

Université de Montréal

**Étude moléculaire des mécanismes d'action
de potentiateurs du canal CFTR sur le canal KCa3.1**

par

Ariane LONGPRÉ-LAUZON

Département de Physique
Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.) en physique
option Biophysique et physiologie moléculaire

Août, 2009

© Ariane Longpré-Lauzon, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude moléculaire des mécanismes d'action
de potentiateurs du canal CFTR sur le canal KCa3.1**

présenté par

Ariane Longpré-Lauzon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Yves Lapointe
Président-rapporteur

Rémy Sauvé
Directeur de recherche

Emmanuelle Brochiero
Membre du jury

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier Rémy Sauvé de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Il a su me guider dans ma recherche des faits et me faire profiter de son expérience. Nos discussions ont grandement contribué à mon évolution scientifique.

Je dois aussi beaucoup à Line Garneau, assistante de recherche au laboratoire, qui m'a formée au laboratoire et m'a enseigné la méthode du patch clamp. Elle restera pour moi un modèle de rigueur, d'application et de patience. Son support, sa compréhension, sa générosité et la complicité que nous avons développée m'ont été des plus précieux tout au long de ma maîtrise.

Je veux aussi souligner la bienveillance de tous les membres et de tout le personnel du GÉPROM, qui en font un milieu de recherche à l'ambiance agréable et stimulante. Un merci tout particulier à Hélène Klein, Julie Verner, Michel Brunette et Bernadette Wallendorf, qui m'ont été d'un support très précieux. Je souhaite aussi témoigner ma reconnaissance aux membres de mon jury, les docteurs Jean-Yves Lapointe et Emmanuelle Brochiero, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci aussi à mon entourage, tout particulièrement à Philippe et à Patricia, aux côtés desquels ces deux dernières années ont été beaucoup plus faciles. Finalement, je veux adresser des remerciements spéciaux à ma mère, qui m'a toujours supportée avec amour et confiance dans mes études et autres apprentissages.

RÉSUMÉ

Les cellules épithéliales des voies aériennes respiratoires sécrètent du Cl^- via le canal CFTR. La fibrose kystique est une maladie génétique fatale causée par des mutations de ce canal. La mutation la plus fréquente en Amérique du Nord, ΔF508 , met en péril la maturation de la protéine et affecte les mécanismes d'activation du canal. Au cours des dernières années, plusieurs molécules ont été identifiées par criblage à haut débit qui peuvent rétablir l'activation de protéines CFTR mutées. Ces molécules sont nommées potentiateurs. Les canaux K^+ basolatéraux, dont KCa3.1, jouent un rôle bien documenté dans l'établissement d'une force électromotrice favorable à la sécrétion de Cl^- par CFTR dans les cellules épithéliales des voies aériennes respiratoires. Il a par exemple été démontré que l'application de 1-EBIO, un activateur de KCa3.1, sur des monocouches T84 résulte en une augmentation soutenue de la sécrétion de Cl^- et que cette augmentation était réversible suite à l'application de CTX, un inhibiteur de KCa3.1 (Devor et al., 1996). Dans le cadre d'une recherche de potentiateurs efficaces en conditions physiologiques et dans un contexte global de transport trans-cellulaire, il devient essentiel de considérer les effets des potentiateurs de CFTR sur KCa3.1. Une caractérisation électrophysiologique par la méthode du patch clamp et structurale via l'utilisation de canaux modifiés par mutagenèse dirigée de différents potentiateurs de CFTR sur KCa3.1 fut donc entreprise afin de déterminer l'action de ces molécules sur l'activité de KCa3.1 et d'en établir les mécanismes.

Nous présentons ici des résultats portant sur les effets sur KCa3.1 de quelques potentiateurs de CFTR possédant différentes structures. Un criblage des effets de ces molécules sur KCa3.1 a révélé que la genisteine, le SF-03, la curcumine et le VRT-532 ont des effets inhibiteurs sur KCa3.1. Nos résultats suggèrent que le SF-03 pourrait agir sur une protéine accessoire et avoir un effet indirect sur KCa3.1. La curcumine aurait aussi une action inhibitrice indirecte, probablement via la membrane cellulaire. Nos recherches sur les effets du VRT-532 ont montré que l'accessibilité au site d'action de cette

molécule est indépendante de l'état d'ouverture de KCa3.1. L'absence d'effets inhibiteurs de VRT-532 sur le mutant constitutivement actif V282G indique que cette molécule pourrait agir via l'interaction CaM-KCa3.1 et nécessiter la présence de Ca^{2+} pour agir. Par ailleurs, un autre potentiateur de CFTR, le CBIQ, a des effets potentiateurs sur KCa3.1. Nos résultats en canal unitaire indiquent qu'il déstabilise un état fermé du canal. Nos travaux montrent aussi que CBIQ augmente la probabilité d'ouverture de KCa3.1 en conditions sursaturantes de Ca^{2+} , ainsi que son affinité apparente pour le Ca^{2+} . Des expériences où CBIQ est appliqué en présence ou en absence de Ca^{2+} ont indiqué que l'accessibilité à son site d'action est indépendante de l'état d'ouverture de KCa3.1, mais que la présence de Ca^{2+} est nécessaire à son action. Ces résultats sont compatibles avec une action de CBIQ déstabilisant un état fermé du canal. Finalement, des expériences en Ba^{2+} nous ont permis d'investiguer la région du filtre de sélectivité de KCa3.1 lors de l'action de CBIQ et nos résultats pointent vers une action de CBIQ dans cette région. Sur la base de nos résultats nous concluons que CBIQ, un potentiateur de CFTR, aurait un effet activateur sur KCa3.1 via la déstabilisation d'un état fermé du canal à travers une action sur sa 'gate' au niveau du filtre de sélectivité. De plus, les potentiateurs de CFTR ayant montré des effets inhibiteurs sur KCa3.1 pourraient agir via la membrane ou via une protéine accessoire du canal ou sur l'interaction CaM-KCa3.1.

Dans l'optique de traitements potentiels de la fibrose kystique, nos résultats indiquent que le CBIQ pourrait être un potentiateur efficace puisqu'il est capable de trimuler à la fois KCa3.1 et CFTR. Par contre, dans les cas du VRT-532 et du SF-03, une inhibition de KCa3.1 pourraient en faire des potentiateurs moins efficaces.

Mots clés: Canal potassique activé par le calcium intracellulaire, patch clamp, criblage, fibrose kystique, CBIQ

ABSTRACT

Airway epithelial cells are the site of Cl^- secretion through CFTR. Cystic fibrosis is a fatal genetic disease caused by mutations in CFTR. The most frequent mutation in North America (ΔF508) results in impaired maturation and altered channel gating of the protein. In the last years, several small molecules were identified by high throughput screening that could restore mutated CFTR function. Compounds addressing CFTR gating defects are referred to as potentiators. The basolateral K^+ channel KCa3.1 has been documented to play a prominent role in establishing a suitable driving force for CFTR-mediated Cl^- secretion in airway epithelial cells. It has been shown, for example, that the application of 1-EBIO on T84 monolayers results in a sustained increase of Cl^- secretion and that this current can be reversed by application of CTX, a KCa3.1 inhibitor (Devor et al., 1996). Thus, in a global approach of transepithelial transport, the research for physiologically relevant CFTR potentiators should also consider their effects on the KCa3.1 channel. Electrophysiological patch clamp measurements and channel structural modification by site directed mutagenesis were used to characterize the action of CFTR potentiators on KCa3.1 and study their molecular mode of action.

In this work we present results on the effects on KCa3.1 of several CFTR potentiators of different structures. We observed that the CFTR potentiators genistein, curcumin, SF-03 and VRT-532 could inhibit KCa3.1 activity at concentrations known to activate CFTR. Our results suggest that SF-03 could act indirectly on KCa3.1 through a mechanism involving an accessory protein. Curcumin would also have an indirect inhibitory effect, probably mediated by the plasma membrane, as documented for other ion channels. A detailed study of VRT-532 revealed that this molecule has access to its binding site in a state independent manner, and is poorly effective on the V282G mutant of KCa3.1 , which is constitutively active. These results suggest that VRT-532 could act through the CaM/KCa3.1 complex and require the presence of Ca^{2+} to inhibit channel activity. In contrast, CBIQ, another CFTR potentiator, succeeded to activate KCa3.1 . Our results in single channel show that CBIQ

destabilizes a non conducting state of the channel. We also showed that this molecule increases the apparent Ca^{2+} affinity as well as the channel open probability, even in saturating Ca^{2+} conditions. Experiences in which Ba^{2+} was used as a probe were also performed to determine if the action mechanism of CBIQ involves an effect on the selectivity filter. Our results showed that Ba^{2+} could displace CBIQ from its interacting site, suggesting that the increases in channel activity induced by CBIQ could result from a change in the energetics of the channel at the level of the selectivity filter. On the basis of our results, we conclude that CBIQ, a CFTR potentiator, could activate KCa3.1 by destabilizing a non conducting state of the channel, probably through an action near the selectivity filter region. Also, CFTR potentiators having an inhibitory effect on KCa3.1 are likely to act through the plasmic membrane, the CaM/KCa3.1 interaction or an accessory protein of the channel.

In a perspective of future treatments for CF, our results indicate that CBIQ could be an efficient potentiator since this product stimulates KCa3.1 as well as CFTR. Conversely, the VRT-532 and SF-03 could be less efficient than on CFTR alone, due to their inhibition of KCa3.1 .

Keywords: calcium-activated potassium channel, patch clamp, drug screening, cystic fibrosis, CBIQ

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Alanine (Ala)
aa	Acides aminés
ABC	'ATP-binding cassette'
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ATP	Adénosine triphosphate
C	Cystéine (Cys)
CaM	Calmoduline
CBIQ	4-chloro-benzo[<i>F</i>]isoquinoline
CFFT	Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
D	Aspartate (Asp)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EBIO	ethyl-2-benzimidazolone
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
F	Phénylalanine (Phe)
FK	Fibrose kystique
G	Glycine (Gly)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
KCa	Canaux potassiques dépendants du Ca ²⁺
Kv	Canaux potassiques dépendants du voltage
L	Leucine (Leu)
LZ	'Leucine zipper', domaine d'interaction riche en leucines
MSD	'Membrane spanning domains'
NBD	'Nucléotide binding domain'
NDPK	Nucléoside DiPhosphate Kinase
PDB	'Protein Data Bank', banque de données sur les protéines
P ₀	Probabilité d'ouverture
PKA	protéine kinase A
RD	Domaine régulateur
SF-03	Sulfonamide-03
TRAM-34	1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole
V	Valine (Val)
VRT-532	4-methyl-2-(5-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)-phenol

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION	1
1.1	Membrane plasmique : composition et propriétés	1
1.2	Les canaux ioniques	4
1.3	Les canaux potassiques	6
1.4	Les canaux potassiques dépendants du calcium intracellulaire	8
1.5	Le canal potassique activé par le calcium intracellulaire KCa3.1	11
1.5.1	Structure	11
1.5.2	'Gating'	14
1.5.3	Régulation	15
1.5.4	Rôles physiologiques.....	16
1.6	Processus de sécrétion de Cl ⁻ et d'eau	17
1.6.1	Protéines de transport membranaire impliquées.....	17
1.6.1.1	Canaux K ⁺ impliqués dans les processus de sécrétion.....	19
1.6.1.2	CFTR : la protéine	20
1.7	Problématique de recherche.....	23
1.7.1	Fibrose kystique et mutations.....	23
1.7.2	Stratégies pour corriger le phénotype de la fibrose kystique.....	25
1.7.2.1	Approche pharmaceutique : correcteurs et potentiateurs	26
2	MÉTHODOLOGIE	38
2.1	Protocole expérimental	38
2.2	Solutions	38
2.3	Produits.....	39
2.4	Ovocytes.....	40
2.5	Clonage et mutagenèse.....	40
2.6	Cellules	41
2.7	Présentation des figures	41
2.8	Analyse des résultats.....	43
2.8.1	Courants unitaires	43
2.8.2	Courants de macro patch	43

3	RÉSULTATS	45
3.1	Genisteine, curcumine et Sf-03	45
3.2	VRT-532	47
3.3	4-Chlorobenzo[F]isoquinoline	52
4	DISCUSSION	62
4.1	Les potentiateurs de CFTR ayant un effet inhibiteur sur KCa3.1	62
4.1.1	Les effets inhibiteurs du SF-03 sur KCa3.1	63
4.1.2	Les effets inhibiteurs du VRT-532 sur KCa3.1	63
4.2	CBIQ : un potentiateur de CFTR qui active KCa3.1	65
4.2.1	Modèle de fonctionnement moléculaire	66
4.2.2	Localisation du site d'action	72
5	CONCLUSION	74
6	RÉFÉRENCES	77
7	ANNEXE	89
8	PUBLICATIONS	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Membres de la famille KCa	9
Tableau 1.2: Caractéristiques des canaux K^+ activés par le Ca^{2+} intracellulaire....	10
Tableau 1.3: Classes de mutations de CFTR engendrant un phénotype de FK....	25
Tableau 3.1: Structures chimiques des potentiateurs de CFTR testés.....	45
Tableau 4.1 : Potentiateurs testés avec leur effet sur KCa3.1.....	62

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1.1 : Équation de Born.	2
Équation 1.2 : Potentiel de Nerst	5
Équation 4.1: Modèle du fonctionnement d'un monomère de KCa3.1.....	68
Équation 4.2: Expression donnant la P_0 dans le cas de notre modèle.....	68
Équation 4.3: Expression donnant la P_0 en Ca^{2+} saturant	68
Équation 4.4: Valeur de la concentration de Ca^{2+} pour laquelle $P_0 = 0,5 P_{0max}$...	70

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Phospholipide	2
Figure 1.2 : Hélices alpha et feuillets bêta.	3
Figure 1.3 : Modèle de la topologie membranaire d'un monomère de KCa3.1.....	12
Figure 1.4 : Modèle par homologie du canal KCa3.1.....	12
Figure 1.5 : Sécrétion de sel et d'eau dans les cellules épithéliales.	18
Figure 1.6 : Schéma du canal CFTR.....	21
Figure 1.7 : Effets du VRT-532 sur CFTR Δ F508	30
Figure 1.8 : Effets du CBIQ sur CFTR et CFTR Δ F508	32
Figure 1.9 : Courbe courant-réponse de CBIQ sur KCa3.1	33
Figure 1.10 : Effets de CBIQ avec et sans inhibiteurs de canaux potassiques.....	34
Figure 1.11 : Modèle cellulaire des voies respiratoires au niveau des bronches... 36	
Figure 3.1 : Effets inhibiteurs de la genisteine et de la curcumine sur KCa3.1.....	46
Figure 3.2 : Effet inhibiteur de 60nM SF-03 sur le canal KCa3.1.....	47
Figure 3.3 : Effets du VRT-532 sur les canaux KCa3.1 et KCa2.3	48
Figure 3.4 : Courbe dose-réponse pour l'inhibition de KCa3.1 par le VRT-532.....	49
Figure 3.5 : Accessibilité au site d'action du VRT-532 en zéro Ca^{2+}	50
Figure 3.6 : Effet de 40 μM VRT-532 sur le canal KCa3.1 muté V282G.....	51
Figure 3.7 : Effet de 10 μM CBIQ sur KCa3.1.....	53
Figure 3.8 : Effet du CBIQ sur KCa3.1 en canal unitaire	54
Figure 3.9 : Ralentissement des τ_{off} du canal en présence de CBIQ.	55
Figure 3.10 : Mesures de l'accessibilité du CBIQ à son site d'action en EGTA.	57
Figure 3.11 : Effets de CBIQ sur le canal muté V275C/A279G.	58
Figure 3.12 : Effets du Ba^{2+} sur l'action du CBIQ sur KCa3.1.....	60
Figure 3.13 : Effets du Ba^{2+} sur l'action de 100 μM EBIO sur KCa3.1.....	61
Figure 4.1 : Dose-réponse en Ca^{2+} pour KCa3.1	67
Figure 4.2 : P_0 de KCa3.1 en fonction de la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracellulaire.	71

1 Introduction

1.1 Membrane plasmique : composition et propriétés

L'homéostasie se définit comme la capacité de l'organisme de maintenir un état de stabilité relative des différentes composantes de son milieu interne et ce, malgré les variations constantes de l'environnement externe. Afin de maintenir cette stabilité, les cellules vivantes sont délimitées par une membrane plasmique, qui protège leur intégrité et régit leurs échanges avec leur milieu. La perméabilité de cette membrane doit être contrôlée afin d'isoler et de protéger le milieu intracellulaire tout en permettant l'élimination des déchets cellulaires et l'apport de nutriments et autres éléments vitaux. La membrane cellulaire constitue donc un élément clef dans la communication entre les cellules et leur milieu.

La composition lipidique de la membrane plasmique est propre à chaque type cellulaire, mais les phospholipides en sont l'élément fondamental. Les phospholipides sont des molécules amphipathiques formés d'une tête polaire et, en général, de deux chaînes hydrophobes (voir figure 1.1). Dans un milieu aqueux, ces lipides s'agencent spontanément en deux feuilletts antiparallèles, leurs chaînes hydrophobes s'opposant de façon à les isoler du milieu aqueux. Ce dernier est donc en contact avec leurs têtes polaires seulement (voir figure 1.1). La couche hydrophobe formée par les chaînes de phospholipides, d'une épaisseur de 30 à 50 Å, représente une barrière à la diffusion de molécules organiques polaires et bloque le passage aux ions.

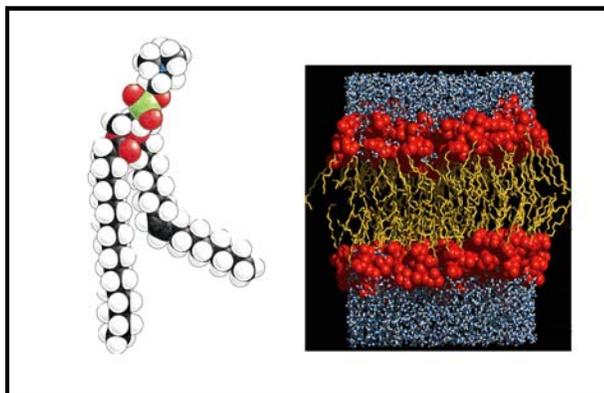


Figure 1.1: Phospholipide

Représentation de la structure d'un phospholipide (gauche) et de l'arrangement des phospholipides en bicouche dans un milieu aqueux (droite). La tête polaire du phospholipide comporte un groupement alcool azoté, un groupement phosphate et un groupement glycérol. Les chaînes hydrocarbonées qui s'y rattachent sont hydrophobes et permettent l'arrangement en bicouche. À droite, les chaînes hydrocarbonées sont en jaune, les têtes polaires en rouge et les molécules d'eau en bleu. Figure adaptée à partir de (Alberts et al., 2007).

En effet, dans le cas d'un ion monovalent de rayon r passant d'un milieu aqueux continu à une bicouche lipidique infiniment épaisse, l'énergie nécessaire au passage de l'ion dans la membrane à 298K est calculée à partir de l'équation de Born ((Hille, 2001), voir équation 1.1). Pour les valeurs indiquées dans le tableau si-dessous, et si l'on approxime que la membrane a une épaisseur infinie par rapport à un ion, on obtient une barrière d'énergie de 97.8 kT pour le passage d'un ion monovalent dans une membrane biologique.

r	Rayon de Pauling (K^+)	133 pm
Z	Valence	1
ϵ_2	Constante diélectrique intracellulaire	80
ϵ_1	Constante diélectrique membranaire	2.1

$$\Delta G = \frac{z^2 q_e^2 N}{8\pi \epsilon_0 r} \left(\frac{1}{\epsilon_2} - \frac{1}{\epsilon_1} \right) \quad (1.1)$$

La vie de la cellule ainsi que les différents processus de signalisation intra et extracellulaires nécessitent toutefois le passage sélectif d'ions et de molécules polaires à travers la membrane plasmique. Par exemple, il a été démontré (Hodgkin and Huxley, 1952) qu'un courant sodique et un courant potassique sont essentiels à la génération d'un potentiel d'action dans les cellules excitables (ex. neurones, cellules musculaires). La membrane plasmique doit donc être pourvue de systèmes pouvant réguler de façon précise et sélective le passage des différents ions. Ces systèmes sont constitués de protéines membranaires, elles mêmes formées d'acides aminés. Ces derniers ont la propriété de faire des liens peptidiques et de former des structures, dites secondaires, pouvant s'insérer dans les membranes pour former des complexes fonctionnels. Les structures secondaires que l'on retrouve en majorité dans les protéines membranaires sont de types feuillet β et hélice α (voir figure 1.2). La majorité des canaux ioniques sont formés d'un assemblage d'hélices alpha transmembranaires.

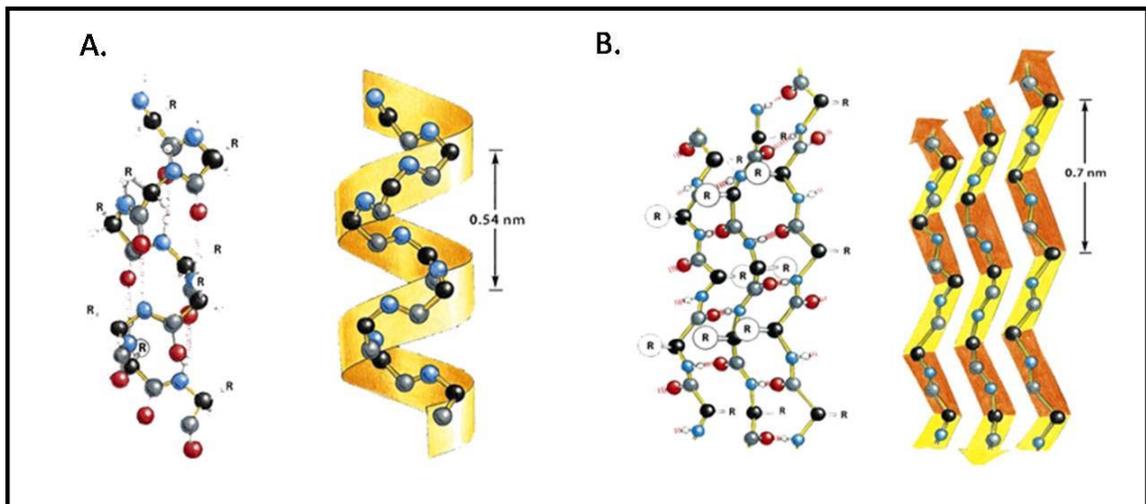


Figure 1.2 : Hélices alpha et feuillets bêta.

Illustration de la structure de base d'une hélice α (A) et d'un feuillet β (B). Les atomes d'oxygène, d'hydrogène et d'azote sont illustrés en rouge, blanc et bleu respectivement. Les atomes de carbone sont en gris et noir et les liens hydrogène sont représentés par des traits rouges. Les chaînes latérales des acides aminés sont représentées par les lettres R. Figure adaptée à partir de (Alberts et al., 2007).

1.2 Les canaux ioniques

Il existe plusieurs types de protéines membranaires. Par exemple, certaines d'entre elles sont responsables du maintien de la structure cellulaire et s'attachent au cytosquelette. D'autres ont un rôle dans la communication entre la cellule et le milieu extracellulaire en agissant comme récepteurs à divers signaux extracellulaires. Ce mémoire s'intéresse aux canaux ioniques. Ces derniers sont des protéines membranaires qui facilitent la diffusion d'ions entre les milieux intra- et extra-cellulaires en abaissant considérablement la barrière d'énergie imposée par la couche hydrophobique de la membrane.

La diffusion simple est un processus de transport passif commun à toutes les membranes biologiques via lequel de petites molécules (O_2 , H_2O , CO_2 , etc.) traversent les lipides membranaires en réponse à un gradient chimique pour atteindre un état d'équilibre de part et d'autre de la membrane.

Le mécanisme de la diffusion simple n'est cependant pas suffisamment rapide dans le cas de plusieurs processus cellulaires à cause de la barrière d'énergie que représente la couche hydrophobe de la membrane au passage d'ions et de molécules chargées. La cellule a donc recours à un autre processus de transport passif, nommée diffusion facilitée. En effet, les propriétés électriques des membranes biologiques sont très différentes de celles formées uniquement de lipides purs. Le flux de substrats est facilité par différentes protéines qui, en modifiant la perméabilité de la membrane, catalysent le transfert des molécules dans la direction déterminée par le potentiel électrochimique des molécules en question. Le potentiel électrochimique est une grandeur thermodynamique impliquant le potentiel électrostatique ressenti par un ion ainsi que son potentiel chimique, déterminé par la différence de concentration de l'ion concerné. On peut déterminer la valeur du potentiel d'équilibre électrochimique E_{eq} d'un ion

selon les valeurs des potentiels extracellulaires et intracellulaires (E_o et E_i respectivement) et les concentrations intra et extracellulaires de l'ion concerné ($[K_i]$ et $[K_o]$ dans notre cas, voir équation 1.2).

$$E_{eq} = E_i - E_o = \frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{[K_o]}{[K_i]}\right) \quad (1.2)$$

Chez les mammifères, les concentrations intracellulaires et extracellulaires de potassium sont typiquement de l'ordre de 120 et de 5 mM respectivement. Pour ce qui est du sodium, on retrouve des concentrations intracellulaires de 5 à 15 mM et extracellulaires d'environ 145 mM.

Le flux de substrats menant à l'équilibre ne nécessitant pas d'apport d'énergie, ce dernier type de transport est un transport passif. La catégorie de protéines permettant la diffusion facilitée est en grande partie responsable des propriétés électrophysiologiques des membranes cellulaires. Elle regroupe les pores, les ionophores, les transporteurs passifs de type uniport et les canaux ioniques, classe dont le sujet d'étude de ce mémoire fait partie.

Les canaux ioniques sont caractérisés par une propriété que l'on nomme 'gating', qui consiste en la capacité du canal de fluctuer entre des états permettant ou ne permettant pas le passage d'ions. Le processus de 'gating' est dynamique et implique différentes réorganisations de la protéine dont la structure est modifiée pour atteindre un état non-conducteur ou un état conducteur. Le flux d'ions à travers les canaux ioniques lorsqu'ils sont dans l'état conducteur est estimé à plus de 10^6 ions par seconde (Hille, 2001). Une autre propriété des canaux ioniques est leur sélectivité à un type d'ion, qui définit dans quelles proportions ils laissent passer de façon préférentielle un type d'ion relativement à un autre. Il existe des canaux anioniques laissant passer préférentiellement le Cl^- et des canaux cationiques, dits sélectifs au Na^+ , au Ca^{2+} , ou au K^+ . Les canaux les plus

sélectifs à un ion en particulier sont ceux qui laissent passer le K^+ et on les désigne comme la famille des canaux potassiques.

1.3 Les canaux potassiques

Les canaux potassiques sont des protéines insérées dans les membranes plasmiques et dont les acides aminés formant le filtre de sélectivité laissent préférentiellement passer les ions K^+ en conditions physiologiques. Ils sont ubiquitaires et présents chez tous les êtres vivants (eucaryotes et procaryotes). Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires chez les mammifères, dont l'excitabilité cellulaire (Hodgkin and Huxley, 1952), le maintien de la force électromotrice nécessaire à la sécrétion de sels et d'eau dans les épithéliums (Bardou et al., 2009), la prolifération cellulaire (Zhang et al., 2009) et la motilité (Schwab et al., 1999). Ces exemples ne sont que quelques illustrations de la multitude de rôles des canaux potassiques et plusieurs autres processus impliquant ces canaux seront probablement découverts dans les années à venir.

La structure cristalline de différents canaux potassiques est déjà connue. La première a été résolue par l'équipe de Roderick MacKinnon en 1998 pour le canal bactérien KcsA (Doyle et al., 1998). La connaissance de la structure tridimensionnelle de ces canaux contribue grandement à l'avancement des connaissances sur la relation 'structure-fonction' des canaux potassiques et des canaux ioniques en général, puisque ces structures sont aussi utilisées en modélisation par homologie.

