calcium. *The Lancet* **352**, 306-311, 1998.
- 16 **Cai, Q., J.S. Chandler, R.H. Wasserman, R. Kumar, and J.T. Penniston.** Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 1345-1349, 1993.
- 17 **Catterall, W.A.** Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 521-555, 2000.
- 18 **Clampham, D.E., L.W. Runnels, and C. Strübing.** The TRP ion channel family. *Nature* **2**, 387-396, 2001.
- 19 **Corry, B., T.W. Allen, S. Kuyucak, and S.H. Chung.** Mechanisms of permeation and selectivity in calcium channels. *Biophysical Journal* **80**, 195-214, 2001.
- 20 **Dang, T.X., and E.W. McCleskey.** Ion channel selectivity through stepwise changes in binding affinity. *J. Gen. Physiol.* **111**, 185-193, 1998.
- 21 **Doyle, D.A., J.M. Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, and R. MacKinnon.** The structure of the potassium channel: molecular basis of  $\text{K}^+$  conductance and selectivity. *Science* **280**, 69-77, 1998.
- 22 **Eisner, D.A., and W.J. Lederer.** Na:Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity. *Am. J. Physiol.* **248**, C189-C202, 1985.
- 23 **Ellinor, P.T., J. Yang, W.A. Sather, J.F. Zhang, and R.W. Tsien.**  $\text{Ca}^{2+}$  channel selectivity at a single locus for high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  interactions. *Neuron* **15**, 1121-1132, 1995.
- 24 **Fabiato, A., and F. Fabiato.** Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol. (Paris)* **75**, 463-505, 1979.
- 25 **Feher, J.J., C.S. Fullmer, and R.H. Wasserman.** Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **262**, C517-C526, 1992.

- 26 **Friedman, P.A.** Codependence of renal calcium and sodium transport. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 179-197, 1998.
- 27 **Friedman, P.A., and F.A. Gesek.** Calcium transport in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **264**, F181-F198, 1993.
- 28 **Friedman, P.A., and F.A. Gesek.** Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms and regulation. *Physiol. Rev.* **75**, 429-471, 1995.
- 29 **Friedman, P.A., B.A. Coutermarsh, S.M. Kennedy, and F.A. Gesek.** Parathyroid hormone stimulation of calcium transport is mediated by dual signaling mechanisms involving protein kinase A and protein kinase C. *Endocrinology* **137**, 13-20, 1996.
- 30 **García- Martínez, C., C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, J.M. Merino, and A. Ferrer-Montiel.** Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 32552-32558, 2000.
- 31 **Gesek, F.A., and P.A. Friedman.** Calcitonin stimulates calcium transport in distal convoluted tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **264**, F744-F751, 1993.
- 32 **Harteneck, C., T.D. Plant, and G. Schultz.** From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* **23**, 159-166, 2000.
- 33 **Hemmingsen, C.** Regulation of renal calbindin-D28k. *Pharmacol. Toxicol.* **87**, suppl. 3, 5-30, 2000.
- 34 **Hess, P., and R.W. Tsien.** Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* **309**, 453-456, 1984.
- 35 **Hess, P., J.B. Lansman, and R.W. Tsien.** Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. *J. Gen. Physiol.* **88**, 293-319, 1986.
- 36 **Hille, B.** *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Sunderland, MA: Sinauer Associates. 1-814, 2001.
- 37 **Hoenderop, J.G.J., A. Hartog, M. Stuiver, A. Doucet, P.H.G.M. Willems, and R.J.M. Bindels.** Localization of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel in rabbit kidney and intestine. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 1171-1178, 2000.
- 38 **Hoenderop, J.G.J., A.W.C.M van der Kemp, A. Hartog, S.F.J. van de Graaf, C.H. van Os, P.H.G.M. Willems, and R.J.M. Bindels.** Molecular identification of the apical Ca<sup>2+</sup> channel in 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-responsive epithelia. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 8375-8378, 1999.
- 39 **Hoenderop, J.G.J., B. Nilius, and R.J.M. Bindels.** ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca<sup>2+</sup> transport. *Biochimica and Biophysica Acta* **1600**, 6-11, 2002.

