

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**Étude du couplage entre les sous-unités du canal potassique
KcsA par des mesures de spectroscopie de fluorescence en
canal unitaire**

par

Hugo McGuire

Département de Physique
Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences
en physique
option biophysique et physiologie moléculaire

Mai 2009

© Hugo McGuire 2009



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude du couplage entre les sous-unités du canal potassique
KcsA par des mesures de spectroscopie de fluorescence en
canal unitaire**

présenté par :
Hugo McGuire

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Yves Lapointe, président-rapporteur
Dr. Rikard Blunck, directeur de recherche
Dr. Lucie Parent, membre du jury

Résumé

Le canal KcsA a été largement étudié pour comprendre la conduction des ions K^+ dans les canaux ioniques. Il a été postulé que l'ouverture du pore de conduction au « bundle crossing » des quatre hélices TM2 doit se produire avant la conduction ionique. Il n'est pas clair si ce processus s'effectue en une étape coopérative, tel qu'il est suggéré pour les canaux potassiques dépendants du voltage, ou si les sous-unités peuvent agir de façon indépendante. Nous présentons ici une étude du couplage entre les quatre sous-unités en utilisant la spectroscopie de fluorescence en canaux unitaires. Blunck et al. (2006) ont précédemment montré qu'il est possible de suivre le mouvement des hélices TM2. Ce suivi est réalisé par un marquage au C-terminus de chacune des hélices TM2 avec un fluorophore sensible à son environnement local. Nous introduisons donc ces canaux KcsA purifiés et marqués dans une bicouche lipidique supportée afin d'observer leurs changements temporels de fluorescence avec une caméra EMCCD. Les fluctuations de l'intensité de la fluorescence avant le photoblanchiment sont interprétées comme étant la conséquence du mouvement des quatre sous-unités. La probabilité d'ouverture associée à ces traces de fluorescence suit la dépendance au pH connue de KcsA et les valeurs moyennes sont similaires à celles mesurées par le courant en bicouche lipidique planaire. Nous observons des mouvements simultanés des quatre sous-unités, mais aussi des mouvements n'impliquant qu'une seule sous-unité. Afin de quantifier le couplage entre les sous-unités, nous analysons les tracés temporels de fluorescence avec un modèle de Markov caché (« hidden Markov model ») qui considère le photoblanchiment et le couplage énergétique entre les sous-unités. Nous avons trouvé une énergie moyenne de couplage d'environ 2.5 kT et il semble que cette valeur soit un peu plus grande à faible pH.

Mots-clés : biophysique, « gating », canal ionique, molécule unitaire, spectroscopie de fluorescence, KcsA

Abstract

KcsA channel has been extensively studied to understand K^+ permeation through ion channels. It has been postulated that the opening of the conducting pore at the bundle crossing of the four TM2 helices has to occur before ion conduction. It remains unclear whether this process happens in one cooperative step, as suggested for voltage-gated channels, or if the subunits can act independently. Here, we present a study of the subunits' cooperativity using single channel fluorescence spectroscopy. Blunck & al. (2006) have shown previously that we can monitor the movement of the TM2. This is done by labeling them at the C-terminus of TM2 with an environment sensitive dye. We introduce purified and labeled KcsA channels into supported lipid bilayer and image their fluorescence time course with an EMCCD camera. Fluctuations in the fluorescence intensity prior to photobleaching are interpreted as the movement of the four subunits. The associated open probability follow the KcsA pH dependence, and mean values similar to our results in planar lipid bilayer are observed. We observe occurrence of simultaneous gating of all four subunits, but also independent gating of single subunits. We analyze the time traces with a hidden Markov model, considering photobleaching and coupling energy between subunits, in order to quantify the coupling energy. We found a coupling energy with a mean value of about 2.5 kT, which seems to be slightly higher at low pH.

Keywords : biophysics, gating, ion channel, single-molecule, fluorescence spectroscopy, KcsA

Table des matières

1. Introduction	1
1.1. Les canaux potassiques	3
1.1.1. Les canaux potassiques dépendants du voltage	6
1.1.2. Le canal potassique bactérien de <i>Streptomyces lividans</i> : KcsA	9
1.1.2.1. Le filtre de sélectivité	13
1.1.2.2. La région du « helical bundle crossing »	16
1.2. Spectroscopie de fluorescence avec KcsA	18
1.2.1. Principes de fluorescence	18
1.2.1.1. Fluorescence vs Phosphorescence	21
1.2.2. Les fluorophores	23
1.2.2.1. Le fluorophore tétraméthylrhodamine (TMR)	26
1.2.3. Suivre le mouvement des sous-unités de KcsA avec le fluorophore tétraméthylrhodamine-maleimide (TMRM)	28
1.3. Le modèle de Markov caché (Hidden Markov Model)	30
1.4. Introduction à l'électrophysiologie en voltage imposé	32
1.5. Objectifs	34
1.5.1. Objectifs spécifiques	35
2. Méthodologie	35
2.1. Avant-propos	35
2.2. Purification et reconstitution des protéines	36
2.3. Mesures de fluorescence en bicouche supportée	39
2.4. Bicouche lipidique plane pour mesures d'électrophysiologie	40
3. Résultats	43
3.1. Article	43
3.1.1. Abstract	44
3.1.2. Introduction	44
3.1.3. Methods	46

3.1.3.1. Protein purification and reconstitution.....	46
3.1.3.2. Fluorescence measurements of supported bilayer...	47
3.1.3.3. Data analysis.....	48
3.1.3.4. Design of hidden Markov model with bleaching and coupling.....	49
3.1.4. Results.....	50
3.1.4.1. Fluorescence represents the subunits of KcsA.....	50
3.1.4.2. Fluctuation changes show characteristics of KcsA gating.....	53
3.1.4.3. Simultaneous movement of KcsA subunits.....	58
3.1.4.4. Kinetic analysis of subunit movement.....	59
3.1.4.5. Cooperative gating events.....	60
3.1.4.6. Gating is not fluorophore specific.....	61
3.1.5. Discussion.....	62
3.1.6. Conclusion.....	64
3.1.7. Acknowledgements.....	65
3.1.8. Supporting information.....	65
3.1.8.1. Robustness of fit.....	65
3.1.8.2. Calculation of double-jump probability.....	68
3.1.9. References.....	72
3.2. Résultats non publiés.....	76
4. Discussion.....	78
4.1. Coopérativité ou indépendance : retour sur les résultats.....	78
4.2. Énergie de couplage entre les sous-unités.....	79
4.3. Les traces de fluorescence.....	84
4.4. Modèle coopératif.....	86
Courbes de probabilité d'ouverture.....	87
Comment améliorer le système.....	89
5. Conclusion.....	90
6. Bibliographie.....	91
7. Annexe I.....	99

Liste des tableaux

Chapitre 3

Table III.I: Comparison of bleaching rates from exponential fit and QUB.....	71
--	----

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1. Illustration de la barrière diélectrique d'une membrane lipidique.....	3
Figure 1.2. Schéma de l'ouverture du pore au « helical bundle crossing »	4
Figure 1.3. Illustration du pore pour trois canaux potassiques cristallisés.....	5
Figure 1.4. Canal potassique dépendant du voltage de Shaker.....	6
Figure 1.5. Modèle du mouvement des régions sensibles au voltage.....	8
Figure 1.6. Structure cristalline du canal KcsA.....	10
Figure 1.7. Illustration du mouvement de rotation des hélices TM2 lors de l'ouverture du canal KcsA.....	11
Figure 1.8. Courbes de probabilité d'ouverture.....	13
Figure 1.9. Filtre de sélectivité du canal KcsA.....	14
Figure 1.10. Illustration du modèle de liaison dans le filtre de sélectivité entre l'acide aminé E71 et D80.....	15
Figure 1.11. Probabilité d'ouverture en fonction du pH déterminé en canal unitaire.....	16
Figure 1.12. Modèle de stabilisation de l'état fermé de Thompson et al. (2008)	17
Figure 1.13. Diagramme de Jablonski pour la fluorescence.....	19
Figure 1.14. Exemple d'un spectre d'absorption et d'émission de fluorescence.....	20

Figure 1.15. Diagramme de Jablonski incluant la phosphorescence.....	22
Figure 1.16. Couleurs d'émission de fluorescence pour différents nombres de cycles aromatiques liés.....	24
Figure 1.17. Spectre d'émission et d'absorption du fluorophore TMR.....	27
Figure 1.18. TMR lié à une cystéine.....	28
Figure 1.19. Résultats principaux de Blunck et al. (2006)	29
Figure 1.20. Illustration des positions de marquage du fluorophore TMR dans le canal KcsA.....	30
Figure 1.21. Modèle de Markov.....	31
Figure 1.22. Électrophysiologie en voltage imposé.....	33

Chapitre 2

Figure 2.1. Montage expérimental des mesures de fluorescence en bicouche supportée.....	40
Figure 2.2. Montage expérimental pour les mesures d'électrophysiologie en bicouche lipidique planaire.....	40

Chapitre 3

Figure 3.1. Single channel imaging.....	51
Figure 3.2. Subunit counting.....	53
Figure 3.3. Open probability determined directly from fluorescence time traces.....	55
Figure 3.4. Markov model fitting of KcsA fluorescence time traces.....	56
Figure 3.5. Robustness of fit.....	67
Figure 3.6. Calculation of double jump probabilities.....	69
Figure 3.7. Results from ATTO-565M imaging.....	70
Figure 3.8. KcsA dans une bicouche lipidique planaire.....	76

Chapitre 4

Figure 4.1. Schématisation du modèle indépendant et du modèle coopératif.....	78
Figure 4.2. Simulations du modèle coopératif pour différentes valeurs de couplage.....	80
Figure 4.3. Sous-conductance.....	82
Figure 4.4. Nouveau modèle de stabilisation de l'état ouvert.....	83

Liste des abréviations

-A-

A : Acide aminé alanine

ATP : Adénoside triphosphate

-D-

D : Acide aminé aspartate

DDM : n-Dodecyl β -D-maltoside (détergent)

DPhPC : Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (lipide synthétique)

-E-

EMCCD : Electron Multiplying Charged Coupled Device (type de détecteur de photon)

-F-

FRET : « Förster resonance Energy Transfer »

-G-

G : Acide aminé glycine

-H-

HMM : « Hidden Markov Model »

-I-

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

-K-

K^+ : L'ion potassium

-L-

L : Acide Aminé Leucine

-P-

POPC : 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (lipide)

-Q-

Q : Acide aminé glutamine

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr. Rikard Blunck, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Son support, son enseignement, ses judicieux conseils et sa rigueur ont grandement contribué à mon évolution en tant que scientifique.

Je voudrais aussi remercier les autres membres du laboratoire pour les discussions, scientifiques ou non, toujours très importantes. Je remercie notamment Élise Faure et Mireille Marsolais, sans qui mes mutants de KcsA auraient dû s'armer de patience. Leur aide en biologie moléculaire m'a été extrêmement précieuse tout au long de ma maîtrise.

Je tiens aussi à souligner l'excellent travail technique de Michel Brunette, qui, avec sa dextérité manuelle, sa minutie et son perfectionnisme nous construit des outils de laboratoire de très haute qualité.

Je remercie aussi les membres du GEPRON, professeurs et étudiants, pour leur gentillesse qui crée un environnement de recherche convivial et très agréable. Je tiens à souligner l'apport des professeurs de ce groupe pour leur enseignement essentiel. Je souhaite particulièrement témoigner ma gratitude aux docteurs Jean-Yves Lapointe et Lucie Parent pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

1. Introduction

Il existe une propriété commune aux cellules vivantes : elles possèdent toutes un potentiel électrique membranaire. Ce potentiel est en effet nécessaire à leur survie, puisqu'il constitue une réserve d'énergie permettant le transport de plusieurs molécules ainsi que la production d'ATP dans la cellule (Alberts *et al.*, 2002). La différence de concentration ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule doit ainsi être régulée afin que les fonctions cellulaires demeurent intactes. Il va donc de soi que des ions doivent inévitablement passer à travers une membrane plasmique qui est physiquement très défavorable par sa nature même au passage des ions (Parsegian, 1969). C'est pourquoi la cellule produit des protéines membranaires qui servent de système stable pour le passage de certains ions. Il existe notamment des canaux ioniques et aussi des pompes électrogéniques utilisant de l'ATP. Ces dernières établissent le gradient ionique de part et d'autre de la membrane cellulaire et permettent de retrouver l'équilibre normal des concentrations suite à une perturbation. Quant aux canaux ioniques, ils sont impliqués principalement dans la signalisation électrique du système nerveux central, la régulation de la sécrétion d'hormones dans le système sanguin, le contrôle sur le système musculaire et du rythme cardiaque (Widmaier *et al.*, 2005). Plus particulièrement, les canaux sélectifs aux ions K^+ jouent un rôle de première importance dans les cellules animales puisque le potentiel membranaire dépend principalement de ces derniers (Alberts *et al.*, 2002). Aussi, les canaux potassiques dépendants du voltage sont à la base de nombreuses études en sciences neurologiques, puisqu'ils sont impliqués dans le potentiel d'action en contrôlant la repolarisation des cellules excitables (comme les neurones). Ils gouvernent d'ailleurs la forme de ce potentiel d'action. Les canaux potassiques sont de plus une cible importante pour plusieurs médicaments. Une investigation rigoureuse sur le fonctionnement de ces protéines est donc fondamentale.

Il ne suffit pas de connaître uniquement la fonction des canaux potassiques pour bien comprendre ces protéines complexes formées par à peu près tout organisme vivant. Une étude structure-fonction de celles-ci est essentielle pour bien expliquer les

phénomènes physiologiques observés. Si la structure du canal est établie, une profonde analyse de celle-ci permet de relier une fonction ou une caractéristique à la conformation possible du canal. Plusieurs principes et techniques physiques viennent alors contribuer à ce type d'étude, que ce soit pour établir quelques éléments de structure, pour détecter des mouvements à l'intérieur de cette structure ou pour analyser sa dynamique. On y retrouve notamment les principes de résonance magnétique nucléaire (RMN), l'analyse de structure cristalline, la microscopie à force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy) et la spectroscopie de fluorescence.

La question abordée dans le cadre de cette étude est celle de la coopérativité entre les sous-unités des canaux potassiques (Voir section 1.1). Nous désirons donc mieux comprendre les changements de conformation qui mènent à l'ouverture ou à la fermeture du canal. Il est évident que pour analyser sa dynamique, le mouvement des sous-unités doit être détectable. Dans ce cas, la spectroscopie de fluorescence devient un outil de mesure de premier choix. Cette technique, lorsque utilisée astucieusement, peut permettre d'associer une conformation du canal (nombre de sous-unités ouvertes ou fermées) à une intensité de fluorescence. On peut donc étudier temporellement les changements de conformation. L'analyse de la dynamique par des modèles cinétiques peut ensuite faire ressortir plusieurs paramètres d'éventuelles interactions entre les sous-unités.

Il sera tout d'abord question d'une revue de la littérature permettant une introduction au sujet de recherche. Une discussion sur les canaux potassiques initie cette revue, suivie par le système modèle utilisé : le canal bactérien KcsA de *Streptomyces lividans*. On abordera aussi quelques bases de fluorescence ainsi que les modèles cinétiques de Markov caché (« Hidden Markov Model »). Finalement, une brève entrée en matière à l'électrophysiologie en voltage imposé terminera l'introduction. Ensuite, le travail de recherche effectué est abordé par une section « Objectifs » afin de mettre en contexte les sections subséquentes.

1.1. Les canaux potassiques

Les canaux potassiques font partie de la famille des canaux ioniques, ces derniers permettant le passage des ions à travers la membrane cellulaire. Ce sont des protéines membranaires pouvant réduire la barrière d'énergie du passage de l'ion K^+ à un niveau très faible. La présence d'un ion dans une membrane lipidique est normalement très défavorisée étant donné l'énorme barrière d'énergie créée par un environnement hydrophobe au centre de la membrane (Parsegian, 1969). Pour visualiser ce phénomène, la figure 1.1 illustre la barrière d'énergie à franchir pour un ion K^+ dans une membrane lipidique ainsi que dans un pore aqueux traversant la membrane et dont le diamètre est de 3 Å.

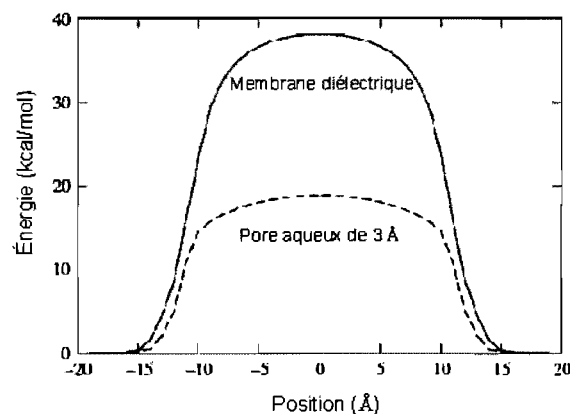


Figure 1.1. Illustration de la barrière diélectrique d'une membrane lipidique. Le trait continu fait référence au passage d'un ion K^+ à travers la membrane, alors que le trait pointillé illustre ce même passage, mais dans un pore aqueux dont le diamètre est de 3 Å. Adapté de Roux et al. (2000)

Les canaux potassiques sont des tétramères, donc composés de quatre sous-unités, qui peuvent être identiques (homotétramères) ou différentes (hétérotétramères). Ils sont alignés dans l'espace de façon symétrique, tel que le montre la figure 1.4. à la section suivante. Chaque sous-unité au niveau du pore est formée de deux hélices transmembranaires et il peut exister des régions extérieures au pore. Par exemple, les sous-unités des canaux potassiques dépendants du voltage sont composées de six hélices transmembranaires, dont deux forment la région du pore et dont quatre

forment la région sensible au voltage (Jiang *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2005). Il est démontré que le pore du canal doit s'ouvrir afin de permettre le passage aux ions K^+ (Liu *et al.*, 2001; Perozo *et al.*, 1999). La conduction peut en fait être bloquée à deux régions du pore : au « helical bundle crossing » et au filtre de sélectivité. Le « helical bundle crossing » est au croisement des hélices transmembranaires et est en fait une barrière dont le petit diamètre en position fermée ($\leq 4 \text{ \AA}$) ne permet pas le passage aux ions K^+ (Doyle *et al.*, 1998; Long *et al.*, 2005; Meuser *et al.*, 1999; Perozo *et al.*, 1998; Uysal *et al.*, 2009). Un mouvement d'ouverture (Figure 1.2) se produisant ainsi dans cette région peut permettre la conduction des ions K^+ , à condition que le filtre de sélectivité ne soit pas inactivé (Blunck *et al.*, 2006; Chakrapani *et al.*, 2007a; Chakrapani *et al.*, 2007b; Cordero-Morales *et al.*, 2006b). Le filtre de sélectivité peut donc agir comme barrière avec une configuration moléculaire particulière ne permettant pas le passage des ions K^+ (Cordero-Morales *et al.*, 2006b).

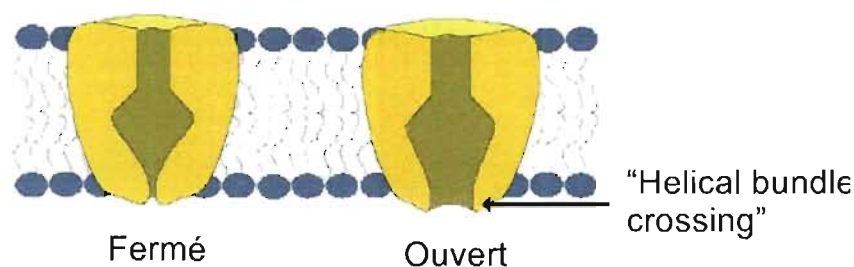


Figure 1.2. Schéma de l'ouverture du pore au « helical bundle crossing ». Deux canaux potassiques apparaissent, dont un est fermé au « helical bundle crossing » et dont l'autre est ouvert.

Les canaux potassiques ont tous la propriété d'être très sélectif à l'ion K^+ : environ 50 à 10 000 fois plus que l'ion Na^+ (Doyle *et al.*, 1998; Heginbotham *et al.*, 1994; Heginbotham *et al.*, 1998), bien que ce dernier soit plus petit. Ce n'est donc pas le diamètre du pore qui produit cette sélectivité évidente. Bien que leur sélectivité soit très grande, la conduction s'effectue près de la limite de diffusion. La sélectivité aurait pu être bien expliquée par une forte interaction moléculaire entre l'ion potassium et le canal, formant un site de liaison énergétiquement très confortable pour l'ion, mais la conductance unitaire élevée de ce canal en exclut la possibilité (Alberts *et al.*, 2002). Une conduction beaucoup plus lente aurait été observée dans le

dernier cas. Le paradoxe fut mieux compris une fois la première structure cristalline d'un canal potassique établie (Doyle *et al.*, 1998). Le phénomène sera expliqué dans la section sur le canal potassique KcsA (section 1.1.2.).

Il existe quatre grandes familles de canaux potassiques : ceux dépendants du voltage (K_v), ceux activés par le calcium (K_{ca}), les canaux à rectification entrante (K_{ir}) et les canaux au domaine du pore agissant en tandem (K_{2p}). Même divisés en seulement 4 familles, il existe une grande diversité fonctionnelle et structurale chez les canaux potassiques, particulièrement pour ceux dépendants du voltage (Hille, 2001). Malgré tout, il existe beaucoup de similitudes entre eux. La séquence en acides aminés des différents canaux potassiques indique plusieurs ressemblances quant à leur formation en hélices alpha. La structure principale où on retrouve le plus de similarités est le pore de conduction (Figure 1.3) (Gulbis & Doyle, 2004). La conservation de structure au niveau du pore indique en fait que le mécanisme de conduction des ions K^+ dans les canaux ioniques doit être sensiblement le même (MacKinnon *et al.*, 1998). Le pore de conduction contient entre autres le filtre de sélectivité, où subsiste une région clé bien conservée : la séquence en acides aminés TTVGYG (Doyle *et al.*, 1998; Heginbotham *et al.*, 1992). Le passage des ions K^+ dans le filtre de sélectivité pour différents canaux potassiques serait donc possiblement identique.