Les canaux potassiques des mammifères sont caractérisés par un assemblage en tétramère de leurs sous-unités principales¹, chaque monomère de ces dernières comportant de 2 (KcsA) à 7 segments

¹ Certains canaux potassiques ont aussi d'autres sous-unités, le plus souvent des sous-unités β , qui jouent un rôle de protéine auxiliaire.

transmembranaires (TM). Le côté intracellulaire du canal donne sur une cavité aqueuse, formée par les hélices transmembranaires du côté C terminal (M2 ou S6) de la protéine, et qui contient des ions hydratés. La haute sélectivité des canaux potassiques (K vs Na > 100 : 1 (Doyle et al., 1998; Noskov and Roux, 2006)) leur est conférée par une structure longue de 12Å nommée filtre de sélectivité, qui permet un passage sélectif des ions K⁺ en absence de la barrière d'énergie de diffusion que représente la membrane. Le filtre de sélectivité est formé par une boucle semi-transmembranaire du côté extracellulaire du canal, entre l'hélice du pore (Liu and Siegelbaum, 2000) et la dernière hélice du côté C-terminal (S6 dans le cas des canaux à 6TM). Sa longueur est de l'ordre d'une dizaine d'angströms. La séquence consensus du filtre de sélectivité des canaux potassiques¹ est donnée par –TXXTXGYGD– (Heginbotham et al., 1994), et les résidus TXGYG de chaque monomère constituent les éléments clefs du filtre de sélectivité.

Une autre caractéristique commune aux canaux potassiques est leur séquence de sélectivité. La séquence de sélectivité d'une famille de canaux est donnée par le rapport de perméabilité de l'ion X par rapport à l'ion K⁺ (P_X/P_K). Pour la famille des canaux potassiques dépendants du Ca²⁺ intracellulaire, cette séquence correspond à K⁺ > Rb⁺ > Cs⁺, NH₄⁺ > Na⁺ (Park, 1994). Finalement, les canaux potassiques sont aussi reconnus pour être inhibés par le tétraéthylammonium (TEA) ainsi que par des cations divalents dont le Ba²⁺ et le Cd²⁺.

Le processus de 'gating' d'un canal ionique est généralement couplé à la présence ou non d'un élément déclencheur entraînant l'ouverture du canal. Les canaux potassiques sont répertoriés en différentes catégories selon l'élément déclencheur qui les influence. Le gating de certains canaux

¹ 'Potassium channel signature sequence' en anglais

K^+ dépend des variations de potentiel membranaire; on les dit dépendants du voltage¹. D'autres canaux K^+ dépendent du pH intracellulaire (KcsA) ou de ligands intracellulaires, tels que le Ca^{2+} (MthK, KCa3.1) ou les sous unités β et α des protéines G (Nishida and MacKinnon, 2002). Le potentiel membranaire et la présence de différents ligands intracellulaires sont donc des exemples de facteurs permettant la régulation des canaux potassiques.

Notons qu'il existe d'autres catégories de canaux potassiques ayant des caractéristiques particulières. Mentionnons par exemple les canaux potassiques de la famille des Kir, caractérisés par leur courbe courant-voltage à rectification entrante (Kir), ou les canaux potassiques à deux pores (TWIK, TASK, TREK).

1.4 Les canaux potassiques dépendants du calcium intracellulaire

Le présent travail porte sur un canal faisant partie de la famille des canaux potassiques activés par le calcium intracellulaire (KCa). La probabilité d'ouverture de ces canaux est sensible aux variations de concentration du Ca^{2+} intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$). Une des conséquences importantes de cette dépendance à la $[Ca^{2+}]_i$ est le couplage entre la présence de Ca^{2+} , un important second messenger, et la régulation des propriétés électriques d'une cellule par un canal potassique. Les canaux KCa sont présents dans une grande majorité des cellules de mammifères. Ils ont d'abord été classés, selon leurs propriétés de conduction, en trois grandes familles : BK, IK et SK. BK est l'abréviation de 'big-conductance K^+ channel', SK de 'small-conductance K^+ channel' et IK de 'intermediate-conductance K^+ channel'. On retrouve maintenant 5 catégories différentes de canaux KCa (voir tableau 1.1). Puisque les trois canaux KCa4.1, KCa4.2 et KCa5.1 sont insensibles au Ca^{2+} intracellulaire, il n'en sera pas davantage question ici. Le

¹ Kv1.2, utilisé comme base pour construire des modèles de KCa3.1, est un membre de cette famille

tableau 1.1 présente l'ensemble des canaux K_{Ca}, tandis que le tableau 1.2 présente les principales caractéristiques des canaux K_{Ca}1-3, activés par le Ca²⁺ intracellulaire.

Nomenclature officielle	Gène	Autres désignations	Facteurs influençant le gating
K _{Ca} 1.1	KCNMA1	BK, Slo1.1	[Ca ²⁺] _i et voltage
K _{Ca} 2.1	KCNN1	SK1	[Ca ²⁺] _i
K _{Ca} 2.2	KCNN2	SK2	[Ca ²⁺] _i
K _{Ca} 2.3	KCNN3	SK3	[Ca ²⁺] _i
K _{Ca} 3.1	KCNN4	SK4, I _{K_{Ca}} , Gardos channel	[Ca ²⁺] _i
K _{Ca} 4.1	KCNT1	Slack Slo2.2	[Cl ⁻] _i et [Na ⁺] _i
K _{Ca} 4.2	KCNT2	Slick Slo2.1	[Cl ⁻] _i et [Na ⁺] _i
K _{Ca} 5.1	KCNU1	Slo3	[OH ⁻] _i (alcalinisation)

Tableau 1.1: Membres de la famille K_{Ca}

Tableau indiquant le gène encodant la protéine, les différents noms qui ont été donnés à ces canaux depuis leur découverte et les facteurs influençant leur 'gating'. (Wei et al., 2005)

	KCa1.1 (BK)	KCa3.1 (IK)	KCa 2.1, 2.2, 2.3 (SK)
Dépendance au Calcium	Intrinsèque Sites de liaison au Ca^{2+} sur la partie C terminale du canal	Liaison à la calmoduline	Liaison à la calmoduline ($k_d=0,6-0,7 \mu M$)
Dépendance au voltage	oui	non	non
Conductance	260 pS	11 - 33 pS	9,2 à 9,9 pS
Nombre d'acides aminés	1182 aa	427 aa	543 à 736 aa
Nombre de segments transmembranaires	7 TM (sous unité principale)	6TM (homotétramère)	6TM (homotétramère)
Sous unités et protéines associées	Sous unité β à 1 TM. (BK- β)	calmoduline	calmoduline
Distribution	Cerveau, muscle squelettique, épithélium du colon et du rein et poumon	Épithélium des voies respiratoires, muscle lisse vasculaire, colon, fibroblastes, prostate érythrocytes, placenta, lymphocytes (B et T), foie, pancréas (cell. β),	Cerveau et autres organes (KCa2.3 a la plus large distribution)
Activateurs	NS1608, NS1619, BMS204352, DHS-1, estradiol	1-EBIO, DCEBIO, riluzole, methylxanthine	1-EBIO, NS309, riluzole
Inhibiteurs et bloqueurs	TEA, charibdotoxine, iberitoxine, paxiline, slotoxine	charibdotoxine, maurotoxine, TRAM-34, clotrimazole, TEA	UCL1684, apamine, scyllatoxine, fluoxetine, bicuculine

Tableau 1.2: Caractéristiques des canaux K^+ activés par le Ca^{2+} intracellulaire. La troisième colonne du tableau présente uniquement les caractéristiques communes aux trois canaux KCa2.X. Les données du tablelau sont tirées de (Stocker, 2004;Wei et al., 2005).

1.5 Le canal potassique activé par le calcium intracellulaire KCa3.1

Tel que mentionné dans le tableau 1.2, KCa3.1 est un canal activé par le calcium intracellulaire. Sa probabilité d'ouverture est donc fonction de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (voir figure 4.1) et ne dépend pas du voltage. Le courant de KCa3.1 montre une rectification entrante faible (30 et 11pS à -100 et +100 mV, respectivement (Jensen et al., 1998)). Le clonage du canal KCa3.1 (Ishii et al., 1997; Joiner et al., 1997) a permis une meilleure compréhension de sa composition moléculaire (Maylie et al., 2004).

1.5.1 Structure

Le canal KCa3.1 humain est un homotétramère dont chaque monomère comprend 427 acides aminés organisés en 6 hélices transmembranaires (S1 à S6) (voir figure 1.3). L'hélice du pore et le filtre de sélectivité sont situés entre les segments transmembranaires S5 et S6. Une calmoduline (CaM) est liée constitutivement à la région C-terminale de chaque monomère (Joiner et al., 2001; Khanna et al., 1999). Elle est responsable de la sensibilité au Ca^{2+} du canal et régule aussi son assemblage et son adressage à la membrane. La liaison constitutive de la CaM au canal se ferait dans la région des résidus 312 à 329 de KCa3.1. La partie intracellulaire du canal KCa3.1 comporte aussi deux structures nommées 'leucine zippers' (LZ), en N-terminal et en C-terminal, qui contribuent à l'adressage à la membrane de KCa3.1 (Syme et al., 2003). Un site potentiel de glycosylation dont la fonction n'est pas encore connue se trouve près du pore. Il y a aussi un site de phosphorylation par la kinase NDPK-B¹ au niveau de l'histidine en position 358 (Srivastava et al., 2006).

¹ Nucléoside DiPhosphate Kinase B

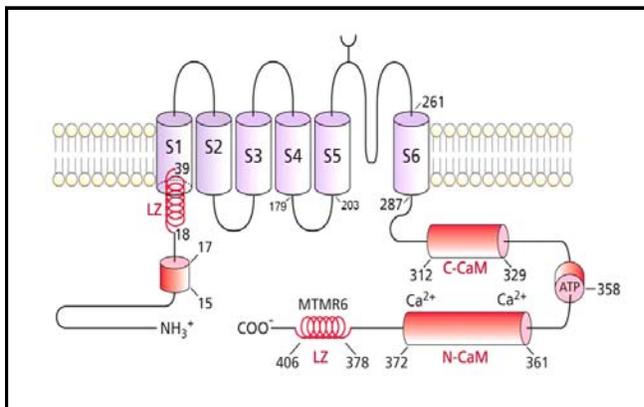


Figure 1.3 : Modèle de la topologie membranaire d'un monomère de KCa3.1.
Figure de Rémy Sauvé, 2009

Il n'existe pas, au moment de l'écriture de ce mémoire, de structure résolue par rayons X du canal KCa3.1. Les structures de différents canaux potassiques récemment cristallisés permettent toutefois d'élaborer des modèles par homologie pour décrire la structure de KCa3.1 dans l'état ouvert (Kv1.2 (Long et al., 2005), PDB:2a79) (voir figure 1.4) ou fermé (MlotiK1 (Clayton et al., 2008), PDB:3BEH).

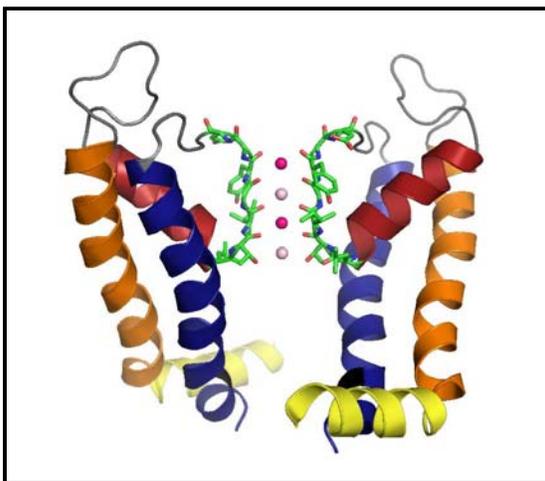


Figure 1.4 : Modèle par homologie du canal KCa3.1.

Modèle construit à partir de la structure du canal Kv1.2 avec le logiciel Modeller 9v1. Deux monomères opposés sont illustrés. Les hélices S5, S6, l'hélice du pore, le filtre de sélectivité et les boucles les reliant sont indiqués en orange, bleu, rouge et vert, et gris, respectivement. Les segments reliant S4 et S5 sont en jaune. Les ions potassium dans les sites S4 et S2 sont en rose pâle et dans les sites S3 et S1 en rose foncé.

Notre laboratoire a montré, par des mesures d'accessibilité, que la région du croisement des hélices S6 de KCa3.1 (V282-A286) n'est pas obstructive au passage des ions K^+ , même lorsque le canal est en configuration fermée. Ces expériences d'accessibilité utilisaient l' Ag^+ , dont une des propriétés est de se lier aux cystéines. L' Ag^+ est une excellente sonde pour l'étude des canaux K^+ , les deux ions étant des cations monovalents de dimensions comparables (K^+ 1.52Å et Ag^+ 1.29Å) (Lu and Miller, 1995; Marcus, 1988). Les mesures avec l' Ag^+ ont démontré que l'accessibilité à un site de liaison localisé dans la cavité centrale du canal était indépendante de l'état d'ouverture du canal (Klein et al., 2007). Dans le cas du canal Shaker, les taux de modification de l' Ag^+ pour l'acide aminé correspondant au V282 sont 700X plus lents en configuration fermée qu'à l'état conducteur (del Camino and Yellen, 2001).

Les modèles actuels et les résultats obtenus en SCAM¹ au laboratoire indiquent que les résidus V275, T278, A279, V282 et A286 de l'hélice S6 feraient face à l'intérieur du pore (Klein et al., 2007; Simoes et al., 2002). Les résidus C276, C277, L280, et L281 seraient orientés vers la membrane. Selon les études d'accessibilité effectuées sur le canal fermé en utilisant comme sonde le MTSEA (D=4.5Å) et le MTSET (D=5.8Å), le diamètre interne du pore du canal fermé à la hauteur du résidu 286 serait d'au moins 4.5 Å, mais inférieur à 5.8 Å. La partie la plus étroite du pore (dans l'état non-conducteur) serait située au niveau des résidus V282-A286. Cette région correspond au croisement des hélices S6 dans Kv1.2² par exemple (Pathak et al., 2007).

¹ Pour 'substituted cysteine accessibility method', en anglais.

² Dans le cas de Kv1.2, cette région est caractérisée par une distance entre les carbonés α de monomères opposés d'environ 2Å dans la configuration fermée.

1.5.2 'Gating'

Le contrôle de la 'gate' chez les canaux potassiques est un processus dynamique encore mal connu. Dans le cas de KCa3.1, le processus de 'gating' s'amorce avec la liaison du Ca^{2+} à la CaM. Les mécanismes exacts qui s'en suivent sont encore méconnus. Les hypothèses actuelles se basent sur les données apportées par la cristallisation, en présence de Ca^{2+} , de monomères du canal KCa2.2, chacun couplé à une CaM (voir structure PDB 1G4Y). Selon le modèle proposé par Schumacher et son équipe (Schumacher et al., 2004), en présence de Ca^{2+} le lobe-N de la CaM irait se lier à la partie C-terminale du monomère voisin, ce qui résulterait en une double dimérisation des monomères adjacents. Une rotation ou une translation des hélices S6 s'ensuivrait possiblement. (Maylie et al., 2004; Schumacher et al., 2001; Schumacher et al., 2004; Wissmann et al., 2001). Les mécanismes permettant à l'information sur la liaison du Ca^{2+} à la CaM de se rendre vers la 'gate' pourraient impliquer un ou plusieurs changements de conformations et se traduiraient, après un nombre inconnu d'étapes, par l'ouverture du canal.

La région du croisement des hélices S6 (V282-A286) n'étant pas obstructive au passage des ions K^+ pour KCa3.1, il serait possible que la 'gate' se trouve au niveau du filtre de sélectivité. En effet, le filtre étant la section la plus étroite du canal (~3.5 Å de largeur) et étant directement en contact avec les ions K^+ déshydratés, il serait concevable que cette section puisse influencer les propriétés de conduction du canal, même par de très faibles changements de conformation. Selon notre hypothèse, le filtre de sélectivité est la structure contrôlant ultimement les propriétés de conduction du canal. Dans ce cas, la transmission de l'information en provenance de la CaM et de la partie C-terminale du canal pourrait se faire par l'hélice S6 et par l'hélice du pore, directement liée au filtre de sélectivité. Cette dernière semble en effet subir d'importants changements de conformation pendant le

'gating' dans le cas des canaux dépendants de nucléotides (Liu and Siegelbaum, 2000).

L'hypothèse du filtre de sélectivité agissant comme 'gate' est supportée par de récentes données structurales (Proks et al., 2003;Cordero-Morales et al., 2007;Contreras et al., 2008;Baker et al., 2007;Claydon et al., 2003;Cordero-Morales et al., 2006) ainsi que par les modèles et les calculs par ordinateur (Domene et al., 2008;Berneche and Roux, 2003). Des résultats avec le canal KCa2.2 suggéraient aussi récemment que la 'gate' pourrait être située haut dans la cavité, possiblement dans le filtre de sélectivité (Bruening-Wright et al., 2007).

1.5.3 Régulation

La sensibilité au Ca^{2+} de KCa3.1 est aussi modulée par différents processus de phosphorylation. L'ATP a un effet activateur sur KCa3.1 (Gerlach et al., 2000) et cet effet implique probablement différentes protéines kinases. Par exemple, l'activité du canal KCa3.1 est augmentée dans certains types cellulaires par la PKA. Cette dernière ne phosphorylerait pas le canal directement, car la mutation de son site consensus de phosphorylation (S334A) s'est avérée incapable de modifier l'action activatrice de la kinase sur KCa3.1 (Gerlach et al., 2000). Il existe donc probablement une protéine accessoire de KCa3.1 sensible à la PKA. KCa3.1 possède aussi un site de phosphorylation par la kinase NDPK¹-B au niveau de l'histidine en position 358, dans la région C-terminale du canal. La phosphorylation de H358 a pour conséquence une augmentation de l'activité du canal (Srivastava et al., 2006). Finalement, des travaux récents de notre laboratoire ont montré que l'activation de la protéine kinase AMPK par l'AMP

¹ Nucléoside DiPhosphate Kinase

diminuerait l'activité du canal en interagissant avec sa région C-terminale (Klein et al., 2009).

1.5.4 Rôles physiologiques

L'implication de KCa3.1 dans plusieurs processus cellulaires clés est maintenant connue (Chou et al., 2008). Ce canal (d'abord appelé *Gardos channel*) a été découvert dans les érythrocytes, où il est impliqué dans la régulation du volume. Les canaux KCa sont aussi des acteurs importants lors des cascades de signalisation de Ca^{2+} (Ledoux et al., 2008). En effet, la présence de Ca^{2+} augmente leur probabilité d'ouverture, résultant en une variation du potentiel membranaire. Ces cascades de signalisation de Ca^{2+} sont présentes dans une large variété de tissus et impliquent des cellules excitables et non excitables. Il n'est donc pas surprenant que KCa3.1 soit impliqué dans plusieurs processus cellulaires dont l'activation des lymphocytes (Jensen et al., 2002), l'angiogénèse (Grgic et al., 2005), la prolifération de muscles lisses vasculaires (Si et al., 2006) et la vasodilatation régulée par l'EDHF¹ (Feletou and Vanhoutte, 2004). KCa3.1 est aussi une cible pharmacologique dans la recherche sur l'athérosclérose (Tharp et al., 2008; Toyama et al., 2008), la resthénose (Kohler et al., 2003) et l'œdème cérébral suite à un traumatisme (Mauler et al., 2004).

Le canal KCa3.1 est aussi exprimé dans une grande variété de tissus ayant des fonctions de sécrétion chez les mammifères, dont l'intestin, les glandes salivaires, les glandes lacrymales, les cellules épithéliales des voies aériennes et le pancréas (Ishii et al., 1997; Hamilton et al., 1999; Thompson-Vest et al., 2006). Nous verrons que KCa3.1 joue un rôle important dans les

¹ pour 'Endothelium-derived hyperpolarizing factor'

processus de sécrétion de Cl^- et d'eau impliquant aussi la protéine CFTR, sujet sur lequel porteront les prochains chapitres.

1.6 Processus de sécrétion de Cl^- et d'eau

Plusieurs fonctions physiologiques impliquent des processus de sécrétion et d'absorption de sel et d'eau. Par exemple, les cellules épithéliales des voies aériennes ayant pour fonction la sécrétion de mucus doivent réguler très étroitement le niveau d'hydratation des sécrétions. En effet, afin de pouvoir maximalement protéger les voies respiratoires tout en maximisant la conduction d'air, la quantité de sels et d'eau dans la lumière des voies respiratoires doit faire l'objet d'un contrôle serré. Ce contrôle est sous la responsabilité de plusieurs protéines de transport membranaire qui seront présentées dans cette section.

1.6.1 Protéines de transport membranaire impliquées

Les canaux chlore sont parmi les responsables de la régulation des mouvements transépithéliaux de sel et d'eau (Boucher, 2003). Dans les cellules responsables de ces processus le Cl^- est accumulé au dessus de son équilibre électrochimique par une combinaison de transport actif primaire et secondaire (voir figure 1.5).

D'abord, la Na^+/K^+ -ATPase, présente à la membrane basolatérale, permet l'établissement d'un gradient de Na^+ qui est ensuite utilisé pour le cotransporteur $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ pour faire entrer du Cl^- dans la cellule. Les ions potassiques transportés dans la cellule lors de ce processus sont recyclés par les canaux potassiques (les plus importants étant KvLQT1 et KCa3.1 (Wilson et al., 2006; Cowley and Linsdell, 2002; Devor et al., 1996; Leroy et al., 2004; Bardou et al., 2009) à la membrane basolatérale. Puisque la concentration de Cl^- est maintenue au-dessus de l'équilibre électrochimique pour cet ion, un flux sortant de Cl^- se dirige vers la lumière de l'épithélium

lorsque les canaux Cl^- de la membrane apicale, dont CFTR et les canaux Cl^- activés par le calcium intracellulaire (CaCC, pour 'Calcium activated Chloride Channels') (Foskett, 1998) s'activent. Le déplacement de Cl^- vers la lumière entraîne le passage de Na^+ vers la lumière par la voie paracellulaire. La présence de sel dans la lumière attire par osmose l'eau, qui vient hydrater les voies aériennes.

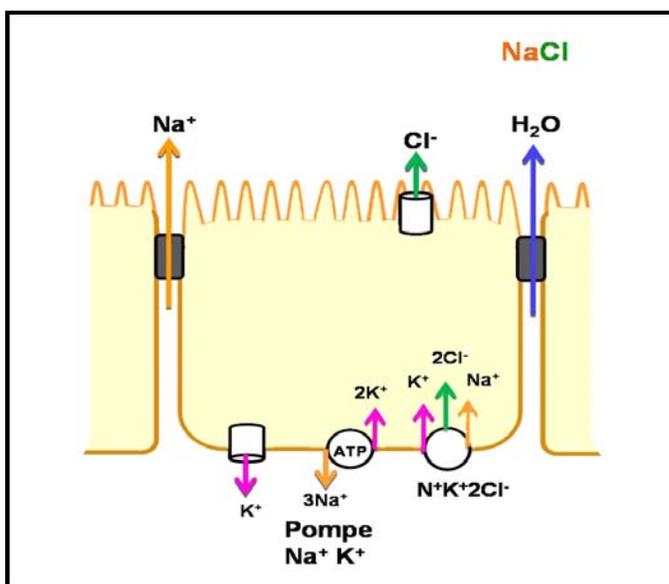


Figure 1.5 : Sécrétion de sel et d'eau dans les cellules épithéliales.

Schéma illustrant de façon générale le processus de sécrétion de sel et d'eau dans les cellules épithéliales des voies aériennes.

La sortie apicale de Cl^- a pour conséquence une dépolarisation de la cellule. Afin d'obtenir un transport de Cl^- soutenu, l'activation des canaux potassiques basolatéraux est donc nécessaire pour faciliter l'hyperpolarisation et maintenir une force électromotrice propice à l'efflux des ions Cl^- (Smith and Frizzell, 1984). Il en résulte que les canaux K^+ sont considérés comme essentiels pour une sécrétion de chlore soutenue (Szkotak et al., 2004; Smith and Frizzell, 1984; McCann and Welsh, 1990; Devor et al., 1996; Cowley and Linsdell, 2002; Warth, 2003; Mall et al., 2003).

Dans l'épithélium respiratoire, il est possible de diviser les canaux potassiques en trois catégories, soit les canaux à six, quatre ou deux segments transmembranaires. La catégorie des canaux à six segments transmembranaires (TM) regroupe les canaux dépendant du voltage (Kv) et les canaux dépendants du calcium intracellulaire (KCa). Les canaux à quatre TM sont ceux ayant 2 segments de pore, les K2P. Finalement, les canaux à 2TM sont les canaux à rectification entrante, les Kir (Bardou et al., 2009).

1.6.1.1 Canaux K⁺ impliqués dans les processus de sécrétion

Dans la multitude de différents canaux K⁺ exprimés dans les épithéliums sécréteurs de Cl⁻, les deux canaux les mieux connus pour leur participation à ces processus sont KvLQT1 et KCa3.1. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces canaux affecte grandement les processus de sécrétion de Cl⁻ en chambre d'Ussing (Cowley and Linsdell, 2002; Bernard et al., 2003; Devor et al., 2000; Mall et al., 2000). Le canal KvLQT1 s'exprime dans les cellules des voies nasales, de la trachée et des bronches (Demolombe et al., 2001; Grahammer et al., 2001; Cowley and Linsdell, 2002). Ce canal est activé par l'AMPc, inhibé par le chromanol (Mall et al., 2000; Warth et al., 1996) et a une faible conductance (<3pS).

Le canal KCa3.1 a été détecté dans la trachée, les bronches et les bronchioles. Différentes mesures en chambres d'Ussing ont démontré que KCa3.1 est actif dans plusieurs lignées cellulaires des voies respiratoires (16HBE14o (Bernard et al., 2003), Calu-3 (Cowley and Linsdell, 2002; Szkotak et al., 2004), NHBE (Dulong et al., 2007), NuLi et CuFi (Trinh et al., 2008; Klein et al., 2009). À de bas niveaux de calcium intracellulaire, le canal KCa3.1 n'a pas un impact majeur sur la conductance basolatérale au K⁺. Par contre, dans les cas où KCa3.1 est activé, il a été prouvé que la

conductance basolatérale au potassium était grandement augmentée. Le EBIO est un ouvreur du canal KCa3.1, et plusieurs études ont montré que ce composé augmente le transport transépithélial de Cl^- et de Na^+ dans les voies respiratoires (Gao et al., 2001; Singh et al., 2001; Wilson et al., 2006), en accord avec une contribution de KCa3.1 et de la conductance basolatérale au potassium dans ce processus.

1.6.1.2 CFTR : la protéine

CFTR (pour '*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*') est un canal perméable aux anions (Cl^- et HCO_3^-) (Welsh et al., 1992; Tang et al., 2009; Pilewski and Frizzell, 1999) dépendant de l'AMP cyclique (AMPC) (Anderson et al., 1991). Sa séquence de sélectivité ionique est la suivante : $\text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{HCO}_3^- > \text{gluconate}$. Il est présent à la membrane de plusieurs types de cellules épithéliales, dont les cellules des voies respiratoires aériennes et alvéolaires, de l'intestin et du pancréas (Anderson et al., 1992; Boom et al., 2007; Engelhardt et al., 1992; Puchelle et al., 1993; Brochiero et al., 2004).

De par sa structure, CFTR fait partie de la famille des transporteurs 'ATP-binding cassette' (ABC). C'est une molécule monomérique formée de 1480 acides aminés, constituée de deux domaines transmembranaires (MSDs, pour 'membrane spanning domains') reliés par un domaine régulateur (RD). Chaque MSD est aussi lié à un domaine liant les nucléotides (NBD1 et NBD2, pour 'nucléotide binding domain') (voir figure 1.6). Dans la famille des ABC, ces domaines utilisent en général l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour pomper des substrats à travers la membrane cellulaire en passant par les MSDs. Dans le cas de CFTR, les MSDs forment un canal Cl^- , dont le transport est passif, et le contrôle de la 'gate' se fait par l'action des NBDs (Vergani et al., 2005). Certaines régions,

dont les régions Walker A, Walker B et LSGGQ de NBD1 et de NBD2 sont très conservées chez les protéines de la famille des ABC (Schmitt and Tampe, 2002).

Le domaine régulateur qui lie les deux moitiés de la protéine contrôle son activité. Ce domaine ne se retrouve pas chez les autres membres de la famille des ABC. Chez CFTR, la protéine kinase A (PKA), stimule l'ouverture du canal en augmentant l'interaction entre les NBD et l'ATP (Mense et al., 2006).