- 40 **Hoenderop, J.G.J., B. Nilius, and R.J.M. Bindels.** Molecular mechanism of active  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption in the distal nephron. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 529-549, 2002.
- 41 **Hoenderop, J.G.J., D. Müller, M. Suzuki, C.H. van Os, and R.J.M. Bindels.** Epithelial calcium channel: gate-keeper of active calcium reabsorption. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **9**, 335-340, 2000.
- 42 **Hoenderop, J.G.J., P.H.G.M. Willems, and R.J.M. Bindels.** Toward a comprehensive molecular model of active calcium reabsorption. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **278**, F352-F360, 2000.
- 43 **Hoenderop, J.G.J., R. Vennekens, D. Müller, J. Prenen, G. Droogmans, R.J.M. Bindels, and B. Nilius.** Function and expression of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel family: comparison of mammalian ECaC1 and ECaC2. *J. Physiol.* **537.3**, 747-761, 2001.
- 44 **Hoenderop, J.G.J., T. Voets, S. Hoefs, F. Weidema, J. Prenen, B. Nilius, and R.J.M. Bindels.** Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channels TRPV5 and TRPV6. *The EMBO Journal.* Vol. **22**, No. 4, 776-785, 2003.
- 45 **Jean, K., G. Bernatchez, H. Klein, L. Garneau, R. Sauvé, and L. Parent.** Role of aspartate residues in  $\text{Ca}^{2+}$  affinity and permeation of the distal ECaC1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, C665-C672, 2001.
- 46 **Kaluz, S., K. Kolble, and K.B. Reid.** Directional cloning of PCR products using exonuclease III. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4369-4370, 1992.
- 47 **Koster, H.P.G., A. Hartog, C.H. van Os, and R.J.M. Bindels.** Calbindin-D28k facilitates cytosolic calcium diffusion without interfering with calcium signaling. *Cell Calcium* **18**, 187-196, 1995.
- 48 **Kuo, C.C., and P. Hess.** Ion permeation through the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel in rat pheochromocytoma cells: two sets of ion binding sites in the pore. *J. Physiol.* **466**, 629-655, 1993.
- 49 **Lester, H.A., and D.A. Dougherty.** New views of multi-ion channels. *J. Gen. Physiol.* **111**, 181-183, 1998.
- 50 **Loo, T.W., C. Ho, and D.M. Clarke.** Expression of a functionally active human renal sodium-calcium exchanger lacking a signal sequence. *J. Biol. Chem.* **270**, 19345-19350, 1995.
- 51 **Marieb, E. N.** Anatomie et physiologie humaines. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc. (ERPI). 1-1014, 1993.
- 52 **Matsuoka, S.** Stoichiometry of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger: models and implications. *Ann. NY Acad. Sci.* **976**, 121-132, 2002.