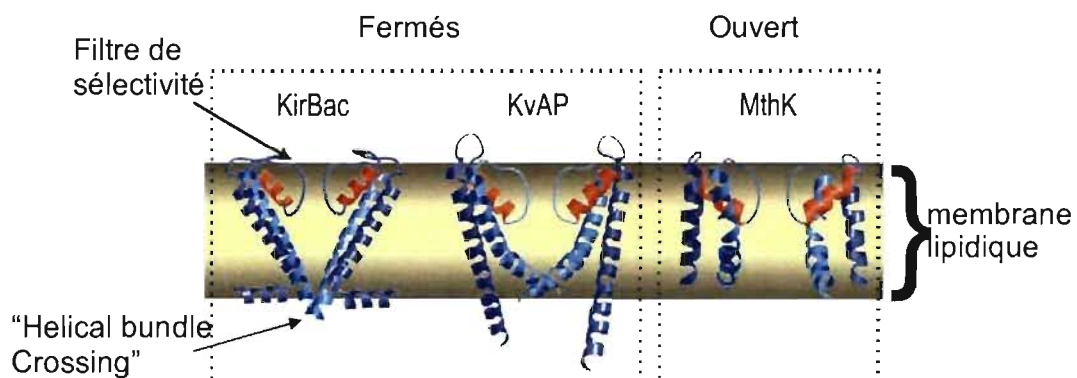


Figure 1.3. Illustration du pore pour trois canaux potassiques cristallisés. KirBac et KvAP ont été cristallisés dans la conformation fermée, alors que MthK l'a été dans la conformation ouverte. Le filtre de sélectivité et le « helical bundle crossing » sont indiqués. Adapté de Gulbis & Doyle (2004)

1.1.1. Les canaux potassiques dépendants du voltage

Les canaux dépendants du voltage soulèvent un intérêt particulier en étant entre autres impliqués dans les potentiels d'action (Hodgkin & Huxley, 1952), servant à la signalisation électrique. Ces canaux sont sensibles aux variations de potentiel membranaire et peuvent s'ouvrir ou se fermer dépendant de la valeur de ce potentiel électrique (Hille, 2001). Le domaine sensible au voltage de ces canaux est indiqué par les hélices S1 à S4, tandis que la région du pore est indiquée par les hélices S5 et S6 (Figure 1.4).

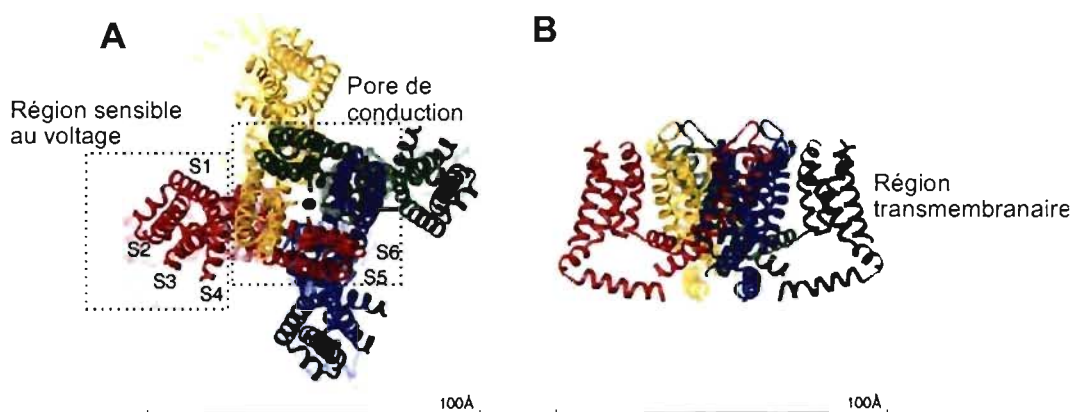


Figure 1.4. Canal potassique dépendant du voltage de *Shaker*. A : Le pore de conduction est formé par les hélices S5 et S6, tandis que chacune des quatre régions sensibles au voltage est formée par les hélices S1 à S4. B : Région transmembranaire du canal. Adapté de Chanda et al. (2005).

La sensibilité au potentiel électrique provient principalement de la présence d'acides aminés chargés localisés dans l'hélice S4 (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Seoh *et al.*, 1996). Cette hélice se compose en fait d'acides aminés chargés positivement séparés par des acides aminés hydrophobes (Hoshi *et al.*, 1994; Noda *et al.*, 1984). Quatre arginines placées périodiquement à chaque troisième résidu sont principalement reconnues pour être importantes relativement à cette sensibilité au potentiel électrique (Chanda *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2003). Suite à un changement de potentiel permettant l'ouverture ou la fermeture du canal, les charges de ces acides aminés se déplacent dans la membrane.

Le mouvement de ces charges provoque des courants transitoires directement observables en bloquant le pore de conduction (Armstrong & Bezanilla, 1974; Armstrong & Bezanilla, 1973; Keynes & Rojas, 1974). En détectant ces courants, il est possible d'extraire davantage d'information sur la cinétique d'un canal que si on ne pouvait détecter seulement le courant ionique (ions traversant le pore de conduction). Par exemple, Zagotta et al. (1994a) ont modélisé la cinétique d'ouverture et de fermeture du canal potassique de *Shaker* et ont simulé des courants reproduisant les résultats expérimentaux de courant transitoire et de courant macroscopique (Hoshi et al., 1994; Zagotta et al., 1994b) en considérant que chacune des régions sensibles au voltage des quatre sous-unités s'activent en deux étapes, dont la seconde est couplée avec la première. L'ouverture du pore serait la dernière étape suivant l'activation des régions sensibles au voltage. De plus, cette ouverture serait un processus hautement coopératif où les quatre sous-unités s'ouvrent rapidement en une seule étape. Les résultats expérimentaux ne pouvaient pas être expliqués par un modèle simple où chacune des quatre régions sensibles au voltage s'activent en une seule étape. Ce dernier modèle traduit bien l'hypothèse de départ de Hodgkin et Huxley où quatre particules chargées indépendantes doivent se déplacer à travers la membrane afin de permettre l'activation du canal (Hodgkin & Huxley, 1952). Bien que le modèle ait évolué avec les années, il est admis que les quatre régions sensibles au voltage doivent se déplacer avant l'ouverture du pore de conduction (Bezanilla & Stefani, 1994; Sigworth, 1994; Zagotta et al., 1994a).

Mais de quelle façon les régions sensibles au voltage se déplacent dans la membrane et quel est l'impact de ce déplacement sur l'ouverture du pore ? Tout d'abord, c'est en 1996 que la première démonstration expérimentale du mouvement dépendant du voltage de l'hélice S4 fut effectuée. Mannuzzu a utilisé des marqueurs fluorescents à des sites spécifiques (position 356 et 359 sur la chaîne d'acides aminés du canal potassique de *Shaker*) pour détecter le mouvement de l'hélice S4 avec des changements d'intensité de fluorescence (Mannuzzu et al., 1996). Ce mouvement serait par contre limité dans la membrane, selon une étude de fluorescence plus

poussée de Chanda et al. (2005). Il y aurait en fait un changement d'inclinaison d'environ 45° entre l'état fermé et l'état ouvert, mais avec un déplacement perpendiculaire à la membrane de moins de 2\AA (Figure 1.5B : hélice en bleu). Ainsi, le fait que des charges se déplacent dans le champ électrique membranaire n'implique pas que l'hélice doit bouger beaucoup dans la membrane. Bien qu'il y ait eu une certaine controverse faisant suite au modèle du « paddle » de Mackinnon (Jiang *et al.*, 2003) (Figure 1.5.A), celui-ci impliquant un large mouvement de l'hélice dans la membrane, il est maintenant démontré que ce modèle n'est pas énergétiquement fonctionnel. Le modèle généralement accepté, construit à partir d'expériences sur le canal *Shaker*, décrit un déplacement des charges par un mouvement des chaînes latérales des acides aminés chargés (arginines) (Figure 1.5.B). Les hélices du domaine sensible au potentiel changent un peu d'inclinaison, mais le mouvement reste léger par rapport au mouvement des charges (Chanda *et al.*, 2005).

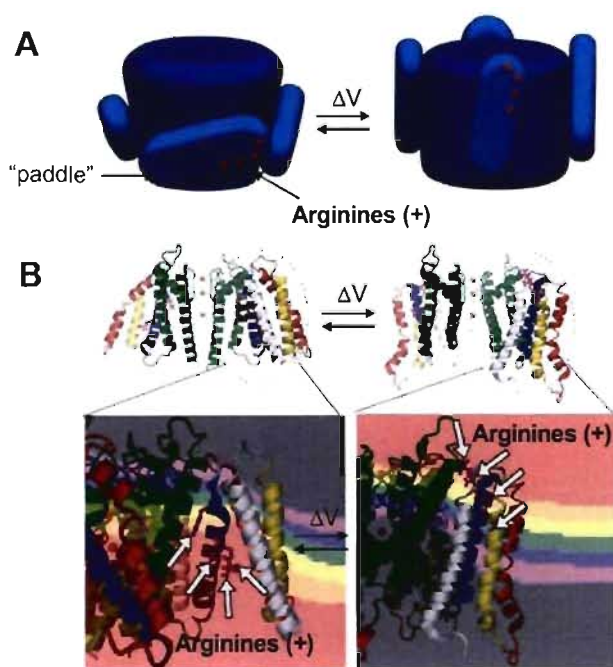


Figure 1.5. Modèle du mouvement des régions sensibles au voltage. **A** : Illustration du modèle du « paddle ». L'hélice S4 peut bouger transversalement dans la membrane. **B** : Illustration du modèle de déplacement des charges de Chanda et al. (2005). Les radicaux des arginines se déplacent dans la membrane. Les deux figures sont adaptés de Chanda et al. (2005).

Faisant suite aux mouvements des régions sensibles au voltage, il a récemment été démontré que l'ouverture des quatre sous-unités dans la région du pore s'effectue de manière coopérative, selon un processus simultané (Ledwell & Aldrich, 1999; Pathak *et al.*, 2005). Cette ouverture serait en fait influencée par le mouvement des hélices S4 apparemment par un couplage entre ces dernières et les hélices S6 du pore (Pathak *et al.*, 2005; Smith-Maxwell *et al.*, 1998a). Il se peut donc que ce type d'ouverture coopérative soit causé uniquement par la présence des régions sensibles au potentiel, qui sont liées au pore au niveau du « helical bundle crossing » et qui adoptent une conformation particulière dépendant du potentiel. Il semble plausible que ces régions puissent en fait accélérer l'ouverture du pore.

1.1.2 Le canal potassique bactérien de *Streptomyces lividans* : KcsA

Pour étudier la coopérativité entre les sous-unités, une structure la plus simple possible permet d'éviter plusieurs erreurs provenant d'interactions autres que celles entre les sous-unités. On cherche donc un canal sans aucune structure liée au pore, et c'est pourquoi nous avons choisi de se pencher sur le canal potassique bactérien de *Streptomyces lividans*, KcsA (Doyle *et al.*, 1998). C'est un canal dont la structure n'est composée que du pore et dont l'ouverture au « helical bundle crossing » est contrôlée par le pH du côté intracellulaire (Figure 1.6). De plus, la similarité évoquée précédemment des différents canaux potassiques au niveau du pore rend possible l'utilisation d'un canal procaryote plutôt qu'un canal eucaryote. Le canal KcsA devient alors un modèle tout à fait approprié pour cette étude. Son étude pourrait aussi possiblement amener plusieurs pistes de recherche concernant plusieurs types de canaux ioniques (Roux *et al.*, 2000). De plus, son expression ainsi que sa purification sont généralement bien établies.

C'est seulement en 1998 qu'on a pu connaître la structure 3D du canal potassique KcsA de *Streptomyces lividans* par diffraction aux rayons-X (Doyle *et al.*, 1998). C'est en fait la première fois qu'on a pu déterminer la structure d'un canal potassique

à l'aide de cette même méthode. C'est une technique précise permettant une résolution de l'ordre du Angstrom, mais aussi très difficile à réaliser dans le cas des protéines membranaires, puisqu'elles ne sont pas stables en milieu aqueux. Cette structure établie permet de mieux comprendre la conduction des ions K^+ dans les canaux ioniques.

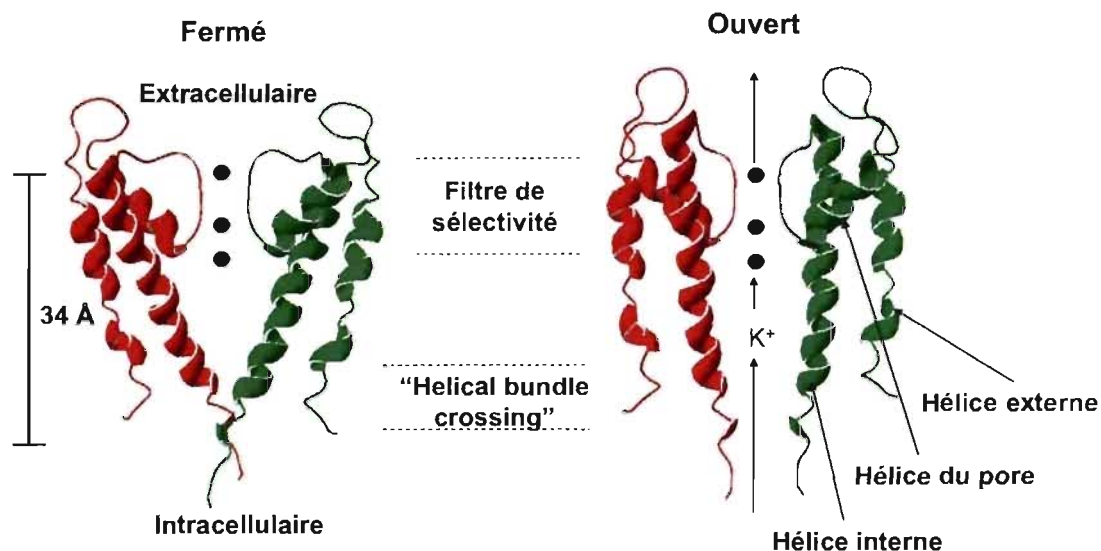


Figure 1.6. Structure cristalline du canal KcsA. Représentation transversale de deux des quatre sous-unités de KcsA. Seulement les acides aminés 23 à 119 sont illustrés. Puisque le canal a été cristallisé dans la conformation fermée (gauche), la conformation ouverte (droite) n'est qu'un modèle. Construit à partir de la structure 1bl8.pdb de la cristallisation de KcsA en 1998.

La figure 1.6. montre deux des quatre sous-unités de la structure du canal selon un plan transversal. Chacune des sous-unités contient 160 acides aminés, mais la structure révèle seulement les résidus 23 à 119. Une sous-unité se replie en trois hélices alpha : une hélice transmembranaire interne, une hélice transmembranaire externe et une dernière nommée l'hélice du pore. La forme de la cavité interne est moulée par les hélices transmembranaires, qui sont placés en forme de « teepee » inversé lorsque le canal est fermé (Doyle *et al.*, 1998).

Suite à la cristallisation du canal, plusieurs changements dans la structure servant à la conduction des ions K^+ dans le canal ont été décrits par le groupe de Perozo en utilisant les techniques de spectroscopie de « site-directed spin labeling » et de

« electron paramagnetic resonance (EPR) ». Un mouvement des deux hélices transmembranaires pouvant ouvrir le canal dans la région intracellulaire a été détecté, en plus d'un léger mouvement de l'hélice du pore (Perozo *et al.*, 1999). Aussi, les mouvements d'ouverture et de fermeture des deux hélices transmembranaires impliqueraient la rotation de l'hélice interne (TM2) (Figure 1.7.) (Perozo *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2008).



Figure 1.7. Illustration du mouvement de rotation des hélices TM2 lors de l'ouverture du canal KcsA. Construit à partir de la structure ibl8.pdb.

En modélisant la structure du canal dans son environnement naturel, il a été calculé que si les ions peuvent pénétrer le canal, ils sont toujours suffisamment stables pour pouvoir traverser la membrane sans grand obstacle (si le canal est ouvert et actif) (Allen *et al.*, 2000; Roux & MacKinnon, 1999). En plus de l'hydratation de l'ion dans la cavité interne, la stabilisation électrostatique par les hélices du pore permet la présence d'un cation au centre de la membrane dans le canal (Roux & MacKinnon, 1999).

Avant la cristallisation de KcsA, le paradoxe entre la grande conduction et la forte sélectivité était toujours incompris. Comment un ion plus petit que le potassium, comme le sodium, ne peut pas passer à travers le canal, alors que l'ion K^+ traverse à une vitesse proche de sa limite de diffusion. Le mécanisme pour y arriver apparaît maintenant clair aux yeux des biophysiciens. Du côté extracellulaire, les ions doivent passer dans la région du filtre de sélectivité. Dans celui-ci, les groupements

carbonyles des acides aminés de la séquence clé TTVGYG seraient alignés de sorte à stabiliser les ions K^+ , mais pas les ions plus petits comme le Na^+ ou plus gros comme le Ca^{2+} (Noskov *et al.*, 2004). En solution, les ions potassium sont stabilisés par les molécules d'eau (qui sont polaires). Dans le filtre de sélectivité, les ions se déshydratent, mais il doit y avoir un moyen de garder les ions stabilisés par une partie polaire ou chargée pour éviter de créer une barrière d'énergie. Les groupements carbonyles de ces acides aminés jouent ce rôle pour l'ion K^+ , offrant juste l'espace nécessaire pour remplacer l'hydratation des ions K^+ . L'ion Na^+ est trop petit et n'est pas bien stabilisé. Les ions divalents sont aussi mal stabilisés n'étant pas optimisés pour passer à travers ce type de canal. Puisque l'ion K^+ est stabilisé tout au long du canal, contrairement aux ions Na^+ , la barrière d'énergie est à peu près inexistante relativement à celle de la membrane cellulaire. C'est la façon utilisée par la nature pour conserver une grande sélectivité, tout en maintenant une conduction près de la limite de diffusion libre dans un milieu aqueux.

Un des aspects les plus importants du canal KcsA est qu'il soit activé à des valeurs de pH acides ($\sim < \text{pH } 4.5$) (Figure 1.8.A) (Cuello *et al.*, 1998; Heginbotham *et al.*, 1999). Il doit donc y avoir présence d'environ 1000 fois plus de protons par rapport à la concentration à pH physiologique (~ 7.4) afin que le canal puisse être ouvert. Par analogie avec les canaux dépendants du voltage, qui sont ouverts au « helical bundle crossing » suite au mouvement de charges des régions sensibles au voltage, le canal KcsA est ouvert suite à la protonation de certains résidus clés. Comme il sera discuté plus loin (section 1.1.2.2.), il doit y avoir un changement de charge sur des acides aminés entre deux valeurs de pH différentes pour que de nouveaux liens se forment ou se brisent plus facilement. Aussi, même si KcsA n'est pas proprement dit « dépendant du voltage » puisqu'il n'y a pas le domaine sensible au potentiel (hélices S1 à S4), le canal démontre tout de même une certaine dépendance au voltage, étant beaucoup plus activé lorsque le potentiel intracellulaire est positif relativement au potentiel extracellulaire (Figure 1.8.B) (Heginbotham *et al.*, 1999; Meuser *et al.*, 1999). Cette dépendance au voltage semble être amené par un site particulier dans le filtre de sélectivité (Cordero-Morales *et al.*, 2006a). Autre aspect intéressant,

l'activité du canal semble réagir à la présence de phospholipides chargés négativement (Heginbotham *et al.*, 1998). Sans aucune charge dans les lipides, le canal paraît être moins actif, même s'il peut conduire. Un mélange de lipides compétent serait composé d'environ 25% de lipides chargés négativement et 75% de lipides neutres.

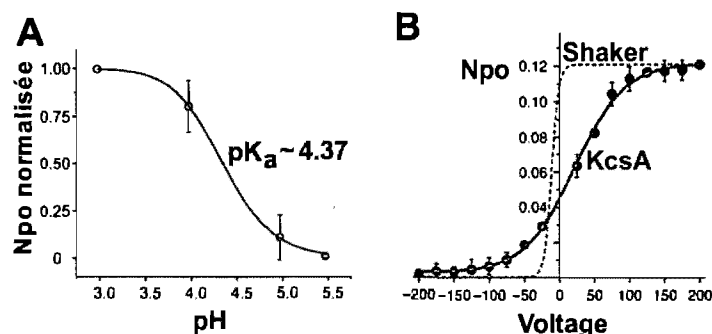


Figure 1.8. Courbes de probabilité d'ouverture. **A** : Probabilité d'ouverture normalisée sur un ensemble de canaux KcsA pour différentes valeurs de pH. Adapté de Chakrapani *et al.* (2007b). **B** : Probabilité d'ouverture normalisée sur un ensemble de canaux KcsA selon le potentiel membranaire. À titre comparatif, la dépendance au voltage du canal *Shaker* est normalisée par rapport à la valeur maximale obtenue de KcsA. Adapté de Cordero-Morales *et al.* (2006a).

1.1.2.1. Le filtre de sélectivité

La dynamique moléculaire et la cristallisation ont pu révéler la présence de 4 sites de liaisons des ions dans le filtre de sélectivité : S1, S2, S3, S4 (Figure 1.9.). Il y aurait seulement deux ions dans le filtre de sélectivité, et donc une alternance rapide (pratiquement aucune barrière d'énergie) entre une liaison aux sites S1 et S3 ; S2 et S4 (Allen *et al.*, 2000). La conduction serait ainsi possible dès l'arrivée d'un 3^e ion K⁺ dans le filtre de sélectivité : celui-ci pousserait le premier ion K⁺ à sortir par répulsion de charge. La barrière d'énergie non significative semble aussi bien expliquer la conduction rapide (Allen *et al.*, 2000; Noskov *et al.*, 2004; Roux, 2005).

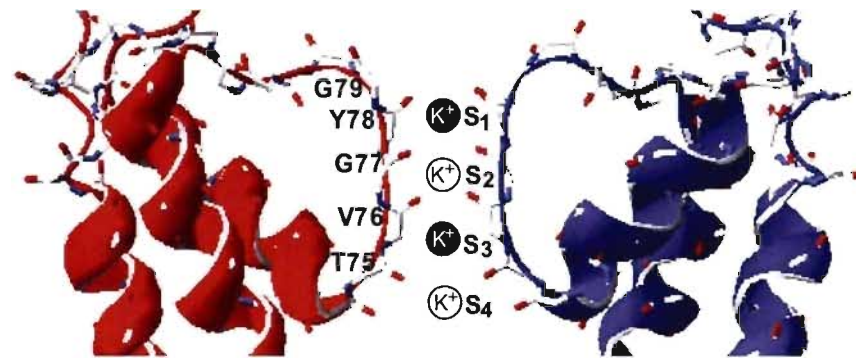


Figure 1.9. Filtre de sélectivité du canal KcsA. On y voit la séquence clé TVGYG ainsi que les sites de liaison des ions K^+ . Construit à partir du fichier .pdb 1bl8.