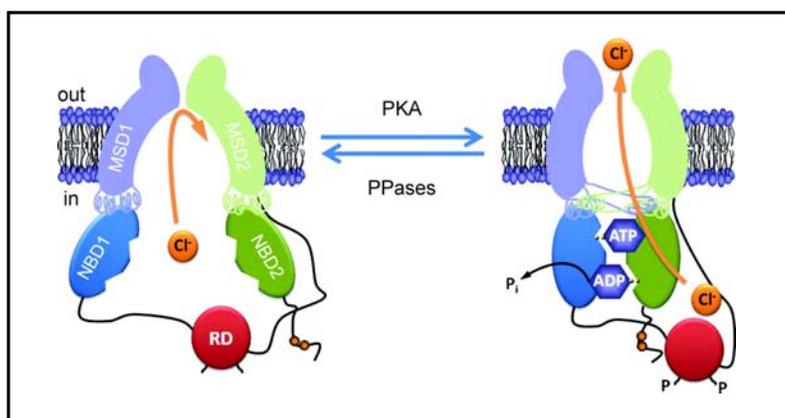


Figure 1.6 : Schéma du canal CFTR

Schéma illustrant les deux domaines transmembranaires (MSD 1 et 2) de CFTR, ses deux domaines liant les nucléotides (NBD 1 et 2) ainsi que son domaine régulateur (RD). L'illustration de gauche représente un canal CFTR non conducteur, tandis que celle de droite représente le canal conducteur. Ce dernier est en présence d'ATP et possède un domaine régulateur phosphorylé. Figure tirée de (Hwang and Sheppard, 2009).

En présence d'ATP, deux NBDs forment ensemble un dimère dans une conformation 'tête à queue' (voir figure 1.6) qui contient deux sites de liaison à l'ATP (Hwang and Sheppard, 2009). Les propriétés de conduction de Cl⁻ sont influencées par l'interaction de molécules d'ATP dans ce dimère (Bompadre et al., 2005). Les deux sites de liaison de l'ATP dans la structure dimérique des NBDs sont formés par les motifs Walker A et Walker B d'un NBD et le motif LSGGQ du NBD opposé. Ces deux sites n'ont pas la même

fonction (Zhou et al., 2006) et ne présentent pas de symétrie l'un avec l'autre (Callebaut et al., 2004). Le site 1 lie les nucléotides de façon stable (sans hydrolyse), tandis que le site 2 hydrolyse les nucléotides. Quelques structures de NBD de la famille des ABC ont été cristallisées à ce jour, dont celle de NBD1 dans CFTR (Lewis et al., 2004).

La région du motif LSGGQ est hautement conservée dans les NBD et son intégrité est probablement critique au bon fonctionnement de la liaison des nucléotides par les protéines de la famille ABC. Des analyses génotype/phénotype ont montré que les mutations de CFTR dans la région des NBDs engendrent généralement un phénotype plus grave. (Tummler et al., 1993). Par exemple, la mutation G551D dans le motif LSGGQ du NBD1 et la mutation correspondante dans NBD2, G1349D, diminuent l'affinité des nucléotides pour les NBDs dans CFTR (Logan et al., 1994). Ceci suggère qu'il y ait un lien entre l'affinité de liaison de l'ATP et l'apparition d'un phénotype fibrose kystique (FK) suite à la mutation G551D, retrouvée chez plusieurs patients.

La protéine CFTR est aussi reconnue pour former des complexes protéiques et/ou régulateurs avec des protéines auxiliaires. La complexité et la diversité de ces mécanismes régulateurs dépassent le cadre de ce mémoire. Une des interactions les plus importantes de CFTR dans ce contexte est une possible régulation à la baisse de l'activité de ENaC, un canal sodique (Stutts et al., 1995). Celui-ci est présent aux côtés de CFTR à la membrane apicale des cellules de surface de l'épithélium respiratoire. Cette interaction controversée (Nagel et al., 2005) pourrait être importante dans le cas de la FK, puisque le canal muté $\Delta F508$ n'aurait pas cette capacité de ralentir la réabsorption de Na^+ par ENaC. Cette incapacité aurait pour conséquence une déshydratation accrue des voies respiratoires puisque la réabsorption de sodium par le canal ENaC entraîne la réabsorption d'eau. À la naissance ou dans les cas d'œdème, par exemple, la réabsorption de

Na⁺ par ENaC permet la réabsorption du volume aqueux en amorçant la réabsorption de sel, afin de permettre les échanges gazeux (Randrianarison et al., 2008; Berthiaume and Matthay, 2007; Hummler et al., 1996).

Finalement, des canaux Cl⁻ activés par le Ca²⁺ intracellulaire, dont le canal TMEM 16A (Caputo et al., 2008), cloné récemment (Schroeder et al., 2008), sont aussi présents dans quelques types cellulaires dans les voies respiratoires et dans l'intestin. Les augmentations de concentration de Ca²⁺ intracellulaire y stimulent la sécrétion de Cl⁻. Dans ces conditions, les canaux KCa passent aussi dans l'état conducteur.

1.7 Problématique de recherche

Depuis quelques années, différentes classes de molécules ont été identifiées comme étant de potentiels cibles pharmacologiques pour aider les patients atteints de FK. Ces molécules sont maintenant reconnues comme ayant un effet positif sur la sécrétion de Cl⁻, phénomène déficient dans les voies respiratoires des patients atteints de FK. Les recherches dont il sera question dans ce mémoire portent sur l'effet de ces produits sur le canal KCa3.1, exprimé dans les mêmes cellules que la protéine déficiente dans la FK.

1.7.1 Fibrose kystique et mutations

La FK est causée par un dysfonctionnement du canal CFTR suite à une mutation du gène de la protéine (Riordan et al., 1989). Ces mutations entraînent des défauts dans la synthèse protéique, dans l'adressage à la membrane, dans la régulation de l'activité du canal ou dans la conductance de ce dernier (voir tableau 1.3). La mutation Δ F508-CFTR, une délétion de la phénylalanine en position 508 dans CFTR, est la plus commune en Amérique de Nord. Cette mutation entraîne des problèmes d'adressage à la

membrane (Welsh and Smith, 1993), compromet la stabilité de CFTR à la membrane et affecte son 'gating' (Schultz et al., 1999;Dalemans et al., 1991).

La fibrose kystique est donc caractérisée par un transport d'ions déficient de la part des cellules exprimant CFTR. Une conséquence importante de la mutation de CFTR est la diminution de la sécrétion de Cl^- par les cellules exocrines. Dans l'épithélium de surface des voies aériennes, les processus de sécrétion de Cl^- et d'eau ont d'abord une fonction de protection de la muqueuse respiratoire, de la trachée jusqu'aux bronchioles. Dans les voies respiratoires, cette diminution de sécrétion de Cl^- entraîne une réduction du volume périciliaire et met en péril l'évacuation des sécrétions des voies respiratoires (Boucher, 1994b;Boucher, 1994a;Jiang et al., 1993). L'accumulation de mucus dans les glandes submucosales, conséquence de la déshydratation des sécrétions, entraîne une obstruction des glandes et favorise l'apparition d'infections. Après des infections répétées et suite aux problèmes d'évacuation du mucus dans les bronches, s'installe souvent une colonisation bactérienne chronique et de l'inflammation. En effet, la majorité des patients fibro-kystiques décèdent des suites d'infections prolongées et chroniques au niveau des voies respiratoires.

Les cellules épithéliales et les cellules séreuses des glandes submucosales, dont il sera question plus loin (voir figure 1.11), sont d'importants sites d'expression de CFTR dans les voies respiratoires (Engelhardt et al., 1992). Par ailleurs, en plus des voies respiratoires, plusieurs autres tissus et organes sont touchés par cette pathologie, dont les intestins, le pancréas, les glandes salivaires et sudoripares, les reins, le foie et la vésicule biliaire. Les conduits et la lumière des organes sécrétant du mucus ou des protéines sont souvent bouchés ou endommagés au cours de la vie des patients, suite à l'accumulation de sécrétions trop visqueuses. Notons qu'il y a une faible corrélation entre génotypes et phénotypes dans le

cas des atteintes pulmonaires, ce qui suggère l'influence de facteurs environnementaux et de facteurs génétiques variables chez les patients FK.

1.7.2 Stratégies pour corriger le phénotype de la fibrose kystique

La guérison de la fibrose kystique passera probablement, dans plusieurs années, par la thérapie génique (Norek and Bal, 2006). Au moment de l'écriture de ce mémoire, l'infection des patients atteints de FK avec des vecteurs contenant de l'ADN codant pour une protéine CFTR WT n'est pas au point. Par contre, les gens présentant une mutation du gène CFTR sur un seul allèle ne développent pas la FK. Ne posséder qu'une fraction de la quantité normale de protéines CFTR viables à la membrane peut donc être suffisante pour ne pas souffrir de la FK. Retrouver une faible fraction de l'activité normale de CFTR pourrait donc grandement améliorer le phénotype (Van Goor et al., 2006; McKone et al., 2003). Le tableau 1.3 illustre les différents défauts moléculaires de CFTR associés à un phénotype FK. Les différentes mutations de CFTR ont été divisées en cinq classes, chacune étant associée au défaut moléculaire qui la caractérise (Rowntree and Harris, 2003).

I	II (dont $\Delta F508$)	III (dont G551D)	IV	V
Défauts de production	Défauts d'adressage à la membrane	Défauts de régulation	Défauts de conductance	Production et assemblage partiellement affectés

Tableau 1.3: Classes de mutations de CFTR engendrant un phénotype de FK.

Dans les cas des classes de mutations III, IV et V, il se trouve des protéines CFTR à la membrane. Les propriétés de conduction de ces protéines sont déficientes et peuvent être stimulées par une classe de molécules nommée potentiateurs. Dans le cas des protéines dont la

production ou l'adressage à la membrane sont affectés (classes I et II), il est nécessaire de traiter d'abord avec des correcteurs, afin qu'un certain nombre de protéines puisse se rendre à la membrane. Par la suite, le traitement avec des potentiateurs stimule la fonction de ces dernières.

1.7.2.1 Approche pharmaceutique : correcteurs et potentiateurs

Plusieurs stratégies de recherche pharmaceutique ont été élaborées lors des dernières années dans le but d'améliorer le phénotype de la fibrose kystique. Certaines visent à stimuler la sécrétion de Cl^- par les protéines CFTR mutées afin d'hydrater les sécrétions dans les voies respiratoires des patients et faciliter la clairance du mucus par les cellules ciliées. Pour ce faire, certaines approches pharmacologiques visent à augmenter l'adressage à la membrane (correcteurs) et/ou corriger le 'gating' de CFTR (potentiateurs) (Pusch and Bittar, 2007). Les correcteurs (dont le VRT-325, dont il sera question plus loin) agissent en quelque sorte comme des chaperonnes et font en sorte que la protéine ne soit pas prématurément dégradée, permettant ainsi son insertion et/ou sa stabilisation à la membrane. Par ailleurs, suite à certaines mutations (dont CFTR ΔF508), même les protéines stabilisées à la membrane ne sont pas efficaces dans la sécrétion de Cl^- puisqu'elles présentent un 'gating' déficient. Les potentiateurs ont été développés dans le but de corriger les problèmes de gating de CFTR à la membrane. Ces molécules ont donc pour effet l'augmentation de l'activité de CFTR lorsqu'il est phosphorylé par la PKA.

L'activité de CFTR peut être stimulée par des potentiateurs de différents types dont les flavonoïdes, les benzoquinoliziniums (Galiotta et al., 2001) les benzimidazolones (Devor et al., 1996) et les xanthines (dont l'IBMX (Chappe et al., 1998)). Certains potentiateurs agissent directement sur la

protéine CFTR, d'autres ont un effet à partir de protéines régulatrices de cette dernière.

Les caractéristiques des potentiateurs de CFTR, leurs sites et leurs mécanismes d'action ont été l'objet de différentes études dans les dernières années. Un site d'action pour les potentiateurs de CFTR a été suggéré en 2005 (Moran et al., 2005). L'emplacement de ce site a d'abord été prédit par arrimage moléculaire. Par la suite, il a été confirmé par une comparaison des constantes de dissociation expérimentales des potentiateurs sur CFTR avec les constantes de dissociation prédites par les modèles. Une très bonne corrélation entre les prédictions d'arrimage moléculaire et les données expérimentales ont permis à l'équipe du Dr. Moran de proposer un site potentiel de liaison des potentiateurs sur CFTR. Ce site serait situé à l'interface des deux NBDs. Il serait formé du domaine Walker-A du NBD2 ainsi que du LSGGQ et du switch-II de NBD1.

Une des premières molécules identifiée comme potentiateur fut la genisteine (Wang et al., 1998). Cette molécule, de la famille des flavonoïdes, ainsi que la Phloxadine B, sont deux potentiateurs qui agiraient à l'interface du dimère des NBDs. Ces molécules se lieraient à un site différent de celui de l'ATP et affecteraient la dimérisation des deux structures. La genisteine pourrait stabiliser le dimère tout en diminuant l'énergie nécessaire pour sa formation (Ai et al., 2004). La Phloxadine B, de son côté, pourrait stabiliser le dimère en augmentant l'affinité de liaison de l'ATP. Ceci aurait pour effet de stabiliser le canal dans un état conducteur (Cai and Sheppard, 2002).

Les connaissances sur la pharmacologie et sur les potentiateurs de CFTR ont beaucoup évolué dans les dernières années grâce au criblage à haut débit. Cette méthode consiste à tester les effets de grandes quantités de molécules, appelées banques de molécules, afin de découvrir de

nouveaux composés actifs. Différentes équipes scientifiques ont fait des percées dans ce domaine dans les dernières années.

L'équipe de Verkman a fait des recherches sur les benzo(c)quinoliziniums et a découvert que les composés de la famille des 7,8 benzoflavones, dont UC_{CF}-029 (Galiotta et al., 2001) sont des potentiateurs de CFTR. L'équipe de Springsteel a découvert les propriétés de potentiateur du UC_{CF}-039 et a énoncé quelques caractéristiques des potentiateurs pouvant faire des interactions avec le dimère de NBDs. Selon leur modèle, ces caractéristiques comprendraient la présence d'un cycle aromatique, d'un groupe hydrophobe et d'un accepteur de lien hydrogène (Springsteel et al., 2003). Le laboratoire de Yang a découvert que le tétrahydrobenzothiophène activait CFTR avec un K_D de moins de 100nM (Yang et al., 2003).

La molécule VRT-532 [4-méthyl-2-(5-phényl-1H-pyrazol-3-yl)-phénol], de la famille des pyrazoles, est apparue comme étant une des plus efficaces lors d'un criblage effectué sur des cellules NIH/3T3 (fibroblastes) exprimant CFTR $\Delta F508$ ($EC_{50} = 3.8 \pm 0.5 \mu M$; $n = 46$) (Van Goor et al., 2006). Les cellules utilisées pour ces expériences étaient incubées à 27° afin de stimuler l'adressage à la membrane de CFTR $\Delta F508$. Ils ont montré que le canal CFTR $\Delta F508$ doit préalablement être stimulé par l'AMPc suite à l'exposition à de la forskoline pour être activable par le VRT-532. L'activité du VRT-532 a aussi été confirmée en patch clamp, en configuration inside-out, sur des cellules NIH/3T3. L'application de 20 μM VRT-532 en présence d'ATP et de PKA entraîne une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal en augmentant la durée des périodes d'ouverture, sans affecter la conductance (Van Goor et al., 2006) (voir figure 1.7 B). Le VRT-532 n'a pas d'effet sur le niveau d'AMPc dans les cellules, et n'inhibe pas les phosphodiesterases. L'équipe de Christine Bear a recueilli plusieurs résultats indiquant que le

VRT-532 agirait en modifiant l'activité ATPase des protéines CFTR mutées (Pasyk et al., 1996;Wellhauser et al., 2009).

La mutation G551D entraîne des problèmes de gating chez CFTR, mais n'affecte pas son adressage à la membrane. Le VRT-532 a aussi un effet stimulateur sur la sécrétion des Cl⁻ par cette protéine, même si son action est environ cinq fois moins efficace que sur CFTR Δ F508 (Van Goor et al., 2006;Pasyk et al., 2009). L'action du VRT-532 sur le mutant CFTR G551D se ferait via une augmentation de l'affinité du mutant pour l'ATP, corrigeant la liaison et l'hydrolyse défectueuses de l'ATP chez ce mutant.

Une autre molécule de la même famille, le VRT-325, découvert par *Vertex Pharmaceutiques*, est un correcteur de CFTR- Δ F508. Le VRT-325 aurait en effet des effets positifs sur la maturation et la densité de l'expression membranaire des canaux CFTR- Δ F508. Cette molécule, combinée avec le VRT-532 (10 μ M), aurait des effets prometteurs sur la sécrétion de Cl⁻ par les cellules exprimant CFTR- Δ F508 (voir figure 1.7 A). Dans ces conditions, un EC₅₀ de (2.7 \pm 0.2 μ M) a été calculé pour l'effet du VRT-532 (Van Goor et al., 2006). Les résultats obtenus avec le VRT-325 et le VRT-532 illustrent bien les effets favorables de la combinaison de molécules qui augmentent l'adressage à la membrane et de molécules qui stimulent le 'gating'.

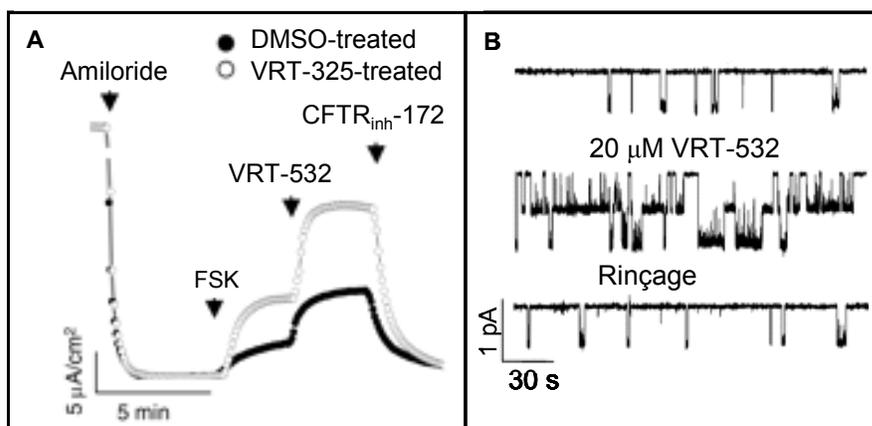


Figure 1.7 : Effets du VRT-532 sur CFTR Δ F508

A. Mesure de courant de court circuit sur des cellules HBE (bronchiques) exprimant CFTR Δ F508. Suite à 48h d'incubation dans une solution contenant 6.7 μ M VRT-325 ou dans du DMSO (contrôle), l'application de VRT-532 (10 μ M) entraîne une nette augmentation de courant. La réponse supérieure des cellules préalablement incubées dans le VRT-325 illustre que les effets de VRT-325 et de VRT-532 sont additifs. **B.** Illustration de l'effet du VRT-532 sur le canal CFTR Δ F508. Application de 20 μ M VRT-532 en patch clamp, configuration inside-out. $V_m = -80$ mV. Le bain contient 1 mM ATP et 75 nM PKA pour l'activation du canal. Figures de (Van Goor et al., 2006).

En 1999, une équipe française a produit une série de molécules de la famille des benzo[c]quinolizinium et ont démontré que cette famille comportait des activateurs de CFTR (Becq et al., 1999). En 2001, l'équipe du Dr Cuthbert a publié un papier démontrant que des molécules telles que les phenanthrolines et les benzoquinolines ont des effets activateurs sur CFTR ainsi que sur les canaux potassiques basolatéraux. Les recherches sur ces benzoquinolines ont mené à la découverte d'une molécule encore plus puissante, le 4-chloro-benzo[F]isoquinoline (CBIQ) (Szkotak et al., 2004). Cette molécule prometteuse s'est avérée être aussi un activateur du canal KCa3.1.

L'équipe de Cuthbert a en effet montré que CBIQ a un effet activateur sur différentes protéines. En effet, CBIQ est un potentiateur de CFTR, de la

protéine mutée CFTR Δ F508, ainsi que du canal KCa3.1 (Murthy et al., 2005).

Les autres benzoquinolines (7,8-benzoquinoline et 5,6-benzoquinoline) testés ne sont pas actifs auprès de la protéine mutée CFTR Δ F508. Ces molécules sont très proches chimiquement de CBIQ, qui se différencie principalement par le fait qu'elle comporte un atome de Cl, halogène, en position 4 sur un de ses cycles. L'apport de nouvelles informations sur les modes d'action de CBIQ pourrait donc mener à la compréhension des structures pouvant activer CFTR Δ F508.

Afin d'observer l'effet stimulateur de CBIQ sur CFTR et CFTR Δ F508, une stimulation préalable du système adénylate cyclase était nécessaire. Ceci était effectué via l'incubation des ovocytes ou des cellules dans 1 μ M forskoline (stimule l'activité de la PKA en élevant les niveaux d'AMPc) et 100 μ M isobutyl methyl xanthine (IBMX) (augmente l'activité de la PKA) (Schultz et al., 1999). Les courbes courant-réponses obtenues par l'équipe de Cuthbert avec CFTR et CFTR Δ F508 sont illustrées à la figure 1.8. Les ovocytes de *Xenopus laevis* exprimant CFTR Δ F508 étaient incubés à 18°C pour stimuler l'adressage des protéines à la membrane plasmique. L'effet activateur de CBIQ sur CFTR Δ F508 est observé à 10 μ M et des concentrations plus élevées entraînent une baisse de courant. Ce phénomène encore inexpliqué lors de l'écriture de ce mémoire laisse suggérer l'existence de deux sites d'action de ces molécules, un permettant d'en stimuler l'activité et l'autre ayant l'effet inverse.

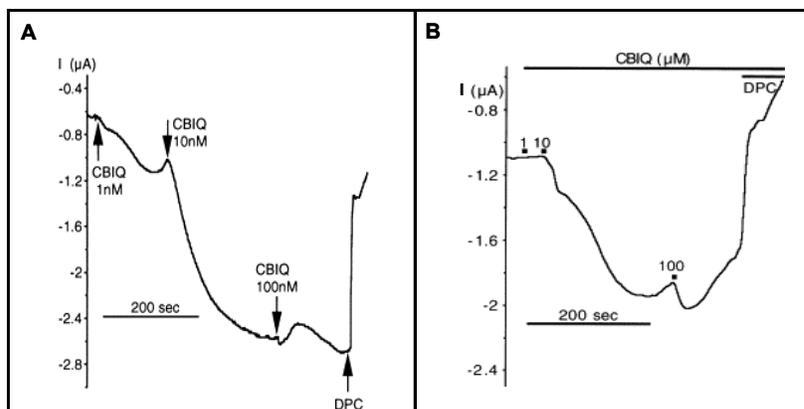


Figure 1.8 : Effets du CBIQ sur CFTR et CFTR Δ F508

Deux exemples représentatifs de dose-réponses obtenues par l'équipe de Cuthbert. CFTR est préalablement stimulé par l'incubation des ovocytes dans une solution contenant 1 μ M forskolin et 100 μ M IBMX. Les mesures de courant sont faites suite à l'application de différentes concentrations de CBIQ. Les concentrations de CBIQ supérieures à celle engendrant une activation maximale présentent un effet activateur plus faible. L'application d'un inhibiteur de CFTR, le diphenyl carboxylate DPC (1 mM) confirme que le courant stimulé par CBIQ provient de ce canal. **A** : Courbe courant-réponse obtenue avec des ovocytes exprimant CFTR (WT). Dans ces conditions, les ovocytes exprimant CFTR sont sensibles à des concentrations de CBIQ de l'ordre du nano molaire. **B** : Courbe courant-réponse obtenue avec des ovocytes exprimant CFTR Δ F508. Figures adaptées à partir de (Murthy et al., 2005).

Des mesures effectuées sur des cellules thyroïdiennes de rat (FRT) ont confirmé l'activation de CFTR et de CFTR Δ F508¹ observée chez les ovocytes. Les K_d de CBIQ pour CFTR et pour CFTR Δ F508 sont estimés à 12.2 et 18.7 μ M respectivement dans des conditions de 0,5 μ M forskolin. Le degré de phosphorylation a une influence sur le K_d apparent de CBIQ dans les deux systèmes d'expression. Il a déjà été observé que la sensibilité à certains ouvreurs de CFTR (dont CBIQ) pourrait dépendre de l'activité endogène du système adénylate cyclase (Murthy et al., 2005). Des mesures en canal unitaire en configuration cellule entière sur un canal présentant des caractéristiques de CFTR ont montré que CBIQ augmente la fréquence des ouvertures du canal sans modifier sa conductance (Szkotak et al., 2004).

¹Les cellules exprimant CFTR Δ F508 avaient été incubées à 27 °C 24 h avant les mesures afin de permettre leur expression à la membrane.

Des mesures en voltage clamp à $V_m = -60$ mV sur des ovocytes exprimant KCa3.1 ont montré que CBIQ a aussi un effet activateur sur le canal potassique (Murthy et al., 2005) (voir figure 1.9 A). L'équipe de Cuthbert a obtenu une mesure de K_d pour l'activation de KCa3.1 par CBIQ. Cette valeur, obtenue par interpolation à partir des courbes dose-réponses (voir figure 1.9 B), est de 3.9 ± 1.6 μM ($n = 4$) (Murthy et al., 2005). Un exemple représentatif d'une mesure courant ainsi que la courbe dose-réponse associée à ces mesures sont illustrés à la figure 1.9. Il est à noter qu'à des concentrations élevées, CBIQ a un effet activateur plus faible sur KCa3.1. Des mesures en patch clamp en canal unitaire présentant des caractéristiques typiques du canal KCa3.1 avaient précédemment indiqué que le benzoquinoline augmentait la probabilité d'ouverture sans affecter sa conductance (Devor and Frizzell, 1993). Finalement, il est à noter que CBIQ pourrait aussi activer les canaux KCNQ1 et KCNE3, sensibles au 293B, mais l'effet étant mineur il n'a pas été investigué en profondeur (Szkotak et al., 2004).

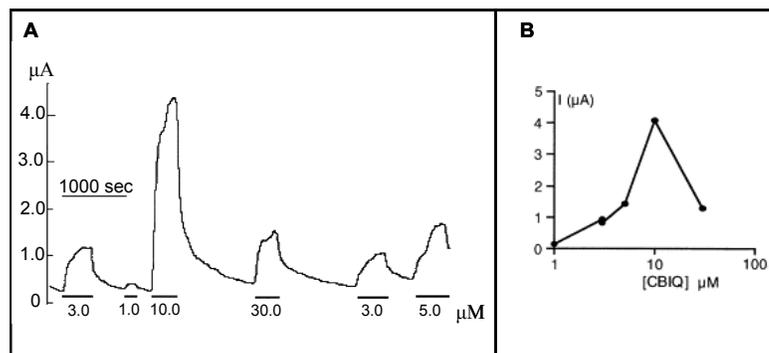


Figure 1.9 : Courbe courant-réponse de CBIQ sur KCa3.1

A. Courbe courant-réponse illustrant l'effet de différentes concentrations de CBIQ sur le canal KCa3.1 exprimé dans des ovocytes. Les mesures sont faites avec la méthode de voltage-clamp à deux électrodes, à $V_m = -60\text{mV}$. Les concentrations de CBIQ sont indiquées en μM . **B.** Courbe dose-réponse de CBIQ à partir de laquelle un K_d de 3.9 ± 1.6 μM ($n = 4$) a été calculé. Figure adaptée à partir de .

Finalement, CBIQ s'est avéré être efficace sur des cellules formant un épithélium. Le K_d pour l'activation de CFTR par CBIQ sur les monocouches de cellules séreuses des voies aériennes (Calu-3) a été estimé à une valeur de $4.0 \pm 1.3 \mu\text{M}$, similaire à celui mesuré pour KCa3.1 dans les ovocytes ($3.9 \pm 1.6 \mu\text{M}$). Ce résultat s'inscrit bien dans l'hypothèse suggérant une grande importance du rôle des canaux potassiques basolatéraux dans la sécrétion transépithéliale de Cl^- . Le niveau d'hyperpolarisation pourrait alors être une l'étape limitante dans ce processus. En effet, des mesures en courant de court-circuit sur des monocouches de cellules Calu-3 ont montré que les effets de CBIQ sur le transport de chlore sont très affectés par la présence d'inhibiteurs sélectifs des canaux potassiques basolatéraux (voir figure 1.10) (Szkotak et al., 2004). Ce résultat indique que CBIQ a un effet sur le canal KCa3.1 même en conditions basales.