- 53 **McCleskey, E. W.** Calcium channel permeation: a field in flux. *J. Gen. Physiol.* **113**, 765-772, 1999.
- 54 **Minke, B., and B. Cook.** TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol. Rev.* **82**, 429-472, 2002.
- 55 **Montell, C., L. Birnbaumer, V. Flockerzi, R.J.M. Bindels, E.A. Bruford, M.J. Caterina, D.E. Clapham, C. Harteneck, S. Heller, D. Julius, I. Kojima, Y. Mori, R. Penner, D. Prawitt, A.M. Scharenberg, G. Schultz, N. Shimizu, and M.X. Zhu.** A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular Cell* **9**, 229-231, 2002.
- 56 **Müller D., J.G.J. Hoenderop, G.F.M. Merckx, C.H. van Os, and R.J.M. Bindels.** Gene structure and chromosomal mapping of human epithelial calcium channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 47-52, 2000.
- 57 **Müller, D., J.G.J. Hoenderop, I.C. Meij, L.P.J. van den Heuvel, N.V.A.M. Knoers, A.I. den Hollander, P. Eggert, V. Garcí-Nieto, F. Claverie-Martin, and R.J.M. Bindels.** Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal mapping of the human epithelial Ca<sup>2+</sup> channel (EcaC1). *Genomics* **67**, 48-53, 2000.
- 58 **Nargeot, J., et P. Charnet.** Diversité moléculaire des canaux calciques : du gène à la fonction. *Médecine/Sciences* **10**, 1293-1307, 1994.
- 59 **Nilius, B., R. Vennekens, J. Prenen, J.G.J. Hoenderop, G. Droogmans, and R.J.M. Bindels.** The single pore residue Asp<sup>542</sup> determines Ca<sup>2+</sup> permeation and Mg<sup>2+</sup> block of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* **276**, 1020-1025, 2001.
- 60 **Nilius, B., R. Vennekens, J. Prenen, J.G.J. Hoenderop, R.J.M. Bindels, and G. Droogmans.** Whole-cell and single channel monovalent cation currents through the novel rabbit epithelial Ca<sup>2+</sup> channel ECaC. *J. of Physiol.* **527.2**, 239-248, 2000.
- 61 **Nonner, W., D.P. Chen, and B. Eisenberg.** Anomalous mole fraction effect, electrostatics, and binding in ionic channels. *Biophys. J.* **74**, 2327-2334, 1998.
- 62 **Parent, L., and M. Gopalakrishnan.** Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca<sup>2+</sup> channel. *Biophys. Journal* **69**, 1801-1813, 1995.
- 63 **Parent, L., R. Sauvé, et S. Bernèche.** À bas les barrières...d'énergie dans les canaux potassiques. *Médecine/Sciences* **18**, 605-609, 2002.
- 64 **Peng J.B., X.Z. Chen, U.V. Berger, P.M. Vassilev, E.M. Brown, and M.A. Hediger.** A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 28186-28194, 2000.

- 65 **Peng, J.B., X.Z. Chen, U.V. Berger, P.M. Vassilev, H. Tsukaguchi, E.M. Brown, and M.A. Hediger.** Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 22739-22746, 1999.
- 66 **Perez-Reyes, E., and T. Schneider.** Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int.* **48**, 1111-1124, 1995.
- 67 **Poujeol, P., M. Bidet, and M. Tauc.** Calcium transport in rabbit distal cells. *Kidney Int.* **48**, 1102-1110, 1995.
- 68 **Raber, G., P.H.G.M. Willems, F. Lang, R. Nitschke, C.H. van Os, and R.J.M. Bindels.** Co-ordinated control of apical calcium influx and basolateral calcium efflux in rabbit cortical collecting system. *Cell Calcium* **22**, 157-166, 1997.
- 69 **Randall, D., W. Burggren, and K. French.** Eckert animal physiology: mechanisms and adaptations. 4<sup>th</sup> Edition. W.H. Freeman and Company. 1-728, 1997.
- 70 **Reilly, R.F., C.A. Shugrue, D. Lattanzi, and D. Biemesderfer.** Immunolocalization of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in rabbit kidney. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol* **265**, F327-F332, 1993.
- 71 **Suki, W.N., and D. Rouse.** Renal transport of calcium, magnesium, and phosphorus. *The Kidney*, edited by B. M. Brenner. Philadelphia. Vol. I, 472-515. Vol. II, 1893-1935, 1996.
- 72 **Talavera, K., M. Staes, A. Janssens, N. Klugbauer, G. Droogmans, F. Hofmann, and B. Nilius.** Aspartate residues of the EEDD pore locus control selectivity and permeation of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_1G$ . *J. Biol. Chem.* **276**, 45628-45635, 2001.
- 73 **Taylor, A.N., J.E. McIntosh, and J.E. Bourdeau.** Immunocytochemical localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein in renal tubules of rabbit, rat and chick. *Kidney Int.* **21**, 765-773, 1982.
- 74 **Torres, A., M. Rodriguez, A. Felsenfeld, A. Martin-Malo, and F. Llach.** Sigmoidal relationship between calcitonin and calcium: studies in normal, parathyroidectomized, and azotemic rats. *Kidney Int.* **40**, 700-704, 1991.
- 75 **Tortora, G.J., and S.R. Grabowski.** Principles of anatomy and physiology. 7<sup>th</sup> Edition. Biological Sciences Textbooks, Inc. 1-1204, 1993.
- 76 **Tran, Q.K., K. Ohashi, and H. Watanabe.** Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovascular Res.* **48**, 13-22, 2000.
- 77 **Tsien, R.W., P. Hess, E.W. McCleskey, and R.L. Rosenberg.** Calcium channels: Mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 265-290, 1987.