Le filtre de sélectivité mesure environ 12 Å avec un rayon moyen de 1.4 Å et une distance d'environ 7.5 Å sépare les deux ions présents soit aux sites S1 et S3 ou soit aux sites S2 et S4 (Doyle *et al.*, 1998). On a mentionné que le filtre de sélectivité a une certaine dépendance au voltage. Selon Cordero-Morales *et al.*, celle-ci serait causée par un glutamate (chargé négativement) en position 71 de chacune des quatre sous-unités. Il semble que cet acide aminé (E71) serait partiellement ionisé et pourrait interagir avec un autre acide aminé chargé négativement en position 80 (une aspartate : D80) via un proton logé entre les deux (Figure 1.10.) (Cordero-Morales *et al.*, 2006a). L'interaction déstabiliserait la conformation du filtre de sélectivité de sorte à le rendre inactif (non conducteur). La « liaison » des deux acides aminés via le proton semble déplacer l'acide aminé D80 de sorte que les groupements carbonyles du filtre de sélectivité ne puissent plus stabiliser un ion déshydraté. Un potentiel positif intracellulaire pourrait faire bouger le glutamate 71 de manière à réduire la probabilité d'interaction avec le filtre de sélectivité: un potentiel positif serait donc favorisé, mais le processus d'inactivation est seulement réduit sans disparaître complètement (Cordero-Morales *et al.*, 2006a).

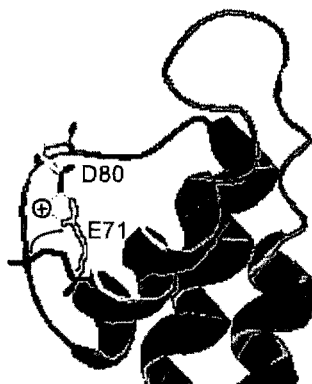


Figure 1.10. Illustration du modèle de liaison dans le filtre de sélectivité entre l'acide aminé E71 et D80. L'acide aminé E71 bouge et peut se lier à l'acide aminé D80.

Ainsi, tel que mentionné plus tôt, puisque le filtre de sélectivité peut s'inactiver, il constitue non seulement un élément clé pour contrôler la sélectivité ionique, mais agit en plus en tant que barrière à la conduction : c'est une des deux barrières du canal. Cette barrière dépendrait donc du voltage et pourrait empêcher la conduction (en inactivant le filtre de sélectivité), même si le canal était physiquement ouvert au « helical bundle crossing » selon le pH (Blunck *et al.*, 2006). Il est suggéré que ce même processus d'inactivation serait en fait relié à l'inactivation « C-type » que l'on retrouve notamment chez les canaux dépendants du voltage (Cordero-Morales *et al.*, 2006b).

L'inactivation du canal a été décrite comme étant un processus rapide suivant l'ouverture ou l'activation du canal (Chakrapani *et al.*, 2007a; Chakrapani *et al.*, 2007b; Cordero-Morales *et al.*, 2006b). Il semblerait donc que l'ouverture du canal puisse engendrer un mouvement dans le filtre de sélectivité favorisant un lien entre E71 et D80 et engendrer ainsi l'inactivation du canal. Si on pouvait enlever la possibilité d'interaction entre ces deux acides aminés, on pourrait ainsi retirer le processus d'inactivation et la dépendance au voltage. Cordero-Morales *et al.* a construit le mutant E71A, remplaçant le glutamate chargé négativement par une alanine non chargé et non polaire, de sorte à réaliser un mutant qui semble ne pas s'inactiver (Chakrapani *et al.*, 2007a; Chakrapani *et al.*, 2007b; Cordero-Morales *et al.*, 2006b). La mutation E71A serait donc en mesure d'enlever une barrière à la

conduction. Ainsi, si on mesure la probabilité d'ouverture de ce canal muté, on obtient seulement la valeur reliée au « helical bundle crossing » du canal. Le canal semble être ouvert à peu près toujours à pH 3 et à peu près toujours fermé à pH 7, selon des mesures prises en canaux unitaires en bicouche lipidique planaire (Figure 1.11.) (Thompson *et al.*, 2008).

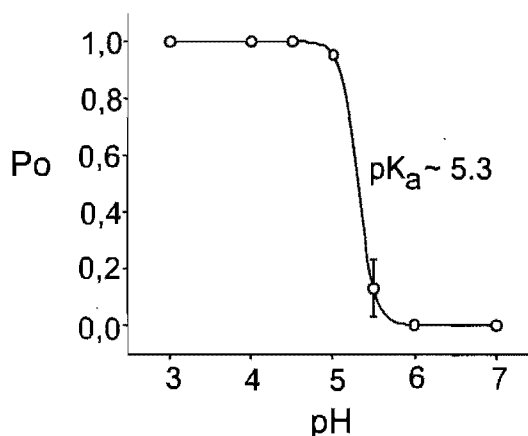


Figure 1.11. Probabilité d'ouverture en fonction du pH déterminé en canal unitaire. Adapté de Thompson *et al.* (2008).

1.1.2.2. La région du « helical bundle crossing »

C'est dans cette région, qui se retrouve à l'intérieur de la cellule, qu'on a les « détecteurs » de pH permettant l'ouverture intracellulaire. Il a été démontré (Thompson *et al.*, 2008) que les acides aminés suivants sont essentiels à la dépendance au pH : l'histidine en position 25, les acides glutamiques en position 118 et 120. Selon l'étude de Thompson *et al.*, la formation de ponts hydrogènes entre les acides glutamiques (E118/E120) et les arginine en position 121 et 122, stabiliserait le canal fermé (Figure 1.12). Au contraire, la protonation de l'histidine déstabiliserait ces liaisons, ce qui augmenterait la probabilité d'ouverture à des pH acides, d'où la dépendance au pH. Cette étude de Thompson *et al.* est basée sur la mesure de la probabilité d'ouverture en canal unitaire sur différents mutants de KcsA. Chacun d'eux possède la mutation E71A pour éviter d'impliquer le filtre de sélectivité dans le

calcul de la probabilité d'ouverture. Ils ont pu construire un mutant de KcsA (H25R/E118A/E120A) qui est toujours ouvert jusqu'à pH 9 et ainsi établir un modèle des interactions entre les sous-unités.

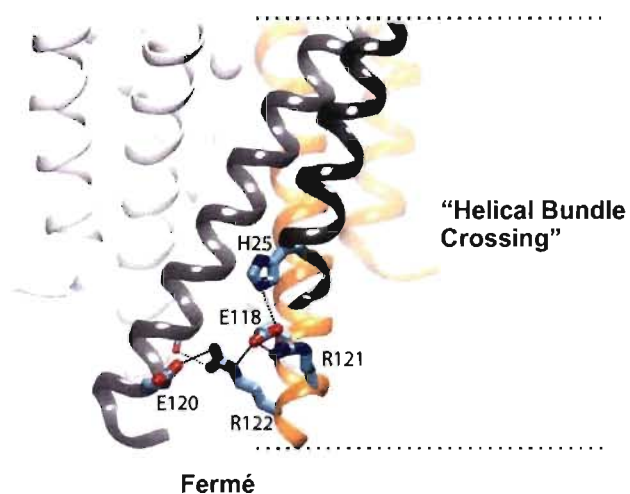


Figure 1.12. Modèle de stabilisation de l'état fermé de Thompson et al. (2008). Adapté de Thompson et al. (2008).

L'ouverture du « helical bundle crossing » engendre un large mouvement des sous-unités. Il est souvent appelé la première barrière (« gate ») au passage des ions potassiques. Cette région semble se déplacer d'au moins 9 Å (Cordero-Morales *et al.*, 2006b), passant d'une conformation empêchant le passage des ions K⁺ (diamètre ≤ 4 Å) à une autre permettant la conduction. Récemment, des résultats de diffraction en solution aux rayons X et aux neutrons ont montré une ouverture totale de 20 à 30 Å (Zimmer *et al.*, 2006). Ces résultats sont de plus en accord avec des simulations numériques de type Monte Carlo (Miloshevsky & Jordan, 2007).

Étant donné ce grand déplacement moléculaire, plusieurs techniques peuvent détecter ce changement. Il existe entre autres certaines techniques de fluorescences pouvant apporter plusieurs informations concernant la conformation et la cinétique du canal.

1.2. Spectroscopie de fluorescence avec KcsA

L'imagerie de systèmes biologiques fait souvent appel à des principes de fluorescence. Ces derniers peuvent permettre de localiser certaines molécules spécifiques, d'observer un changement de conformation, de suivre un processus de diffusion, etc. Dans le cas présent, la fluorescence est utilisée afin de détecter des changements de conformation (ouverture et fermeture au « helical bundle crossing ») de la protéine KcsA. Ces changements de conformation amènent des changements dans l'environnement local d'un fluorophore attaché dans la région du « helical bundle crossing ». Pour bien comprendre l'ensemble des expériences effectuées avec KcsA, il est d'abord essentiel d'introduire les bases de la fluorescence. On parlera ensuite des fluorophores pour comprendre leurs caractéristiques et finalement d'une application pour le canal KcsA.

1.2.1. Principes de fluorescence

La fluorescence se produit suite à une excitation dans les niveaux électroniques d'une molécule : si elle se trouve dans un niveau électronique excité et qu'elle retourne au niveau fondamental, celle-ci peut émettre un photon. La fluorescence est souvent décrite par le diagramme de Jablonski (Figure 1.13.), où les processus y sont illustrés en terme d'énergie. Le diagramme montre différents niveaux d'énergie électroniques qui sont impliqués : S_0 , S_1 et S_2 . Pour chacun de ces niveaux, des sous-niveaux d'énergie vibrationnelle de la molécule apparaissent, ceux-ci étant indiqués par 0, 1, 2.

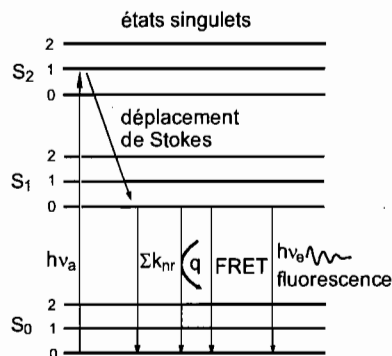


Figure 1.13. Diagramme de Jablonski pour la fluorescence. On y indique l'absorption, suivie du déplacement de Stokes et d'une émission radiative ou non radiative. En vert : excitation électronique suite à l'absorption d'un photon ($h\nu_a$). En noir : Relaxation de S_2 à S_1 (processus non radiatif); désexcitation non radiative de S_1 à S_0 (le processus de FRET est indiqué, ainsi que le « quenching » de collision (q) et la somme des autres processus non radiatifs ($\sum k_{nr}$)). En rouge : désexcitation émettant un photon ($h\nu_e$).

Une orbitale est excitée par absorption d'un photon, et cette absorption peut amener cette orbitale à des niveaux d'énergie supérieurs au premier état excité. Selon le principe de Frank-Condon, la transition va s'effectuer très rapidement (après environ 10^{-15} s). Pendant ce temps, le noyau atomique ne peut se déplacer que très peu, et les transitions verticales illustrées à la figure 1.13 indiquent que ce processus est donc quasi instantané. L'énergie de l'électron va ensuite généralement relaxer jusqu'à l'état vibrationnel de base de la molécule du premier état excité S_1 en atteignant l'équilibre thermique de cet état excité. Ce processus est indiqué par la conversion interne et celui-ci se produit aussi rapidement, en environ 10^{-12} s. Suite à ces événements, l'électron va demeurer dans l'état excité pour un temps donné en moyenne par son temps de vie ($\sim 1-10$ ns). C'est le temps moyen entre l'excitation de l'électron et le retour à l'état fondamental. Le retour à l'état fondamental permet l'émission d'un photon et se fait généralement vers un état vibrationnel supérieur pour finalement rejoindre l'équilibre thermique en retournant à l'état vibrationnel de base (Lakowicz, 2006).

En pratique, une désexcitation jusqu'à l'état fondamental n'implique pas toujours l'émission d'un photon. Il peut aussi se produire des transitions non radiatives. Il peut

s'agir par exemple de « quenching » de collision, référant à une collision qui récupère l'énergie de l'état excité, ou de transfert d'énergie à une autre molécule fluorescente. Le diagramme de Jablonski décrit ces transitions.

À partir du diagramme de Jablonski, il est aussi possible d'illustrer certaines caractéristiques importantes. À cause de la conversion interne jusqu'au niveau vibrationnel de base de l'état excité S_1 (0 de S_1), l'émission de fluorescence est moins énergétique que l'absorption. C'est ce qu'on appelle le déplacement de Stoke, où le spectre d'émission est déplacé vers des longueurs d'onde plus grandes que le spectre d'absorption (Figure 1.14.).

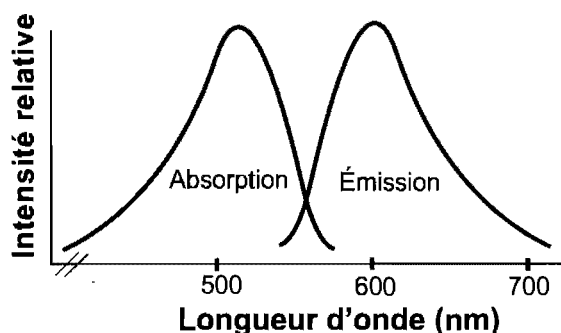


Figure 1.14. Exemple d'un spectre d'absorption et d'émission de fluorescence.

Le spectre d'absorption et d'émission de fluorescence montre un caractère de symétrie (Figure 1.14). C'est en fait généralement le cas. C'est la conséquence de la symétrie en énergie entre l'absorption et l'émission. L'absorption se fait à des niveaux vibrationnels supérieurs, alors que l'émission, généralement à partir du niveau vibrationnel de base, rejoint des niveaux vibrationnels supérieurs aussi (Principe de Frank-Condon).

Un autre processus peut déplacer le spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées. Il s'agit de la relaxation du solvant, dont l'effet est d'autant plus grand dans un solvant polaire. Lorsqu'un fluorophore est excité, la distribution électronique se modifie et le dipôle associé au fluorophore s'en retrouve réorienté, en plus d'avoir une amplitude augmentée. Si le solvant est polaire, les dipôles du solvant s'aligneront

avec celui du fluorophore de sorte à minimiser l'énergie. Ce phénomène a pour conséquence de réduire l'énergie associée à l'état excité et l'émission devient alors aussi moins énergétique, déplaçant ainsi le spectre vers des longueurs d'onde plus grandes. Par exemple, c'est ce qui se produit lorsqu'un fluorophore passe d'un environnement comme l'huile, qui n'est pas polaire, à un autre comme l'eau, qui est polaire. Ainsi, un déplacement d'un fluorophore logé dans la membrane lipidique, où l'environnement ressemble à celui de l'huile, vers un environnement aqueux sera lié à un déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus grandes.

1.2.1.1 Fluorescence vs Phosphorescence

Bien que les principes discutés précédemment décrivent le comportement général de la fluorescence, ils ne sont pas uniques à ce phénomène. La fluorescence est un cas particulier de la luminescence, tout comme la phosphorescence. La distinction entre la fluorescence et la phosphorescence réside dans la nature de l'état excité (Lakowicz, 2006). Dans le cas de la fluorescence, l'état excité est singulet, alors que pour la phosphorescence, l'état excité est triplet. La mécanique quantique décrit la différence entre les deux types d'état. Cette description provient de la combinaison du spin de deux électrons. Un électron a un spin de $\frac{1}{2}$, mais la combinaison produit soit un spin nul (état singulet), soit un spin de 1 (état triplet) (Griffiths, 2004). Dans une molécule, si deux électrons formant une orbitale à l'état fondamental sont en paires ($\uparrow\downarrow$), le spin correspondant est nul. Par contre, si un des deux électrons est excité vers une orbitale de plus haute énergie, celui-ci peut se réorienter de sorte que la combinaison des spins soit de 1 ($\uparrow\uparrow$ ou $\downarrow\downarrow$). Dans le cas de la fluorescence, le spin de l'électron excité est opposé au spin de l'électron resté à l'état de base. La transition de l'état excité jusqu'au niveau fondamental est donc permise par les règles de mécanique quantique, et la transition se fait donc généralement très rapidement (haute probabilité de transition), typiquement de l'ordre de 1-10 ns en moyenne. En ce qui concerne la phosphorescence, le spin de l'électron excité est le même que celui de l'état fondamental. En conséquence, la transition s'effectue beaucoup plus lentement, celle-

ci étant classiquement « interdite ». La mécanique quantique l'autorise en fait selon une faible probabilité, impliquant un changement de spin (Turro, 1978). Le temps moyen typique pour un retour au niveau de base est de l'ordre de la milliseconde à la seconde, mais certains composites phosphorescents (e.g. aluminat de strontium activé par du europium) peuvent avoir un temps de vie allant jusqu'à des heures. C'est ce qui explique que la fluorescence est émise dès qu'on excite un fluorophore alors que la phosphorescence peut émettre beaucoup plus longtemps, mais à faible intensité.

La phosphorescence se décrit principalement de la même façon que la fluorescence dans le diagramme de Jablonski (Figure 1.15.). Il peut se produire, à partir de l'état excité S_1 , une conversion du spin de l'électron excité, l'amenant ainsi à l'état triplet. L'émission à partir de l'état triplet représente donc le phénomène de phosphorescence. Selon la règle de Hund, cette conversion de spin est de plus généralement accompagnée d'une diminution en énergie, celle-ci étant reflétée par une émission de phosphorescence à des longueurs d'onde plus grandes (Valeur, 2004). Ces explications impliquent que la fluorescence et la phosphorescence peuvent toutes deux se produire pour une même molécule. Cependant, certaines molécules sont plus favorables à émettre un des deux types de luminescence. Généralement, les molécules luminescentes formées d'atomes lourds sont plus phosphorescentes que fluorescentes. Par exemple, les molécules qui contiennent du brome ou de l'iode sont susceptibles d'être plus phosphorescentes que fluorescentes. À l'inverse, les molécules qui ne sont formées que de cycles aromatiques (sans atomes lourds) sont beaucoup plus fluorescentes que phosphorescentes.

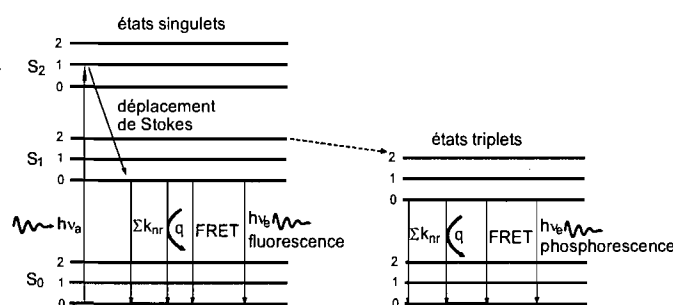


Figure 1.15. Diagramme de Jablonski incluant la phosphorescence. Les états triplets sont distingués des états singulets.

1.2.2. Les fluorophores

Les fluorophores répondent aux propriétés de fluorescence énoncées précédemment et sont décrits par le diagramme de Jablonski. Ce sont des molécules fluorescentes souvent utilisées en biophysique ainsi qu'en biochimie et ils ont des caractéristiques spécifiques décrivant leur comportement relativement à leur excitation et leur émission. Dépendamment de leur utilisation, ces caractéristiques doivent être vérifiées afin de choisir un fluorophore approprié pour une expérience donnée. Une description des fluorophores et de leurs caractéristiques est donc essentielle pour comprendre comment il est possible de les utiliser.

D'un point de vue mécanique, on peut considérer les fluorophores comme des dipôles. Si une onde électromagnétique (lumière) vient interagir avec un fluorophore avec une longueur d'onde pouvant amener une orbitale non excitée à une autre excitée, cette orbitale se comporte comme un dipôle oscillant. Celui-ci est induit principalement par le champ électrique oscillant de l'onde électromagnétique (le champ magnétique a un effet négligeable). Ce processus représente en fait l'absorption d'un photon par un fluorophore. Les fluorophores utilisés dans la région UV-visible du spectre de la lumière sont généralement composés de liaisons doubles conjuguées, où des liaisons π sont délocalisées. Un bon fluorophore doit cependant non seulement pouvoir absorber de l'énergie lumineuse, mais doit aussi en émettre efficacement. En principe, le dipôle induit peut émettre un photon, mais si une orbitale excitée fait partie d'une molécule flexible, il y a des chances que la désexcitation électronique se transforme en mouvement mécanique de la molécule (Turro, 1978). Dans ce dernier cas, une émission radiative réduite est observée. Par exemple, la fluorescence du naphthalène, une molécule très rigide, produit une intensité de fluorescence environ cinq fois plus élevée que la vitamine A, une molécule linéaire qui est plus flexible, même si les deux molécules ont le même nombre de liaisons doubles conjuguées (Rohatgi-Mukherjee, 1978). Donc, les molécules plus rigides formées de cycles aromatiques sont généralement des bons

fluorophores. C'est pour cette raison que les fluorophores commerciaux sont généralement composés à partir de ce type de molécule.

La structure de la molécule fluorescente détermine donc les propriétés d'absorption et d'émission des différents fluorophores. Par exemple, une extension du système d'orbitales π s'accompagne d'un déplacement des spectres d'absorption et d'émission vers des longueurs d'onde plus grandes et aussi d'une augmentation du rendement de la fluorescence relativement aux désexcitations non radiatives. Donc, une molécule composée d'un seul cycle aromatique émettra à des longueurs d'onde plus petites qu'une molécule composée de plusieurs cycles aromatiques attachés les uns aux autres (Figure 1.16.) (Valeur, 2004).

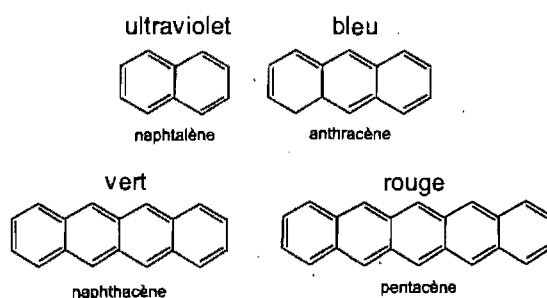


Figure 1.16. Couleurs d'émission de fluorescence pour différents nombres de cycles aromatiques liés.

Les fluorophores sont généralement décrits par leur spectre d'absorption et d'émission, par leur temps de vie, par leur rendement quantique et aussi par leur stabilité. Les données spectrales, telles que montrées à la figure 1.14., indiquent principalement de quelle façon on peut exciter un fluorophore et récolter sa fluorescence.