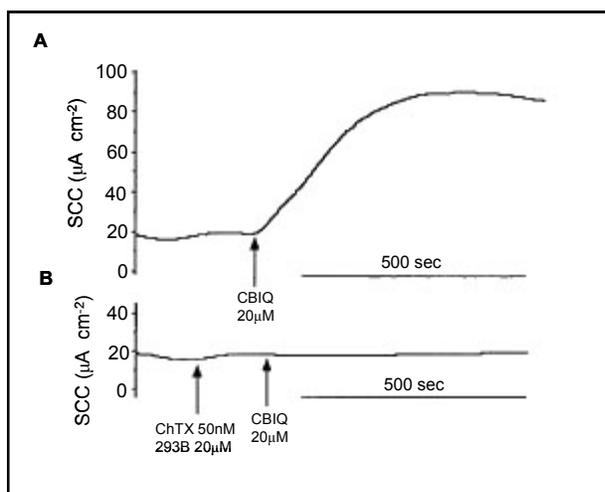


Figure 1.10 : Effets de CBIQ avec et sans inhibiteurs de canaux potassiques
Monocouches de cellules Calu-3 exposées à 20 μM CBIQ. B : CBIQ n'a pas d'effet stimulateur sur la sortie d'ions lorsque appliqué sur des cellules traitées avec des inhibiteurs des canaux potassiques basolatéraux. Figure tirée de (Szkotak et al., 2004).

La recherche de correcteurs et de potentiateurs par criblage à haut débit a mené à l'identification de plusieurs molécules prometteuses depuis quelques années. Par contre, comme il a été démontré plus haut, la

sécrétion dans les cellules épithéliales est un processus complexe impliquant diverses protéines et canaux ioniques. Les molécules identifiées par criblage à haut débit et qui pourraient potentiellement jouer le rôle de correcteurs ou de potentiateurs ont été testées sur la protéine CFTR dans la forme sauvage, ou sur une forme mutante de CFTR, majoritairement $\Delta F508$. Suite à l'identification de molécules pouvant efficacement stimuler la sécrétion de Cl^- par CFTR dans ces cellules, il est donc important d'aborder le problème dans son contexte global. Afin de sélectionner les molécules les plus efficaces pour stimuler la sécrétion épithéliale de Cl^- , il est nécessaire de tester leurs effets sur les différents canaux impliqués dans ce processus. Les effets de potentiateurs dans un contexte global de transport trans-cellulaire ne concernent en effet pas seulement la protéine CFTR elle-même, mais doivent prendre en considération l'effet de ces potentiateurs sur les autres systèmes de transport d'ions présents dans ces cellules, dont les canaux potassiques exprimés à la membrane basolatérale. Par exemple, il est reconnu que les molécules stimulant les canaux potassiques basolatéraux ont un effet positif sur la sécrétion apicale de Cl^- . Un bon exemple de cette classe de molécules est le 1-ethyl-2-benzimidazolone (EBIO) (Singh et al., 2001).

Une molécule qui stimulerait à la fois CFTR et KCa3.1 aurait donc pour effet de maximiser la sécrétion de Cl^- et ainsi offrirait de meilleures performances qu'un potentiateur agissant exclusivement sur CFTR. Ce serait le cas dans les épithéliums sécrétant du Cl^- mais n'exprimant pas le canal sodique ENaC à la membrane apicale, tels que les glandes submucosales (voir figure 1.11), l'intestin et le pancréas, par exemple. Dans les cellules épithéliales de surface dans les bronches une activation importante de KCa3.1 pourrait stimuler l'absorption de Na^+ de la part de ENaC et nuire à l'hydratation de l'épithélium (voir figure 1.11). Dans ce cas, une combinaison d'inhibiteurs sélectifs d'ENaC et d'activateurs de KCa3.1 et de CFTR pourrait éventuellement engendrer de bons résultats.

D'autre part, une molécule stimulant l'activité du canal CFTR pourrait inhiber la sécrétion de K^+ chez les canaux potassiques impliqués dans les mêmes cellules. Ceci compromettrait la force électromotrice nécessaire à la sécrétion de Cl^- et pourrait donc atténuer les effets bénéfiques d'un potentiateur de CFTR.

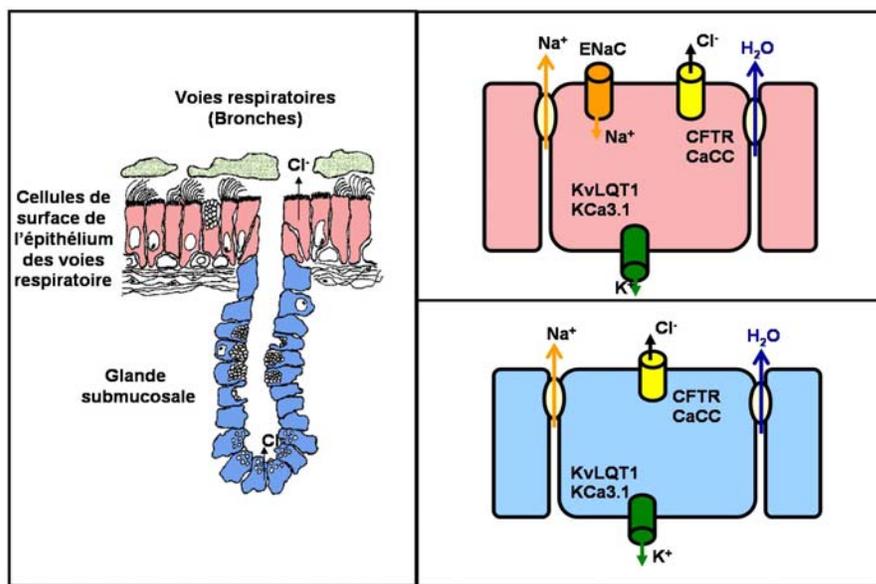


Figure 1.11 : Modèle cellulaire des voies respiratoires au niveau des bronches. Dans les glandes submucosales (en bleu) on retrouve des cellules séreuses, responsables de la sortie de Cl^- et donc d'eau, ainsi que des cellules muqueuses, qui sécrètent des mucines. Le canal sodique ENaC n'est pas présent dans les cellules muqueuses. Aussi impliquées dans la sécrétion de Cl^- et d'eau, les cellules épithéliales de surface (en rose) expriment le canal ENaC à la membrane apicale et sont responsables de l'équilibre entre la réabsorption de Na^+ et la sécrétion de Cl^- . Cet équilibre est crucial pour le maintien d'un volume périliculaire adéquat. Figure adaptée de (Pilewski and Frizzell, 1999).

Il est donc essentiel de bien connaître les mécanismes et les sites d'action des potentiateurs de CFTR sur les canaux K^+ régissant indirectement la sortie apicale d'anions dans les cellules des voies respiratoires. Dans cette optique, nous avons étudié les effets de différents potentiateurs de CFTR sur $KCa3.1$. Notre approche a d'abord consisté à faire un criblage à l'aide de la méthode du patch clamp en configuration

membrane détachée (*inside-out*) afin de déterminer les effets de différents potentiateurs connus de CFTR¹ sur KCa3.1. Le canal était exprimé dans des ovocytes de Xénope ou dans des cellules HEK-293. Suite aux résultats obtenus, nous avons sélectionné les potentiateurs ayant des effets significatifs sur KCa3.1 et nous nous sommes intéressés à comprendre par quels mécanismes moléculaires ces potentiateurs peuvent affecter à la fois CFTR et KCa3.1, deux protéines très différentes.

À cet effet, nous avons effectué des expériences électrophysiologiques par la méthode du patch clamp en utilisant la mutagenèse dirigée. Afin de déterminer si l'action observée impliquerait une interaction avec le complexe CaM-KCa3.1, les effets des molécules étudiées ont été testés sur des canaux KCa3.1 constitutivement actifs². Le site d'action potentiel a aussi été investigué en testant l'accessibilité de ces molécules à leur site d'action sur KCa3.1 selon l'état d'ouverture du canal.

Des mesures de temps de désactivation du canal en présence et en absence des produits nous ont permis de comprendre comment varie l'affinité apparente pour le Ca²⁺ du canal dans ces deux conditions. Des mesures en canal unitaire nous ont permis d'étudier les temps moyens d'ouverture et de fermeture du canal en présence de notre activateur et ainsi de mieux comprendre son mécanisme d'action. Finalement, des expériences avec du Ba²⁺ nous ont permis de sonder la région du filtre de sélectivité de KCa3.1, qui est un site possible de l'action d'activateurs de ce canal. Un modèle cinétique simple décrivant le fonctionnement de KCa3.1 est proposé et rend compte de nos résultats.

¹ Plusieurs des molécules étudiées ont été fournies au laboratoire par la Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics.

² Les canaux mutés V275C-A279G et V275C-V282G sont actifs même en absence de Ca²⁺ intracellulaire. Voir (Garneau et al., 2009a) en annexe.

2 Méthodologie

2.1 Protocole expérimental

Ce mémoire présente des résultats obtenus en 'patch clamp' en configuration membrane détachée ('inside out'). Les enregistrements illustrent en majorité des courants générés par plusieurs canaux ioniques. Un résultat en canal unitaire est aussi présenté. Toutes les expériences ont été effectuées avec un amplificateur Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Les pipettes utilisées ont été fabriquées à l'aide d'un étireur vertical Narishige (modèle PP-83) à partir de capillaires de borosilicate. La résistance des pipettes en solution variait de 2 à 7 M Ω . Les enregistrements ont été effectués avec le système d'acquisition Digidata 1320A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) à une fréquence d'échantillonnage de 1.0 kHz. Les résultats expérimentaux étaient extraits à l'aide du logiciel Axoscope (Molecular Devices). Les expériences se déroulaient à la température de la pièce (20° C). Les changements de perfusion de solution étaient effectués avec le système de perfusion rapide RSC-160 (BioLogic, Grenoble, France) et le délai de changement de perfusion est estimé à moins de 30 ms.

2.2 Solutions

Différentes solutions ont été utilisées. La solution de 200 K₂SO₄ contenait, en mM, 200 K₂SO₄, 1.8 MgCl₂, 0.025 CaCl₂ et 25 HEPES. Elle était ajustée à un pH de 7.4 avec du KOH. Les solutions sans Ca²⁺ (EGTA) étaient préparées en remplaçant, dans la solution de 200 K₂SO₄, le 0.025 mM CaCl₂ par 1-10 mM EGTA. Les sels de sulfate sont utilisés pour prévenir la contamination de nos courants par les courants Cl⁻ endogènes des ovocytes. Aussi, ces solutions ont comme propriété de chélater les divalents

contaminants tels que le Ba^{2+} (La concentration maximale de Ba^{2+} libre en 200 mM K_2SO_4 est de 0.5 nM seulement).

Dans le cas des expériences utilisant le Ba^{2+} comme agent bloqueur, des solutions de KCl étaient utilisées. Des concentrations asymétriques en K^+ entre le bain et la pipette permettait d'effectuer ces expériences à 0mV. La contamination par les courants Cl^- endogènes des ovocytes était alors minimisée en gardant les concentrations de cet ion à l'équilibre. La solution de la pipette contenait, en mM, 198 NaCl, 2 KCl, 0.5 $MgCl_2$, 1 EGTA et 25 HEPES, tamponnée à un pH de 7.3 avec du NaOH. La solution du bain contenait, en mM, 200 KCl, 0.5 $MgCl_2$ et 25 HEPES, et 0.025 $CaCl_2$ tamponnée à un pH de 7.3 avec du KOH. Pour la solution sans Ca^{2+} (EGTA), on remplaçait 0.025 $CaCl_2$ par 5 mM EGTA.

La solution utilisée pour la majorité des expériences sur des cellules HEK-293 était composée (en mM) de 145 K-gluconate, 5 KCl, 2.5 $MgCl_2$, 1 EGTA, 0.99 $CaCl_2$, et 10 HEPES, tamponnée à un pH de 7.2 avec du KOH. La concentration de Ca^{2+} libre dans cette solution est estimée à 10 μ M. La solution sans Ca^{2+} (EGTA) équivalente était préparée en omettant le $CaCl_2$ (Ca^{2+} libre estimé à <10 nM).

Les concentrations résultantes de Ca^{2+} libre de nos solutions étaient calculées avec le logiciel EQCAL (Biosoft, Cambridge, UK) en supposant une concentration de Ca^{2+} contaminant de l'ordre de 5 μ M.

2.3 Produits

Le EBIO (Tocris Cookson Inc.), le CBIQ (Ubichem), la curcumine (Sigma), le VRT-532, la genisteine et le SF-03 (fournis par la CFFT), et le TRAM-34 (fourni par le Dr. George K. Chandy de l'Université de Californie) étaient d'abord dissous dans du DMSO et ensuite dilués dans les solutions expérimentales. Le TRAM-34, un inhibiteur spécifique du canal $KCa3.1$, était

préparé moins de 30 min avant son utilisation. Le Ba^{2+} ainsi que le TBA (Sigma) étaient ajoutés directement à la solution à perfuser en début de journée.

2.4 Ovocytes

Des ovocytes matures de stade V ou VI étaient extraits de grenouilles *Xenopus laevis* (Université d'Alberta, Biosciences Animal Service). La membrane folliculaire était enlevée par incubation des ovocytes dans un milieu Barth sans Ca^{2+} contenant 1.6 mg/ml de collagénase (Sigma-Aldrich) pendant environ 60 min. La solution Barth contient, en mM, 88 NaCl, 3 KCl, 0.82 $MgSO_4$, 0.41 $CaCl_2$, 0.33 $CaCl_2$ et 5 HEPES, à un pH de 7.6. Une fois défolliculés, les ovocytes étaient conservés à 18° C dans une solution Barth dans laquelle était ajouté 5% de sérum de cheval, 2.5 mM Na-pyruvate, 100 μ L/ml pénicilline, 0.1 mg/ml kanamycine, et 0.1 mg/ml streptomycine.

De 5h à 48h après l'opération de la grenouille, les ovocytes étaient injectés avec 0.1–1 ng d'ADNc. Les ovocytes étaient utilisés de 1-5 jours après l'injection. Avant les expériences, les ovocytes défolliculés étaient incubés dans une solution hyperosmotique contenant, en mM, 250 KCl, 1 $MgSO_4$, 1 EGTA, 50 sucrose et 10 HEPES, tamponnée à un pH de 7.4 avec du KOH. Après quelques secondes d'incubation dans cette solution, la membrane vitelline était enlevée avec des forceps. L'ovocyte était alors transféré dans la chambre de perfusion pour les expériences de patch clamp.

2.5 Clonage et mutagenèse

L'ADNc du canal KCa3.1 a été obtenu par transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR) de cellules HeLa (Simoes et al., 2002). Le clone du canal KCa2.2 a été généreusement fourni par le Dr Daniel C. Devor (University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA). Il a été cloné dans

le vecteur pMT21 (gracieusement du Dr. Michael Coady, Université de Montréal). Les ADNc utilisés ont été amplifiés dans des bactéries compétentes, extraits à l'aide de la trousse *QIAprep® Spin Miniprep* (Qiagen, Mississauga, Ont) et ensuite stockés à -20°C. Les mutants du canal KCa3.1 ont été obtenus en utilisant la trousse *QuickChange™* (Stratagene, La Jolla, CA).

2.6 Cellules

Des cellules HEK-293 transfectées de façon stable avec le canal KCa3.1 marqué en C-terminal avec un épitope *myc* ont gracieusement été fournies au laboratoire par le Dr. Daniel C. Devor. Ces cellules étaient cultivées en présence de 0.1 mg/ml de zéocine. De plus, des cellules HEK-293 ont été transfectées avec l'ADNc du canal KCa2.3, cloné dans le vecteur pMT21, en utilisant de la lipofectamine (Lipofectamine 2000, Invitrogen, Burlington, ON).

Les cellules HEK-293 étaient cultivées dans un milieu Dulbecco haut en glucose (DMEM-HG) auquel était ajouté 2.2g/l NaHCO₃, 10% FBS, pénicilline et streptomycine. Les cellules étaient maintenues à une concentration de 5% CO₂ à 37°C.

2.7 Présentation des figures

À moins de spécification contraire, les enregistrements de courants présentés dans ce mémoire ont été obtenus avec des canaux KCa3.1 exprimés dans des ovocytes. Les rectangles noirs au dessus des tracés indiquent la perfusion d'une solution d'EGTA, contenant 0 µM Ca²⁺ libre. Le niveau de courant mesuré dans les conditions où le canal est fermé est indiqué par la lettre F sur les figures des enregistrements de courants.

Un courant sortant est défini comme la sortie de charges positives ou l'entrée de charges négatives dans une cellule. Inversement, un courant entrant est défini comme la sortie de charges négatives ou l'entrée de charges positives dans une cellule.

Plusieurs expériences présentées dans ce mémoire ont été effectuées dans des conditions de concentrations symétriques de K^+ dans la pipette (milieu extracellulaire) et dans le bain (milieu intracellulaire). Un potentiel de +60 mV était alors appliqué dans la pipette (ce qui équivaut à poser un potentiel membranaire de -60 mV). Dans ces conditions, des ions K^+ se dirigent de la pipette (milieu extracellulaire) vers le bain (milieu intracellulaire), ce qui équivaut au déplacement d'ions positifs vers l'intérieur cellulaire. On est donc alors en présence de courants négatifs. C'est ainsi que s'explique le fait que le niveau fermé des canaux est plus élevé que les courants mesurés dans les figures présentées ici.

Par contre, quelques expériences présentées dans ce mémoire ont été effectuées dans des conditions de concentrations asymétriques de K^+ . La concentration de K^+ était alors de 2mM dans la pipette et de 200 mM dans le bain avec un potentiel maintenu à 0 mV. Dans ces conditions, des ions K^+ se dirigent du bain vers la pipette et on est en présence d'un courant positif. Dans ce cas le niveau fermé des canaux est donc plus bas que les courants mesurés.

Pour la simplicité de la présentation et à des fins d'uniformité, ces courbes ont été inversées (les valeurs des courants multipliés par (-1)) dans les figures présentées ici. En effet, tous les courants présentés représentent le courant traversant un canal potassique et les résultats sont équivalents pour un courant sortant ou pour un courant entrant. L'inversion des courbes en mentionnée dans les légendes des figures concernées.

2.8 Analyse des résultats

Les résultats étaient jugés statistiquement différents si un *Student t-test* révélait une valeur de P inférieure à 0.05. Le logiciel QuB (Research Foundation State, University of New York) a été utilisé pour l'analyse des enregistrements en canal unitaire et pour les mesures de courants moyens.

2.8.1 Courants unitaires

L'analyse cinétique des résultats en canal unitaire a été effectuée en utilisant le logiciel QuB. Les données étaient d'abord idéalisées avec l'algorithme segmentaire 'K-Means', basé sur une analyse de type HMM (*hidden Markov model*). Un modèle à deux états fermés et un état ouvert a servi de base à ces idéalizations. Ensuite, la méthode d'estimation '*maximum interval likelihood*' (Qin et al., 1997) a été utilisée pour obtenir des histogrammes d'intervalles de temps. L'abscisse de ces derniers est tracée en mode logarithmique afin de permettre la représentation des résultats sur plusieurs ordres de grandeur et faciliter l'interprétation des résultats (Sigworth et al., 1987). Le comptage des événements en ordonnée fait en sorte que le graphique est présenté de façon analogue à une fonction de densité de probabilité. Des valeurs initiales du bon ordre de grandeur étaient assignées pour les constantes de temps afin de faciliter la convergence des optimisations.

2.8.2 Courants de macro patch

Selon le modèle de fonctionnement du canal que nous avons construit (présenté à l'

(4.1), il est possible de démontrer que la variation du courant en fonction du temps suite au retrait du Ca^{2+} est décrite, en première approximation, par une équation exponentielle décroissante de la forme $I(t) = A e^{(-t/\tau)} + I_0$ (voir

annexe). Les courbes de désactivation et, similairement, de réactivation du canal ont donc été lissées à l'aide de simples exponentielles.

Les pourcentages d'inhibition de courant par le VRT-532 ont été calculés selon le ratio $100 \times (I_{\text{ctrl}} - I_{\text{VRT-532}})/I_{\text{ctrl}}$. Le pourcentage d'activation par le CBIQ a été calculé selon le ratio $100 \times (I_{\text{CBIQ}} - I_{\text{ctrl}})/I_{\text{ctrl}}$. Les valeurs des courant étaient moyennées sur une période de 5s, 90s ou plus après le début de la perfusion de la solution concernée. Les valeurs des courants moyens étaient calculées avec le logiciel QuB. Les résultats sont exprimés sous la forme : moyenne \pm écart type.

3 Résultats

Dans un premier temps, nos travaux ont porté sur un ensemble de 6 molécules obtenues de la *Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics* (CFFT). Chacune de ces molécules est documentée comme étant un potentiateur de CFTR. Tel qu'illustré au tableau 3.1, ces molécules possèdent des structures très différentes les unes des autres. Nous avons entrepris une première série d'expériences afin de déterminer si ces molécules pouvaient aussi affecter KCa3.1. L'ensemble des résultats de ce criblage sur KCa3.1 est illustré au tableau 3.1.

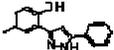
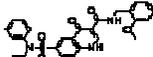
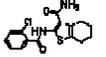
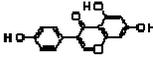
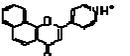
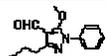
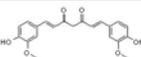
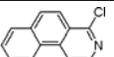
	Potentiateurs de CFTR	Structure chimique	EC ₅₀ estimé pour CFTR
Fournis par la CFFT	VRT-532		3-5µM
	SF-03		30 nM
	P5		70 nM
	Genistein		10-30 µM
	P8		2 µM
	P9		10 µM
	Curcumine		21 µM
	CBIQ		4 µM

Tableau 3.1: Structures chimiques des potentiateurs de CFTR testés.
 Excepté le CBIQ, tous les potentiateurs de CFTR testés au laboratoire agissent comme des inhibiteurs de KCa3.1, malgré leurs effets d'activation sur CFTR.

3.1 Genisteine, curcumine et Sf-03

Un effet d'inhibition fut observé avec la genisteine à une concentration de 60µM (n=2), soit le double de la concentration nécessaire à l'activation de CFTR (voir figure 3.1A). Un effet d'inhibition fut aussi observé en présence

de curcumine (n=4)(voir figure 3.1B). Plusieurs travaux ont déjà documenté une action de la curcumine qui serait peu spécifique (Egan et al., 2004; Shishodia et al., 2007). Des travaux récents (Ingolfsson et al., 2007) semblent montrer à cet égard que la curcumine agirait via les membranes cellulaires. Compte tenu du manque de spécificité de cette action, une étude plus approfondie des effets de cette molécule n'a pas été entreprise.

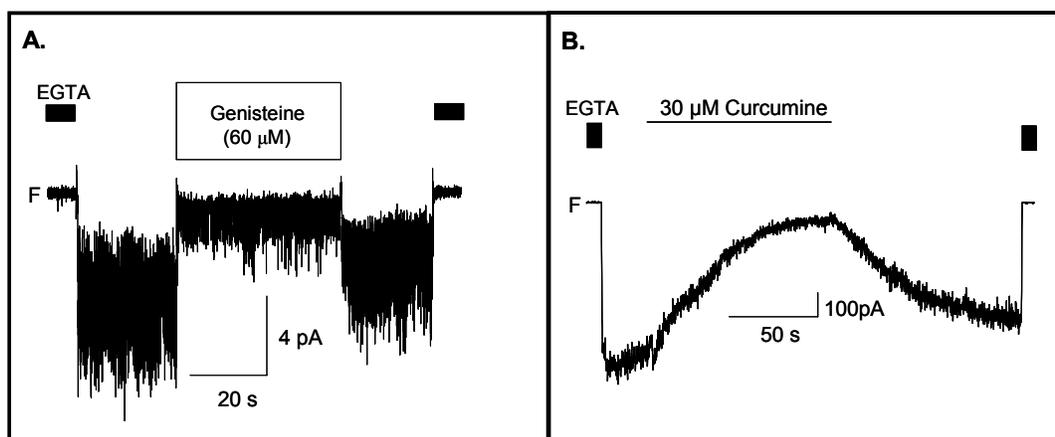


Figure 3.1 : Effets inhibiteurs de la genisteine et de la curcumine sur KCa3.1

A. Effet inhibiteur de 60µM genisteine sur le canal KCa3.1. **B.** Effet inhibiteur de 30µM curcumine sur le canal KCa3.1. Les enregistrements de courants ont été obtenus en conditions symétriques de 200mM K₂SO₄ en présence (25 µM) et en absence de Ca²⁺ libre (EGTA), à V_m=-60 mV.

Une inhibition à une concentration de 60 nM fut observée avec le SF-03 (n=5), ce qui indique une très grande affinité pour KCa3.1 (voir figure 3.2). Malgré l'intérêt soulevé par cette grande affinité, nous n'avons pas poursuivi nos recherches sur les effets de cette molécule. Ces derniers étaient difficilement reproductibles et variaient selon le système d'expression utilisé pour KCa3.1. Ceci suggère que l'effet du SF-03 pourrait impliquer une protéine accessoire, présente en quantités variables dans les différents systèmes d'expression utilisés.

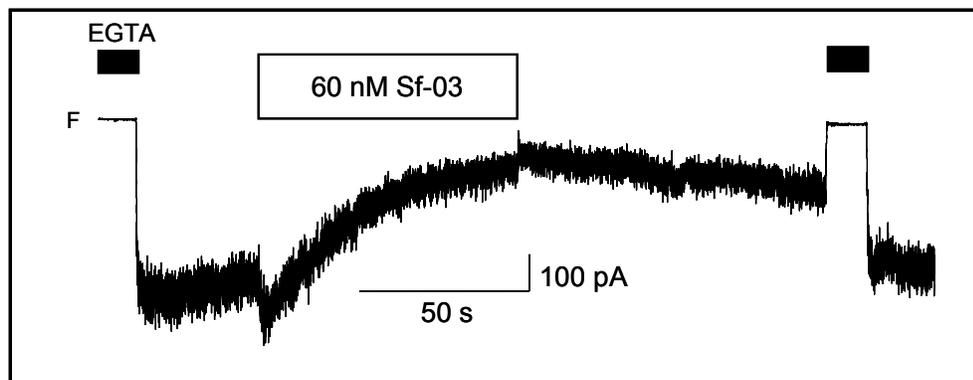


Figure 3.2 : Effet inhibiteur de 60nM SF-03 sur le canal KCa3.1

L'inhibition du courant de KCa3.1 n'est pas totalement réversible par rinçage. Par contre, le courant revient à son niveau basal suite au passage à l'état fermé en EGTA. L'enregistrement de courant a été obtenu en conditions symétriques de 200mM K₂SO₄ en présence (25 μM) et en absence de Ca²⁺ libre (EGTA), à V_m= -60 mV.

3.2 VRT-532

Le VRT-532 est un potentiateur de CFTR qui a fait l'objet de plusieurs études (Van Goor et al., 2006; Pasyk et al., 1996; Wellhauser et al., 2009) et un mécanisme moléculaire d'action selon lequel la liaison du VRT-532 modifierait l'activité ATPase de CFTR ΔF508 a récemment été proposé par l'équipe du Dr C. Bear (Wellhauser et al., 2009). Nos travaux effectués sur des ovocytes de Xénope et sur des cellules HEK-293 montrent que le VRT-532 a un effet inhibiteur sur KCa3.1 (n=4)(voir figure 3.3A), ainsi que sur le canal KCa2.3, un autre canal K⁺ dépendant du Ca²⁺ intracellulaire (n=5)(voir figure 3.3B). Des effets inhibiteurs sur KCa3.1 ont été observés à plusieurs reprises (n=12) et la figure 3.3A représente un cas typique. Tel qu'illustré, l'effet inhibiteur du VRT-532 sur KCa3.1 n'est pas totalement réversible par rinçage. Toutefois, suite à la fermeture du canal par la perfusion d'une solution sans Ca²⁺, le courant retourne à un niveau équivalent au courant précédant l'inhibition par VRT-532. Ceci suggère que VRT-532 a pu être délogé de son site lors du passage de la configuration ouverte à la configuration fermée du canal. L'effet sur KCa2.3 apparaît plus facilement réversible par rinçage.