- 78 **van Baal, J., A. Yu, A. Hartog, J.A.M. Fransen, P.H.G.M. Willems, J. Lytton, and R.J.M. Bindels.** Localization and regulation by vitamin D of calcium transport proteins in rabbit cortical collecting system. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **271**, F985-F993, 1996.
- 79 **Vennekens, R., J. Prenen, J.G.J. Hoenderop, R.J.M. Bindels, G. Droogmans, and B. Nilius.** Modulation of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel ECaC by extracellular pH. *Pflügers Arch* **442**, 237-242, 2001.
- 80 **Vennekens, R., J. Prenen, J.G.J. Hoenderop, R.J.M. Bindels, G. Droogmans, and B. Nilius.** Pore properties and ionic block of the rabbit epithelial calcium channels expressed in HEK 293 cells. *J. Physiol.* **530.2**, 183-191, 2001.
- 81 **Vennekens, R., J.G.J. Hoenderop, J. Prenen, M. Stuiver, P.H.G.M. Willems, G. Droogmans, B. Nilius, and R.J.M. Bindels.** Permeation and gating properties of the novel epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 3963-3969, 2000.
- 82 **Vinay, P., A. Gougoux, and G. Lemieux.** Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am. J. Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **241**, F403-F411, 1981.
- 83 **Voet, D., and J.G. Voet.** Biochemistry. 2<sup>nd</sup> Edition. John Wiley & Sons, Inc. 1-1361, 1995.
- 84 **Wasserman, R.H., and C.S. Fullmer.** Calcium transport proteins, calcium absorption, and vitamin D. *Ann. Rev. Physiol.* **45**, 375-390, 1983.
- 85 **Weber, K., R.G. Erben, A. Rump, and J. Adamski.** Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channel ECaC1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **289**, 1287-1294, 2001.
- 86 **White, K.E., F.A. Gesek, R.F. Reilly, and P.A. Friedman.** NCX1 Na/Ca exchanger inhibition by antisense oligonucleotides in mouse distal convoluted tubule cells. *Kidney Int.* **54**, 897-906, 1998.
- 87 **Yang, J., P.T. Ellinor, W.A Sather, J.F. Zhang, and R.W. Tsien.** Molecular determinants of  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity and ion permeation in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Nature* **366**, 158-161, 1993.
- 88 **Yue, L., J.B. Peng, M.A. Hediger, and D.E. Clapham.** CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* **410**, 705-709, 2001.
- 89 **Zhu, X., and L. Birnbaumer.** Calcium channels formed by mammalian Trp homologues. *News Physiol. Sci.* **13**, 211-217, 1998.

## **7- ANNEXES**

## *Annexe 1*

### **Contribution de chacun des coauteurs à la réalisation de l'article**

#### **Karine Jean**

---

La co-signataire a réalisé la majorité des manipulations sous la supervision du Dr. Lucie Parent. Elle a effectué la technique de mutagenèse dirigée à l'aide du « Quick-Change™ XL-mutagenesis » afin de modifier les résidus à l'intérieur du pore du canal ECaC1 et ainsi de produire les différents mutants désirés. Elle a effectué la traduction de l'ADN en ARNm pour chacun des mutants ainsi que pour le canal ECaC1 de type sauvage. Elle a ensuite injecté cet ARNm dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. Finalement, elle a effectué les enregistrements électrophysiologiques pour chacun des mutants exprimés dans les œufs de Xénope.

De plus, la co-signataire a suivi de près la réalisation de l'article en participant à la rédaction de certains passages, en apportant des opinions et des éléments de discussion, et en révisant à plusieurs reprises le contenu de l'article.

#### **Gérald Bernatchez**

---

Le co-signataire a contribué à ce travail de recherche en supervisant de près les expériences électrophysiologiques. Ainsi, le co-signataire a vérifié et validé les données électrophysiologiques obtenues au cours de la réalisation de cette recherche.