Le temps de vie, tel que mentionné plus tôt, réfère au temps passé dans un état moléculaire excité. Ce temps est important puisque l'interaction du fluorophore avec son environnement se fait au cours de celui-ci. Ainsi, on peut retirer de l'information

sur l'environnement du fluorophore avec sa fluorescence. Par exemple, si un fluorophore se trouve dans un environnement qui est riche en molécules pouvant amener des transitions non-radiatives (« quenchers »), la fluorescence détectée sera plus petite que pour un environnement pauvre en « quenchers ». Si le temps de vie du fluorophore est suffisamment long pour interagir avec l'environnement, la différence de fluorescence entre les deux différents environnements sera plus facile à détecter. On verra à la section suivante que ce principe est essentiel à la détection du mouvement au « helical bundle crossing » de KcsA.

Quant au rendement quantique, il indique le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Dans un cas théorique parfait, sans aucun processus de désexcitation autre que la fluorescence, le rendement quantique serait de un. Cependant, les différents processus d'émission non radiative font en sorte que ce dernier est plus petit que la valeur unitaire et diffère selon la structure de la molécule fluorescente. Le rendement quantique se décrit mathématiquement par le taux d'émission de fluorescence Γ et le taux de désexcitation non radiative k_{nr} :

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}$$

On recherche souvent une forte intensité de fluorescence, alors il est clair qu'on tente de maximiser cette valeur. Il est particulièrement important d'avoir un excellent rendement quantique dans le cas où la fluorescence est utilisée en molécule unitaire (Gruber *et al.*, 2000). Puisque seulement une molécule doit être détectée, un faible rendement quantique amène un signal de fluorescence qui se perd plus facilement dans le bruit.

Une autre caractéristique importante, la stabilité, est reliée au photoblanchiment. Ce dernier est un phénomène qui engendre la perte de fluorescence de façon permanente et qui est causé par une liaison covalente du fluorophore généralement avec une molécule d'oxygène. Il semble que ce processus puisse se produire uniquement pour les états excités (Eggeling *et al.*, 1998). Ainsi, plus l'intensité de la lumière excitant un fluorophore est élevée, plus ce phénomène se produira rapidement. La stabilité

d'un fluorophore sous-entend une faible probabilité de former un lien covalent avec une molécule comme l'oxygène. Une molécule fluorescente ayant une très faible énergie interne formera donc plus difficilement ce type de lien. Certains fluorophores sont plus stables que d'autres et vont ainsi permettre plus de cycles de fluorescence avant de subir le photoblanchiment. Par exemple, les fluorophores dérivés de la rhodamine, comme le tétraméthylrhodamine (TMR), sont considérés relativement stables (Eggeling *et al.*, 1998).

Bien que ce photoblanchiment soit un phénomène qui réduise le temps d'observation de la fluorescence, il y a moyen de profiter du phénomène. Normalement, le photoblanchiment sur une grande quantité de fluorophores est détecté par une décroissance exponentielle du signal de fluorescence, mais si le nombre de fluorophores est petit, il est possible de détecter le photoblanchiment de chacun des fluorophores. Puisque le phénomène de photoblanchiment est stochastique, chacun des fluorophores va subir le processus selon une même probabilité et on peut observer des niveaux équidistants entre chacune des pertes de fluorescence. Chacune de ces pertes correspond à un fluorophore. Une application à ce principe est le décompte des sous-unités (« subunit counting ») appartenant à une protéine. Ainsi, si une protéine a quelques sous-unités marquées par un fluorophore, on peut en connaître le nombre en comptant le nombre d'étapes par lesquelles il y a perte totale de fluorescence (Ulbrich & Isacoff, 2007).

1.2.2.1 Le fluorophore tétraméthylrhodamine (TMR)

C'est le fluorophore TMR qui a été utilisé dans nos expériences pour suivre le mouvement des sous-unités de KcsA. Tel que mentionné précédemment, c'est le changement d'environnement local des fluorophores qui permet cette détection et l'utilisation du TMR est classique lorsqu'il s'agit de distinguer deux environnements différents (Blunck *et al.*, 2004; Cha & Bezanilla, 1998). Sa structure fait en sorte qu'il a une photostabilité élevée, et qu'il répond fortement aux changements de son

environnement local. Les fluorophores réagissent généralement beaucoup aux changements de leur environnement, comme la concentration de « quenchers », ou la polarité du milieu. Par contre, en raison du temps de vie et de la stabilité du fluorophore, certains, comme le TMR, peuvent répondre un peu mieux.

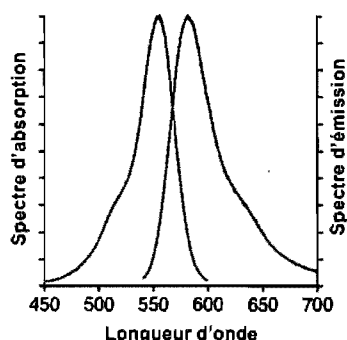


Figure 1.17. Spectre d'absorption et d'émission du fluorophore TMR.

Pour attacher ce fluorophore au canal KcsA, il est possible de le lier à un groupe fonctionnel, qui peut produire un lien covalent (e.g. Maleimide) ou un pont disulfure (e.g. Methanethiosulfonate (MTS)) avec un groupement thiol apparaissant dans la structure de l'acide aminée cystéine (Figure 1.18.). La principale différence entre les deux types de lien est la réversibilité. Dans le premier cas, une fois que le lien entre la cystéine et le groupe fonctionnel est établi (lien thioether), tout est bien attaché. Dans l'autre cas, il est possible de briser le lien entre la cystéine et le groupement fonctionnel (MTS) avec un agent réducteur comme le dithiothreitol (DTT) (Berliner, 1983). Un groupement comme le maleimide est donc utilisé dans les cas où le fluorophore doit rester en place, alors qu'un groupement comme le MTS est employé par exemple pour placer un fluorophore temporairement. Dans la section suivante le groupement maleimide est utilisé puisque les fluorophores doivent absolument rester en place dans la protéine.

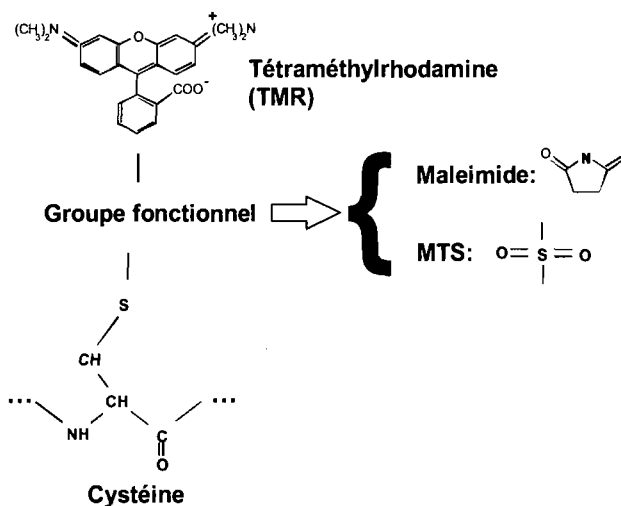


Figure 1.18. TMR lié à une cystéine. Nous illustrons une cystéine liée à un groupe fonctionnel, qui lui est relié au fluorophore TMR. On illustre deux groupements fonctionnels : Maleimide et MTS.

1.2.3. Suivre le mouvement des sous-unités de KcsA avec le fluorophore tétraméthylrhodamine-maleimide (TMRM)

En pratique, en plus de chercher un fluorophore avec certaines caractéristiques d'absorption et d'émission particulières, on veut aussi un fluorophore dont la taille permette l'expérimentation. Certains types d'étude avec des protéines permettent l'utilisation d'une molécule fluorescente dont la grosseur est similaire à celle de la protéine, comme dans le cas où on cherche simplement à suivre les protéines dans leur environnement. Si on veut par contre étudier le mouvement moléculaire d'une protéine, il est souvent essentiel de marquer la protéine à un ou des endroits stratégiques en évitant d'interférer avec sa fonction. Dans ce cas, la protéine doit donc être marquée d'un fluorophore qui modifie le moins possible ses mouvements, donc le plus petit possible. Il n'y a pas de grosseur prédéfinie, mais des expériences contrôles doivent être effectuées afin de comparer les propriétés de la protéine marquée relativement à celle non marquée.

Dans le cas présent, avec KcsA, il a été démontré qu'il est possible de suivre le mouvement des sous-unités avec le fluorophore tétraméthylrhodamine-5-maleimide

(TMRM) attaché au « helical bundle crossing » de chacune des quatre sous-unités (Blunck *et al.*, 2006). Lorsqu'une sous-unité marquée est en conformation fermée, sa fluorescence est maximale. En conformation ouverte, le fluorophore subit la conséquence du phénomène de « quenching » et la fluorescence diminue. Blunck et al. ont démontré que le signal de fluorescence obtenu suit la dépendance au pH connue de KcsA (Figure 1.19.).

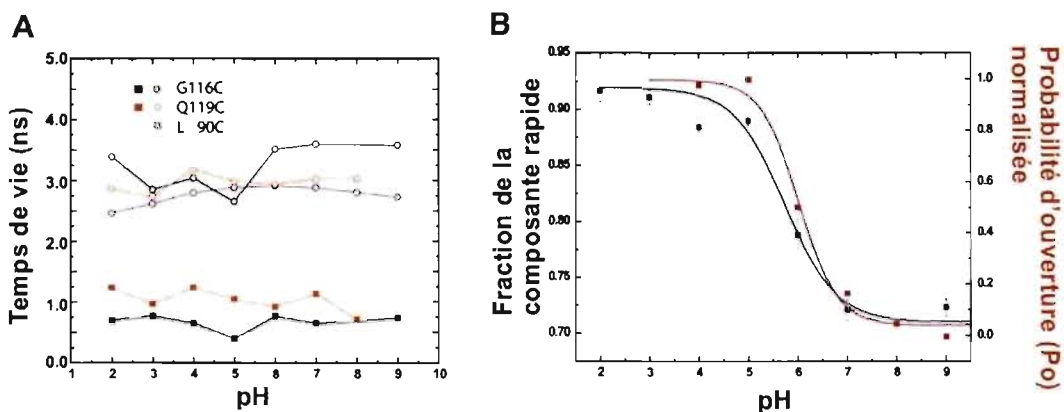


Figure 1.19. Résultats principaux de Blunck et al. (2006) **A** : Mesure des temps de vie des fluorophores à différents pH. Les fluorophores sont attachés aux positions indiquées. **B** : Fraction du temps de vie le plus rapide en fonction du pH ainsi que la probabilité d'ouverture normalisée. Adapté de Blunck et al. (2006).

Dans leurs expériences, le fluorophore TMRM a été placé à une des positions suivantes : L90, G116 ou Q119 (Figure 1.20.). La position L90 sert de contrôle puisque seulement un léger mouvement est attendu : le fluorophore ne devrait pas subir de changement d'environnement local significatif. Les positions G116 et Q119 sont situées dans le « helical bundle crossing » et un large mouvement est attendu. À la position L90, un seul temps de vie est en mesure de bien représenter les résultats (Figure 1.19A). Quant aux positions choisies dans le « helical bundle crossing », deux valeurs de temps de vie différentes sont nécessaires (Figure 1.19A). Une des deux valeurs (~1 ns) est plus petite que le temps de vie du fluorophore en solution (~1.6 ns), suggérant un processus de « quenching », alors que l'autre valeur se rapproche du temps de vie du fluorophore dans de l'octanol (~3.2 ns). En vérifiant la fraction du temps de vie le plus court en fonction du pH, la même dépendance au pH que la

probabilité d'ouverture apparaît, suggérant que chacun des deux temps de vie correspond à une conformation particulière. La conformation fermée serait donc liée à un long temps de vie, alors que la conformation ouverte serait associée à un court temps de vie. Un temps de vie plus court provient d'une augmentation du taux de transition non radiative, ce qui amène une baisse d'intensité de la fluorescence. À l'inverse, le temps de vie plus long signifie une augmentation du niveau de fluorescence. C'est ce qui permet d'affirmer que la fluorescence, à travers différentes intensités, permet de suivre le mouvement d'ouverture et de fermeture.

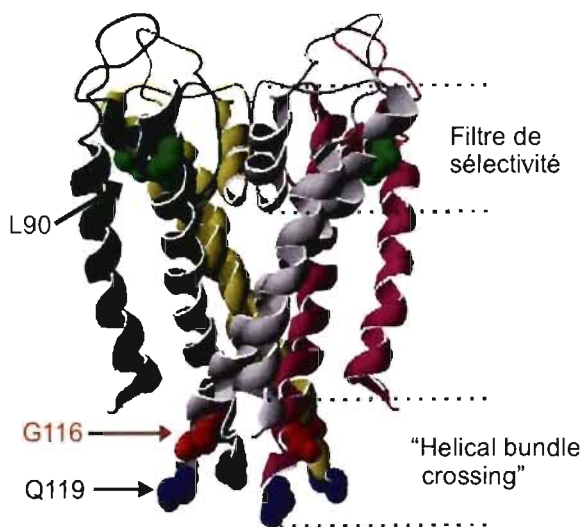


Figure 1.20. Illustration des positions de marquage du fluorophore TMR dans le canal KcsA. Les positions L90, G116 et Q119 sont marquées.

1.3. Le modèle de Markov caché (Hidden Markov Model)

Le modèle de Markov caché est largement utilisé pour modéliser des phénomènes biologiques. Ils sont à la base de plusieurs programmes pour la recherche de gènes, pour la recherche de profils génétiques, pour l'alignement de plusieurs séquences et pour l'identification d'un site de régulation (Eddy, 2004). Les fondements du modèle relèvent des éléments de la théorie des probabilités (Mukherjee & Mitra, 2005).

Le modèle de Markov représente en quelque sorte un système où plusieurs états sont reliés par des taux de transition, avec la distinction particulière que les transitions d'état sont sans mémoire (Rabiner, 1989). Des transitions entre les états peuvent donc s'effectuer dans le temps et sont probabilistes. Il est ainsi possible d'associer une probabilité de présence à un état donné à partir des taux de transition. Le fait que les transitions soient sans mémoire signifie seulement que la transition d'un état à un autre dépend uniquement de l'état présent, et non des transitions précédentes.

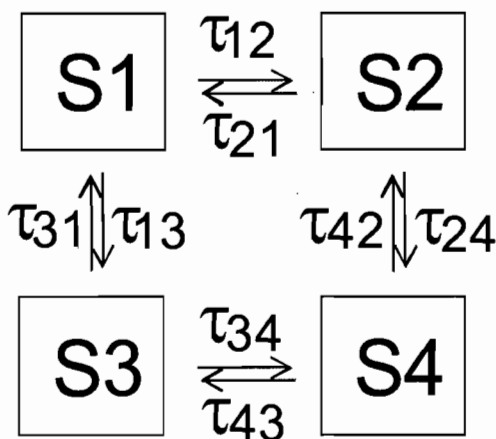


Figure 1.21. Modèle de Markov. Exemple d'un modèle de Markov indiquant les états S1, S2, S3 et S4 ainsi que les taux de transitions entre ces états.

Dans le cas ordinaire des modèles de Markov, chacun des états correspond à un observable physique. Si les observables sont reliés et dépendent de l'état, mais sans avoir directement un observable pour un état, il s'agit plutôt d'un modèle de Markov caché (Hidden Markov Model) (HMM). Relativement au premier type, les HMM sont largement plus utilisés étant donné leur nature moins restrictive (Rabiner, 1989).

Dans le cas des HMM, l'observation physique serait donc une fonction probabiliste de l'état. Ainsi, le processus statistique véritable de transition entre les états est caché : ce n'est pas ce qu'on observe directement. Ce qu'on détecte (l'observable physique) peut par contre être représenté par un modèle capable de reproduire la séquence des observations, sans connaître le véritable mécanisme (Rabiner, 1989).

Certaines études sur les protéines ont déjà utilisé les HMM pour décrire certaines dynamiques spécifiques. Par exemple, le laboratoire de Sigworth (Zheng *et al.*, 2001) a étudié les phénomènes d'ouverture et de fermeture du canal potassique Shaker en canaux unitaires avec ce type de modèle. Les auteurs ont analysé la cinétique des niveaux de sous-conductance, où le courant détecté est partiel, avec plusieurs HMM afin de mieux comprendre de quelle manière une protéine composée de plusieurs sous-unités peut s'ouvrir et se fermer. Les modèles ont permis l'étude d'événements rapides apparaissant dans le bruit des signaux de courant mesurés (Zheng *et al.*, 2001).

La façon classique de faire ressortir les paramètres d'un HMM est l'utilisation du « likelihood » maximal, ce dernier permettant de quantifier la convergence du modèle. Le « likelihood » est en quelque sorte une fonction de probabilité conditionnel. Si on garde tous les paramètres libres fixés sauf pour un d'entre eux, il est possible de varier ce dernier et de calculer la probabilité que le modèle corresponde aux mesures observables. Certains algorithmes permettent de modifier les paramètres libres jusqu'à ce que la meilleure convergence globale soit atteinte (Mukherjee & Mitra, 2005).

1.4 Introduction à l'électrophysiologie en voltage imposé

Afin de vérifier l'activité et la fonction d'un canal ionique, il faut mesurer le courant qui peut le traverser dans diverses conditions. Pour y parvenir, on utilise des mesures d'électrophysiologie en voltage imposé. Ces mesures consistent à mesurer le courant qui traverse une membrane biologique ou synthétique (dans des systèmes reconstitués) où des canaux y ont été insérés et où la différence de potentiel est contrôlée et maintenue à une valeur spécifique (Hodgkin *et al.*, 1952). Le système peut être utilisé sur un ensemble de protéines ou en molécule unitaire.

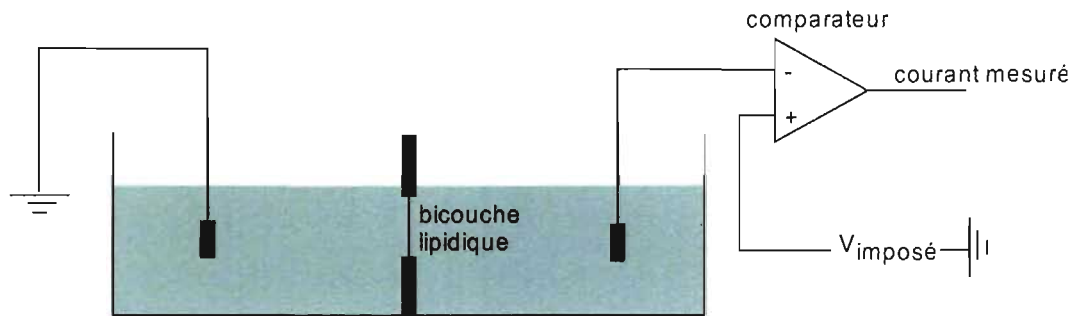


Figure 1.22. Électrophysiologie en voltage imposé. Il s'agit du circuit de base, où un système de feedback négatif permet de conserver un voltage choisi.

Le principe réside dans la capacité du système à injecter un courant de manière à conserver une valeur donnée de potentiel. Tel qu'indiqué à la figure 1.22, une membrane sépare l'électrode qui injecte du courant de celle reliée à la terre (« ground ») (Les électrodes baignent dans une solution ionique). Puisque les ions ne peuvent pas traverser cette membrane (Mueller & Rudin, 1963), si un changement de voltage imposé est appliqué, il y aura seulement un courant transitoire, le temps que les charges du côté de la membrane où il y a l'injection de courant s'ajustent en fonction du potentiel. C'est le même principe qu'un élément capacitif, où des charges ne peuvent traverser l'élément, mais s'accumulent pour atteindre un potentiel donné. S'il y avait des trous dans la membrane permettant un passage ionique (comme un canal ionique ouvert), un courant à travers la membrane pourrait apparaître et être détecté par une injection de courant pour conserver le potentiel imposé. Il y a cependant une condition importante pour observer ce courant : le voltage imposé doit être différent du potentiel d'équilibre électrochimique, sinon il n'y a pas de gradient de force pouvant déplacer les ions.

Ce potentiel d'équilibre est appelé potentiel de Nernst : il indique simplement le potentiel auquel un ion est en équilibre entre deux environnements de différentes concentrations (aucun gradient de force) (Hodgkin & Huxley, 1952).

$$V_{eq} = \frac{k_B T}{q} \ln \left(\frac{C_{ext}}{C_{int}} \right)$$

V_{eq} représente le potentiel de Nernst, ou encore le potentiel d'équilibre ; k_B est la constante de Boltzmann ; T est la température en °K; q est la charge de l'ion ; C_{ext} et C_{int} sont les concentrations externes et internes respectivement. Un courant qui peut traverser la membrane sera donc représenté par

$$I = G(V_{imp} - V_{eq})$$

où I est le courant ; G est la conductance ; V_{imp} est le voltage imposé.

1.5. Objectifs

Ce mémoire constitue une étude du mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal potassique KcsA, ce dernier étant accepté comme modèle du pore des canaux ioniques. Le but général est de déterminer s'il existe un couplage entre les sous-unités qui provoque une ouverture et/ou une fermeture coopérative. À partir des travaux de Blunck et al. (2006), il est possible de détecter par fluorescence en canal unitaire l'ouverture et la fermeture d'une sous-unité du canal KcsA (voir section 1.2.3). Ainsi, une analyse approfondie du mouvement des sous-unités dans la région du « helical bundle crossing » permet de mieux comprendre comment une sous-unité bouge relativement aux mouvements des autres sous-unités. Aussi, en se basant sur les travaux de Cordero-Morales et al. (2006b; 2006a), il est possible d'éviter d'impliquer les processus d'inactivation et de dépendance au voltage dans nos mesures avec la mutation E71A (voir section 1.1.2.1).

Depuis plusieurs années, le mécanisme d'ouverture des canaux ioniques suscite beaucoup de questions demeurées sans réponse relativement à une possible coopérativité entre les sous-unités (Chapman & VanDongen, 2005; Ledwell & Aldrich, 1999; Pathak *et al.*, 2005; Smith-Maxwell *et al.*, 1998b). La nouvelle approche décrite dans ce mémoire permet d'observer directement le mouvement des sous-unités, et donc d'étudier la coopérativité.