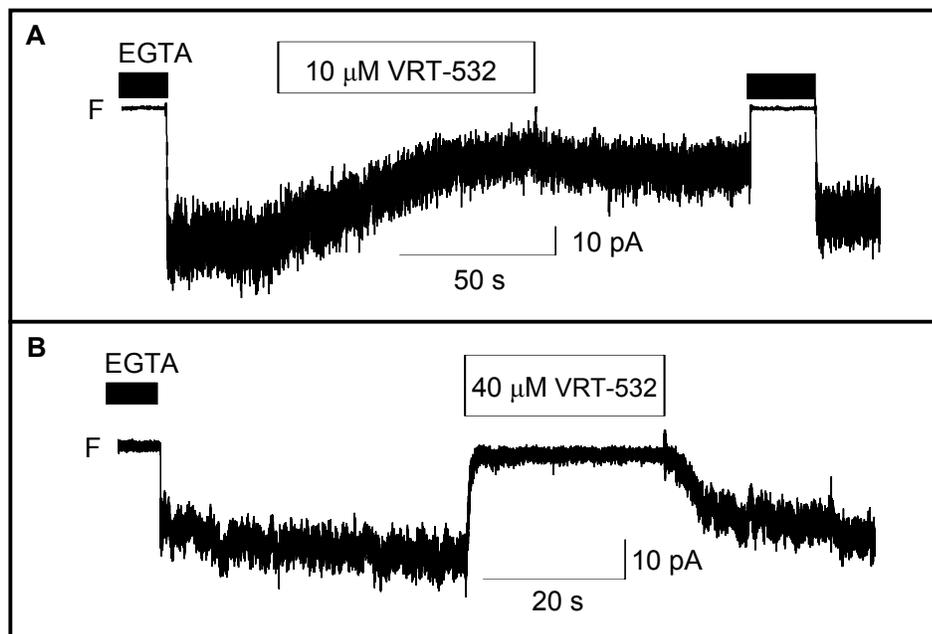


Figure 3.3 : Effets du VRT-532 sur les canaux KCa3.1 et KCa2.3

A. Effet inhibiteur de 10 μM VRT-532 sur le canal KCa3.1. L'enregistrement de courant a été obtenu en conditions asymétriques de K^+ avec (2mM KCl + 198 mM NaCl) dans la pipette et 200 mM KCl dans le bain, en présence (25 μM) et en absence de Ca^{2+} libre (EGTA). Le voltage était maintenu à 0mV afin de minimiser la contribution des courants Cl^- endogènes des ovocytes, les concentrations de Cl^- étant symétriques. Sous ces conditions expérimentales, les courants provenant de KCa3.1 sont sortants; la courbe a été inversée à des fins d'uniformité. **B.** Effet inhibiteur de 40 μM VRT-532 sur des cellules HEK transfectées exprimant le canal KCa2.3. L'enregistrement de courant a été obtenu en conditions symétriques de K-gluconate en présence (10 μM) et en absence de Ca^{2+} libre (EGTA), à $V_m = -60$ mV.

Des mesures de doses-réponses sur KCa3.1 exprimé dans des cellules HEK nous ont ensuite permis de calculer un EC_{50} approximatif de (15 ± 7 μM ; $n=3$) pour l'inhibition de KCa3.1 par VRT-532 (voir figure 3.4), ce qui est 3 fois supérieur au EC_{50} rapporté pour CFTR ΔF508 .

Nous avons ensuite cherché à obtenir de l'information sur la nature et sur l'emplacement du site de liaison du VRT-532 sur KCa3.1. Nous avons testé l'accès de cette molécule à son site d'action lorsque le canal est en configuration fermée (0 μM Ca^{2+} libre). Suite au rinçage après l'application du VRT-532 en zéro Ca^{2+} , nous avons pu observer une lente réactivation du canal lors de l'ajout de Ca^{2+} .

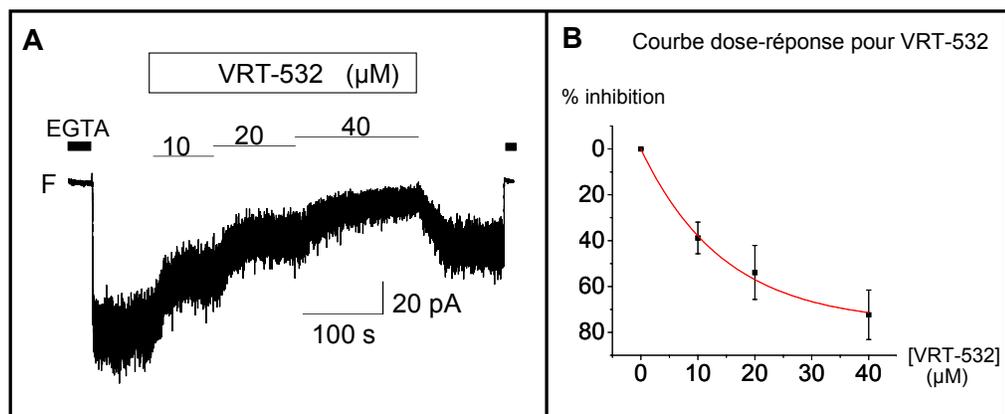


Figure 3.4 : Courbe dose-réponse pour l'inhibition de KCa3.1 par le VRT-532

A. Enregistrement représentatif des courbes dose-réponse obtenues pour l'inhibition de KCa3.1 par le VRT-532. Les canaux KCa3.1 sont exprimés par transfection stable dans des cellules HEK. L'enregistrement de courant a été obtenu en conditions symétriques de K-gluconate en présence (10 μM) et en absence de Ca²⁺ libre (EGTA), à V_m = -60 mV. **B.** Graphique illustrant la courbe dose-réponse obtenue (n=3, moyenne sur trois mesures). Les pourcentages d'inhibition par rapport au courant contrôle sont tracés en fonction de la concentration de VRT-532 en μM. Les pourcentages d'inhibition sont donnés par $100 \cdot (I_{\text{ctl}} - I_{\text{VRT-532}}) / I_{\text{ctl}}$ (0% correspond au courant avant l'application de VRT-532 et 100% correspond au courant zéro mesuré en EGTA).

La constante de temps obtenue est de $(4.5 \pm 0.3 \text{ s}; n=3)$, comparativement à $(0.74 \pm 0.05 \text{ s}; n=3)$ en conditions contrôle (voir figure 3.5 A). Ces résultats sont significativement différents. La réactivation 5 fois plus lente suite à l'application de VRT-532 en EGTA suggère que VRT-532 a accès à son site même en conditions où le canal est fermé. La valeur du courant mesurée 2s suivant la reperfusion en Ca²⁺ indique un haut pourcentage d'inhibition de $(77 \pm 6)\%$ suite à l'application de VRT-532 en EGTA, tandis qu'en conditions contrôle, le courant est stabilisé à sa valeur maximale après ce délai.

Un effet d'inhibition sur KCa3.1 pourrait entre autres provenir de l'obstruction du pore. Nous avons donc cherché à déterminer si la molécule VRT-532 agissait via un mécanisme où elle se lierait à l'intérieur de la cavité du canal et jouerait le rôle d'un bouchon plus ou moins étanche au passage

des ions K^+ . Pour ce faire, nous avons effectué des expériences avec un mutant constitutivement actif de $KCa3.1$, le canal V282G (Garneau et al., 2009).

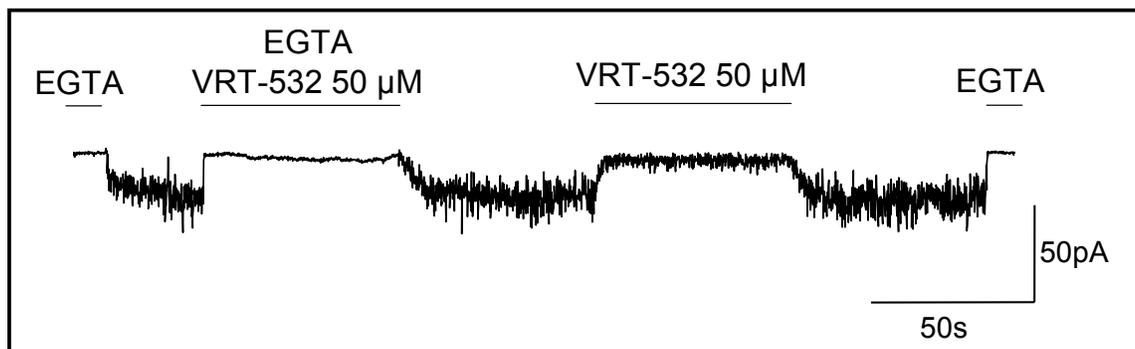


Figure 3.5 : Accessibilité au site d'action du VRT-532 en zéro Ca^{2+} .

Exemple représentatif de tracé illustrant que le VRT-532 a accès à son site d'action en canal fermé, en absence de Ca^{2+} libre (EGTA). Ceci s'exprime par une lente réactivation des canaux lors de la perfusion de Ca^{2+} suite à l'application de VRT-532 en canal fermé (II) par rapport à la réactivation normale du canal (I). L'enregistrement de courant a été obtenu en conditions symétriques de K-gluconate en présence (10 μ M) et en absence de Ca^{2+} libre (EGTA), à $V_m = -60$ mV.

Le canal muté V282G a comme propriété d'être conducteur indépendamment de la quantité de Ca^{2+} libre présente en solution. Nos résultats montrent que le VRT-532 n'a qu'un faible effet sur le mutant V282G (voir figure 3.6).

Il a été démontré que le MTSET, dont le diamètre est de 5.8Å, peut accéder à la cavité centrale du canal V282G en présence de Ca^{2+} (Garneau et al., 2009).

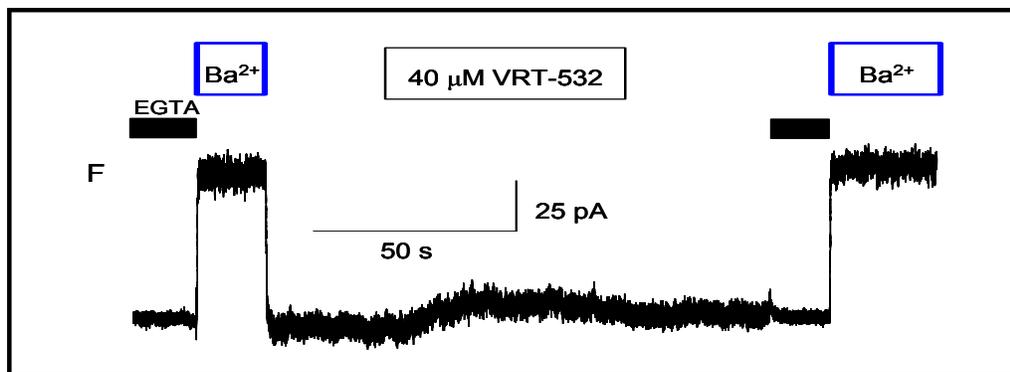


Figure 3.6 : Effet de 40 μM VRT-532 sur le canal KCa3.1 muté V282G.

Cette mutation de KCa3.1 fait en sorte que le canal est constitutivement actif, donc conducteur même en zéro Ca^{2+} (EGTA). En présence de $25\mu\text{M}$ Ca^{2+} libre, l'application de $40\mu\text{M}$ VRT-532 n'a qu'un faible effet sur le courant V282G comparativement à son effet sur la forme sauvage ($n=4$). Le Ba^{2+} étant un bloqueur du canal, une solution de $10\mu\text{M}$ Ba^{2+} a été utilisée afin d'illustrer le courant zéro, qui ne correspond pas au niveau de courant mesuré en EGTA. L'enregistrement de courant a été obtenu en conditions asymétriques de K^+ avec (2mM KCl + 198mM NaCl) dans la pipette et 200mM KCl dans le bain, en présence ($25\mu\text{M}$) et en absence de Ca^{2+} libre (EGTA). Le voltage était maintenu à 0mV afin de minimiser la contribution des courants Cl^- endogènes des ovocytes, les concentrations de Cl^- étant symétriques. Sous ces conditions expérimentales, les courants provenant de KCa3.1 sont sortants; la courbe a été inversée à des fins d'uniformité.

Le VRT-532 a un diamètre estimé¹ de 5\AA et il est donc peu probable que l'absence d'effet sur V282G soit due à l'incapacité de la molécule à pénétrer le pore. Le fait que VRT-532 ne puisse inhiber le V282G en présence de Ca^{2+} suggère donc que cette molécule aurait un effet allostérique sur KCa3.1 qui nécessiterait que le canal soit sensible au Ca^{2+} , ce qui n'est pas le cas du V282G. Ces résultats seraient compatibles avec un modèle du VRT-532 qui agirait sur les interactions CaM-KCa3.1 responsables de l'ouverture du canal (voir section 1.5.1).

En résumé, nos résultats montrent que le VRT-532 a un effet inhibiteur sur KCa3.1 avec un EC_{50} d'environ $15\mu\text{M}$, qu'il a accès à son site d'action

¹ Diamètre estimé à l'aide du logiciel YASARA, de YASARA Biosciences.

même en configuration canal fermé et qu'il pourrait agir via une action sur le complexe CaM-KCa3.1.

3.3 4-Chlorobenzo[F]isoquinoline

Tel que nous l'avons vu à la section 1.7.2.1, il a été démontré que la molécule 4-Chlorobenzo[F]isoquinoline (CBIQ), un potentiateur de CFTR et de CFTR Δ F508, a un effet activateur sur le canal KCa3.1 (Szkotak et al., 2004). Cette action activatrice polyvalente fait de CBIQ une molécule prometteuse en vue de stimuler la sécrétion transépithéliale de Cl⁻ chez les patients atteints de FK. Nous avons donc poursuivi des recherches sur les mécanismes d'action de cette molécule sur KCa3.1.

L'équipe du Dr. Cuthbert a publié une courbe dose-réponse de CBIQ pour le canal KCa3.1 (illustrée précédemment à la figure 1.9B). Selon ces résultats, la concentration pour laquelle l'effet de CBIQ est maximal est de 10 μ M. Ils ont aussi démontré que CBIQ a un effet maximal sur CFTR Δ F508 à une concentration de 10 μ M (voir figure 1.8). Nous avons donc effectué nos expériences à cette concentration.

Il a d'abord été vérifié que l'effet observé lors de nos applications de CBIQ provenait d'une action sur KCa3.1. Les courants observés en présence de CBIQ sont bloqués par l'application de TRAM-34, un inhibiteur sélectif de KCa3.1 (Wulff et al., 2000) (voir figure 3.7). Le pourcentage moyen d'activation de KCa3.1 mesuré suite à l'application de 10 μ M CBIQ sur le canal KCa3.1 exprimé dans des ovocytes était de (210 \pm 60%; n=10; p=0.006).

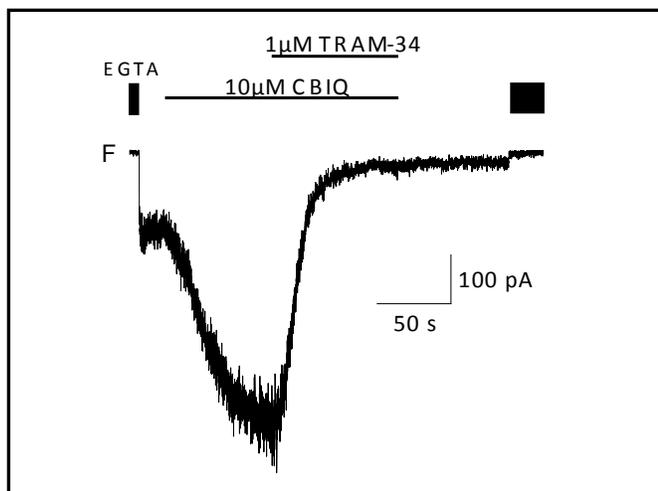


Figure 3.7 : Effet de 10 μ M CBIQ sur KCa3.1

Le courant engendré par l'application du CBIQ est bloqué par 1 μ M TRAM-34, un inhibiteur sélectif de KCa3.1. L'effet du TRAM-34 persiste longtemps et n'est pas totalement réversible (n=3). L'enregistrement de courant a été obtenu en conditions symétriques de 200mM K₂SO₄ en présence (25 μ M) et en absence de Ca²⁺ libre (EGTA), à V_m= -60 mV.

Le mécanisme d'action de CBIQ fut ensuite étudié en effectuant des mesures en canal unitaire sur KCa3.1. Les résultats montrent une augmentation de la fréquence des ouvertures de KCa3.1 en présence de CBIQ, avec des temps moyens de fermeture de 21 et 127¹ms en présence (10 μ M) et de 83 et 553¹ms en absence de CBIQ (voir figure 3.8C). Par contre, les temps moyens d'ouverture du canal ne sont pas modifiés (4.6 par rapport à 6.14 ms)¹. Ce résultat pointe vers un mécanisme d'activation de CBIQ déstabilisant un état non-conducteur du canal.

¹ Ces valeurs sont données à titre indicatif et ont été obtenues à partir de l'enregistrement représentatif présenté à la figure 3.8.

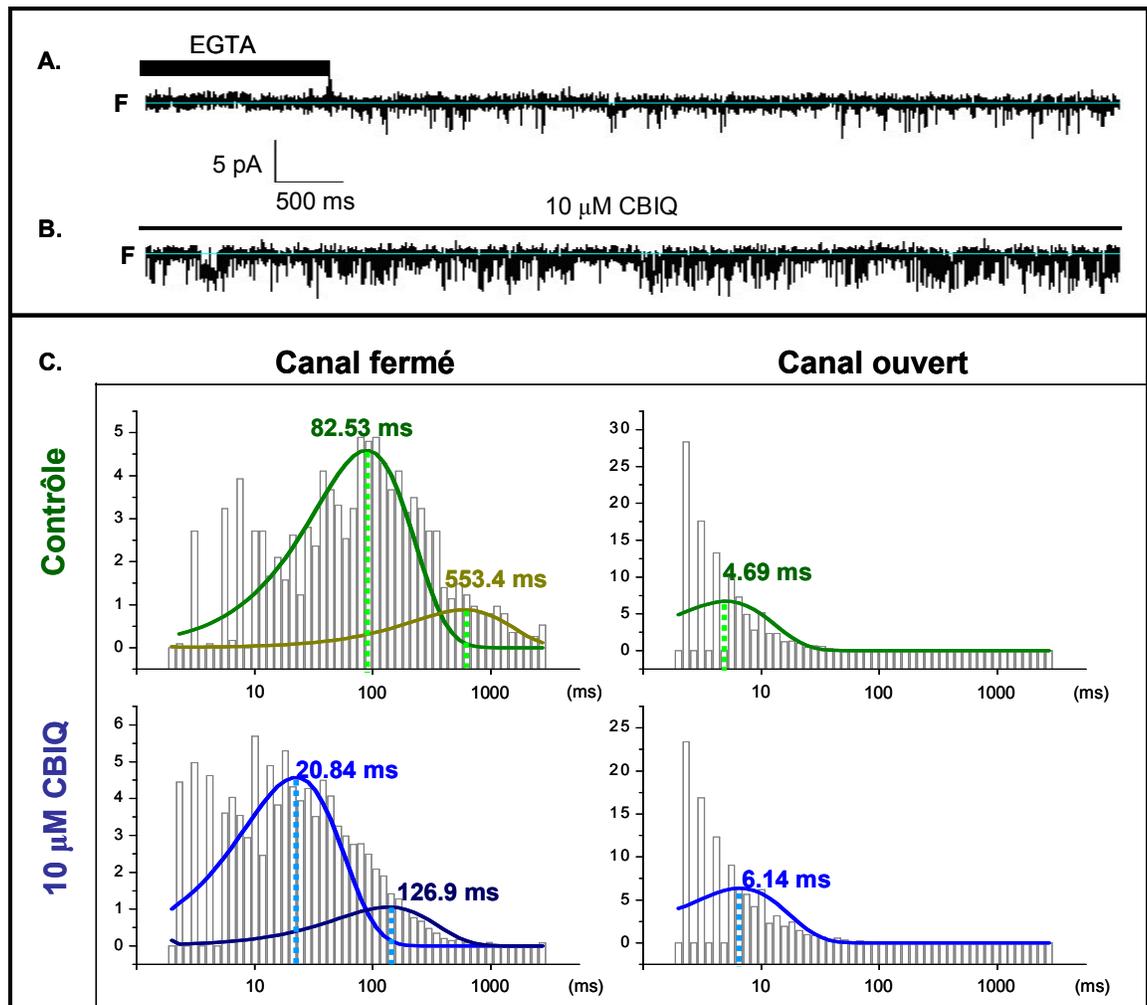


Figure 3.8 : Effet du CBIQ sur KCa3.1 en canal unitaire

A. Courant contrôle illustré en absence (EGTA) et en présence de $25\mu\text{M Ca}^{2+}$ libre. **B.** Effet de $10\mu\text{M CBIQ}$ en présence $25\mu\text{M Ca}^{2+}$ libre, 30 secondes après son l'application. L'enregistrement de courant a été obtenu en conditions symétriques de $200\text{mM K}_2\text{SO}_4$ à $V_m = -60\text{ mV}$. **C.** Histogrammes illustrant la distribution des intervalles de temps pendant lesquels le canal est dans l'état ouvert ou dans l'état fermé. Les histogrammes sont construits à partir de l'enregistrement illustré en A. et B. sur une durée d'enregistrement de plus de 200s chacun. L'abscisse des l'histogrammes est tracée en mode logarithmique afin de faciliter la présentation et l'interprétation des résultats. On remarque que la présence de $10\mu\text{M CBIQ}$ influence à la baisse les temps moyens de fermeture du canal, sans avoir d'influence significative sur les temps moyens d'ouverture. Les valeurs des maxima des fonctions de lissage sont indiquées à titre indicatif.

L'effet du CBIQ sur les cinétiques d'ouverture (τ_{on}) et de désactivation (τ_{off}) lors de l'ajout ou du retrait de Ca^{2+} apporte aussi de l'information sur le mécanisme d'activation de cette molécule. Nos résultats indiquent une augmentation de ($140 \pm 70\%$; $n=3$) des taux de désactivation en présence de CBIQ par rapport au contrôle. Les comparaisons avec les contrôles étaient toujours effectuées dans une même expérience, tel qu'illustré à la figure 3.9 (B et C) et les valeurs obtenues en présence et en absence de CBIQ sont statistiquement différentes ($P=0,03$). Un tel ralentissement des taux de désactivation de KCa3.1 en présence de CBIQ (voir figure 3.9) indique une plus grande affinité apparente pour le Ca^{2+} . Les taux d'activation en absence et en présence de CBIQ ne montraient pas de différence significative.

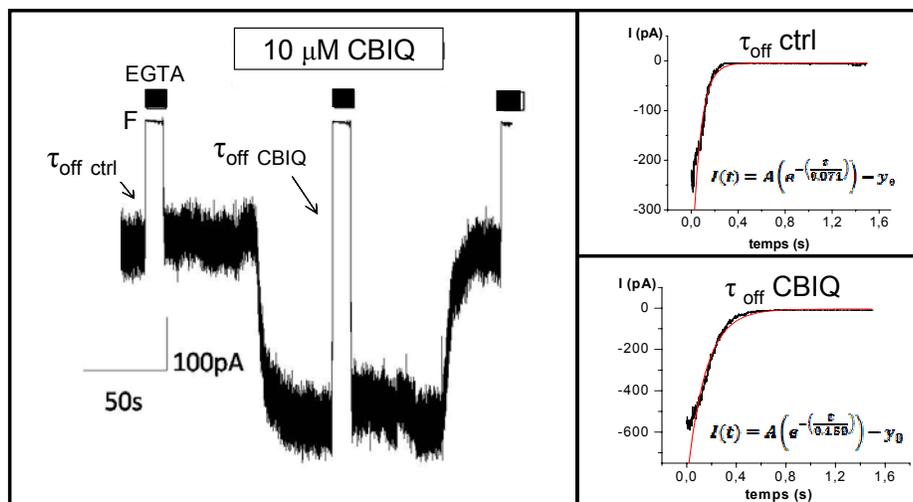


Figure 3.9 : Ralentissement des τ_{off} du canal en présence de CBIQ.

A. Exemple représentatif des enregistrements obtenus avec KCa3.1 à partir desquels les τ_{off} ont été mesurés en absence ($\tau_{off\ ctrl}$) et en présence de CBIQ ($\tau_{off\ CBIQ}$). L'enregistrement a été obtenu en conditions symétriques de 200mM K_2SO_4 en présence (25 μ M) et en absence de Ca^{2+} libre (EGTA), à $V_m = -60$ mV. **B.** et **C.** Agrandissement des tracés lors de la désactivation du canal en absence ($\tau_{off\ ctrl}$) et en présence de CBIQ ($\tau_{off\ CBIQ}$), respectivement. La courbe de lissage, en rouge sur les graphiques, ainsi que l'équation qui la caractérise illustrent le comportement exponentiel des événements de fermeture des canaux lors du passage en EGTA (τ_{off}).

Afin d'obtenir de l'information sur l'emplacement du site de liaison de CBIQ sur KCa3.1 nous avons testé l'accessibilité à son site d'action lorsque le canal est fermé. Nous avons comparé le temps de rinçage de CBIQ en canal ouvert au temps de rinçage lorsque le canal est fermé. Pour ce faire, nous avons appliqué le CBIQ pour activer maximalelement le canal et ensuite mesuré le temps de rinçage vers le niveau de courant initial. Cette mesure nous a servi de contrôle dans chaque expérience. Ensuite, après une autre application de CBIQ, nous avons rincé ce dernier en fermant le canal par l'application d'EGTA ou de TBA (un bloqueur du canal (Banderali et al., 2004)). Afin de mesurer le taux de rinçage en canal fermé, il était nécessaire de pouvoir mesurer le niveau de courant en fonction du temps. Des pulses de solution à 25 μM Ca^{2+} libre ont donc été appliqués pendant 1s à toutes les 2s passées en EGTA (n=4, voir figure 3.10 A). En comparant ces courbes de rinçage à nos contrôles, nous avons pu constater que le CBIQ se rince aussi facilement que le canal soit fermé ou ouvert (figure 3.10 C). En effet, les courbes présentent la même cinétique. De plus, suite à l'application en canal fermé de CBIQ, le canal s'ouvre à un niveau activé qui revient au niveau contrôle selon le taux de rinçage du CBIQ (figure 3.10 B et D). Des résultats équivalents ont été obtenus suite à l'utilisation de TBA (n=1, résultats non illustrés ici) selon le même protocole. Ces résultats indiquent que le site d'action du CBIQ est accessible à partir du milieu intracellulaire, même lorsque le canal est fermé.

Par contre, nos résultats montrent que CBIQ ne peut activer KCa3.1 en absence de Ca^{2+} . Ceci suggère deux possibilités : que la présence de Ca^{2+} soit nécessaire à l'action de CBIQ, ou que ce dernier nécessite un canal dans l'état conducteur afin de l'activer. Afin de discriminer entre ces deux possibilités, nous avons effectué des expériences avec le canal KCa3.1 muté V275C/A279G. Ce mutant du canal est toujours dans l'état conducteur, mais avec une probabilité d'ouverture plus faible en absence de Ca^{2+} ($P_{0 \text{ EGTA}} \approx 0,46$ par rapport à $P_{0 \text{ Ca}} \approx 0,97$) (Garneau et al., 2009).

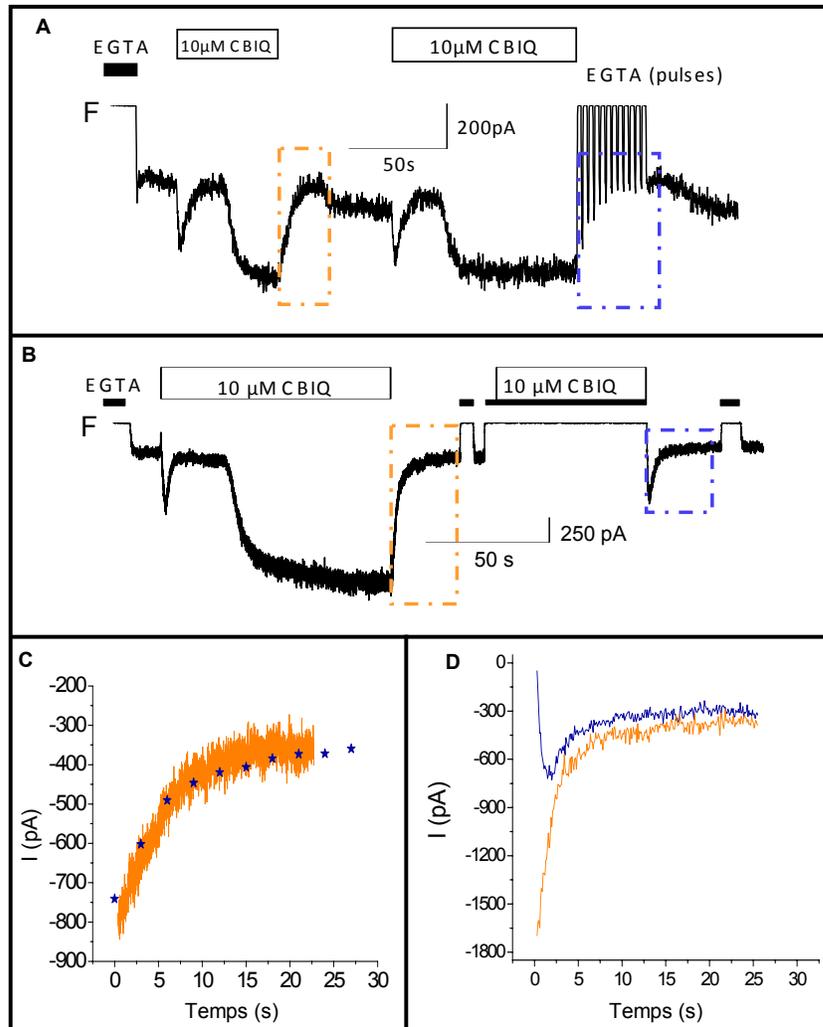


Figure 3.10 : Mesures de l'accessibilité du CBIQ à son site d'action en EGTA.