De plus, le co-signataire a suivi la réalisation de l'article en révisant le contenu final de l'article.

#### **Hélène Klein**

---

La co-signataire a contribué à la réalisation de ce travail de recherche en clonant le canal calcique ECaC1 de type sauvage à partir de tubules distaux purifiés de rein de lapin.

De plus, la co-signataire a contribué à la réalisation de l'article en participant à la rédaction de certains passages.

#### **Line Garneau**

---

La co-signataire a contribué à la réalisation de ce travail de recherche pour le premier jet de l'article soumis à *Biophysical Journal*. Les expériences en canal unitaire n'ont pas été retenues par les arbitres de l'*American Journal of Physiology*.

De plus, la co-signataire a suivi la réalisation de l'article en révisant à plusieurs reprises le contenu final de l'article.

**Rémy Sauvé**

---

Le co-signataire a suivi de près la réalisation de l'article en apportant des opinions et des éléments de discussion, et en révisant le contenu final de l'article.

**Lucie Parent**

---

La co-signataire a supervisé et analysé la totalité des manipulations effectuées dans son laboratoire au cours de ce travail de recherche.

De plus, la co-signataire était responsable de l'élaboration et de la rédaction de l'article, assistée de tous les co-signataires de l'article.

*Annexe 2***Déclaration des coauteurs de l'article**

**Déclaration des coauteurs d'un article****1. Identification de l'étudiant et du programme**

JEAN, Karine ( [REDACTED] )  
 M.Sc. Physiologie (2-525-1-0) option physiologie et biophysique moléculaire

**2. Description de l'article**

K. Jean, G. Bernatchez, H. Klein, L. Garneau, R. Sauvé and L. Parent  
 Titre : Role of aspartate residues in  $Ca^{2+}$  affinity and permeation of the distal ECaC1  
 Revue : American Journal of Physiology, publié le 14 novembre 2001.

**3. Déclaration des coauteurs**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Karine Jean inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Caractérisation moléculaire de la région responsable de l'affinité et de la perméabilité du canal calcique EcaC1 (TRPV5) »

Lucie Parent	[REDACTED]	30 mai 2003
Coauteur		Date
Rémy Sauvé	[REDACTED]	30 mai 2003
Coauteur		Date
Gérald Bernatchez	[REDACTED]	30 mai 2003
Coauteur		Date
Hélène Klein	[REDACTED]	30 mai 2003
Coauteur		Date
Line Garneau	[REDACTED]	30 mai 2003
Coauteur	Signature	Date



*Annexe 3***Permission de l'éditeur de la revue**

3

**REQUEST TO REPRINT ARTICLE**

**1. Journal**

- Nom complet de la revue  
American Journal of Physiology. Cell physiology.
- Adresse  
APS Permission Office  
9650 Rockville Pike  
Bethesda, MD20814
- Date  
March 14, 2003

**2. Identification de l'éditeur**  
APS publications

**3. Identification de l'article**

Jean, K., Klein, H., Bernatchez, G., Garneau, L., Sauvé, R., Parent, L. 2002. Role of aspartate residues in Ca<sup>2+</sup> affinity and permeation of the distal ECaC1. *Am. J. Physiol. (Cell Physiology)* 282 : C665-C672.

Ms **Karine Jean**, who is currently a graduate student at the Université de Montréal, is hereby authorized to include the article mentioned above in her **M.Sc. dissertation** entitled : "*Caractérisation moléculaire de la région responsable de l'affinité et de la perméabilité du canal calcique ECaC1 (TRPV5)*".

		Date
Editor	Signature	
<p><b>THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY</b> 9650 Rockville Pike - Bethesda, MD 20814-3991</p> <p>Permission is granted for use of the material specified above provided the publication is credited as the source</p>		
	<p style="font-size: 1.5em; font-family: cursive;">3/14/03</p>	<div style="background-color: black; width: 150px; height: 30px; margin: 0 auto;"></div>
	Date	Publ Mgr & Exec Editor