1.5.1. Objectifs spécifiques

- Vérifier la dépendance au pH de la probabilité d'ouverture des mutants de KcsA (KcsA-E71A-Q119C et KcsA-E71A-G116C) via la détection de l'ouverture des sous-unités en canal unitaire par spectroscopie de fluorescence.
- Vérifier la dépendance au pH de la probabilité d'ouverture de ces mêmes mutants de KcsA par des mesures d'électrophysiologie en canal unitaire, de sorte à comparer ces résultats aux mesures de fluorescence obtenues.
- Vérifier que, pour le mutant KcsA-E71A-L90C, le photoblanchiment domine largement les changements d'intensité de fluorescence (expériences contrôles).
- Analyser les traces de fluorescence avec un modèle de Markov caché pour déterminer s'il existe un couplage entre les sous-unités.
- Dans le cas où un couplage existe, calculer l'énergie d'interaction entre les sous-unités à partir du modèle.
- Valider le modèle en vérifiant la probabilité d'ouverture obtenue à partir de la modélisation des traces de fluorescence expérimentales.
- Vérifier les limites du modèle en modélisant des traces de fluorescence obtenue de simulations du même modèle en variant les paramètres cinétiques.

2. Méthodologie

2.1. Avant-propos

Bien que la méthodologie soit décrite dans l'article présenté dans ce mémoire, plusieurs détails importants sont absents. Il est donc important de revenir sur quelques aspects pour compléter la méthodologie puisque la technique de fluorescence développée pour l'étude est nouvelle.

2.2. Purification et reconstitution des protéines

Trois mutants du canal KcsA ont été construits pour les expériences de fluorescence. La séquence d'acides aminés des mutants ne contient qu'une seule cystéine, à un site bien spécifique, pour y attacher un fluorophore via un lien maleimide. Chacune des quatre sous-unités du canal KcsA pourront donc être marquées avec un fluorophore. La séquence d'ADN du canal KcsA a été insérée dans le vecteur pQE-32 et la mutagenèse dirigée fut employée pour produire les mutants suivants : KcsA-E71A-Q119C ; KcsA-E71A-G116C ; KcsA-E71A-L90C. Des cellules M15 de la bactérie *E. coli* ont été transformées avec le vecteur portant le gène exprimant un des trois mutants pour ensuite faire la culture des bactéries, induire l'expression du canal, le récolter, le marquer avec des fluorophores et le reconstituer.

La culture des bactéries s'effectue de la façon suivante. 3 ml de milieu de culture avec une colonie bactérienne d'un mutant ainsi que les antibiotiques (100 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine) sont placés à 37°C pour environ sept heures. Puisque les cellules qui ont capté le vecteur contiennent un gène résistant à ces antibiotiques, les risques de contaminations sont réduits presque totalement. 0,5 ml de cette culture est transféré dans 1 litre de milieu de culture contenant les mêmes antibiotiques pour une nuit entière à 37°C.

Afin de sur-exprimer le canal, 0,5 mM d'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) est ajouté le lendemain matin et la température est fixée entre 20°C et 23°C. L'IPTG agit sur une région du vecteur pQE-32 (le promoteur T5) de sorte à inhiber le répresseur LacI et permettre la production de la protéine reliée au gène inséré dans ce même vecteur. Après environ quatre heures, les cellules sont recueillies par centrifugation et sont brisées à l'aide d'un « French Press » à 20000 psi. Une autre centrifugation doit servir à recueillir les membranes cellulaires, qui elles, sont solubilisées avec 2% de n-Dodecyl β -D-maltoside (DDM).

Étant donnée que le vecteur pQE-32 produit une étiquette poly-his (six histidines) qui sera fusionnée en position N-terminal de la protéine, il est possible de purifier le canal KcsA par chromatographie d'affinité. Dans le cas présent, il s'agit de l'affinité entre l'étiquette histidine et le cobalt, accroché à des petites billes de sépharose. À pH neutre, un azote du groupement imidazole de l'histidine est partiellement chargé négativement, ce qui signifie une interaction avec les ions métalliques comme le Co^{2+} . L'interaction devient relativement forte avec six histidines.

L'échantillon précédemment solubilisé est ainsi injecté dans une colonne et circule grâce à un système de pompage. C'est la tâche principale d'un FPLC (Fast protein liquid chromatography) ou d'un HPLC (High performance liquid chromatography). L'échantillon circule dans la colonne de sorte que la protéine s'accroche aux ions cobalt de la résine. On retire les molécules indésirables pouvant légèrement s'accrocher à la résine avec 40 mM d'imidazole. L'imidazole entre en compétition avec l'étiquette poly-his, mais à faible concentration, on élimine les contaminants qui auraient pu s'attacher à la résine de façon non spécifique. Il est ensuite nécessaire de réduire les cystéines, pour que le lien maleimide du fluorophore s'accroche avec 1mM de Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) (agent réducteur). Une fois le site réduit, le canal KcsA est élué par compétition avec 400 mM d'imidazole. La concentration de protéine est déterminée par absorbance au spectromètre avec du bleu de coomassie (Coomassie Plus Protein assay reagent, PIERCE).

La protéine doit à présent être marquée avec le Tétraméthylrhodamine-5-maleimide (Tétraméthylrhodamine, le fluorophore, lié au groupement maleimide) ou avec la ATTO-565 maleimide (ATTO-565M). La façon de procéder est la suivante. L'échantillon concentré est placé à 4°C en présence du marqueur fluorescent (10X plus de fluorophore selon le nombre de monomères de la protéine pour s'assurer d'un bon marquage). L'excès de fluorophore doit cependant être enlevé. Pour ce faire, un second passage sur la colonne de chromatographie par affinité est effectué. La même

méthode que le premier passage est employée, mais sans faire usage de TCEP, puisque le marqueur est déjà accroché sur chacun des monomères de la protéine.

Les canaux KcsA sont encore « solubilisés » dans le détergent à cette étape ci. Les « biobeads » ou la dialyse doit à présent servir à se débarrasser de ce détergent et à remplacer cet environnement stable pour la protéine par un environnement aussi très stable : des vésicules lipidiques. Les « biobeads » ont une forte interaction avec les molécules de détergent, mais n'interagissent pas avec les protéines ou les vésicules lipidiques. Ainsi, en mélangeant des « biobeads », des protéines KcsA solubilisées dans du détergent et des vésicules lipidiques, le détergent est amené vers les « biobeads » et les canaux s'incorporent ensuite dans les vésicules lipidiques. Quant à la dialyse, il s'agit principalement d'une membrane qui laisse passer les molécules dont le poids est plus petit que la valeur définie par les propriétés de la membrane de dialyse. Les caractéristiques de la membrane sont choisies de sorte que le détergent soit perméable à la membrane et que la protéine ne le soit pas. Ainsi, le détergent peut traverser la membrane dépendant de la concentration de part et d'autre de cette dernière. Une membrane de dialyse fermée contient un certain volume avec des vésicules et des canaux solubilisés dans du détergent. Ce système baigne dans une solution sans détergent, ce qui permet au détergent de sortir de l'environnement des protéines. Pour demeurer dans un environnement favorable, les protéines se placent dans les vésicules spontanément lorsqu'elles ne sont plus solubilisées. C'est un processus qui est contrôlé principalement par l'entropie, et non par l'enthalpie.

Ces vésicules sont similaires aux membranes plasmiques des cellules, en ce qui concerne leur composition. Les lipides utilisés pour les former sont soit du Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DPhPC) ou du 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (POPC). Ces lipides sont commercialement disponibles et solubilisés dans du chloroforme à une concentration de 25 mg/ml (Avanti Polar Lipids). Pour produire les vésicules, 20 µl est ajouté à un contenant propre et séché sous un flot constant d'azote gazeux. Le contenant est ensuite déposé dans une cloche à vide pour environ 2 heures afin de s'assurer qu'il ne reste plus que les lipides. Par

après, 400 μl de la solution de dialyse est ajouté au contenant, qui sera placé dans un bain à ultrasons pour environ 30 minutes, le temps d'obtenir un mélange sans turbidité (presque clair comme de l'eau). À cette concentration, les lipides forment spontanément des vésicules, mais les ultrasons sont requis pour briser les grandes membranes et favoriser la formation de vésicules les plus petites possibles. La turbidité apparaît comme une conséquence d'un phénomène de diffraction où la théorie de Rayleigh-Debye s'applique (Pozharski *et al.*, 2001). Lorsque les vésicules sont plus grosses, la diffraction par les vésicules est plus grande, ce qui augmente la turbidité du milieu. Des plus petites vésicules vont par contre diffracter la lumière beaucoup moins fortement, et le mélange sera plus clair. Des petites vésicules peuvent contenir moins de canaux, ce qui évite la formation de gros agrégats. Un volume défini de protéines concentrées et marquées est ensuite ajouté aux vésicules selon un ratio de 1:100 avec un volume final de 500 μl .

Après l'utilisation des « biobeads » ou de la dialyse, l'échantillon est séparé en alicots de 10 μl qui sont immédiatement utilisés ou congelés à -80°C . Les vésicules peuvent ainsi être utilisées directement dans nos expériences décrites dans la section suivante.

2.3. Mesures de fluorescence en bicouche supportée

Les vésicules contenant les canaux marqués sont injectés à très faible concentration ($\sim 1\mu\text{g}/\text{ml}$ de protéines). Elles formeront une bicouche lipidique supportée par une lamelle de verre, où des canaux sont individuellement distinguables (ratio protéine-lipide $\sim 1:1\ 000\ 000$). L'excitation des fluorophores par un laser vert (532 nm) permet une observation directe de la fluorescence à l'aide d'une caméra EMCCD, où chacun des 16384 pixels agit comme un détecteur de photon. Puisque les canaux sont très dilués, les canaux sont séparés spatialement. Un pixel va donc détecter la fluorescence d'un seul canal et la variation de l'intensité de fluorescence des pixels avec un canal est ainsi observée.

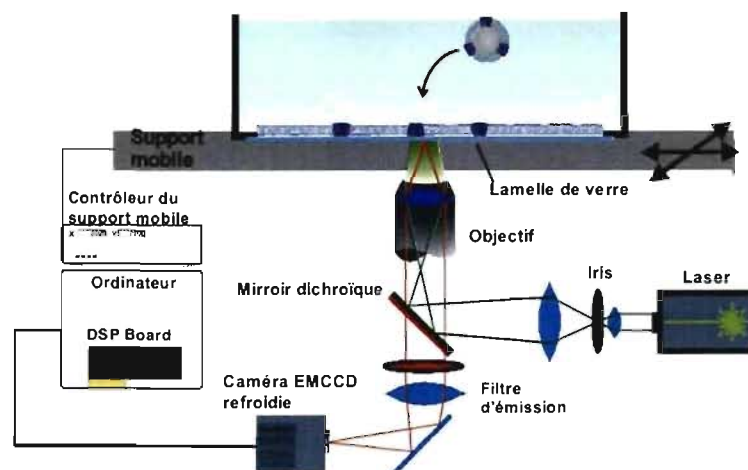


Figure 2.1. Montage expérimental des mesures de fluorescence en bicouche supportée. Un laser excite les fluorophores couvrant une large région. Un objectif à haute ouverture numérique (1.4) et avec un grossissement de 63X recueille l'émission de fluorescence et un miroir dichroïque empêche la lumière initiale du laser de traverser. Les images sont observées avec une caméra EMCCD refroidie.

2.4. Bicouche lipidique planaire pour mesures d'électrophysiologie

Pour vérifier la fonction de la protéine, des mesures de courant en canaux unitaires ont été effectuées.

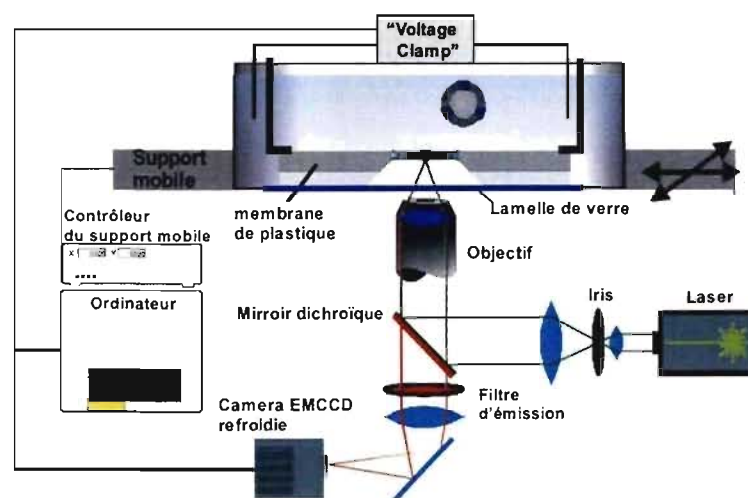


Figure 2.2. Montage expérimental pour les mesures d'électrophysiologie en bicouche lipidique planaire. La fluorescence peut être utilisée selon le même principe que la figure 2.1. et des électrodes sont plongées dans les solutions afin de mesurer le courant traversant la bicouche lipidique planaire.

L'électrode dans la chambre externe est maintenue à la terre, tandis que l'électrode dans la chambre interne injecte du courant afin de maintenir un potentiel désiré. Une membrane de téflon avec un trou central dont le diamètre est d'environ 90-100 μm sépare les côtés cis (chambre interne) et trans (chambre externe). Ce trou de forme conique agit comme support à la bicouche lipidique. Le trou est formé par une méthode similaire à celle appelée « melt-and-shave » (Wonderline et al. 1990). Il s'agit simplement de faire chauffer une aiguille ou un objet métallique très pointu à blanc, de sorte que lorsqu'un léger coup d'aiguille est porté au téflon, le côté touché en premier s'élargit plus vite en raison de la chaleur. De cette façon, une forme en « teepee » est créée. Selon Wonderline et al., une telle forme permet de stabiliser la bicouche, puisque plus la paroi qui tient la bicouche est mince, plus la bicouche sera stable. Parce que la membrane de téflon est hydrophobe, tout comme les acides gras des lipides, une meilleure correspondance entre l'épaisseur de la paroi et l'épaisseur de l'environnement en acide gras des lipides renforce les liens hydrophobes. Étant donné que l'épaisseur de la bicouche est de l'ordre des 40 Å, une paroi de téflon la plus mince possible est requise. Il est cependant difficile de construire un système dont la paroi atteint une valeur de l'ordre du nanomètre, en plus que ce serait probablement très fragile. Il est suffisant d'obtenir une paroi dont l'épaisseur est d'environ quelques micromètres ($\sim 1-10 \mu\text{m}$), de sorte qu'une bicouche puisse être très stable et que la membrane de téflon soit solide.

La bicouche est formée à partir de lipides solubilisés dans du décane. Le 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DPhPC) a été utilisé pour former les bicouches, à une concentration de 25 mg/ml. Une tige en verre agissant comme pinceau est construite à partir d'une pipette en verre dont la petite extrémité est formée par la chaleur d'une flamme. Une petite boule de verre d'environ 500 μm de diamètre doit apparaître au bout de la pipette. Cette grosseur semble être bien ajustée pour déposer des lipides à la surface du trou de la membrane de téflon, sans toutefois s'y introduire trop loin.

Avant de former la bicouche dans le système contenant les solutions, une première couche de lipide est appliquée à sec en grande quantité de sorte à favoriser la formation d'une bicouche. Le principe est le suivant : les lipides ne formeront pas de bicouche à sec puisque les têtes polaires des lipides ne sont pas en contact avec un environnement polaire comme de l'eau, ce qui laisse beaucoup de lipides sur les parois du trou.

La chambre interne avec la membrane de téflon est mise dans la solution de la chambre externe (100 mM KCl, 10 mM phosphate de potassium monobasique). Cette même solution est ajoutée dans le trou de la chambre interne (celui qui sert de soutien à la membrane de téflon). Le pinceau est trempé dans la solution de lipides et appliqué sur le trou de la membrane sans pression jusqu'à ce que la bicouche se forme. Il est possible de savoir quand la bicouche se forme grâce au système d'acquisition. Avant qu'une bicouche ne soit formée, avec les solutions présentes dans les deux chambres, il y a un lien électrique direct entre les deux électrodes. Par contre, si une bicouche est formée, aucune charge (en principe, s'il n'y a pas de fuite) ne peut traverser la bicouche lipidique. Cette dernière agit en fait comme un condensateur : il y a deux environnements conducteurs séparés par un environnement diélectrique (l'intérieur de la bicouche). Il est ainsi prévisible qu'une rampe de potentiel dont la pente est 1 mV/ms va indiquer un courant dont la valeur (en pA) est celle de la capacitance (en pF), tel que le prouve l'équation suivante :

$$V \cdot C = Q \Rightarrow \frac{d}{dt}(V \cdot C) = \frac{d}{dt}Q = I \Rightarrow C \frac{dV}{dt} = I$$

où V est le potentiel ; C est la capacitance ; Q est la charge ; I est le courant. Une fois que la bicouche est formée, les protéines reconstituées dans des vésicules peuvent être insérées dans la membrane lipidique. Il est possible de simplement injecter les vésicules juste au-dessus de la bicouche et d'attendre qu'il y ait incorporation, mais en général, cette technique injecte trop de canaux au ratio de reconstitution protéine-lipide de 1:100. La concentration peut être diminuée à 1:10000, ce qui fonctionne, mais la technique ne semble pas très efficace. La technique employée pour les expériences était plutôt de briser la bicouche par une injection de courant extrême et

de tremper ensuite le pinceau dans les vésicules pour finalement reformer rapidement la bicouche avec ces mêmes vésicules.

La détection de courant en canaux unitaires se fait par le système d'acquisition et d'amplification. Des mesures à pH 3, 4, 5, 6, 7 ont été prises pour faire l'estimation de la probabilité d'ouverture. Des solutions aux concentrations symétriques entre le côté cis et trans sont utilisées, ce qui signifie qu'un potentiel autre que 0 mV doit être employé pour pouvoir espérer voir un flux d'ions à travers des canaux KcsA. C'est un principe relié au potentiel électrochimique (section 1.4). Un potentiel a -100 mV a été utilisé.

3. Résultats

La section des résultats est principalement composée d'un article, dont je suis second auteur sur un total de quatre contributeurs. Ma contribution apportée à cet article est décrite en annexe I. Une petite section portant sur des résultats non publiés fait suite à cet article.

3.1. Article

Fluorescence detection of the movement of single KcsA subunits reveals cooperativity

Rikard Blunck^a, Hugo McGuire^a, H Clark Hyde^b and Francisco Bezanilla^b

^a Département de physique and GÉPROM, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Chicago, Chicago, United States

3.1.1. Abstract

The prokaryotic KcsA channel is gated at the helical bundle crossing by intracellular protons and inactivates at the extracellular selectivity filter. The C-terminal transmembrane helix has to undergo a conformational change in order for potassium ions to access the central cavity. While a partial opening of the tetrameric channel is suggested to be responsible for subconductance levels of ion channels including KcsA, a cooperative opening of the four subunits is postulated as the final opening step. In this study, we used single channel fluorescence spectroscopy of KcsA to directly observe the movement of each subunit and the temporal correlation between subunits. Purified KcsA channels labeled at the C-terminus near the bundle crossing have been inserted into supported lipid bilayer, and the fluorescence traces analyzed by means of a cooperative or independent Markov model. The analysis revealed that the four subunits do not move fully independently but instead showed a certain degree of cooperativity. However, the four subunits do not simply open in one concerted step.

3.1.2. Introduction

The opening of the ion-conducting pore has been investigated in great detail although the exact mechanisms remain to be elucidated. In the crystal structure of KcsA(Doyle et al.), the helical bundle crossing formed by the TM2 helices is closed, and it is generally agreed that it has to open in order to allow ion conduction. Recently, Shimizu and coworkers(Shimizu et al.) demonstrated a rotational movement of TM2 during gating using X-ray diffraction, which may be responsible for pore opening. But, the ion conducting pore of KcsA can also be gated (inactivated) at the selectivity filter(Cordero-Morales et al.;Blunck et al.). The pH dependence in KcsA, as well as the voltage-dependent gating in the voltage-sensitive channels, is thought to be mediated by the helical bundle crossing(Blunck et al.;Cordero-Morales et al.;Thompson et al.;Takeuchi et al.;Miloshevsky and Jordan), while voltage

dependence of KcsA occurs at the selectivity filter(Cordero-Morales, Cuello, and Perozo). Since the pore region consists of a tetramer, it is still a matter of debate whether the four subunits open in one cooperative movement, or whether all four subunits open and close independently.

The main indications for independent movement of the four subunits came from subconductance levels that were found in different families of channels, including KcsA(Cuello et al.;Thompson et al.;Meuser et al.;Splitt et al.) and Shaker(Mathur et al.;Zheng and Sigworth). It has been suggested that the subconductance levels are caused by a partial (i.e. not all subunits) opening of the pore. Chapman and VanDongen(Chapman and VanDongen) demonstrated for voltage-gated channels that in hetero-tetramers with subunits of different voltage dependence, the channel enters frequently into subconductance levels at intermediate activation voltage. Although these results suggest an independent action of the subunits, their models improved significantly when introducing a cooperativity factor for the pore opening. One also has to keep in mind that in voltage-gated channels, the opening of the pore is coupled to the movement of the voltage sensor. The reason for the partial opening in the drk1 K⁺ channel may therefore be the different energy barriers for the activation of the voltage sensors, and the energy from the sensors may have been sufficient to uncouple any cooperativity between subunits in the C-terminus of S6. Therefore, it remains unknown whether the pore itself - if uncoupled from the voltage sensors - would still open cooperatively.

Although subconductance levels have also been found in 2TM K⁺ channels (KcsA(Cuello et al.;Meuser et al.;Splitt et al.;Thompson et al.) and K_{IR}(Chauhan-Patel and Spruce;Matsuda and Stanfield;Xie et al.)), only little is known about the underlying mechanism. In K_{IR}2.1, Xie et al.(Xie et al.) suggested that the binding of a single PIP₂ leads to opening of subconductance levels as well as full opening of the channel. For KcsA, Kariev et al.(Kariev, Znamenskiy, and Green) suggested a charge interaction at the helical bundle crossing in the protonated channel as a possible reason for the pH dependence. Opening of a single subunit would disturb the

coordination of the interaction and facilitate opening of further subunits. Therefore, in the present work, we set out to directly measure the movement of single subunits in order to determine their temporal coordination with the aim of determining if the channel opens in one cooperative step or if each subunit moves independently. Our method is based on previous work where we showed that labeling of the helical bundle crossing of KcsA (position G116C or Q119C) allows the monitoring of the channel's opening with fluorescence (Blunck et al.). We formed supported bilayers including these mutants and imaged the fluorescence of single channels over time.