Protocoles de perfusion utilisés pour déterminer l'accessibilité du CBIQ à son site d'action en canal fermé (EGTA). **A.** Comparaison des taux de rinçage de 10 μM CBIQ en canal ouvert (encadré orange) et en canal fermé (encadré bleu). Dans le dernier cas, des pulses de solution à 25 μM Ca^{2+} libre sont appliqués pendant 1s à toutes les 2s passées en EGTA afin de permettre la mesure du niveau de courant. **C.** Superposition des courbes de rinçage du CBIQ mesurées en A. Le tracé en orange et les points en bleu correspondent aux mesures de courant dans les boîtes de couleur sur la figure A. **B.** Courbe illustrant l'accessibilité du CBIQ à son site d'action lors de l'application en canal fermé. Lors de la réouverture du canal et du rinçage de CBIQ par la perfusion d'une solution à 25 μM Ca^{2+} libre, les canaux s'ouvrent dans un état activé (encadré bleu) et reviennent au niveau de courant contrôle selon le taux de rinçage de CBIQ (encadré orange) **D.** Superposition des courbes de rinçage du CBIQ mesurées en B. Les tracés en orange et en bleu correspondent aux mesures de courant dans les encadrés de couleur sur la figure B. Les enregistrements ont été obtenus en conditions symétriques de 200mM K_2SO_4 en présence (25 μM) et en absence de Ca^{2+} libre (EGTA), à $V_m = -60$ mV.

Puisque nous avons montré que le CBIQ accède à son site d'action en zéro Ca^{2+} dans le cas de la forme sauvage du canal, il est peu probable que CBIQ n'ait pas accès à son site d'action en zéro Ca^{2+} sur ce canal constitutivement actif.

Nos résultats indiquent que CBIQ n'agit pas sur le canal en absence de Ca^{2+} , même si celui-ci est dans un état conducteur et que sa probabilité d'ouverture n'est pas maximale. Ceci signifie donc que la disponibilité de canaux dans un état conducteur n'est pas suffisante à l'action de CBIQ. Pas contre, nous avons observé un effet activateur de CBIQ en présence de 200nM Ca^{2+} libre (voir figure 3.11). Ces résultats permettent de conclure que CBIQ a besoin de la présence de Ca^{2+} pour agir.

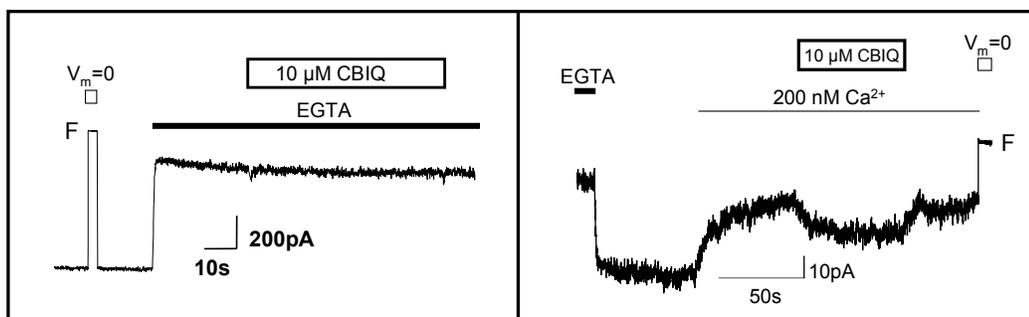


Figure 3.11 : Effets de CBIQ sur le canal muté V275C/A279G.

Figure illustrant les effets de CBIQ en absence et en présence de Ca^{2+} libre sur le canal V275C/A279G, un mutant constitutivement actif de KCa3.1. L'application de CBIQ n'a pas d'effet en EGTA, malgré le fait que le canal soit dans un état conducteur et n'ait pas une probabilité d'ouverture maximale dans ces conditions ($n=3$). Par contre, on remarque qu'en présence de 200nM Ca^{2+} libre, la même concentration de CBIQ a un léger effet activateur sur le canal muté V275C/A279G ($n=3$). Les enregistrements de courants ont été obtenus en conditions symétriques de 200mM K_2SO_4 en présence (25 μM) et en absence de Ca^{2+} libre (EGTA), à $V_m = -60$ mV. Le courant zéro est indiqué par un passage à $V_m = 0$ mV.

Différents mécanismes peuvent être à la base de l'activation initiée par CBIQ. Puisque la sensibilité au Ca^{2+} de KCa3.1 est médiée par la liaison de la CaM au segment C-terminal du canal, une première catégorie de

mécanismes concerne une action de CBIQ sur l'interaction CaM-KCa3.1. Ce genre de mécanisme a été proposé pour rendre compte de l'action de EBIO (Pedarzani et al., 2001). Une autre catégorie de mécanismes concerne une interaction directe du CBIQ avec les résidus de KCa3.1 responsables de l'ouverture et de la fermeture du canal, la 'gate'. Les travaux de notre laboratoire indiquent à cet égard que la région du croisement des hélices S6 en C terminal du canal ne formerait pas une barrière obstructive au passage des ions K^+ (Klein et al., 2007). Il est peu probable que CBIQ agisse à ce niveau. Les données obtenues avec l'ion Ag^+ comme sonde sont toutefois en accord avec un modèle où les résidus impliqués dans l'ouverture et la fermeture du pore seraient localisés au niveau du filtre de sélectivité. Selon ce modèle, le CBIQ pourrait agir via une interaction directe avec le filtre de sélectivité ou avec des résidus susceptibles d'affecter la structure de ce dernier.

Le Ba^{2+} est une excellente sonde pour obtenir de l'information sur la structure du filtre de sélectivité. Il a été suggéré en effet que cet ion irait se lier aux canaux potassiques au site S4 du potassium dans le filtre (voir figure 3.12 A)(Jiang and MacKinnon, 2000). Les résultats de nos expériences avec du Ba^{2+} en présence de CBIQ semblent indiquer que ces deux molécules entrent en compétition pour un site d'action. Malgré le fait que le baryum bloque toujours en grande partie le courant KCa3.1 en présence de CBIQ, le courant moyen en présence des deux molécules est généralement plus important qu'en Ba^{2+} seulement. Remarquablement, lors du rinçage du baryum en présence de CBIQ la cinétique de retour au niveau de courant CBIQ est complexe et passe en général par un plateau transitoire correspondant au niveau de courant sans CBIQ (voir figure 3.12 B). Cette observation est compatible avec l'expulsion du CBIQ lors de l'entrée et de la sortie du Ba^{2+} . Selon l'hypothèse de Jiang et MacKinnon sur le site de liaison du Ba^{2+} dans les canaux potassiques (Jiang and MacKinnon, 2000), nos résultats indiquent que CBIQ pourrait agir dans la région du filtre de

sélectivité. Comme CBIQ est un ouvreur du canal KCa3.1, il pourrait donc jouer directement sur la 'gate' du canal qui, selon nos hypothèses, serait située dans cette région.

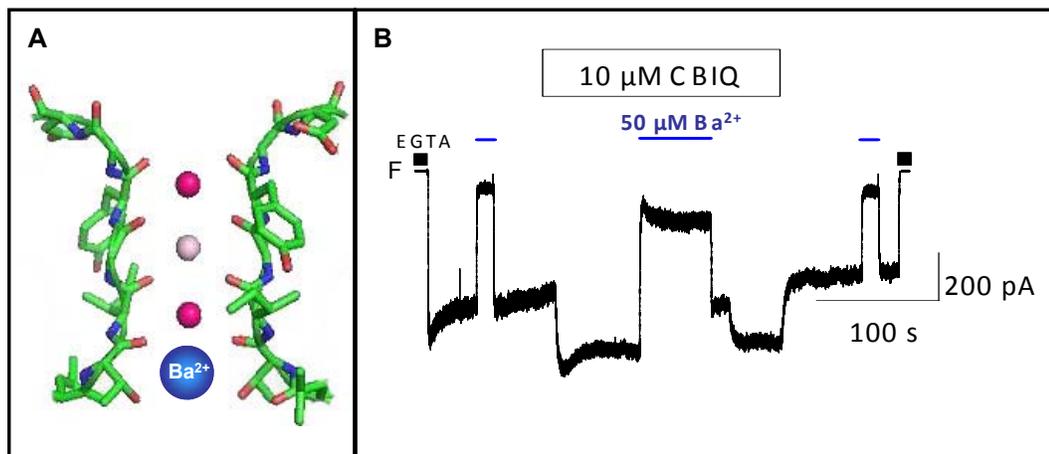


Figure 3.12 : Effets du Ba^{2+} sur l'action du CBIQ sur KCa3.1.

A. Illustration du site proposé par Jiang et MacKinnon pour la liaison du Ba^{2+} dans les canaux potassiques sur un agrandissement, au niveau du filtre de sélectivité, du modèle de la structure tertiaire de KCa3.1 présenté à la figure 1.4. **B.** Effets du Ba^{2+} sur l'action de $10\mu M$ CBIQ sur KCa3.1. En présence de CBIQ, le niveau de courant mesuré en Ba^{2+} est un peu plus élevé que le niveau mesuré avec la Ba^{2+} en conditions contrôles. Aussi, en présence de CBIQ, le niveau de courant mesuré suite au rinçage du Ba^{2+} est plus faible que le niveau du courant activé par CBIQ. Ce dernier est retrouvé après quelques secondes. L'enregistrement de courant a été obtenu en conditions asymétriques de K^+ avec ($2mM$ KCl + 198 mM NaCl) dans la pipette et 200 mM KCl dans le bain, en présence ($25\mu M$) et en absence de Ca^{2+} libre (EGTA) ($n=8$). Le voltage était maintenu à $0mV$ afin de minimiser la contribution des courants Cl^- endogènes des ovocytes, les concentrations de Cl^- étant symétriques. Sous ces conditions expérimentales, les courants provenant de KCa3.1 sont sortants; la courbe a été inversée à des fins d'uniformité.

Le 1-EBIO est un activateur bien connu de KCa3.1 (Hamilton et al., 1999;Devor et al., 1996) et il a été suggéré qu'il agit à partir de la portion intracellulaire du canal (Pedarzani et al., 2001). Nous avons donc tenté la même expérience, mais en utilisant le EBIO plutôt que le CBIQ, afin de comparer les mécanismes d'action moléculaires du CBIQ et du 1-EBIO (voir figure 3.13). Le rinçage du Ba^{2+} suite à son application en présence de EBIO montre un rapide retour au niveau activé par le EBIO. Contrairement aux

résultats obtenus avec le CBIQ, ces mesures avec le EBIO ne semblent pas indiquer une compétition du Ba^{2+} et du EBIO pour l'accès à leurs sites d'action respectifs.

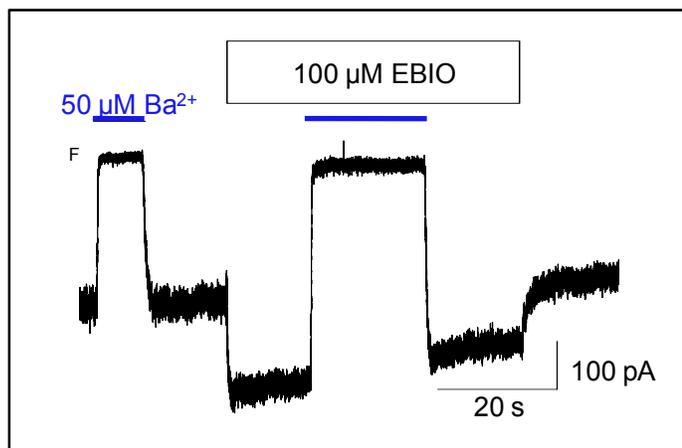


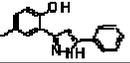
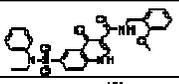
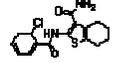
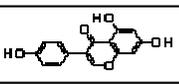
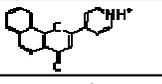
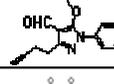
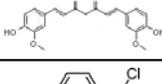
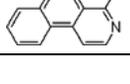
Figure 3.13 : Effets du Ba^{2+} sur l'action de $100\mu M$ EBIO sur KCa3.1.

Contrairement aux effets observés avec CBIQ, en présence de EBIO le niveau de courant mesuré immédiatement suite au rinçage du Ba^{2+} correspond au niveau du courant activé par EBIO ($n=3$). L'enregistrement de courant a été obtenu en conditions asymétriques de K^+ avec (2mM KCl + 198 mM NaCl) dans la pipette et 200 mM KCl dans le bain, en présence (25 μM) et en absence de Ca^{2+} libre (EGTA). Le voltage était maintenu à 0mV afin de minimiser la contribution des courants Cl^- endogènes des ovocytes, les concentrations de Cl^- étant symétriques. Sous ces conditions expérimentales, les courants provenant de KCa3.1 sont sortants; la courbe a été inversée à des fins d'uniformité.

4 Discussion

KCa3.1 est un canal potassique documenté pour jouer un rôle important dans les processus de sécrétion de Cl⁻ des cellules épithéliales. Dans la recherche de molécules susceptibles de stimuler ces processus de sécrétion, les molécules capables de moduler l'activité de KCa3.1 revêtent une importance particulière. Notre travail a consisté à vérifier les effets de potentiateurs de CFTR sur KCa3.1 et à tenter d'en comprendre les mécanismes sous-jacents. Le tableau 4.1 illustre les résultats obtenus.

Tableau 4.1 : Potentiateurs testés avec leur effet sur KCa3.1.

	Potentiateurs de CFTR	Structure chimique	EC ₅₀ estimé pour CFTR	Effet sur KCa3.1
Fournis par la CFFT	VRT-532		3-5 μM	Inhibiteur
	SF-03		30 nM	Inhibiteur
	P5		70 nM	Inhibiteur
	Genistein		10-30 μM	Inhibiteur
	P8		2 μM	Inhibiteur
	P9		10 μM	Inhibiteur
	Curcumine		21 μM	Inhibiteur
	CBIQ		4 μM	Activateur

4.1 Les potentiateurs de CFTR ayant un effet inhibiteur sur KCa3.1

Afin d'étudier l'effet de potentiateurs de CFTR sur KCa3.1, nous avons d'abord utilisé six différentes molécules fournies au laboratoire par la CFFT. Ces molécules présentaient des structures chimiques fort différentes, ce qui pouvait suggérer des modes d'action différents sur CFTR et sur KCa3.1. Un

criblage de leurs effets sur KCa3.1 a révélé que toutes ces molécules avaient un effet inhibiteur sur KCa3.1, à différents degrés.

La curcumine et la genisteine sont deux potentiateurs bien connus de CFTR, mais à propos desquels nous n'avons pas poursuivi nos recherches au-delà de notre criblage. Il serait intéressant lors de travaux futurs de tester les effets de différentes concentrations de ces molécules sur KCa3.1. La genisteine présente une faible affinité pour KCa3.1 et la curcumine est reconnue pour agir via la membrane avec une faible spécificité. Les deux molécules testées lors de notre criblage ayant eu les effets inhibiteurs les plus marqués sont le SF-03 et le VRT-532.

4.1.1 Les effets inhibiteurs du SF-03 sur KCa3.1

Le SF-03 s'est avéré avoir la plus grande affinité pour CFTR ainsi que pour KCa3.1. Les effets inhibiteurs de cette molécule sur KCa3.1 se manifestaient à des concentrations de l'ordre du nano molaire. L'effet du SF-03 sur KCa3.1 s'est toutefois avéré être dépendant du système d'expression utilisé, suggérant un effet indirect de la molécule sur KCa3.1. L'hypothèse la plus probable serait qu'une protéine accessoire, présente en différentes quantités selon les conditions initiales de nos expériences, était en jeu lors de l'action sur KCa3.1.

4.1.2 Les effets inhibiteurs du VRT-532 sur KCa3.1

Plusieurs travaux avaient déjà documenté les effets potentiateurs du VRT-532 sur CFTR lorsque nous avons entrepris nos recherches sur ses effets sur KCa3.1. Nous avons d'abord vérifié que les effets du VRT-532 étaient reproductibles selon le système d'expression utilisé. Nos expériences sur KCa3.1 exprimé dans des ovocytes ou dans des cellules HEK donnaient des résultats semblables. Nous avons aussi testé l'effet du VRT-532 sur KCa2.3, un canal de la même famille que KCa3.1, mais de plus

faible conductance (voir tableau 1.2). Nous n'avons pas caractérisé en détails les effets du VRT-532 sur KCa2.3, mais nous avons déterminé qu'il a aussi un effet inhibiteur sur ce canal. Les effets sur les deux canaux sont comparables pour des concentrations semblables de VRT-532, suggérant des mécanismes d'action communs.

Nos résultats indiquent que les effets du VRT-532 ne sont pas totalement réversibles suite au rinçage du produit. Par contre, après un passage en EGTA suite au rinçage du VRT-532, le niveau de courant augmente. Un effet non réversible du VRT-532 pourrait impliquer qu'il y ait une forte liaison entre cette molécule et son site d'action sur KCa3.1. Par contre, dans notre cas, l'effet inhibiteur est réversible suite à un passage en configuration canal fermé, ce qui suggère que la fermeture du canal implique des remaniements de sa structure qui favorisent la sortie du VRT-532. Le fait que ce changement de configuration puisse contribuer à déloger le VRT-532, une molécule hydrophobe, pourrait signifier que le site d'action du VRT-532 n'est pas accessible au milieu aqueux en canal ouvert, mais qu'il l'est en canal fermé. Ce site d'action serait plus exposé au milieu aqueux, donc au rinçage, en configuration canal fermé.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons vérifié que le VRT-532 peut avoir accès à son site d'action sur KCa3.1, même lorsque ce dernier est en configuration fermée. Nos résultats ont montré une lente réactivation suite à la perfusion de 10 μ M VRT-532 en EGTA par rapport au contrôle. Ceci indique que VRT-532 peut accéder à son site d'action lorsque le canal est dans la configuration fermée.

Nos résultats montrent aussi que le VRT-532 n'a qu'un léger effet inhibiteur sur le canal V282G. Cette légère inhibition de courant pourrait provenir d'une obstruction partielle du pore par VRT-532, puisque ce dernier a un diamètre comparable à celui du MTSET et qu'il est probable qu'il puisse

pénétrer le pore. Par contre, ce mécanisme d'action pourrait difficilement rendre compte de la faible réversibilité de l'effet du VRT-532 en présence de Ca^{2+} sur la forme sauvage. Nos résultats suggèrent plutôt une interaction du VRT-532 avec la machinerie calcique, l'activité du V282G étant indépendante de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ce mécanisme serait aussi compatible avec la nécessité de passer en zéro Ca^{2+} pour libérer VRT-532 de son site d'action, la formation de complexes CaM-KCa3.1 nécessitant la présence de Ca^{2+} . En résumé, VRT-532 serait un inhibiteur allostérique de KCa3.1, dont le site d'action se situe probablement au niveau du complexe CaM-KCa3.1 en C-terminal. Lorsque la région du complexe CaM-KCa3.1 sera mieux caractérisée, il sera intéressant de vérifier notre hypothèse en faisant des expériences de mutagenèse dirigée.

Étant donné leurs effets inhibiteurs sur KCa3.1, les potentiateurs de CFTR SF-03 et VRT-532 sont peut-être de mauvais choix en vue de la stimulation de la sécrétion de Cl^- par les cellules bronchiques FK. Il serait important de tester leurs impacts physiologiques sur des monocouches cellulaires avant de pousser plus loin les études des effets de ces potentiateurs sur CFTR.

4.2 CBIQ : un potentiateur de CFTR qui active KCa3.1

Nous avons ensuite testé l'effet du CBIQ sur le canal KCa3.1. Nous avons observé un effet activateur sur KCa3.1, en accord avec ce qu'avait montré l'équipe du Dr Cuthbert (Szkotak et al., 2004). Selon les résultats de cette équipe, la concentration de CBIQ ayant l'effet optimal sur CFTR- Δ F508 serait de $10\mu\text{M}$. La courbe dose réponse qu'ils avaient calculée pour KCa3.1 atteignait aussi un maximum à cette concentration. Des tests à $1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$ et $10\mu\text{M}$ CBIQ nous ont montré que les niveaux d'activation de KCa3.1 à $10\mu\text{M}$ et à $5\mu\text{M}$ sont comparables. Afin de se placer dans les conditions optimales

pour un éventuel traitement des patients portant la mutation CFTR $\Delta F508$, nous avons effectué nos expériences avec une concentration de $10\mu\text{M}$.

4.2.1 Modèle de fonctionnement moléculaire

Une courbe dose-réponse de l'effet de différentes concentrations de Ca^{2+} sur KCa3.1 a été obtenue au laboratoire (voir figure 4.1). Tel qu'illustré à la figure 4.1, le canal KCa3.1 est en conditions de calcium saturantes lorsqu'il y a plus de $10\mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre en solution : le fait d'augmenter la quantité de ce ligand intracellulaire ne permet pas d'activer davantage le canal. Dans ces conditions, les canaux KCa3.1 atteignent donc leur probabilité d'ouverture maximale. On définit la variable $P_{0\text{max}}$ comme étant la probabilité d'ouverture à une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ saturante. En conditions sursaturantes de Ca^{2+} ($25\mu\text{M}$ Ca^{2+} libre), l'application de CBIQ augmente le niveau de courant (voir figure 3.7). Ce résultat indique que CBIQ augmente $P_{0\text{max}}$ et n'agit pas en augmentant l'affinité du canal pour le Ca^{2+} , conférée par la CaM. La région de la liaison de la CaM au canal, pressentie comme étant un site d'action d'ouvreurs des canaux KCa, pourrait donc ne pas être en cause dans le fonctionnement du CBIQ. Un activateur tel que CBIQ pourrait agir directement sur la gate du canal, dans la région du filtre de sélectivité.

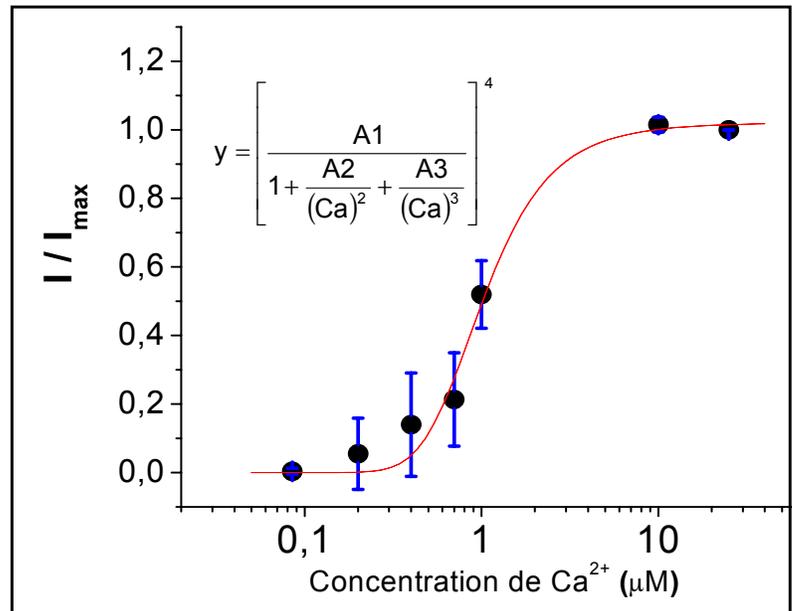
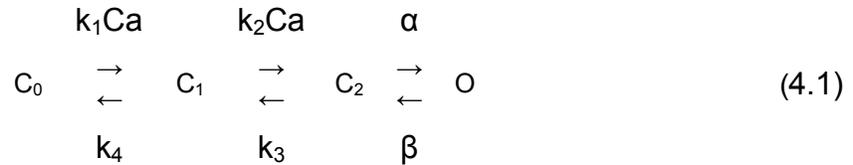


Figure 4.1 : Dose-réponse en Ca^{2+} pour KCa3.1

Dose-réponse expérimentale illustrant l'augmentation de courant de KCa3.1 selon la concentration de Ca^{2+} intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est donnée en μM et le courant est donné sous la forme I/I_{\max} , où I_{\max} représente le courant mesuré en conditions symétriques de $200 \text{ K}_2\text{SO}_4$ en présence de $25 \mu\text{M}$ Ca^{2+} libre. La courbe de lissage est construite selon la fonction indiquée sur le graphique ($A1=1$, $A2=0,211$, $A3=-0,013$). Cette fonction est une bonne approximation de celle donnant la probabilité d'ouverture en fonction de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ selon notre modèle (voir plus bas).

On peut décrire le fonctionnement de KCa3.1 par un modèle simple, avec un état ouvert (O) et trois états fermés (voir équation 4.1). Le premier état fermé représente le canal en absence de Ca^{2+} . Deux autres états correspondent à des états non conducteurs du canal, lorsqu'un ou deux ions Ca^{2+} sont liés à la CaM. Ce modèle représente schématiquement le fonctionnement de chaque monomère du canal. L'état C_0 représente l'état dans lequel se trouve le canal en absence de Ca^{2+} . Les états C_1 et C_2 représentent respectivement des états fermés du canal avec 1 ou 2 Ca^{2+} sur la CaM. L'état O représente l'état conducteur du canal. Le comportement d'un homotétramère tel que KCa3.1 est représenté par les équations dérivées du modèle, élevées à la puissance quatre.



Avec un tel modèle, on peut trouver une expression décrivant la probabilité d'ouverture du canal en fonction de la concentration de Ca^{2+} (voir équation 4.2). Lorsque le système est saturé en Ca^{2+} , on peut considérer la disponibilité de ce ligand intracellulaire comme tendant vers l'infini. En considérant P_0 dans ce cas, on obtient la probabilité d'ouverture $P_{0\text{max}}$, en conditions de Ca^{2+} saturant (voir équation 4.3).

$$P_0 = \left(\frac{\alpha}{\alpha + \beta} \right)^4 \left[\frac{(\text{Ca}^{2+})^2}{(\text{Ca}^{2+})^2 + \frac{\beta}{\alpha + \beta} k_3 \left[\frac{k_4 + k_1 \text{Ca}^{2+}}{k_1 k_2} \right]} \right]^4 \quad (4.2)$$

$$P_{0\text{max}} = \left(\frac{\alpha}{\alpha + \beta} \right)^4 \quad (4.3)$$

Ces équations nous guident quant à l'interprétation de nos résultats. Elles prédisent qu'un composé ayant pour conséquence l'augmentation de $P_{0\text{max}}$ pourrait procéder en augmentant la valeur de α et/ou en diminuant celle de β . Si la liaison d'une molécule au canal stabilise l'état ouvert de ce dernier (diminue β), les temps d'ouverture du canal sont allongés et la probabilité d'ouverture augmente. Par ailleurs, si la liaison de la molécule au canal déstabilise un état non-conducteur de ce dernier (augmente α), les événements d'ouverture du canal sont plus fréquents et la probabilité d'ouverture s'en trouve aussi augmentée.

Nos résultats en canal unitaire indiquent que la liaison du CBIQ à son site d'action a un effet défavorable sur une conformation fermée du canal. Dans le modèle simplifié présenté ci haut, CBIQ pourrait donc agir en augmentant la valeur de la variable α .

Nos résultats par rapport aux taux de désactivation de KCa3.1 indiquent que CBIQ augmente l'affinité apparente du canal pour le Ca^{2+} . Ceci peut être accompli à travers différents mécanismes. Un d'entre eux est d'augmenter la valeur de la variable α . En effet, il est possible d'augmenter la valeur de l'expression obtenue pour la constante de désactivation dans notre modèle (voir équation 4.4 et Annexe) en augmentant α . En utilisant cette expression, on trouve la relation donnée à l'équation 4.5. Cette relation confirme que nos résultats pointent vers une augmentation de la valeur de α . Nous avons obtenu des valeurs approximatives de 3.1 pour le rapport $I_{\max\text{CBIQ}}/I_{\max\text{ctrl}}$ et de 0.4 pour le rapport $\tau_{\text{offctrl}}/\tau_{\text{offCBIQ}}$. Selon ces résultats, l'équation 4.5 prédirait une augmentation approximative d'un facteur 3 de la valeur de α en présence de CBIQ. Une augmentation de la valeur de α aurait pour conséquence de diminuer la probabilité pour le canal de tomber dans les états fermés C_0 et C_1 . Alors, on pourrait constater une augmentation de l'affinité apparente du canal pour le Ca^{2+} .

$$\tau_{\text{off}} \propto \left(\frac{\alpha + \beta}{4k_3\beta} \right) \quad (4.4)$$

$$\frac{I_{\max\text{CBIQ}}}{I_{\max\text{ctrl}}} = \left(\frac{\alpha_{\text{CBIQ}}}{\alpha_{\text{ctrl}}} \right)^4 \left(\frac{\tau_{\text{offctrl}}}{\tau_{\text{offCBIQ}}} \right)^4 \quad (4.5)$$

Selon notre modèle, on peut aussi concevoir qu'une augmentation de la valeur de α augmente l'affinité apparente au Ca^{2+} d'un autre point de vue. En effet, la concentration de Ca^{2+} pour laquelle $K_{\text{Ca}3.1}$ atteint la moitié de $P_{0\text{max}}$ ($C_{1/2}$) est définie par l'équation 4.6. Si CBIQ augmente la valeur de α , la concentration $C_{1/2\text{CBIQ}}$ est diminuée. Ceci a pour effet d'augmenter l'affinité apparente pour le Ca^{2+} . La figure 4.2 illustre les probabilités d'ouvertures théoriques en fonction du Ca^{2+} , calculées avec l'équation 4.2. Comme on peut le remarquer, une augmentation de la valeur de α diminue $C_{1/2}$ et augmente $P_{0\text{Max}}$. Ceci s'illustre par un léger décalage vers la gauche de la courbe ainsi que par l'augmentation du niveau du plateau.

$$C_{1/2} = \frac{\left(\frac{\beta}{\alpha + \beta}\right) \frac{K_3}{K_2} + \left[\left(\frac{\beta}{\alpha + \beta}\right)^2 \frac{K_3^2}{K_2^2} + \frac{4K_3K_4}{K_1K_2} \frac{\beta}{\alpha + \beta} \right]^{1/2}}{2} \quad (4.6)$$

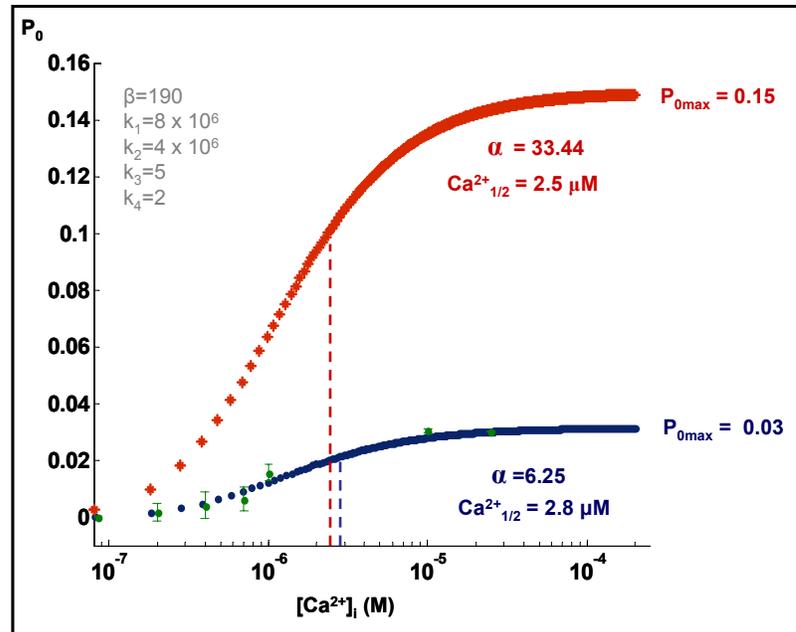


Figure 4.2 : P_0 de KCa3.1 en fonction de la $[Ca^{2+}]_i$ intracellulaire.

Les courbes en rouge et en bleu représentent les valeurs calculées théoriquement pour la P_0 du canal avec 10 μ M CBIQ et sans CBIQ, respectivement. Les valeurs de α et β sont approximatives et proviennent d'une analyse de Markov effectuée avec le logiciel QuB sur une mesure en canal unitaire. Les valeurs de k_1 - k_4 sont déterminées selon l'accord avec les données expérimentales représentées par les points en vert sur la figure. Ces données représentent une conversion des résultats présentés à la figure 4.1. Pour la conversion, on considère que le courant I_{max} représente le courant conduit par N canaux ayant chacun une probabilité d'ouverture $P_{0max}=0.03$. Les lignes pointillées illustrent que l'augmentation de la valeur de α diminue $C_{1/2}$, et donc augmente l'affinité apparente pour le Ca^{2+} . Le graphique illustre aussi l'augmentation de P_{0Max} suite à l'augmentation de la valeur de α .

Nos expériences avec le mutant constitutivement actif V275C-A279G ont montré que la présence d'un état conducteur du canal n'est pas suffisante en absence de Ca^{2+} et que le CBIQ a besoin de Ca^{2+} pour agir. Ces résultats peuvent aussi s'expliquer dans le cadre de notre hypothèse. En effet, si CBIQ active le canal en augmentant la valeur de α , ce dernier doit d'abord avoir une probabilité non nulle d'être dans l'état C_2 , ce qui n'est pas le cas en absence de Ca^{2+} .

Nos résultats montrent donc que le CBIQ est un activateur de KCa3.1. Selon nos résultats en canal unitaire, l'effet de CBIQ déstabilise l'état fermé du canal, mais a besoin de la présence de Ca^{2+} pour agir. Il est intéressant de noter que la régulation à la hausse des stocks de Ca^{2+}_i dans les RE apicaux par l'infection et l'inflammation dans la lumière des voies respiratoires engendre une réponse exagérée de Ca^{2+}_i dans l'épithélium des voies aériennes de patients FK suite à l'activation de récepteurs (P2Y₂ et BK) (Paradiso et al., 2001) (Ribeiro et al., 2005). Le fait que les infections et l'inflammation des voies aériennes des patients FK affecte à la hausse les niveaux de Ca^{2+}_i pourrait faire en sorte que le CBIQ soit un potentiateur de KCa3.1 et de CFTR encore plus efficace chez les sujets FK.

4.2.2 Localisation du site d'action

Des travaux récents du laboratoire indiquent que les résidus impliqués dans l'ouverture et la fermeture du canal seraient localisés au niveau du filtre de sélectivité (Klein et al., 2007; Garneau et al., 2009). Cette région pourrait dès lors constituer un site d'action du CBIQ. Afin d'obtenir plus d'informations sur ce site d'action, nous avons effectué des expériences avec du Ba^{2+} . Cet ion bloque plusieurs canaux potassiques, dont KCa3.1. Il est une excellente sonde pour obtenir de l'information au niveau du filtre de sélectivité, puisque son site de liaison serait situé à la base du filtre, au site S4 de liaison des ions potassiques (voir figure 3.12 A) (Jiang and MacKinnon, 2000).

Nos résultats indiquent que les sites d'action du Ba^{2+} et du CBIQ pourraient être en relation. En effet, lors de l'application de Ba^{2+} en présence de CBIQ, le niveau de blocage du Ba^{2+} est légèrement plus faible. De plus, lors du rinçage du Ba^{2+} en présence de CBIQ, la cinétique de retour au niveau de courant CBIQ est complexe et passe en général par un plateau transitoire correspondant au niveau de courant sans CBIQ (voir figure

3.12B). Ceci nous a incité à poser l'hypothèse que le CBIQ pourrait être expulsé de son site lors de l'entrée et de la sortie du Ba^{2+} .

Nous avons aussi tenté la même expérience, mais en utilisant le EBIO plutôt que le CBIQ (voir figure 3.13). Nos résultats indiquent que les deux molécules pourraient agir à partir de sites différents sur KCa3.1.

Finalement, nos résultats supportent l'hypothèse que CBIQ, un ouvreur du canal KCa3.1, agirait sur la 'gate' dans la région du filtre de sélectivité. Son action aurait pour conséquence de déstabiliser l'état fermé du canal et nécessiterait la présence de Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire.

Un mécanisme d'action impliquant la région du filtre de sélectivité a déjà été proposé pour des activateurs canaux calciques activés par le voltage (L-type Ca^{2+}). Par exemple, en utilisant la méthode de la mutagenèse dirigée, l'équipe du Dr Adachi-Akahane a identifié la Ser1115 comme étant un acteur clé dans l'action du Bay K 8644 (Yamaguchi et al., 2000). Ce résidu se trouve dans la boucle entre les hélices S5 et S6 du canal, dans la sous-unité α_{1C} . L'action de cet activateur d'un canal calcique impliquerait donc elle aussi un site au niveau du filtre de sélectivité.

5 Conclusion

La recherche par criblage à haut débit est une méthode très efficace afin d'identifier des potentiateurs de CFTR et a permis l'avancement des connaissances sur la pharmacologie de ce canal dans les dernières années. Ces travaux sont par contre indissociables de l'étude des effets des potentiateurs sur l'ensemble des protéines impliquées dans les processus de sécrétion de Cl^- .

L'activation des canaux K^+ est primordiale pour la génération d'un gradient électrochimique favorable à la sortie de Cl^- . Des agents ayant des effets stimulateurs sur CFTR, mais inhibant KCa3.1 , ne seraient pas des sujets d'études pharmacologiques optimaux en vue du traitement de la FK (Cuthbert et al., 1999), puisqu'elles entraîneraient à long terme un effet atténué des potentiateurs de CFTR sur la sécrétion globale de Cl^- . Plusieurs molécules identifiées comme des potentiateurs de CFTR inhibent KCa3.1 à des concentrations du même ordre de grandeur que celles activant CFTR. Ces effets d'inhibition sur KCa3.1 peuvent provenir d'effets allostériques, d'interactions avec des protéines auxiliaires ou avec la machinerie calcique du canal.

Dans une optique de développement futur de médicaments pouvant aider les personnes fibro-kystiques, le développement de molécules efficaces à la stimulation de la sécrétion basolatérale de K^+ dans les cellules épithéliales est avantageux. Ces molécules pourraient avoir un effet bénéfique dans le cas de différentes mutations de CFTR, par opposition au développement de molécules dont l'effet est spécifique à une mutation particulière. Le couplage entre la sécrétion apicale de Cl^- et l'activation de canaux potassiques basolatéraux a mené à l'idée que les potentiateurs de ces canaux pourraient avoir un effet positif dans les cas de toutes les mutations de CFTR, dans la mesure où des canaux Cl^- seraient présents à la

membrane apicale. Les deux canaux potassiques les mieux connus pour leur contribution à la conductance basolatérale au potassium sont KvLQT1 et KCa3.1.

Ce dernier est moins actif que KvLQT1 en conditions basales, mais sa contribution devient importante lorsqu'il est stimulé. En effet, différents ouvreurs de KCa3.1, dont 1-EBIO et le CBIQ stimulent grandement les processus de sécrétion de Cl^- en chambre d'Ussing. L'activation des canaux potassiques basolatéraux, dont KCa3.1, pourrait donc favoriser la sécrétion de Cl^- en établissant des conditions favorables à l'activation de CaCC et donc, même en l'absence d'une protéine CFTR fonctionnelle, aurait un effet positif sur la sécrétion épithéliale de Cl^- (Mall et al., 2003). Les ouvreurs de KCa3.1, ainsi que les ouvreurs qui pourraient stimuler KvLQT1 représentent donc de bons espoirs thérapeutiques dans les cas des épithéliums FK caractérisés par une sécrétion déficiente de Cl^- , dont les glandes submucosales, l'intestin et le pancréas.

Dans les cellules épithéliales de surface des voies aériennes, exprimant le canal ENaC, une activation importante des canaux potassiques basolatéraux hyperpolarisant la cellule pourrait stimuler l'absorption de Na^+ de la part de ENaC et nuire à l'hydratation de l'épithélium (Leroy et al., 2006; Gao et al., 2001). Dans ce cas, l'utilisation d'un inhibiteur de ce canal sodique pourrait prévenir ces effets indésirables.

Nos résultats à propos de l'étude du CBIQ, un potentiateur de CFTR qui est aussi un ouvreur de KCa3.1, suggèrent qu'un des modes d'action possibles pour les ouvreurs de ce canal est d'agir via une interaction avec le filtre de sélectivité. Cette section du canal contrôle ses processus d'activation et de désactivation.

Des recherches plus poussées pourraient permettre l'identification précise du site d'action de cette molécule sur KCa3.1. Des expériences impliquant différentes mutations du canal dans la région du filtre de sélectivité sont en cours au laboratoire au moment de l'écriture de ce mémoire. Nous avons aussi créé un modèle par homologie du canal (basé sur la structure de Kv1.2 (PDB 2A79)) qui permettra, dans nos démarches futures, de procéder à des expériences d'arrimage moléculaire et donc d'orienter nos recherches afin de déterminer plus précisément le site d'action et les mécanismes d'action moléculaires de CBIQ sur KCa3.1. Ces expériences pourraient mener à l'identification précise du site et du mécanisme moléculaire d'action d'un ouvreur de KCa3.1 et permettre d'initier des simulations facilitant la conception de nouvelles molécules activatrices de KCa3.1. En effet, une meilleure connaissance de la nature des interactions physiques et structurelles entre les molécules et le canal permettrait d'identifier les caractéristiques des composés qui présentent le meilleur potentiel pharmacologique, tout en offrant des balises utiles à la conception de nouvelles molécules encore plus prometteuses.

6 Références

- Ai, T., S. G. Bompadre, X. Wang, S. Hu, M. Li, and T. C. Hwang. 2004. Capsaicin potentiates wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride-channel currents. *Mol. Pharmacol.* 65:1415-1426.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2007. *Molecular Biology of The Cell*. U.S.A.
- Anderson, M. P., D. P. Rich, R. J. Gregory, A. E. Smith, and M. J. Welsh. 1991. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 251:679-682.
- Anderson, M. P., D. N. Sheppard, H. A. Berger, and M. J. Welsh. 1992. Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am. J. Physiol.* 263:L1-L14.
- Baker, K. A., C. Tzitzilonis, W. Kwiatkowski, S. Choe, and R. Riek. 2007. Conformational dynamics of the KcsA potassium channel governs gating properties. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. Nov. ;14(11):1089. -95.
- Banderali, U., H. Klein, L. Garneau, M. Simoes, L. Parent, and R. Sauvé. 2004. New insights on the voltage dependence of the KCa3.1 channel block by internal TBA . *J. Gen. Physiol* 124:333-348.
- Bardou, O., N. T. Trinh, and E. Brochiero. 2009. Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 296:L145-L155.
- Becq, F., Y. Mettey, M. A. Gray, L. J. Galiotta, R. L. Dormer, M. Merten, T. Metaye, V. Chappe, C. Marvingt-Mounir, O. Zegarra-Moran, R. Tarran, L. Bulteau, R. Derand, M. M. Pereira, M. A. McPherson, C. Rogier, M. Joffre, B. E. Argent, D. Sarrouilhe, W. Kammouni, C. Figarella, B. Verrier, M. Gola, and J. M. Vierfond. 1999. Development of substituted Benzo[c]quinolizinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel. *J. Biol. Chem.* 274:27415-27425.
- Bernard, K., S. Bogliolo, O. Soriani, and J. Ehrenfeld. 2003. Modulation of calcium-dependent chloride secretion by basolateral SK4-like channels in a human bronchial cell line. *J. Membr. Biol.* 196:15-31.
- Berneche, S. and B. Roux. 2003. A microscopic view of ion conduction through the K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:8644-8648.
- Berthiaume, Y. and M. A. Matthay. 2007. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury. *Respir. Physiol Neurobiol.* 159:350-359.

- Bompadre, S. G., J. H. Cho, X. Wang, X. Zou, Y. Sohma, M. Li, and T. C. Hwang. 2005. CFTR gating II: Effects of nucleotide binding on the stability of open states. *J. Gen. Physiol* 125:377-394.
- Boom, A., P. Lybaert, J. F. Pollet, P. Jacobs, H. Jijakli, P. E. Golstein, A. Sener, W. J. Malaisse, and R. Beauwens. 2007. Expression and localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the rat endocrine pancreas. *Endocrine*. 32:197-205.
- Boucher, R. C. 1994a. Human airway ion transport. Part one. *Am. J. Respir. Crit Care Med*. 150:271-281.
- Boucher, R. C. 1994b. Human airway ion transport. Part two. *Am. J. Respir. Crit Care Med*. 150:581-593.
- Boucher, R. C. 2003. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch*. 445:495-498.
- Brochiero, E., A. Dagenais, A. Prive, Y. Berthiaume, and R. Grygorczyk. 2004. Evidence of a functional CFTR Cl(-) channel in adult alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 287:L382-L392.
- Bruening-Wright, A., W. S. Lee, J. P. Adelman, and J. Maylie. 2007. Evidence for a Deep Pore Activation Gate in Small Conductance Ca²⁺-activated K⁺ Channels. *J. Gen. Physiol* 130:601-610.
- Cai, Z. and D. N. Sheppard. 2002. Phloxine B interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at multiple sites to modulate channel activity. *J. Biol. Chem*. 277:19546-19553.
- Callebaut, I., R. Eudes, J. P. Mornon, and P. Lehn. 2004. Nucleotide-binding domains of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: detailed sequence analysis and three-dimensional modeling of the heterodimer. *Cell Mol. Life Sci*. 61:230-242.
- Caputo, A., E. Caci, L. Ferrera, N. Pedemonte, C. Barsanti, E. Sondo, U. Pfeffer, R. Ravazzolo, O. Zegarra-Moran, and L. J. Galletta. 2008. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322:590-594.
- Chappe, V., Y. Mettey, J. M. Vierfond, J. W. Hanrahan, M. Gola, B. Verrier, and F. Becq. 1998. Structural basis for specificity and potency of xanthine derivatives as activators of the CFTR chloride channel. *Br. J. Pharmacol*. 123:683-693.
- Chou, C. C., C. A. Lunn, and N. J. Murgolo. 2008. KCa3.1: target and marker for cancer, autoimmune disorder and vascular inflammation? *Expert. Rev Mol. Diagn*. 2008. Mar. ;8. (2):179. -87. 8:179-187.
- Claydon, T. W., S. Y. Makary, K. M. Dibb, and M. R. Boyett. 2003. The selectivity filter may act as the agonist-activated gate in the G protein-activated Kir3.1/Kir3.4 K⁺ channel. *J. Biol. Chem*. 278:50654-50663.

- Clayton, G. M., S. Altieri, L. Heginbotham, V. M. Unger, and J. H. Morais-Cabral. 2008. Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Feb. 5;105. (5):1511. -5.
- Contreras, J. E., D. Srikumar, and M. Holmgren. 2008. Gating at the selectivity filter in cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Mar. 4;105. (9.):3310. -4.
- Cordero-Morales, J. F., L. G. Cuello, Y. Zhao, V. Jogini, D. M. Cortes, B. Roux, and E. Perozo. 2006. Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:311-318.
- Cordero-Morales, J. F., V. Jogini, A. Lewis, V. Vasquez, D. M. Cortes, B. Roux, and E. Perozo. 2007. Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. Nov. ;14(11):1062. -9.
- Cowley, E. A. and P. Linsdell. 2002. Characterization of basolateral K⁺ channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J. Physiol* 538:747-757.
- Cuthbert, A. W., M. E. Hickman, P. Thorn, and L. J. MacVinish. 1999. Activation of Ca(2+)- and cAMP-sensitive K(+) channels in murine colonic epithelia by 1-ethyl-2-benzimidazolone. *Am. J. Physiol.* 277:C111-C120.
- Dalemans, W., p. Barbry, G. Champigny, S. Jallat, K. Dott, D. Dreyer, R. G. Crystal, A. Pavirani, J.-P. Lecocq, and M. Lazdunski. 1991. Altered chloride ion channel kinetics associated with the deltaF508 cystic fibrosis mutation. *Nature* 354:526-528.
- Del Camino, D. and G. Yellen. 2001. Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K(+) channel. *Neuron* 32:649-656.
- Demolombe, S., D. Franco, P. de Boer, S. Kuperschmidt, D. Roden, Y. Pereon, A. Jarry, A. F. Moorman, and D. Escande. 2001. Differential expression of KvLQT1 and its regulator IsK in mouse epithelia. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 280:C359-C372.
- Devor, D. C., R. J. Bridges, and J. M. Pilewski. 2000. Pharmacological modulation of ion transport across wild-type and DeltaF508 CFTR-expressing human bronchial epithelia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279:C461-C479.
- Devor, D. C. and R. A. Frizzell. 1993. Calcium-mediated agonists activate an inwardly rectified K⁺ channel in colonic secretory cells. *Am. J. Physiol.* 265:C1271-C1280.
- Devor, D. C., A. K. Singh, R. A. Frizzell, and R. J. Bridges. 1996. Modulation of Cl⁻ secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca(2+)-dependent K⁺ channel. *Am. J. Physiol.* 271:L775-L784.
- Domene, C., M. L. Klein, D. Branduardi, F. L. Gervasio, and M. Parrinello. 2008. Conformational changes and gating at the selectivity filter of potassium channels. *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Jul. 23;130. (29.):9474. -80.

- Doyle, D. A., J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Dulong, S., K. Bernard, and J. Ehrenfeld. 2007. Enhancement of P2Y6-induced Cl⁻ secretion by IL-13 and modulation of SK4 channels activity in human bronchial cells. *Cell Physiol Biochem*. 20:483-494.
- Egan, M. E., M. Pearson, S. A. Weiner, V. Rajendran, D. Rubin, J. Glockner-Pagel, S. Canny, K. Du, G. L. Lukacs, and M. J. Caplan. 2004. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 304:600-602.
- Engelhardt, J. F., J. R. Yankaskas, S. A. Ernst, Y. Yang, C. R. Marino, R. C. Boucher, J. A. Cohn, and J. M. Wilson. 1992. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat. Genet.* 2:240-248.
- Feletou, M. and P. M. Vanhoutte. 2004. EDHF: new therapeutic targets? *Pharmacol. Res.* 49:565-580.
- Foskett, J. K. 1998. CIC and CFTR chloride channel gating. *Annu. Rev. Physiol.* 60:689-717.
- Galiotta, L. J., M. F. Springsteel, M. Eda, E. J. Niedzinski, K. By, M. J. Haddadin, M. J. Kurth, M. H. Nantz, and A. S. Verkman. 2001. Novel CFTR chloride channel activators identified by screening of combinatorial libraries based on flavone and benzoquinolinium lead compounds. *J. Biol. Chem.* 276:19723-19728.
- Gao, L., J. R. Yankaskas, C. M. Fuller, E. J. Sorscher, S. Matalon, H. J. Forman, and C. J. Venglarik. 2001. Chlorzoxazone or 1-EBIO increases Na(+) absorption across cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 281:L1123-L1129.
- Garneau, L., H. Klein, U. Banderali, A. Longpre-Lauzon, L. Parent, and R. Sauve. 2009. Hydrophobic interactions as key determinants to the KCa3.1 channel closed configuration. An analysis of KCa3.1 mutants constitutively active in zero Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* 284:389-403.
- Gerlach, A. C., N. N. Gangopadhyay, and D. C. Devor. 2000. Kinase-dependent regulation of the intermediate conductance, calcium-dependent potassium channel, hIK1. *J. Biol. Chem.* 275:585-598.
- Grahammer, F., R. Warth, J. Barhanin, M. Bleich, and M. J. Hug. 2001. The small conductance K⁺ channel, KCNQ1: expression, function, and subunit composition in murine trachea. *J. Biol. Chem.* 276:42268-42275.
- Grgic, I., I. Eichler, P. Heinau, H. Si, S. Brakemeier, J. Hoyer, and R. Kohler. 2005. Selective blockade of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25:704-709.

- Hamilton, K. L., L. Meads, and A. G. Butt. 1999. 1-EBIO stimulates Cl⁻ secretion by activating a basolateral K⁺ channel in the mouse jejunum. *Pflugers Arch.* 439:158-166.
- Heginbotham, L., Z. Lu, T. Abramson, and R. MacKinnon. 1994. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* 66:1061-1067.
- Hille, B. 2001. Ion Channels of excitable membranes. Sinauer Associates, U.S.A.
- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol* 117:500-544.
- Hummler, E., P. Barker, J. Gatzky, F. Beermann, C. Verdumo, A. Schmidt, R. Boucher, and B. C. Rossier. 1996. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat. Genet.* 12:325-328.
- Hwang, T. C. and D. N. Sheppard. 2009. Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J. Physiol* 587:2151-2161.
- Ingolfsson, H. I., R. E. Koeppe, and O. S. Andersen. 2007. Curcumin is a modulator of bilayer material properties. *B* 46:10384-10391.
- Ishii, T. M., C. Silvia, B. Hirschberg, C. T. Bond, and J. P. Adelman. 1997. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11651-11656.
- Jensen, B. S., M. Hertz, P. Christophersen, and L. S. Madsen. 2002. The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a possible target for immune suppression. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 6:623-636.
- Jensen, B. S., Str, P. Christophersen, T. D. rgensen, C. Hansen, A. Silahtaroglu, S. P. Olesen, and P. K. Ahring. 1998. Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca²⁺- activated K⁺ channel. *Am. J. Physiol.* 275:C848-C856.
- Jiang, C., W. E. Finkbeiner, J. H. Widdicombe, P. B. McCray, Jr., and S. S. Miller. 1993. Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science* 262:424-427.
- Jiang, Y. and R. MacKinnon. 2000. The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. *J. Gen. Physiol* 115:269-272.
- Joiner, W. J., R. Khanna, L. C. Schlichter, and L. K. Kaczmarek. 2001. Calmodulin regulates assembly and trafficking of SK4/IK1 Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 276:37980-37985.
- Joiner, W. J., L.-Y. Wang, M. D. Tang, and L. K. Kaczmarek. 1997. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11013-11018.

Khanna, R., M. C. Chang, W. J. Joiner, L. K. Kaczmarek, and L. C. Schlichter. 1999. hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J. Biol. Chem.* 274:14838-14849.

Klein, H., L. Garneau, U. Banderali, M. Simoes, L. Parent, and R. Sauvé. 2007. Structural determinants of the closed KCa3.1 channel pore in relation to channel gating: Results from a substituted cysteine accessibility analysis. *J. Gen. Physiol.* 129:299-315.

Klein, H., L. Garneau, N. T. Trinh, A. Prive, F. Dionne, E. Goupil, D. Thuringer, L. Parent, E. Brochiero, and R. Sauve. 2009. Inhibition of the KCa3.1 channels by AMP-activated protein kinase in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol.*

Kohler, R., H. Wulff, I. Eichler, M. Kneifel, D. Neumann, A. Knorr, I. Grgic, D. Kampfe, H. Si, J. Wibawa, R. Real, K. Borner, S. Brakemeier, H. D. Orzechowski, H. P. Reusch, M. Paul, K. G. Chandy, and J. Hoyer. 2003. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation* 108:1119-1125.

Ledoux, J., A. D. Bonev, and M. T. Nelson. 2008. Ca²⁺-activated K⁺ channels in murine endothelial cells: block by intracellular calcium and magnesium. *J. Gen. Physiol* 131:125-135.

Leroy, C., A. Dagenais, Y. Berthiaume, and E. Brochiero. 2004. Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 286:L1027-L1037.

Leroy, C., A. Prive, J. C. Bourret, Y. Berthiaume, P. Ferraro, and E. Brochiero. 2006. Regulation of ENaC and CFTR expression with K⁺ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 291:L1207-L1219.

Lewis, H. A., S. G. Buchanan, S. K. Burley, K. Connors, M. Dickey, M. Dorwart, R. Fowler, X. Gao, W. B. Guggino, W. A. Hendrickson, J. F. Hunt, M. C. Kearins, D. Lorimer, P. C. Maloney, K. W. Post, K. R. Rajashankar, M. E. Rutter, J. M. Sauder, S. Shriver, P. H. Thibodeau, P. J. Thomas, M. Zhang, X. Zhao, and S. Emtage. 2004. Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J.* 23:282-293.