3.1.3. Methods

3.1.3.1. Protein purification and reconstitution

E. coli strain M15 were transformed with KcsA-G116C-E71A-pQE32, KcsA-119C-E71A-pQE32 or KcsA-L90C-pQE32 and single colonies grown in 3 ml cultures for 7 h in the presence of 100 µg/ml Ampicillin and 25 µg/ml Kanamycin. 0.5 ml of the cultures were added to 1 l of LB containing the same antibiotics and grown overnight. Channel expression was induced by addition of 0.5 mM IPTG (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) at T = 20 °C. The cells were harvested, lysed by passage through a French press at 20,000 psi and the membranes isolated using centrifugation (Blunck et al.; Richardson et al.). The membranes were solubilized using 2 % DDM for 1 h at 4°C and centrifuged at 100,000 g for 30' in order to remove any non-solubilized particles. The channels were purified by metal affinity chromatography (Talon Superflow, Clontech, Mountain View, CA). Before elution, the cysteines were reduced by 1 mM TCEP (Pierce, Rockford, IL). The channels were labeled with TMRM (Invitrogen, Burlington, ON) or ATTO-565M (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Germany) in 10-fold molar excess overnight at 4°C. Excess label was removed by washing on the metal affinity column. POPC or DPhPC (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) vesicles were prepared from chloroform stock by evaporating the solvent under a steady N₂ stream and forming an emulsion in the desired buffer

solution in the presence of 0.02% DDM by vigorous sonication. The lipids were mixed with the protein solution in a mass ratio of 100:1 at a final lipid concentration of 10 mg/ml. The detergent was removed by treatment with biobeads (SM2, Biorad, Herkules, CA) for three successive rounds (2 h at RT, 2 h at RT, 12 h at 4°C). We used 100 mM KCl + 10 mM K₃PO₄ pH-adjusted with H₃PO₄ for all measurements.

3.1.3.2. Fluorescence measurements of supported bilayer

Borosilicate glass coverslip were washed by sonication for 30' in a staining jar in the following order: Alconox (Fischer Scientific, Ottawa, ON), KOH (1 M), Acetone, Methanol (filtered). Between each step, the coverslips were rinsed with H₂O (MilliQ, filtered at 0.2 µm). Coverslips were stored in H₂O and rinsed and dried under a steady N₂ stream right before use. At the intensities used in the recordings (< 1 mW), almost no background fluorescence was detected in the presence of buffer only. In order to adjust the protein concentration, 1.4 µl of the proteoliposome solution was mixed with an emulsion of 225 µl of POPC or DPhPC (2.5 mg/ml in KCl solution at the specified pH) and sonicated. The mixture was subject to five freeze-thaw cycles, in order to ensure homogenous mixing. 4 µl of that solution were then added to 400 µl of buffer on a clean coverslip. After 30'-90', the vesicles formed a supported bilayer on the coverslip, and excess vesicles were carefully washed off with KCl buffer using a micropipette.

Fluorescence was measured using an inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Germany). For excitation a 30 mW 532 nm laser (World Star Tech, Toronto, ON) was used. Excitation light (< 1 mW) was defocused to a diameter of approx. 60-90 µm. Emission was collected with a 63x NA 1.4 objective (Zeiss, Jena, Germany) and filtered by a 610/75 nm emission filter in combination with a Z532 dichroic mirror (Chroma Technologies, Rockingham, VT). Images were recorded with an EMCCD Camera (iXon⁺ 860BV, Andor Technology, South Windsor, CT). For TIR measurements, a similar setup based on an Olympus microscope (IX71) was used.

Emission was collected with a 100x NA 1.45 or 1.65 objective (Olympus America, Center Valley, PA). For TIR measurements with the 1.65 NA objective, N-SF11 coverslips (No.1) were used in order to match the objective's higher index of refraction.

3.1.3.3. Data analysis

Images were first analyzed using the AndorIQ program and an in-house routine written in Matlab (Mathworks, Natick, MA). The spots were selected from the "averaged difference" (Fig. 1d). No further signal conditioning was applied. The averaged intensity of a 3x3 pixel square around the spot's center was plotted over time and further analyzed if it met the selection criteria: only spots that showed a clear bleaching step at the end were considered to ensure that only single channels were observed. Occasionally very intense spots were found, which bleached in a simple exponential decay. These spots contained many fluorophores, therefore we assumed they were aggregates in our preparation and we excluded them from further analysis. For kinetic analysis of the time courses the QUB suite(Qin et al.) was used. The discrete levels of the bleaching steps were found by eye using the "grab" function. Open probability and dwell time histograms were obtained from the "Stat" routine. Before analyzing the open probability, the time course was divided into sections between each bleaching step. The subunit open probability p_o was calculated from the probability of resting in the all closed state p_{ac} : $p_o = 1 - p_{ac}^{1/N}$ (N = number of unbleached subunits). For further analysis the time courses were fitted to a hidden Markov model taking an eventual coupling constant and the bleaching of the single subunits into account (see below). The time series was idealized using the IB routine. The idealized time series was then fitted to the model with the MIL routine.

3.1.3.4. Design of hidden Markov model with bleaching and coupling

In order to analyze whether coupling between the single subunits of the KcsA tetramer exists, the time courses were fitted to a hidden Markov model. This had to take into consideration the bleaching of the single subunits and a possible coupling constant. Figure 4c shows the basic model that only convolutes the bleaching with four independently acting subunits. Each subunit (Fig. 4a) may rest in the closed (fluorescent) or open (dark) conformation, which are assigned different, equidistant fluorescence levels. Thus the “unbleached” channel has five different fluorescence levels and rate constants as shown in Figure 4b. Each subunit may undergo bleaching at a rate k_B . If the four subunits are independent, bleaching of one subunit would merely reduce the number of available fluorescence levels and therefore also reduce the rate constants, as if only three subunits were present and so forth (Fig. 4c).

Interaction between the subunits was considered by introducing a coupling constant C in the model, which changes the rate constants in the partly opened channel (Fig. 4d). The coupling constant reduces the energy for opening of all subunits but the first by $kT \ln(C)$ (see below). The coupling is thus removed by the opening of the first subunit (water basket(Kariev, Znamenskiy, and Green)). In contrast to the independent model, the state of the bleached subunit has to be taken into account when considering the remaining subunits. If, for instance, one subunit is already bleached and closed, the opening probability for any of the other three would be $3 \cdot \alpha$ (Fig. 4d). If, however, the bleached subunit is already open, the probability for the other three would increase by the coupling factor C ($3 \cdot \alpha \cdot C$). The model expands to 31 states.

The coupling energy was determined from the difference of energy the first and the second subunit have to overcome:

$$dG = RT \ln\left(\frac{\alpha}{C \cdot \beta}\right) - RT \ln\left(\frac{C \cdot \alpha}{C \cdot \beta}\right) = RT \ln(C)$$

3.1.4. Results

3.1.4.1. Fluorescence represents the subunits of KcsA

In order to monitor the conformational changes of the KcsA channel, we labeled them with tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMRM) at the helical bundle crossing at positions G116C and Q119C in the KcsA-E71A background. We have shown previously that TMRM attached to these positions follows the movement of the helical bundle crossing: opening of the channel results in decreased fluorescence intensity (Blunck et al.). The E71A background was chosen because the opening of the helical bundle crossing most likely corresponds directly to ion conduction in the absence of inactivation of the selectivity filter (Cordero-Morales et al.). We also labeled position L90C as a control.

We resorted to single channel fluorescence measurements, since in an ensemble measurement, we would not be able to distinguish whether two signals originate from two subunits of the same channel or from neighboring channels. Any modification of the subunits to make them distinct from one another would disturb the symmetry between them and may affect their eventual cooperativity. In order to observe the single channels, we formed a supported bilayer on a glass surface with the lipid to protein mass ratio adjusted in a manner such that single spots would be evenly distributed and spatially distinct in the field of view (Fig. 1a). The fluorescence was recorded with a frame rate of 33 s⁻¹ (30 ms exposure time). For quantitative analysis of the fluorescence intensity, we chose a square region of 3x3 pixels around the center of the spots and determined their average intensity over time (Fig. 1b). In order

to ensure that we are actually observing single KcsA channels, we analyzed the bleaching behavior of the spots and found it to be step-like (Fig. 1b). The step-like bleaching behavior is caused by the quantized photobleaching of single fluorophores and indicated that only a few fluorophores were present within the observed spots. Supported bilayers without any added fluorophore showed a low number of spots (background fluorescence). These spots did not show an ordered step-like bleaching behavior, but mainly very fast fluctuations (data not shown). Some of these spots were also found in our analysis of the measurements, but were not taken into consideration for further analysis. Addition of free fluorophores (TMRM) to the vesicles prior to bilayer formation resulted in rapid movement of fluorescent spots, and we found no clear static spots such as the ones shown in Figure 1d. Therefore, by only considering static spots, we ensured that all fluorescent spots that we analyzed originated from fluorophores bound to the channel protein.

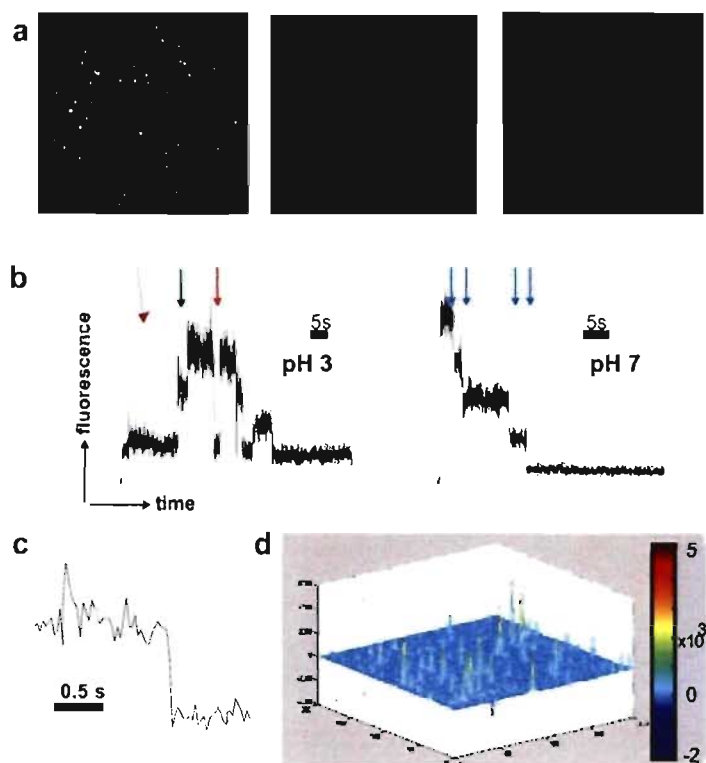


Figure 3.1. Single channel imaging Single channel imaging of KcsA-Q119C-E71A labeled with TMRM. **a.** Distribution of channels in the field of view ($\text{\O} \approx 90\mu\text{m}$). Over time the spots are photobleaching until the last frame (right) is almost completely bleached. Shown are frames taken with

brightfield (BF) at 0.75 s, 24 s and 60 s. **b.** The intensity changes over time are measured within a 3x3 pixel square region (*red box*) around the center of the spot. Shown are two time traces at pH 3 and pH 7, respectively. In the left trace, channel activity can be observed. High intensity reflects a closed subunit (Blunck et al.). The subunits may act independently (*green arrow*) or cooperatively (*red arrow*). In the right trace (pH 7), no activity was observed. The blue arrows indicate the bleaching steps. **c.** Multiple transition step (b) shown on an expanded time scale. **d.** 3-dimensional representation of the entire image intensity averaged over the first one-third of the series, from which the intensity averaged over the last one-third of the image series is subtracted. The spots appear as strong peaks, indicating that the channels are not diffusing in the supported bilayer (moving spots would disappear in the average and not form peaks). It also indicates that the majority of spots is bleached during the recording (bleached spots are positive in the first third but zero in the last third).

In order to further corroborate that the spots represent the single KcsA channels, we counted the bleaching steps (Fig. 2a). As the tetrameric KcsA consists of four identical subunits, each channel had four cysteines as possible labeling positions for the thiol-reactive fluorophore. Consequently, the spots should be bleaching in four equidistant intensity steps, and counting the number of bleaching steps should give the number of subunits (Ulbrich and Isacoff). Figure 2b shows histograms of the number of fluorophores per spot in different preparations, the first from G116C-E71A and the second from Q119C-E71A. In both cases (as well as in the L90C mutant, data not shown) most spots bleached in up to 4 steps. Only a few spots were found, which showed more than 4 bleaching steps, up to 8. We assume that in these cases two channels were present at the same spot in the image. The lower number of steps per spot at position 119 as compared to 116 indicates that we had less visible fluorophores per channel. This may be due to incomplete labeling efficiency (oxidation of cysteines, limited accessibility of cysteine) or to prior photobleaching of attached fluorophores.

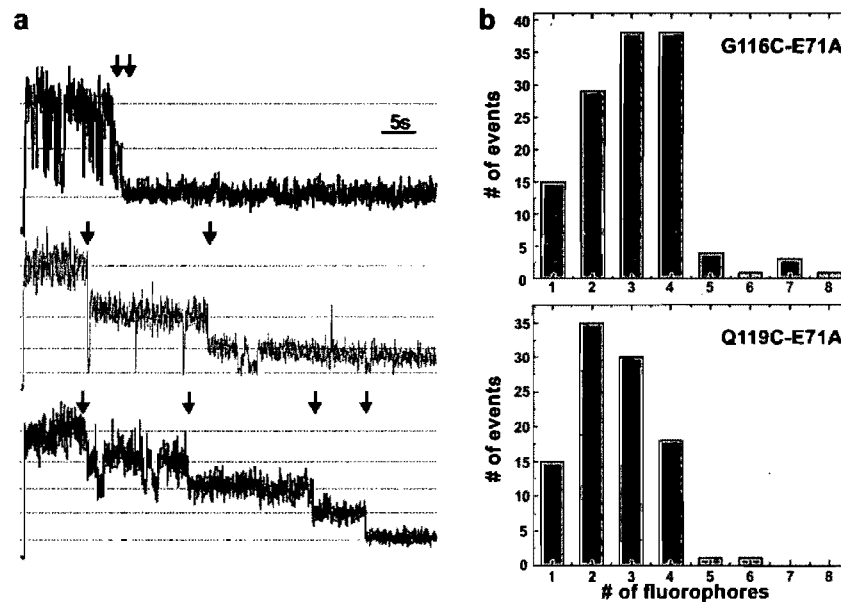


Figure 3.2. Subunit counting **a.** Due to its tetrameric structure, cysteine-modified KcsA can bind up to four thiol-reactive fluorophores. We analyzed the time traces with respect to how many bleaching steps are observed. Here, three different time traces recorded with TIR at pH 5 are shown with two, three and four bleaching steps (arrows). **b.** Histograms of G116C-E71A (*top*) and Q119C-E71A (*bottom*) obtained from counting the bleaching steps from time traces. The probability of a subunits being fluorescent was 0.72 and 0.59 for G116C and Q119C, respectively.

3.1.4.2. Fluctuation changes show characteristics of KcsA gating

In the fluorescence versus time traces, we found step-like fluctuations in the intensity before the actual bleaching (Fig. 1b & 2a). Based on our previous results (Blunck et al.), we interpreted these fluctuations as caused by the gating of the subunits. However, in single molecule fluorescence measurements, “blinking” of the fluorophore itself must also be considered. Blinking - intensity fluctuations in different time ranges - is an intrinsic property of the fluorophore. It is suggested to be a result of transient transitions into triplet states (Ha et al.), formation of conformational isomers (Widengren and Schwille) or interaction with radicals (Zondervan et al.; Sauer et al.). In order to establish the amount of blinking of the fluorophore, we used the L90C control mutant. In this mutant, the label is located near the p-loop, where no large conformational changes are expected. We showed

previously that the fluorescence intensity of this mutant is independent of the pH (Blunck et al.). Therefore, the intensity changes that we found in these mutants are likely caused by intrinsic blinking of the bound fluorophores. Intensity changes in L90C occurred much less frequently ($13\% \pm 8\%$ as compared to 83% of Q119C-E71A at pH 3). However, blinking may influence our results, and we have to keep this in mind when interpreting the quantitative results (see below).

Thompson and coworkers (Thompson et al.) demonstrated that the pH sensor of KcsA is located at the helical bundle crossing. Since it is located in close proximity to the fluorescent probes, is it also possible that the pH sensor directly is responsible for the fluorescence change? It may be that the pH sensor influences the fluorophores attached close to their location. However, this would be a static change, once the pH has been altered, and would influence the overall fluorescence intensity (the transition rates of fluorophores lie in the nanosecond range). For the fluorescence steps that we were analyzing, it would only slightly change the height of the steps while leaving untouched the kinetics between the two states of the channel/fluorophore. In fact, we found a slight increase of the step size as a function of pH, which was opposite to the pH dependence observed in the kinetics. But a mere alteration in the absolute fluorescence values at the bright or dark level would not influence the transition rates between the two states, and thus the single-channel fluorescence kinetics remain independent of such influences.

Given that the fluctuations of the C-terminal mutants are caused by the opening and closing of the channel, they should follow the gating behavior of KcsA. And since the opening of the bundle crossing is the pH-dependent step (Cordero-Morales et al.; Thompson et al.; Blunck et al.), the fluorescence changes should be pH-dependent. We estimated the open probability of the single subunits directly from the fluorescence changes by separating those sections of the time course that included different numbers of visible subunits (Fig. 3). We will refer to this method as the direct determination of single subunit open probability. The subunit open probability estimated in this manner followed the pH dependence of KcsA well, with a pK of 4.9.

The values for the subunit open probability varied widely (0.1 - 0.56 for pH 3, 0.01 - 0.4 for pH 7) as a result of the low observation time caused by the fast bleaching. As expected, the values varied most widely at pH 5 where KcsA undergoes most gating events.

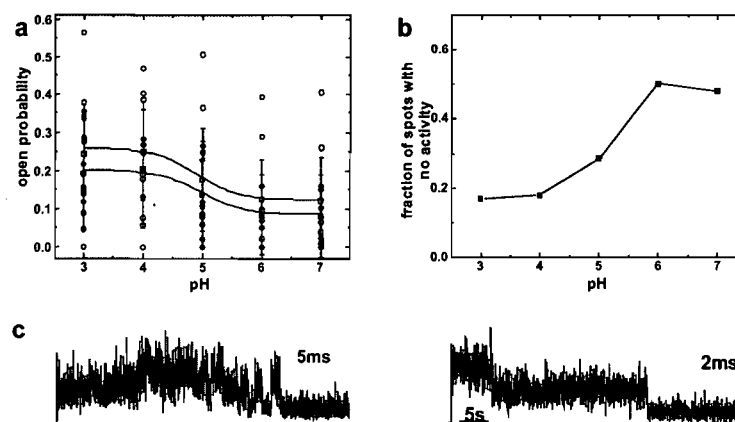


Figure 3.3. Open probability determined directly from fluorescence time traces a. Open probability of one subunit determined from the time traces (BF) considering that the closed subunit is bright and the open subunit dark. The red spots are single values. Mean and SD are shown in blue. Filled symbols are mean of all values, open symbols are “corrected” values, which excluded all time traces with no activity (Fig. 3b). $p=0.014/0.006$ (ANOVA) b. pH dependence of fraction of spots showing no activity. c. Image series (BF) were recorded with higher time resolution (5 and 2 ms respectively). While the signal to noise ratio decreased, no additional information was observed

While the absolute value at high pH (0.12) would fit well with the low open probability of KcsA in this range, the value for the low pH (0.25) is too low with previously published values for the *channel* open probability of this mutant measured in patch-clamp recordings (0.8-0.95)(Cordero-Morales et al.;Chakrapani, Cordero-Morales, and Perozo). (Note that it is assumed that all four subunits have to open for the channel to conduct.) Nevertheless, in our electrophysiological recordings of labeled Q119C-E71A in planar lipid bilayer with the same lipid composition as we used for formation of supported bilayers (phosphatidylcholine, PC), we found a lower open probability than published previously (0.49 ± 0.25 at pH 3; $pK = 4.7$, Fig. 4e). We suppose that the difference in the open probability may be caused by the different lipid composition used for the bilayer as compared to the previous recordings

(PE:PG=3:1(Thompson et al.)). The PC was essential for the formation of stable supported bilayers. We also cannot exclude that the mutations of the positions close to the pH sensor(Thompson et al.) have an influence on the open probability. Labeled mutant channels showed a slightly lower open probability compared to unlabeled ones (0.5 vs. 0.65 at pH3).

KcsA-WT channel switches between gating modes with very different open probabilities (0.16-0.8). But these gating modes as well as the voltage dependence of KcsA-WT, which reduces the open probability at 0 mV (in the supported bilayer) to 0.33, are caused by conformational changes of the selectivity filter, not the helical bundle crossing, and are largely removed in the KcsA-E71A mutant(Cordero-Morales et al.;Chakrapani, Cordero-Morales, and Perozo). One should keep in mind, however, that the published values are apparent open probabilities (NP_o), while we are directly measuring the single subunit open probability.

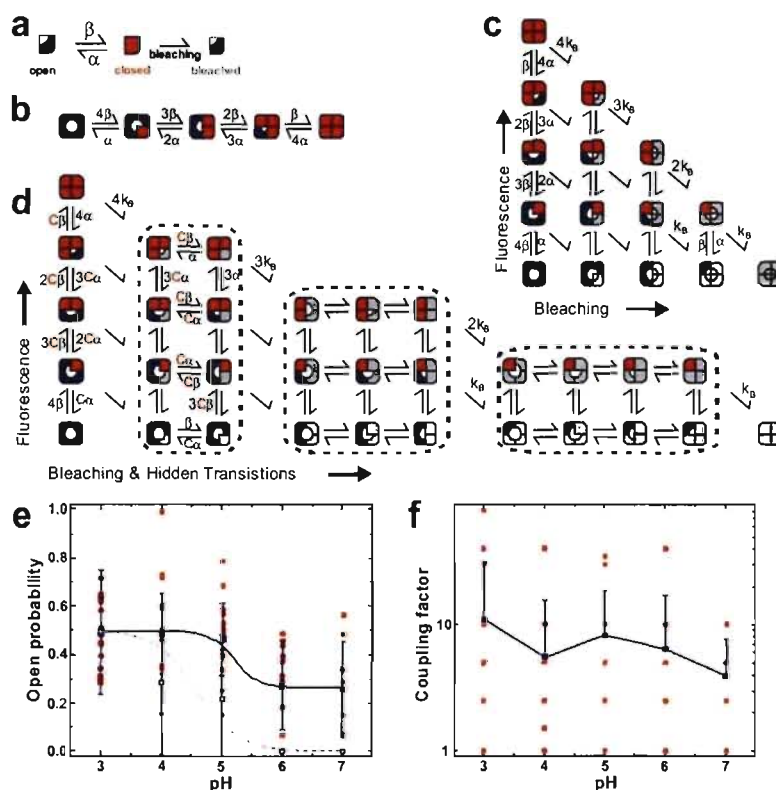


Figure 3.4. Markov model fitting of KcsA fluorescence time traces **a.** Each subunit may be in the fluorescent (closed, red) or non-fluorescent (open, blue) state. After bleaching, the states fuse into the bleached, non-fluorescent state (grey), where we cannot determine the state of the channel anymore. **b.**

If the subunits are independent, the rate constants for opening of a single subunit are multiplied by the number of closed subunits and so on. This model indicates the independent, non-bleaching channel. **c.** Introducing irreversible bleaching into the model results in a 15-state model, where the bleached subunits (grey) have an undefined state of the bundle crossing. **d.** If the subunits are not independent, we have to introduce an additional coupling constant (see text for details) so that the bleached subunits have an influence on the rate constants of the fluorescent subunits. **e.** Open probability of a single subunit calculated from the rate constants α & β . Shown are the actual values (*red*) and mean \pm SD (*blue filled*; $p=0.001$ ANOVA). For comparison the *channel* open probability of KcsA-E71A-Q119C labeled with TMRM is given (*blue open symbol*). **f.** Coupling constant resulting from Markov model fits of the time traces. Shown are single values (*red*) as well as mean \pm SD (*blue*; *neg. SD omitted in logarithmic scale*).