Liu, J. and S. A. Siegelbaum. 2000. Change of pore helix conformational state upon opening of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 28:899-909.

Logan, J., D. Hiestand, P. Daram, Z. Huang, D. D. Muccio, J. Hartman, B. Haley, W. J. Cook, and E. J. Sorscher. 1994. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations that disrupt nucleotide binding. *J. Clin. Invest* 94:228-236.

Long, S. B., E. B. Campbell, and R. MacKinnon. 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309:897-903.

Lu, Q. and C. Miller. 1995. Silver as a probe of pore-forming residues in a potassium channel. *Science*. 268:304-307.

Mall, M., T. Gonska, J. Thomas, R. Schreiber, H. H. Seydewitz, J. Kuehr, M. Brandis, and K. Kunzelmann. 2003. Modulation of Ca²⁺-activated Cl⁻ secretion by basolateral K⁺ channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Pediatr. Res*. 53:608-618.

Mall, M., A. Wissner, R. Schreiber, J. Kuehr, H. H. Seydewitz, M. Brandis, R. Greger, and K. Kunzelmann. 2000. Role of K(V)LQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl⁽⁻⁾ secretion in human airway epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 23:283-289.

Marcus, Y. 1988. Ionic Radii in Aqueous Solutions. *Chem. Rev* 88:1475-1498.

Mauler, F., V. Hinz, E. Horvath, J. Schuhmacher, H. A. Hofmann, S. Wirtz, M. G. Hahn, and K. Urbahns. 2004. Selective intermediate-/small-conductance calcium-activated potassium channel (KCNN4) blockers are potent and effective therapeutics in experimental brain oedema and traumatic brain injury caused by acute subdural haematoma. *Eur. J. Neurosci*. 20:1761-1768.

Maylie, J., C. T. Bond, P. S. Herson, W. S. Lee, and J. P. Adelman. 2004. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin. *J. Physiol* 554:255-261.

McCann, J. D. and M. J. Welsh. 1990. Basolateral K⁺ channels in airway epithelia. II. Role in Cl⁻ secretion and evidence for two types of K⁺ channel. *Am. J. Physiol*. 258:L343-L348.

McKone, E. F., S. S. Emerson, K. L. Edwards, and M. L. Aitken. 2003. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 361:1671-1676.

Mense, M., P. Vergani, D. M. White, G. Altberg, A. C. Nairn, and D. C. Gadsby. 2006. In vivo phosphorylation of CFTR promotes formation of a nucleotide-binding domain heterodimer. *EMBO J*. 25:4728-4739.

Moran, O., L. J. Galiotta, and O. Zegarra-Moran. 2005. Binding site of activators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the nucleotide binding domains. *Cell Mol. Life Sci*. 62:446-460.

Murthy, M., N. Pedemonte, L. MacVinish, L. Galiotta, and A. Cuthbert. 2005. 4-Chlorobenzo[F]isoquinoline (CBIQ), a novel activator of CFTR and DeltaF508 CFTR. *Eur. J. Pharmacol*. 516:118-124.

Nagel, G., p. Barbry, H. Chabot, E. Brochiero, K. Hartung, and R. Grygorczyk. 2005. CFTR fails to inhibit the epithelial sodium channel ENaC expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Physiol* 564:671-682.

Nishida, M. and R. MacKinnon. 2002. Structural Basis of Inward Rectification. Cytoplasmic Pore of the G Protein-Gated Inward Rectifier GIRK1 at 1.8 Å Resolution. *Cell* 111:957-965.

- Norek, A. and J. Bal. 2006. [On the way to gene therapy in cystic fibrosis]. *Med. Wieku. Rozwoj.* 10:247-274.
- Noskov, S. Y. and B. Roux. 2006. Ion selectivity in potassium channels. *Biophys. Chem.* 2006. Dec. 1;124. (3):279. -91.
- Paradiso, A. M., C. M. Ribeiro, and R. C. Boucher. 2001. Polarized signaling via purinoceptors in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *J. Gen. Physiol* 117:53-67.
- Park, Y. B. 1994. Ion selectivity and gating of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond)* 481:555-570.
- Pasyk, E. A., S. Cipris, and E. E. Daniel. 1996. A G protein, not cyclic AMP, mediates effects of VIP on the inwardly rectifying K^{+} channels in endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276:690-696.
- Pasyk, S., C. Li, M. Ramjeesingh, and C. E. Bear. 2009. Direct interaction of a small-molecule modulator with G551D-CFTR, a cystic fibrosis-causing mutation associated with severe disease. *Biochem. J.* 418:185-190.
- Pathak, M. M., V. Yarov-Yarovoy, G. Agarwal, B. Roux, P. Barth, S. Kohout, F. Tombola, and E. Y. Isacoff. 2007. Closing in on the resting state of the Shaker K^{+} channel. *Neuron* 56:124-140.
- Pedarzani, P., J. Mosbacher, A. Rivard, L. A. Cingolani, D. Oliver, M. Stocker, J. P. Adelman, and B. Fakler. 2001. Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *J. Biol. Chem.* 276:9762-9769.
- Pilewski, J. M. and R. A. Frizzell. 1999. Role of CFTR in airway disease. *Physiol. Rev.* 79:S215-S255.
- Proks, P., J. F. Antcliff, and F. M. Ashcroft. 2003. The ligand-sensitive gate of a potassium channel lies close to the selectivity filter. *EMBO Rep.* 4:70-75.
- Puchelle, E., J. Jacquot, C. Fuchey, H. Burlet, J. M. Klossek, L. Gilain, J. M. Triglia, F. P. Thinnès, and N. Hilschmann. 1993. Studies on human porin. IX. Immunolocalization of porin and CFTR channels in human surface respiratory epithelium. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 374:297-304.
- Pusch, M. and E. E. Bittar. 2007. Chloride movements across cellular membranes. San Diego, California, USA.
- Qin, F., A. Auerbach, and F. Sachs. 1997. Maximum likelihood estimation of aggregated Markov processes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 264:375-383.
- Randrianarison, N., C. Clerici, C. Ferreira, A. Fontayne, S. Pradervand, N. Fowler-Jaeger, E. Hummler, B. C. Rossier, and C. Planes. 2008. Low expression of the beta-ENaC subunit impairs lung fluid clearance in the mouse. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 294:L409-L416.

Ribeiro, C. M., A. M. Paradiso, U. Schwab, J. Perez-Vilar, L. Jones, W. O'neal, and R. C. Boucher. 2005. Chronic airway infection/inflammation induces a Ca^{2+} -dependent hyperinflammatory response in human cystic fibrosis airway epithelia. *J. Biol. Chem.* 280:17798-17806.

Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou, and . 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-1073.

Roux, B. and R. Sauvé. 1985. A general solution to the time interval omission problem applied to single channel analysis. *Biophys. J.* 48:149-158.

Rowntree, R. K. and A. Harris. 2003. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann. Hum. Genet.* 67:471-485.

Schmitt, L. and R. Tampe. 2002. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:754-760.

Schroeder, B. C., T. Cheng, Y. N. Jan, and L. Y. Jan. 2008. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134:1019-1029.

Schultz, B. D., R. A. Frizzell, and R. J. Bridges. 1999. Rescue of dysfunctional deltaF508-CFTR chloride channel activity by IBMX. *J. Membr. Biol.* 170:51-66.

Schumacher, M. A., M. Crum, and M. C. Miller. 2004. Crystal structures of apocalmodulin and an apocalmodulin/SK potassium channel gating domain complex. *Structure. (Camb.)* 12:849-860.

Schumacher, M. A., A. F. Rivard, H. P. Bachinger, and J. P. Adelman. 2001. Structure of the gating domain of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel complexed with Ca^{2+} /calmodulin. *Nature* 410:1120-1124.

Schwab, A., J. Reinhardt, S. W. Schneider, B. Gassner, and B. Schuricht. 1999. K^{+} channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. *Cell Physiol Biochem.* 9:126-132.

Shishodia, S., T. Singh, and M. M. Chaturvedi. 2007. Modulation of transcription factors by curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595:127-148.

Si, H., I. Grgic, W. T. Heyken, T. Maier, J. Hoyer, H. P. Reusch, and R. Kohler. 2006. Mitogenic modulation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in proliferating A7r5 vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 2006. Aug. ;148. (7.):909. -17.

Sigworth, F. J., D. W. Urry, and K. U. Prasad. 1987. High-Resolution Recordings Show Rapid Current Fluctuations in Gramicidin A and Four Chemical Analogues. *Biophys. J.* 52:1055-1064.

Simoes, M., L. Garneau, H. Klein, U. Banderali, F. Hobeila, B. Roux, L. Parent, and R. Sauve. 2002. Cysteine mutagenesis and computer modeling of the S6 region of an intermediate conductance IKCa channel. *J. Gen. Physiol* 120:99-116.

- Singh, S., C. A. Syme, A. K. Singh, D. C. Devor, R. J. Bridges, L. C. Lambert, A. DeLuca, and R. A. Frizzell. 2001. Benzimidazolone Activators of Chloride Secretion: Potential Therapeutics for Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Bicarbonate and chloride secretion in Calu-3 human airway epithelial cells. *J. Gen. Physiol.* 296:600-611.
- Smith, P. L. and R. A. Frizzell. 1984. Chloride secretion by canine tracheal epithelium: IV. Basolateral membrane K permeability parallels secretion rate. *J. Membr. Biol.* 77:187-199.
- Springsteel, M. F., L. J. Galiotta, T. Ma, K. By, G. O. Berger, H. Yang, C. W. Dicus, W. Choung, C. Quan, A. A. Shelat, R. K. Guy, A. S. Verkman, M. J. Kurth, and M. H. Nantz. 2003. Benzoflavone activators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: towards a pharmacophore model for the nucleotide-binding domain. *Bioorg. Med. Chem.* 11:4113-4120.
- Srivastava, S., Z. Li, K. Ko, P. Choudhury, M. Albaqumi, A. K. Johnson, Y. Yan, J. M. Backer, D. Unutmaz, W. A. Coetzee, and E. Y. Skolnik. 2006. Histidine phosphorylation of the potassium channel KCa3.1 by nucleoside diphosphate kinase B is required for activation of KCa3.1 and CD4 T cells. *Mol Cell.* 24:665-675.
- Stocker, M. 2004. Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:758-770.
- Stutts, M. J., C. M. Canessa, J. C. Olsen, M. Hamrick, J. A. Cohn, B. C. Rossier, and R. C. Boucher. 1995. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269:847-850.
- Syme, C. A., K. L. Hamilton, H. M. Jones, A. C. Gerlach, L. Giltinan, G. D. Papworth, S. C. Watkins, N. A. Bradbury, and D. C. Devor. 2003. Trafficking of the Ca²⁺-activated K⁺ channel, hK1, is dependent upon a C-terminal leucine zipper. *J. Biol. Chem.* 278:8476-8486.
- Szkotak, A. J., M. Murthy, L. J. MacVinish, M. Duszyk, and A. W. Cuthbert. 2004. 4-Chloro-benzo[F]isoquinoline (CBIQ) activates CFTR chloride channels and KCNN4 potassium channels in Calu-3 human airway epithelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 142:531-542.
- Tang, L., M. Fatehi, and P. Linsdell. 2009. Mechanism of direct bicarbonate transport by the CFTR anion channel. *J. Cyst. Fibros.* 8:115-121.
- Tharp, D. L., B. R. Wamhoff, H. Wulff, G. Raman, A. Cheong, and D. K. Bowles. 2008. Local delivery of the KCa3.1 blocker, TRAM-34, prevents acute angioplasty-induced coronary smooth muscle phenotypic modulation and limits stenosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:1084-1089.
- Thompson-Vest, N., Y. Shimizu, B. Hunne, and J. B. Furness. 2006. The distribution of intermediate-conductance, calcium-activated, potassium (IK) channels in epithelial cells. *J. Anat.* 208:219-229.

- Toyama, K., H. Wulff, K. G. Chandy, P. Azam, G. Raman, T. Saito, Y. Fujiwara, D. L. Mattson, S. Das, J. E. Melvin, P. F. Pratt, O. A. Hatoum, D. D. Gutterman, D. R. Harder, and H. MIURA. 2008. The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 contributes to atherogenesis in mice and humans. *J. Clin. Invest* 118:3025-3037.
- Trinh, N. T., A. Prive, E. Maille, J. Noel, and E. Brochiero. 2008. EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 2008. Aug. 29.
- Tummler, B., T. Dork, P. Kubesch, R. Fislage, N. Kalin, T. Neumann, U. Wulbrand, B. Wulf, G. Steinkamp, and H. H. von der. 1993. Cystic fibrosis: the impact of analytical technology for genotype-phenotype studies. *Clin. Chim. Acta* 217:23-28.
- Van Goor, F., K. S. Straley, D. Cao, J. Gonzalez, S. Hadida, A. Hazlewood, J. Joubran, T. Knapp, L. R. Makings, M. Miller, T. Neuberger, E. Olson, V. Panchenko, J. Rader, A. Singh, J. H. Stack, R. Tung, P. D. Grootenhuys, and P. Negulescu. 2006. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 290:L1117-L1130.
- Vergani, P., S. W. Lockless, A. C. Nairn, and D. C. Gadsby. 2005. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* 433:876-880.
- Wang, R., Y. Liu, R. Sauvé, and M. B. Anand-Srivastava. 1998. Hyperosmolality-induced abnormal patterns of calcium mobilization in smooth muscle cells from non-diabetic and diabetic rats. *Mol. Cell Biochem.* 183:79-85.
- Warth, R. 2003. Potassium channels in epithelial transport. *Pflugers Arch.* 446:505-513.
- Warth, R., N. Riedemann, M. Bleich, W. Van Driessche, A. E. Busch, and R. Greger. 1996. The cAMP-regulated and 293B-inhibited K⁺ conductance of rat colonic crypt base cells. *Pflugers Arch.* 432:81-88.
- Wei, A. D., G. A. Gutman, R. Aldrich, K. G. Chandy, S. Grissmer, and H. Wulff. 2005. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 57:463-472.
- Wellhauser, L., P. K. Chiaw, S. Pasyk, C. Li, M. Ramjeesingh, and C. E. Bear. 2009. A small-molecule modulator interacts directly with deltaPhe508-CFTR to modify its ATPase activity and conformational stability. *Mol. Pharmacol.* 75:1430-1438.
- Welsh, M. J., M. P. Anderson, D. P. Rich, H. A. Berger, G. M. Denning, L. S. Ostedgaard, D. N. Sheppard, S. H. Cheng, R. J. Gregory, and A. E. Smith. 1992. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: A chloride channel with novel regulation. *Neuron* 8:821-829.

- Welsh, M. J. and A. E. Smith. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73:1251-1254.
- Wilson, S. M., S. G. Brown, N. McTavish, R. P. McNeill, E. M. Husband, S. K. Inglis, R. E. Olver, and M. T. Clunes. 2006. Expression of intermediate-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel (KCNN4) in H441 human distal airway epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 291:L957-L965.
- Wissmann, R., W. Bildl, H. Neumann, A. F. Rivard, N. Klocker, D. Weitz, U. Schulte, J. P. Adelman, D. Bentrop, and B. Fakler. 2001. A helical region in the C-terminus of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels controls assembly with apo-calmodulin. *J. Biol. Chem.*
- Wulff, H., M. J. Miller, W. Hansel, S. Grissmer, M. D. Cahalan, and K. G. Chandy. 2000. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:8151-8156.
- Yamaguchi, S., Y. Okamura, T. Nagao, and S. chi-Akahane. 2000. Serine residue in the III S5-S6 linker of the L-type Ca²⁺ channel alpha 1C subunit is the critical determinant of the action of dihydropyridine Ca²⁺ channel agonists. *J. Biol. Chem.* 275:41504-41511.
- Yang, H., A. A. Shelat, R. K. Guy, V. S. Gopinath, T. Ma, K. Du, G. L. Lukacs, A. Taddei, C. Folli, N. Pedemonte, L. J. Galletta, and A. S. Verkman. 2003. Nanomolar affinity small molecule correctors of defective Delta F508-CFTR chloride channel gating. *J. Biol. Chem.* 278:35079-35085.
- Zhang, L., W. Zou, S. S. Zhou, and D. D. Chen. 2009. Potassium channels and proliferation and migration of breast cancer cells. *Sheng Li Xue. Bao.* 61:15-20.
- Zhou, Z., X. Wang, H. Y. Liu, X. Zou, M. Li, and T. C. Hwang. 2006. The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *J. Gen. Physiol* 128:413-422.

7 ANNEXE

Développement des équations décrivant notre modèle

Soit $P = [C_0, C_1, C_2, O]$ le vecteur décrivant les probabilités d'états du système.

Alors, la matrice Q représentant les taux de transitions d'états est définie telle que $d(P)dt = P Q$

$$d(P)dt = [-C_0 k_1 + C_1 k_4 \quad C_0 k_1 + C_1 (-k_2 - k_4) + C_2 k_3 \quad C_1 k_2 + C_2 (-k_3 - \alpha) + O \beta \quad C_2 \alpha - O \beta]$$

où

$$Q = \begin{bmatrix} -k_1 & k_1 & 0 & 0 \\ k_4 & -k_2 - k_4 & k_2 & 0 \\ 0 & k_3 & -k_3 - \alpha & \alpha \\ 0 & 0 & \beta & -\beta \end{bmatrix}$$

Afin de décrire l'évolution des variations de courant au moment où l'on retire le Ca^{2+} libre de la solution, nous devons solutionner $P_O(t)$. $P_O(t)$, selon nos conditions initiales, est influencé par les canaux dans l'état conducteur à $t=0$ et ceux qui ont déjà deux atomes de Ca^{2+} liés à la CaM, mais qui sont dans l'état non conducteur C_2 . Les canaux dans les états C_1 et C_0 peuvent pas passer à l'état conducteur O dans les conditions sans Ca^{2+} , et ne contribuent donc pas à $P_O(t)$. On a donc deux cas à traiter, et la solution est de la forme :

$$[P_{C_0}, P_{C_1}, P_{C_2}, P_O](t, Ca^{2+} \rightarrow 0) = [0, 0, P_{C_2}, P_O](t=0, Ca^{2+} \rightarrow \infty) e^{QT}$$

L'expression e^{QT} peut, dans notre cas, s'exprimer sous la forme suivante (Roux and Sauvé, 1985).

$$e^{Qt} = \frac{-1}{2\pi} \int e^{-iut} (Q + iuI)^{-1} du$$

Les termes (3,4) et (4,4) de notre matrice $M^{-1} = (Q + iuI)^{-1}$ qui multiplie l'exponentielle dans l'intégrale correspondent à des termes de $P_O(t)$.

On peut négliger les termes en K_1 et en K_2 , qui seront nuls si $Ca^{2+} \rightarrow 0$ et simplifier

$$\text{terme}_{44} = \frac{+i u - (k_3 + \alpha)}{(iu)^2 - i u (\alpha + \beta + k_3) + k_3 \beta} \quad \text{terme}_{34} = \frac{-\alpha}{(iu)^2 - i u (\alpha + \beta + k_3) + k_3 \beta}$$

Posons

- $A_{44} = -(k_3 + \alpha)$
- $A_{34} = -\alpha$
- $-\omega_1 - \omega_2 = -(\alpha + \beta + k_3)$
- $\omega_1 \omega_2 = k_3 \beta$

Alors le terme au dénominateur peut se réécrire en fonction de ω_1 et ω_2 :

$$(iu)^2 - iu(\alpha + \beta + k_3) + k_3\beta = (iu - \omega_1)(iu - \omega_2)$$

et donc

$$\text{terme}_{44} = \frac{i u + A_{44}}{(iu - \omega_1)(iu - \omega_2)} \quad \text{terme}_{34} = \frac{A_{34}}{(iu - \omega_1)(iu - \omega_2)}$$

$$\text{terme}_{44} = \frac{\omega_1 + A_{44}}{(iu - \omega_1)(\omega_1 - \omega_2)} + \frac{\omega_2 + A_{44}}{(iu - \omega_2)(\omega_2 - \omega_1)} \quad \text{terme}_{34} = \frac{A_{34}}{(iu - \omega_1)(\omega_1 - \omega_2)} + \frac{A_{34}}{(iu - \omega_2)(\omega_2 - \omega_1)}$$

On a alors

$$P_O(t, Ca^{2+} \rightarrow 0) = [0, 0, P_{c2}, P_O](t=0) \left[\frac{-1}{2\pi} \int e^{-iut} (Q + iuI)^{-1} du \right]$$

$$P_O(t, Ca^{2+} \rightarrow 0) = P_O(t=0) \frac{-1}{2\pi} \int e^{iut} \text{terme}_{44} + P_{c2}(t=0) \frac{-1}{2\pi} \int e^{iut} \text{terme}_{34}$$

Le terme qui multiplie $P_O(t=0, Ca^{2+} \rightarrow \infty)$ devient :

$$\frac{-1}{2\pi} \int e^{-iut} \frac{\omega_1 + A_{44}}{(iu - \omega_1)(\omega_1 - \omega_2)} du - \frac{1}{2\pi} \int e^{-iut} \frac{\omega_2 + A_{44}}{(iu - \omega_2)(\omega_2 - \omega_1)} du$$

Le terme qui multiplie $P_{c2}(t=0, Ca^{2+} \rightarrow \infty)$ devient :

$$\frac{-1}{2\pi} \int e^{-iut} \frac{A_{34}}{(iu - \omega_1)(\omega_1 - \omega_2)} du - \frac{1}{2\pi} \int e^{-iut} \frac{A_{34}}{(iu - \omega_2)(\omega_2 - \omega_1)} du$$

On trouve la solution de chaque intégrale avec le théorème des résidus.
Les pôles des fonctions sont à $u = -i\omega_1$ ou à $u = -i\omega_2$, selon le cas.

La solution des intégrales est

$$P_O(t, Ca^{2+} \rightarrow 0) = P_{C2}(t=0) \frac{A_{34}}{\omega_2 - \omega_1} [e^{-\omega_2 t} - e^{-\omega_1 t}] + P_O(t=0) \frac{1}{(\omega_2 - \omega_1)} [(\omega_2 + A_{44}) e^{-\omega_2 t} - (\omega_1 + A_{44}) e^{-\omega_1 t}]$$

Comme on a $\omega_1 + \omega_2 = (\alpha + \beta + k_3)$, si $k_3 \ll \alpha + \beta$, on peut poser

$$\omega_1 \approx \alpha + \beta \quad \omega_2 \approx \frac{k_3 \beta}{\alpha + \beta} \quad \text{où } \omega_2 \ll \omega_1 \text{ donc } e^{-\omega_1 t} \ll e^{-\omega_2 t}$$

$$P_O(t, Ca^{2+} \rightarrow 0) \approx P_{C2}(t=0) \frac{A_{34}}{\omega_2 - \omega_1} [e^{-\omega_2 t}] + P_O(t=0) \frac{1}{(\omega_2 - \omega_1)} [(\omega_2 + A_{44}) e^{-\omega_2 t}]$$

$$\text{Nous avons démontré que, quand } Ca^{2+} \rightarrow \infty \quad P_O \approx \frac{\alpha}{\beta + \alpha}$$

$$\text{Similairement, quand } Ca^{2+} \rightarrow \infty \quad P_{C2} \approx \frac{\beta}{\alpha + \beta}$$

On obtient donc

$$P_O(t, Ca^{2+} \rightarrow 0) = \frac{\beta A_{34}}{(\omega_2 - \omega_1)(\alpha + \beta)} [e^{-\omega_2 t}] + \frac{\alpha}{(\omega_2 - \omega_1)(\beta + \alpha)} [(\omega_2 + A_{44}) e^{-\omega_2 t}]$$

Comme nous étudions un homotétramère, on élève à la puissance 4^e l'expression trouvée pour un monomère.

$$P_{O \text{ tétramère}}(t, Ca^{2+} \rightarrow 0) = (e^{-\omega_2 t})^4 \left[\frac{\beta A_{34}}{(\omega_2 - \omega_1)(\alpha + \beta)} + \frac{(\omega_2 + A_{44}) \alpha}{(\omega_2 - \omega_1)(\beta + \alpha)} \right]^4$$

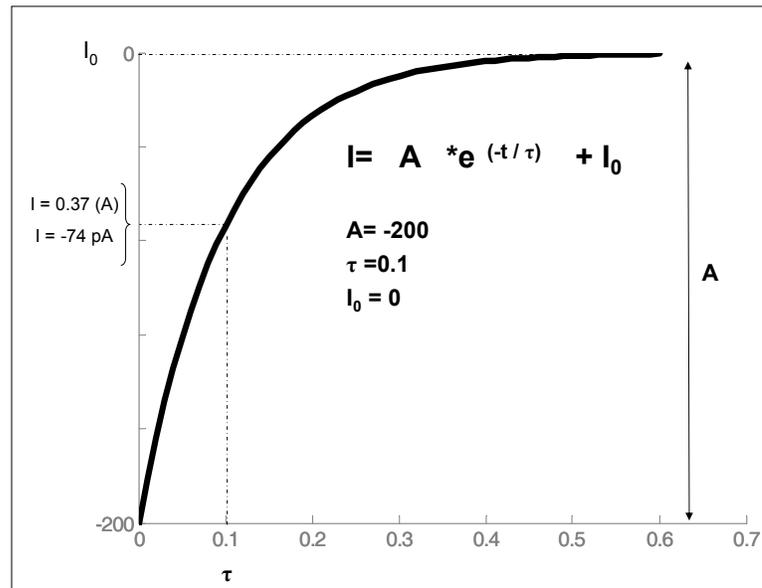
$$P_O(t, Ca^{2+} \rightarrow 0) = A (e^{-\lambda t}) + I_0$$

où I_0 correspond à P_O quand $t \rightarrow \infty$, soit zéro, dans notre cas.
et où $\lambda = 4 \omega_2$ correspond au taux de décroissance de la fonction $P_O(t)$

La constante de temps (temps de vie moyen) d'une fonction de décroissance exponentielle est notée τ et est définie par $\tau = \lambda^{-1}$. Dans ce cas, on obtient

$$\tau^{-1} = (4 \omega_2) \approx \frac{4 k_3 \beta}{\alpha + \beta} \quad \text{pour} \quad P_O(t, Ca^{2+} \rightarrow 0) = A (e^{-t/\tau}) + I_0$$

Soit N canaux générant un courant $I(t)$. Alors, $I(t)$ est décrit par $P_o(t) \cdot N \cdot i$, i étant le courant conduit par chaque canal qui se trouve dans l'état conducteur. La fonction $I(t)$ est donc elle aussi de la forme $A \cdot \exp(-t/\tau) + I_0$. Lors du retrait du Ca^{2+} , les N canaux se ferment un à un pour ne plus laisser passer de courant à $t \rightarrow \infty$. ($I_0=0$).



Pour $I_0=0$ et dans le cas d'un courant entrant (à $t=0$, $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \infty$) de 200 pA , on a $A = -200$. Typiquement, pour KCa3.1 , la constante de temps pour laquelle $I=0.37 \text{ A}$ est d'un peu moins de 100 ms . Posons ici $\tau = 0.1$. Nous avons alors une équation de la forme $I(t) = -200 \cdot e^{-(t/0.1)}$ pour décrire la décroissance exponentielle de notre courant lors du retrait de Ca^{2+} .

8 Publications

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

A. Longpré-Lauzon, L. Garneau, H. Klein and R. Sauvé. Molecular action of CFTR potentiators on the KCa3.1 channel.

Symposium annuel du GÉPROM. Montréal. 21-22 mai 2008.

A. Longpré-Lauzon, L. Garneau, H. Klein and R. Sauvé. Molecular action of CFTR potentiators on the KCa3.1 channel.

Biophysical Society 53rd Annual Meeting. Boston, Massachusetts, 28 février au 4 mars 2009

A. Longpré-Lauzon, L. Garneau, H. Klein and R. Sauvé. Molecular action of CFTR potentiators on the KCa3.1 channel.

Journée Scientifique du GÉPROM. Montréal. 27 mai 2009

ARTICLE

Garneau, L., H. Klein, U. Banderali, A. Longpre-Lauzon, L. Parent, and R.

Sauve. Hydrophobic Interactions as Key Determinants to the KCa3.1 Channel

Closed Configuration: An Analysis of KCa3.1 Mutants Constitutively Active in Zero

Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* 2009. 284:389-403.