We tested whether insufficient exchange of pH on the *trans* side of the supported bilayer might be responsible for the low open probability at low pH. Nevertheless, the results did not change when preparing the vesicles and supported bilayer at pH 3 and then increasing the pH stepwise to pH 7, as compared to starting at pH 7 and decreasing it stepwise to pH 3. Also forming a new bilayer for each pH did not alter our findings. Another possible reason for the low open probability may be that some of the channels become immobilized on the glass surface. Figure 3b shows the pH dependence of the fraction of spots that do not exhibit any fluctuations in the fluorescence intensity. While at pH 6-7, these spots mainly represent those channels that remain closed during the observation time, at pH 3, the fraction with no activity (17%) likely represents channels locked in the closed position. For the calculation of the “corrected” values in Figure 3a, all spots that do not show any activity have been excluded. The “true” curve would start with the normal values at pH 7 and approach the “corrected” curve at pH 3.

We also investigated the dwell times in the open and closed state based on our measurements. We found that the dwell times were relatively long with values of 2.4 ± 1.5 s and 2.2 ± 1.3 s for the open and closed state, respectively. These long dwell times suggest that the movement of the lower bundle crossing is switching from the active to the resting state, while faster gating is caused by movement in the selectivity filter, consistent with previous findings (Cordero-Morales et

al.; Chakrapani, Cordero-Morales, and Perozo; Blunck et al.). Nevertheless, the value for the mean open time is longer than values determined previously using single channel recordings (burst length 0.16 - 0.06 s for pH 3 and 7 respectively). Also here, mutation or labeling of the helical bundle crossing may have an influence on the dwell time distribution. As the long dwell times could also be the result of poor time resolution, we looked for faster events with a higher time resolution. However, with increased frame rates of 50, 200, and 500 s⁻¹ (Fig. 3c), we did not detect additional gating events, but under these recording conditions our signal to noise was reduced significantly.

3.1.4.3. Simultaneous movement of KcsA subunits

While observing the fluorescence versus time traces, we noticed that frequently, two or more subunits changed their state simultaneously (Fig. 1b & 2a). We found that in average 37 ± 29 % of all transitions were multiple transitions. If we calculate the probability for such a double transition in a 2 subunit system with the dwell times observed (see above), the probability is below 1%. For a subsequent simultaneous opening and closing, it is even lower (<0.25%; for details see suppl. material). The transitions, therefore, do not occur independently, but have to be coupled by an interaction. An interaction of an external quencher with several fluorophores simultaneously would be difficult to imagine as a possible cause for the simultaneous events. Self quenching or homo-transfer between the fluorophores attached to different subunits of the channel should occur constantly, considering that the transition time constants of fluorophores lie in the nanosecond range. In this case, we would thus not see independent intensity changes or changes after bleaching of one fluorophore. We therefore set out to investigate more closely whether or not the simultaneous events could be explained by cooperative gating of the four subunits.

We fitted the fluorescence time traces to Markov models. Chakrapani et al. used a cooperative final transition for the opening to fit their KcsA currents similar to the cooperative opening of the voltage-gated channels. Here, on the other hand, we

assumed a more basic model, in which each subunit can exist in only two states: open and closed. We are excluding an *a priori* cooperative final step, since we are observing the movement of single subunits and not the actual conductance state of the channel. If the movement that we are observing with the fluorescence involved a single cooperative step, we would never observe the single subunits. Our model results in three fluorescence states, open (dark), closed (bright) and bleached (dark). In the latter, we cannot determine the physical state of the channel (Fig. 4a). A channel with four subunits will have five equidistant fluorescence levels (see above and Fig. 4b). If one considers bleaching, the model expands to 15 states (Fig. 4c).

In the independent model, the channel is described by three parameters: the opening and closing rates α and β as well as the bleaching rate k_B . The model was fitted to the time traces using the QUB software (Qin et al.) as described below. In order to increase the convergence of the model, we compared the bleaching rates found by the fitting routine with the time constant obtained from exponential fitting of the photobleaching time course from the entire field of view. We found a good agreement between the values (Suppl. Table 1) so that we could subsequently fix the bleaching rate k_B to the value obtained from the exponential fit. Nevertheless, this exponential fit had to be done for each image series, since the bleaching rate would be dependent on laser intensity, solutions (presence of reducing agents, oxygen saturation) or focusing. While fixing k_B increased the speed of the fitting and convergence, the other rate constants did not change significantly (for details see supplementary material).

3.1.4.4. Kinetic analysis of subunit movement

From the results of the QUB fits, we calculated the open probability of one subunit (Fig. 4e, *closed symbols*). As in the direct determination, the values had a relatively wide distribution due to the low number of events. At pH 6 & 7, the open probabilities calculated from the rate constants are overestimated. The reason is that at high pH values there are many traces with zero or very few events other than

bleaching (Fig. 3b) due to the fact that the channel is almost constantly closed so that very few conformational changes are observed before bleaching of the fluorophores attached to the channel. Since the number of events was not sufficient to lead to a convergent fit, they could not contribute to the value of the open probability here. Nevertheless, from the direct determination, we know that the open probability of the channels without activity is close to zero.

We found a similar pH dependence as determined directly from the time traces, but with higher absolute open probability. Considering that pH 6 & 7 are overestimated, these values correspond well to the *channel* open probability that we determined for KcsA-E71A-Q119C from electrophysiological recordings in a PC bilayer (Fig. 4e, *open symbols*). One has to keep in mind, however, that the *subunit* open probability in the independent case has to be taken to the 4th power in order to calculate the *channel* open probability. For a highly cooperative case, the subunit and channel open probability are nearly identical.

If we calculate the dwell time constants from the transition rates α and β , we find very similar values as in the direct determination (4.9 ± 2.9 s and 3.6 ± 2 s for closed and open dwell time respectively at pH 5) confirming the slow gating of the bundle crossing. This shows that the model is accurately describing the channels' kinetics.

3.1.4.5. Cooperative gating events

Many traces could not be fitted with the independent model (Fig. 4c) largely due to the simultaneous events. In order to include a cooperativity between the subunits, we introduced a coupling constant C . This coupling constant increases the rate constant of opening and closing for all but the initial subunit (Fig. 4d). Using this coupling constant, the energy difference between two states was decreased by a factor $\Delta\Delta G = kT \ln(C)$. This is, in other words, the coupling energy that the first subunit to

open would have to overcome additionally. The subsequent steps would occur with equal rate constants.

The data were fitted with the independent model first ($C = 1$), and then with increasing value for the coupling constant ($C = 1, 2.5, 5, 10 \dots$) in order to determine the optimal coupling constant. This way, we did not change the number of free parameters so that we could directly compare the quality of the fit. Importantly, the introduction of the coupling constant led to convergence of time traces, for which we did not find a solution with the independent model. For time series that did converge with the independent model, introduction of a coupling factor improved the fit significantly. We found coupling factors that varied over the range from 1-80 with a mean value of 8.3 ± 14 for pH 3-5 (Fig. 4f). They showed slight pH dependence: while the coupling remains constant between pH 4 and pH 6, it seems to be slightly stronger at pH 3 and weaker at pH 7. Considering the variance of the values and the low numbers of events per trace, we are reluctant to dwell into a more detailed discussion about pH dependence. However, these results indicate clearly that there is a direct interaction between the subunits that leads to cooperative opening and closing.

3.1.4.6. Gating is not fluorophore specific

In order to increase the observation time and to verify that the observed effects are not fluorophore specific, we used a different dye, ATTO 565-maleimide (ATTO-565M), which turned out to be much more resistant against photobleaching. Using this dye, we increased the observation time approximately 4 to 5 fold with similar signal to noise ratio. The results from both the direct analysis of the time series and the model fits with ATTO-565M were very similar to the results we obtained with TMRM. The open probability of a subunit varied from 0.08 to 0.23 with a pK of 5.2 (Suppl. Fig. 1a). The coupling constant varied from 1 to 50 with a mean value of 15.4 ± 18.3 for pH 3-4 (Suppl. Fig. 1b). Due to the slow kinetics, the 4-fold increase

of the observation time did not significantly decrease the variance. The results ensure, however, that our findings are not specifically generated by the fluorophore TMRM, but are also true for a completely different dye with different inherent properties (e.g. blinking).

3.1.5. Discussion

By fluorescently labeling the purified KcsA channel at the C-terminus of TM2, we were able to monitor the opening and closing of the channel using single molecule fluorescence spectroscopy. In our analysis of the movement of the four subunits, we required a coupling factor in order to explain the data, demonstrating that there is an energetic coupling between the subunits. Independent movement of single subunits, which was also observed, does not contradict an interaction between the subunits but shows that the coupling energy is not extremely high. We found a value for the coupling energy of up to 3.9-4.4 kT with a mean of 2-2.7 kT. One should keep in mind that the results include some blinking of the fluorophores (13%). But since this is an intrinsic property of the single fluorophore, blinking occurs independently so that the coupling constant would rather be reduced.

What could be the cause for the cooperative action of the subunits that we observed? In the literature, two different mechanisms have been identified that could lead to cooperative opening of the channels. Kariev et al. suggested a water basket built from electrostatic interactions between the glutamines (Q119) near the helical bundle crossing. However, cysteine mutation and/or subsequent labeling of Q119C could destroy the water basket. Similarly, it is likely that labeling G116C could interfere with water basket formation. We did not find a significant difference between the Q119C-E71A and G116C-E71A mutants used in this study. Since both these labeled cysteine mutants do show cooperativity, this suggests two explanations: 1) our labeled mutants did not fully prevent water basket formation or 2) water basket formation was fully prevented but it is not the only underlying mechanism of cooperativity. The second possibility is supported by the fact that we found cooperativity also at low pH, although basket formation is prevented by protonation

of the glutamines. The disturbance of this proposed mechanism may also be responsible for the lower open probability that we observed.

Thompson et al.(Thompson et al.) identified in the pH sensor of KcsA (E118, E120, H25) an intersubunit interaction that may lead to cooperative opening of the channel. At low pH, protonation of H25 disturbs the interaction between E118 and E120 with R121 and R122 and reduces the energy barrier for subunit opening. The authors observed an increased occurrence of subconductance levels upon mutating the pH sensor. While this interaction is in agreement with the cooperative behavior that we found, it cannot fully explain it. In their model, the closed state is stabilized by electrostatic interaction between the glutamates (E118, E120) and arginines (R121,R122). Lowering of the pH would lead to an abolition of the interaction and should thus leave the subunits to act independently. Nevertheless, we find a slight decrease, if any, of the coupling constant at pH 7. Furthermore, while removal of the interaction by mutation increases the occurrence of subconductance levels(Thompson et al.), lowering of pH does not have the same effect although the interaction would also be expected to be removed. We therefore have to postulate another intersubunit interaction that stabilizes the open position. One or more of the identified positions (E118, E120, H25) may still be involved in the putative interaction.

The cooperativity described here for the KcsA channels, has been postulated and demonstrated for voltage-dependent channels, too. There, the four voltage sensors are activated followed by one cooperative opening. Although it has been suggested that it is actually the voltage sensors, which act cooperatively, it may, in fact, be that the interaction between the S5 or S6 (TM1 or TM2) C-termini persists in Shaker and that this indirectly retains the S4 from entering its final position. Once the interaction is broken, the S4 are free to move, which could be the cooperative step described by Pathak et al..

In our study, we did find both behaviors, independent as well as cooperative movement of the four subunits. It has been suggested that the occurrence of a partial

opening of the channel is the cause for subconductance levels, and recently, the removal of an intersubunit interaction at the C-terminus has been shown to increase occurrence of subconductance levels(Thompson et al.). Based on our findings, it is not correct to assume that every time only one subunit opens, the channel conducts, since in the electrophysiological recordings of KcsA the occurrence of subconductance levels is lower than observed here. It is possible, however, that at least two or three subunits must open to create sufficient space for ion conduction. Another possibility is that the movement of the helical bundle crossing is coupled to the activation/inactivation of the selectivity filter(Blunck et al.). The selectivity filter is open after a pH step, because the open probability at that instant is highest, but after opening of the bundle crossing, it evolves into the inactivated state(Cordero-Morales et al.;Chakrapani, Cordero-Morales, and Perozo). This indicates that the movement of the bundle crossing influences the state of the selectivity filter. Thus, it may be that the selectivity filter is in a deactivated state and that several subunits have to open before the selectivity filter becomes conductive. Finally, we should also keep in mind that some of the channels in our preparations may be immobilized on the glass (Fig. 3b) and therefore reduce the observation of opening and cooperative movement. Such a possible influence of the glass surface would be removed in a black lipid bilayer.

3.1.6. Conclusions

Single molecule fluorescence offers a powerful tool to uncover information that is hidden in an ensemble measurement. By direct observation of the subunit movement of KcsA using single channel fluorescence spectroscopy, we found in this study that the subunits of KcsA act cooperatively with a coupling constant of 2-2.7 kT. To finally answer the question, whether a partial opening (just 1-3 subunits) causes subconductance levels, the present technique will have to be combined with electrophysiology so that the single channel current and the single channel fluorescence are measured simultaneously in a bilayer system that allows electrical control of the membrane potential.

3.1.7. Acknowledgements

We would like to thank Mireille Marsolais and Élise Faure for technical assistance. This work is financially supported by the CIHR (MOP-81351 to R.B.), the CRSNG (327201DG to R.B.), the CRC foundation (202965 to R.B.) and the NIH (GM30376 and MH078822 to F.B.). Infrastructure was financed by the CFI (202965 to R.B.). H.M. is supported by FQRNT. H.C.H. is supported by NIH (F31NS054532)

3.1.8. Supporting Information

3.1.8.1. Robustness of fit

The models (Fig. 4c-d) have 15 and 31 states, respectively. By fixing k_B to the overall bleaching rate (Supplementary Table 1) and running different fits for each coupling constant C , we could reduce the number of free parameters to only two. We wanted to know how reliably the algorithm would find the correct rate constants of the model. Therefore we simulated time traces based on the independent model (the dependent model always gave exactly the same results as the independent model with $C = 1$) with different combinations of the four parameters. We subsequently fitted the traces with the model using different starting values. For each combination of α and β , five traces were simulated and fitted with high as well as low starting values. Starting values were chosen at both extremes, too high and too low. Supplementary Figure 2 shows the results of the fitting of the simulated data as a function of the modulated parameter α and β or the coupling constant C . In general, the transition rate constants corresponded well to the theoretical values (*solid lines*) for the different combinations of parameters. The only problem occurred if α was close to the bleaching rate k_B . In this case, a low starting value for β either tended towards zero or remained close to its starting value. A high starting value for β the correct values were found. In our actual data, this could only occur at pH 6-7, where the opening rate constant is very low. This may explain, why we could not fit many of the data at

pH 7 (open probability too low). In all other cases (lower pH), α is larger than k_B . In the fits of the actual data, we used high and low starting values, and ensured that the fits converged to identical results.

If α and β were higher (e.g. = 1), the rate constants estimated by the Markov model were estimated slightly too low. (Suppl. Fig. 2a, *green symbols*). However, the ratio between α and β remained correct, so that the open probability calculated from the rate constants gave the correct value (Suppl. Fig. 2c).

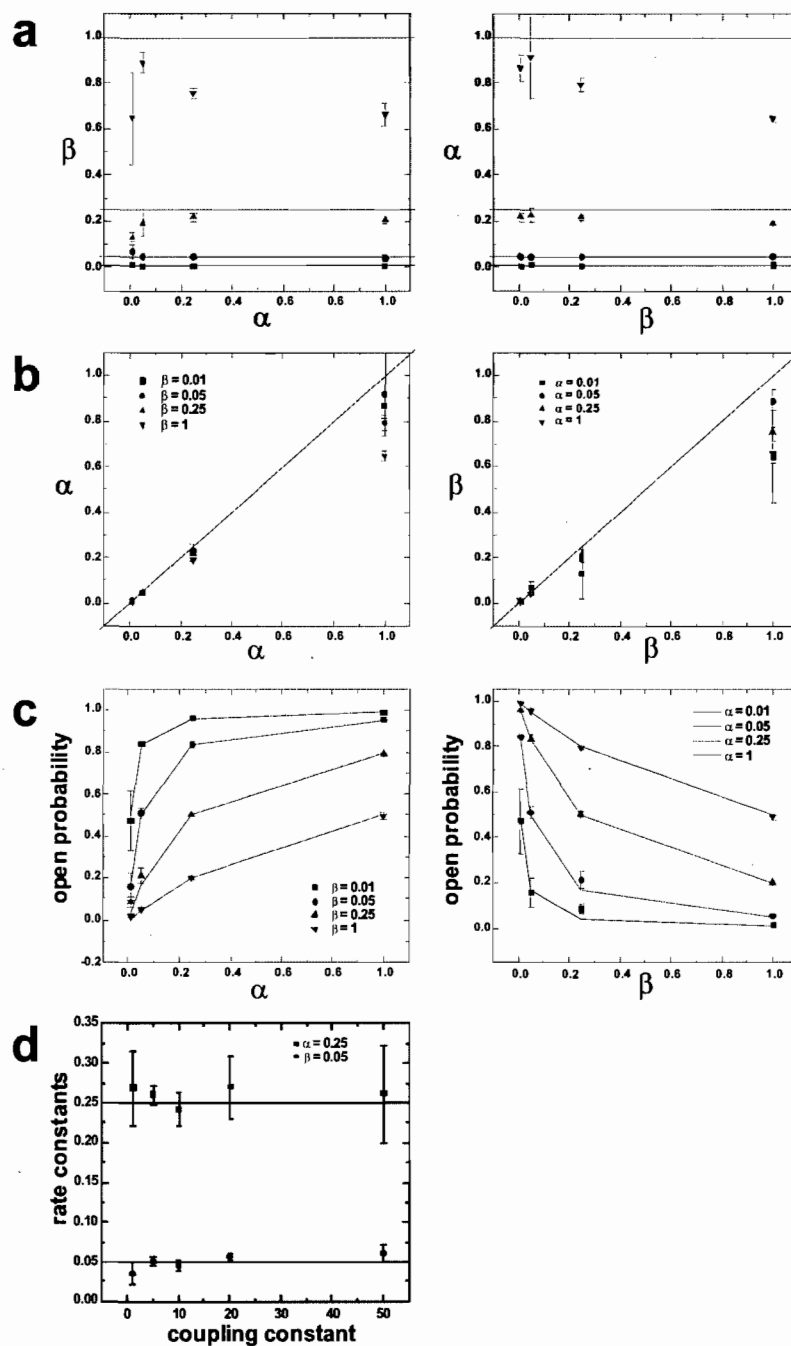


Figure 3.5 : Robustness of fit Results of fitting simulated data with the dependent model. On the abscissa, the theoretical value used to simulate the data, on the ordinate the mean and standard deviation of the fits of five simulations are shown. The lines indicate the theoretical values. For each point five time traces were simulated and fitted with high and low starting values. Open probability was calculated as $\alpha/(\alpha+\beta)$ using the optimal fit results.

3.1.8.2. Calculation of double-jump probability

Assumptions :

1. We consider two identical systems which behave according to a Markov system.
2. Each system may reside in two states.
3. α and β are the closing and opening rate constants.
4. The temporal resolution is $\Delta t=30\text{ms}$.

The probability of the system to reside in the all closed state is:

$$P_{CC} = \left(\frac{\beta}{\alpha+\beta}\right)^2 \quad (1)$$

We wait for one of the two systems to open and calculate the probability of the second one to open within the time Δt after this event.

The probability that a closed system will open within a certain interval Δt can be calculated by integration of the dwell time histogram (normalized to the integral to infinity under the histogram) and is equal to:

$$P(\alpha, \Delta t) = (1 - e^{-\alpha\Delta t}) \quad (2)$$

At the same time, the first system must not reclose:

$$P_{RO}(\beta, \Delta t) = e^{-\beta\Delta t} \quad (3)$$

Thus, the probability of a system residing in state CC to open in a double step is:

$$P_{DSC}(\alpha, \beta, \Delta t) = e^{-\beta\Delta t}(1 - e^{-\alpha\Delta t}) \quad (4)$$

The probability for a double opening to occur in an equilibrated system is thus:

$$\begin{aligned} PDC &= P_{DSC}(\alpha, \beta, \Delta t) P_{CC} \\ &= \left(\frac{\beta}{\alpha+\beta}\right)^2 e^{-\beta\Delta t}(1 - e^{-\alpha\Delta t}) \end{aligned} \quad (5)$$

The closing probabilities (P_{DSO} , PDO) may be calculated accordingly.

The probability for a double opening and subsequent closing is then:

$$PDCO = P_{DSC}(\alpha, \beta, \Delta t) P_{DSO}(\alpha, \beta, \Delta t) P_{CC} \quad (6)$$

and for a double closing and subsequent opening

$$PDOC = P_{DSC}(\alpha, \beta, \Delta t) P_{DSO}(\alpha, \beta, \Delta t) P_{OO} \quad (7)$$

The probability for a double event of either direction to occur is thus:

$$PD = P_{DSC}(\alpha, \beta, \Delta t) P_{DSO}(\alpha, \beta, \Delta t) (P_{OO} + P_{CC}) \quad (8)$$

(Since the dwell times are supposed to be long as compared to Δt , we did not consider the case that the second system opens but closes before the end of Δt .)

Results

The probability for a double step of two subunits (PDC/PDO) and for a double event in either direction (PD) have been calculated using an exposure time $\Delta t = 0.03s$ and dwell times varying between 100ms and 20s.

For the dwell times that we observed in our experiments, the PDC_{exp} was below 1%. The highest probability in the range for a double step was $PDC_{max} = 4.8\%$. This was for the shortest dwell times of 100ms for both opening and closing. However, much shorter dwell times do not further increase the percentage of double steps, because the probability of the first system to reclose would be too large. The optimal values are thus a function of the sampling interval Δt . The maximal probability of 6.7% was reached at 61ms and 39ms for the opening and closing dwell time, respectively. With dwell times so close (or even below) our exposure time, we would not clearly resolve the signals anymore but rather increase the noise.

The probability of observing a double closing and opening step is even lower. All values similar to the experimental values gave probabilities of well below 1% ($PD_{exp} < 1\%$). The maximum is 3.1% at dwell times of 50ms and 38ms for opening and closing respectively.

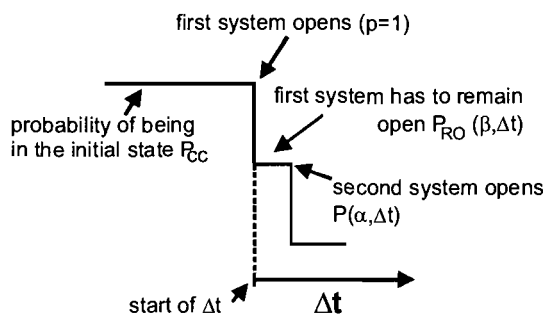


Figure 3.6. Calculation of double jump probabilities

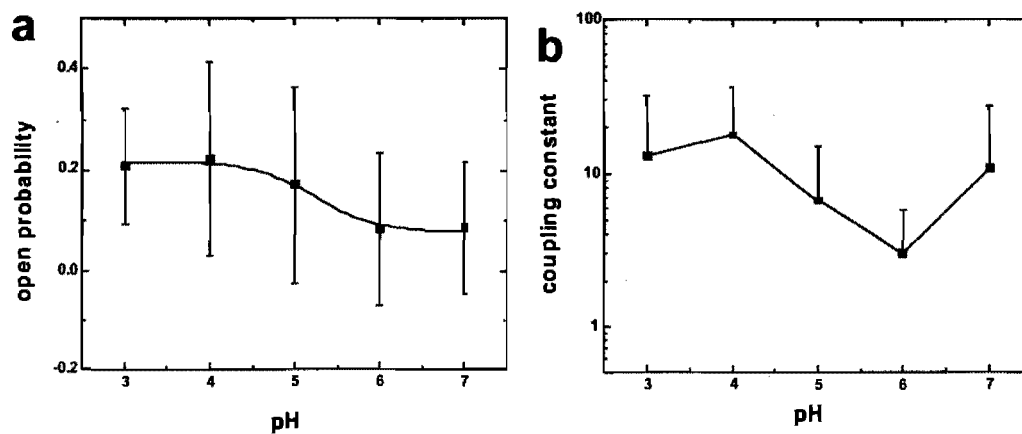


Figure 3.7 : Results from ATTO-565M imaging a. Open probability of one subunit of Q119C-E71A determined directly from the fluorescence traces labeled with ATTO-565M. The data is fitted to a Boltzmann curve with $pK = 5.2$.

b. Coupling constant (mean and SD; *neg. SD omitted in logarithmic scale for clarity*) as a function of Q119C-E71A labeled with ATTO-565M.

image	k_B	$\langle k_B \rangle$	k_τ
1	0.014		
	<i>0.0000017</i>		
	0.055	0.030	0.029
	0.014	(0.036)	
	0.065		
0.030			
2	0.025	0.019	0.029
	0.012		
3	<i>0.00405</i>		
	0.024	0.022	0.037
		(0.031)	
0.037			
4	0.031		
	<i>0.0063</i>		
	0.034	0.026	0.031
		(0.033)	
0.034			
5	0.016		
	0.017	0.011	0.017
		(0.017)	
<i>0.0000022</i>			

Table III.I: Comparison of bleaching rates from exponential fit and QUB

Bleaching rates for five different images are shown. Several single spots per image were fitted with the Markov models (Fig. 4) in QUB with free bleaching rate k_B (2nd column). $\langle k_B \rangle$ is the averaged bleaching rate of these spots. The values were compared to the bleaching rates k_τ obtained directly from exponential fitting of the integrated intensity of the entire image (4th column). Not all values fit perfectly (see *italics*), which is not surprising, since we have a maximum of four events to determine the rate. $\langle k_B \rangle$ values in parenthesis are calculated excluding the values in italics.

3.1.9. References

1. Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. & MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity *Science* 280: 69-77.
2. Shimizu, H., Iwamoto, M., Konno, T., Nihei, A., Sasaki, Y. C. & Oiki, S. (2008) Global twisting motion of single molecular KcsA potassium channel upon gating *Cell* 132: 67-78.
3. Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D. M., Roux, B. & Perozo, E. (2006) Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 311-318.
4. Blunck, R., Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Perozo, E. & Bezanilla, F. (2006) Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction *J. Gen. Physiol* 128: 569-581.
5. Thompson, A. N., Posson, D. J., Parsa, P. V. & Nimigean, C. M. (2008) Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
6. Takeuchi, K., Takahashi, H., Kawano, S. & Shimada, I. (2007) Identification and characterization of the slowly exchanging pH-dependent conformational rearrangement in KcsA *J. Biol. Chem.* 282: 15179-15186.
7. Miloshevsky, G. V. & Jordan, P. C. (2007) Open-state conformation of the KcsA K⁺ channel: Monte Carlo normal mode following simulations *Structure* 15: 1654-1662.

8. Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G. & Perozo, E. (2006) Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 319-322.
9. Cuello, L. G., Romero, J. G., Cortes, D. M. & Perozo, E. (1998) pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K⁺ channel *Biochemistry* 37: 3229-3236.
10. Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R. & Schrempf, H. (1999) Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans* *FEBS Lett.* 462: 447-452.
11. Splitt, H., Meuser, D., Borovok, I., Betzler, M. & Schrempf, H. (2000) Pore mutations affecting tetrameric assembly and functioning of the potassium channel KcsA from *Streptomyces lividans* *FEBS Lett.* 472: 83-87.
12. Mathur, R., Zheng, J., Yan, Y. & Sigworth, F. J. (1997) Role of the S3-S4 linker in Shaker potassium channel activation *J. Gen. Physiol* 109: 191-199.
13. Zheng, J. & Sigworth, F. J. (1998) Intermediate conductances during deactivation of heteromultimeric Shaker potassium channels *J. Gen. Physiol* 112: 457-474.
14. Chapman, M. L. & VanDongen, A. M. (2005) K channel subconductance levels result from heteromeric pore conformations *J. Gen. Physiol* 126: 87-103.
15. Chauhan-Patel, R. & Spruce, A. E. (1997) Characterization of single inward rectifier potassium channels from embryonic *Xenopus laevis* myocytes *J. Membr. Biol.* 158: 265-274.

16. Matsuda, H. & Stanfield, P. R. (1989) Single inwardly rectifying potassium channels in cultured muscle cells from rat and mouse *J. Physiol* 414: 111-124.
17. Xie, L. H., John, S. A., Ribalet, B. & Weiss, J. N. (2008) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity *J. Physiol* 586: 1833-1848.
18. Kariev, A. M., Znamenskiy, V. S. & Green, M. E. (2007) Quantum mechanical calculations of charge effects on gating the KcsA channel *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 1218-1229.
19. Ulbrich, M. H. & Isacoff, E. Y. (2007) Subunit counting in membrane-bound proteins *Nat. Methods* 4: 319-321.
20. Ha, T., Enderle, T., Chemla, D. S., Selvin, P. R. & Weiss, S. (1997) Quantum jumps of single molecules at room temperature *Chemical Physics Letters* 271: 1-5.
21. Widengren, J. & Schwille, P. (2000) Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy *Journal of Physical Chemistry A* 104: 6416-6428.
22. Zondervan, R., Kulzer, F., Orlinskii, S. B. & Orrit, M. (2003) Photoblinking of rhodamine 6G in poly(vinyl alcohol): Radical dark state formed through the triplet *Journal of Physical Chemistry A* 107: 6770-6776.
23. Sauer, M., Drexhage, K. H., Lieberwirth, U., Muller, R., Nord, S. & Zander, C. (1998) Dynamics of the electron transfer reaction between an oxazine dye and DNA oligonucleotides monitored on the single-molecule level *Chemical Physics Letters* 284: 153-163.

24. Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F. & Perozo, E. (2007) A Quantitative Description of KcsA Gating II: Single-Channel Currents *J. Gen. Physiol* 130: 479-496.
25. Qin, F., Milescu, L., Qiong, F., Nicolai, C. & Bannen J. QUB suite. 1997.
Ref Type: Computer Program
26. Pathak, M., Kurtz, L., Tombola, F. & Isacoff, E. (2005) The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel *J. Gen. Physiol* 125: 57-69.
27. Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F. & Perozo, E. (2007) A Quantitative Description of KcsA Gating I: Macroscopic Currents *J. Gen. Physiol* 130: 465-478.
28. Richardson, J., Blunck, R., Ge, P., Selvin, P. R., Bezanilla, F., Papazian, D. M. & Correa, A. M. (2006) Distance measurements reveal a common topology of prokaryotic voltage-gated ion channels in the lipid bilayer *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103: 15865-15870.

3.2 Résultats non publiés

Dans le but de recueillir de l'information sur la fluorescence et sur le courant en canal unitaire de façon simultanée, le système d'électrophysiologie de la figure 2.2. doit être combiné à la méthode de l'article. Tel qu'il a été mentionné dans l'article précédent, ces informations permettraient de corréler les niveaux de sous-conductance en électrophysiologie au nombre de sous-unités ouvertes en fluorescence.

La figure suivante montre qu'il est possible de suivre la fluorescence d'un seul canal dans une bicouche lipidique planaire (non supportée). Le canal diffuse dans la membrane et un programme maison construit en Matlab permet son suivi.

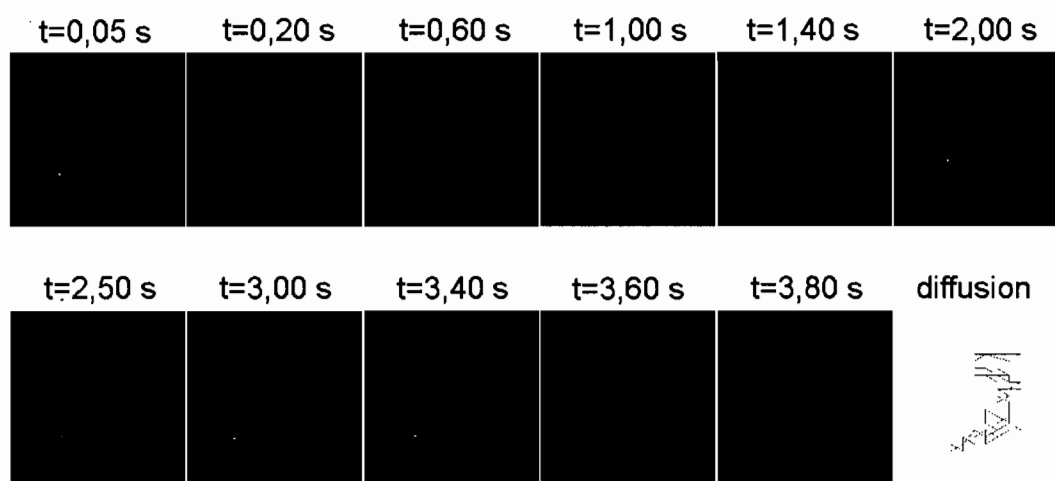


Figure 3.8. KcsA dans une bicouche lipidique planaire. La figure est composée de mesures de fluorescence du canal KcsA diffusant dans la bicouche. Des images à différents temps sont indiquées ainsi que la trace de diffusion du canal.

Selon les mesures effectuées, la principale difficulté à la détection de la fluorescence simultanément au courant en canal unitaire réside dans l'optimisation du signal de fluorescence. Ainsi, plusieurs limitations s'ajoutent relativement au système de bicouche supportée. Premièrement, puisqu'une haute résolution spatiale nécessite un objectif à haute ouverture numérique, la distance maximale entre l'objectif et la

bicouche est très petite (de l'ordre de 150 μm). Ensuite, la membrane de plastique qui tient la bicouche lipidique plane est autofluorescente, ce qui crée un bruit de fond énorme si la lumière incidente est dirigée sur celle-ci. Il est par contre difficile de l'éviter complètement. Aussi, puisque le courant en canal unitaire peut souvent démontrer des sauts dans un intervalle relativement court (~ 20 ms), la détection de fluorescence doit être très rapide pour vérifier si les sauts sont reliés au mouvement du « helical bundle crossing ». Il est cependant difficile de détecter la fluorescence dans un intervalle plus court que 15 ms avec une caméra EMCCD : le temps d'exposition est trop court, et si l'intensité de la lumière incidente est augmentée pour contrecarrer le problème, le photoblanchiment s'effectue plus rapidement. Bien que certains types de détecteurs soient plus rapides, une caméra EMCCD avec une bonne résolution spatiale est essentielle pour nos expériences, étant donné le besoin de vérifier le nombre de canaux présents dans le champ de vision. Si la résolution temporelle n'est donc parfois pas assez grande, les variations de fluorescence sont plus difficiles à interpréter relativement aux variations du courant.

Malgré les limitations énoncées, il est tout de même possible d'optimiser les conditions expérimentales de sorte à visualiser une bonne fluorescence sur un montage d'électrophysiologie. La figure 3.8 témoigne de cette optimisation, qui pourrait possiblement amener des mesures simultanées de fluorescence et de courant en canal unitaire.

4. Discussion

4.1. Coopérativité ou indépendance : retour sur les résultats

Dans l'article précédent, il a été question de coopérativité entre les quatre sous-unités d'un canal potassique bactérien : KcsA. Étant le prototype accepté pour les canaux eucaryotes, on s'attend à ce que les résultats précédents puissent aider à mieux comprendre le pore de conduction en général.

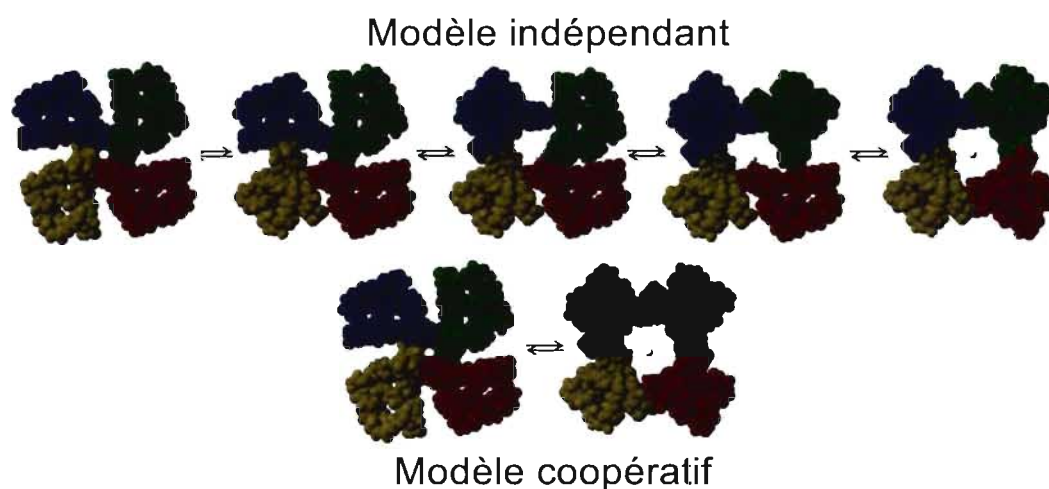


Figure 4.1. Schématisation du modèle indépendant et du modèle coopératif. Le modèle indépendant indique que les sous-unités s'ouvrent et se ferment en passant par différents états de conformation. Le modèle coopératif indique plutôt que les états intermédiaires ne sont pas visités (dans un cas entièrement coopératif).

Les résultats montrent en général qu'il semble exister une certaine coopérativité pour l'ouverture et la fermeture du pore. Cette coopérativité a d'abord été perçue dans la forme des traces de fluorescence. Ce sont les transitions entre les différents états de fluorescence qui semblent indiquer la présence ou non d'un processus coopératif. Lorsque les transitions impliquent plusieurs sous-unités à la fois, il est supposé que la première ouverture ou fermeture entraîne les étapes subséquentes. Bien qu'il soit possible que plusieurs sous-unités puissent changer d'état et être détectées simultanément même si elles agissaient indépendamment, les simulations ont

démontrées que ce n'est pas aussi probable que ce qui est observé expérimentalement. Les simulations montrent en fait que moins de 1% des transitions devraient en moyenne impliquer la détection d'une transition impliquant deux sous-unités. Les transitions impliquant plus de deux sous-unités deviendraient alors négligeables. L'expérience montre plutôt 37 ± 29 % des transitions qui impliquent plusieurs sous-unités. Aussi, plusieurs transitions impliquant trois ou quatre sous-unités sont détectées. Bien que ce ne soit pas toujours le cas et que des transitions n'impliquant qu'une seule sous-unité sont observées, les mécanismes d'ouverture et de fermeture semblent montrer un certain degré de coopérativité.

Afin de vérifier et de quantifier la coopérativité qui semble exister entre les sous-unités, un modèle caché de Markov (« Hidden Markov Model ») a été créé. Le modèle est constitué des processus pouvant apparaître dans les traces de fluorescence : les changements d'état suivant les ouvertures ou les fermetures ainsi que le photoblanchiment. Plusieurs modèles avec différents facteurs de couplage entre les sous-unités ont été créés afin de comparer leur convergence selon un algorithme d'optimisation du « likelihood ». La convergence du modèle est quantifiée par cet algorithme, ce qui permet d'établir quelle valeur de couplage convient le plus à chacune des traces de fluorescence. Les valeurs de couplage utilisées sont en fait un facteur multiplicatif des taux de transition pour les transitions suivant une première ouverture ou fermeture. Afin de converger, certaines traces de fluorescence nécessitaient un facteur de couplage plus grand que un, signifiant qu'un modèle indépendant ne pouvait pas bien les représenter. La construction de modèles coopératifs est donc essentielle pour modéliser les résultats présentés dans l'article.

4.2. Énergie de couplage entre les sous-unités

À partir des valeurs de couplage obtenues de chacune des traces de fluorescence, une énergie de couplage entre deux sous-unités a été calculée ($E = k_{\beta}T \ln(C)$) (Voir section 3.1.3.4). Cette énergie montre des valeurs allant de 3,9 à 4,4 $k_{\beta}T$ avec une

moyenne de 2,0 à 2,7 $k_{\beta}T$. La valeur du couplage correspondant dans la modélisation est donc d'environ 10. Le calcul implique qu'un modèle indépendant aurait une énergie nulle. Aux fins de comparaison, une modélisation qui aurait nécessité une valeur de couplage aussi élevée que 100 ou 1000 correspondrait à une énergie de 4,6 et 6,9 $k_{\beta}T$. Visuellement, à ces énergies, les simulations ne semblent pas montrer de niveaux intermédiaires (ouvertures ou fermetures partielles) (Figure 4.2.).

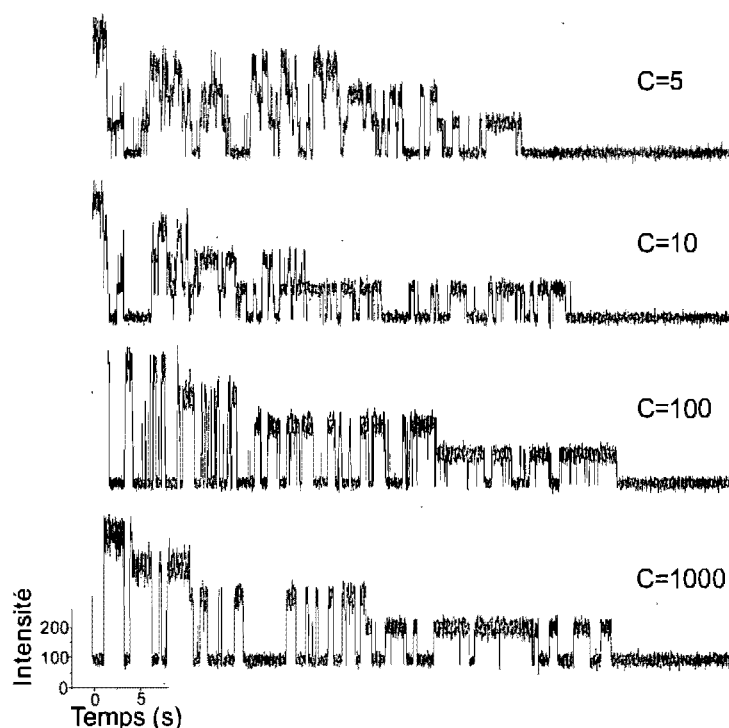


Figure 4.2. Simulations du modèle coopératif pour différentes valeurs de couplage. À partir d'une valeur de 100, les états intermédiaires d'ouverture et de fermeture sont rarement visités. Seulement les états de fermeture et d'ouverture complète apparaissent. Le photoblanchiment est présent pour chacune des traces jusqu'à perte complète de fluorescence.

Cette énergie de couplage peut en partie s'expliquer par le modèle de Thompson et al. (Thompson *et al.*, 2008). Comme mentionné précédemment, des interactions dans la région du « helical bundle crossing » stabiliseraient l'état fermé. Une diminution de pH pourrait déstabiliser ces interactions via l'histidine en position 25, dont la charge est modifiée à pH acide. Cependant, si on se fie à ce modèle, une diminution de pH pourrait briser les interactions de sorte que les sous-unités se comporteraient de façon

indépendante. Ce n'est pas ce qui est observé, puisque la coopérativité semble exister aussi à faible pH. Il existerait alors possiblement d'autres interactions permettant une stabilisation de l'état ouvert. La stabilisation de l'état fermé semble plus évidente, puisque les acides aminés au « helical bundle crossing » sont très près les uns des autres dans cette conformation (Perozo *et al.*, 1998). Les hélices TM2 (équivalentes aux hélices S6 de canaux dépendants du voltage) pourraient donc former des liens électrostatiques relativement forts dans l'état fermé. Les interactions semblent se produire entre des arginines (chargées positivement pour à peu près tout pH plus petit que 10) et des glutamates (chargées négativement à pH neutre) des hélices TM2 et impliquant une histidine (H25) de l'hélice TM1 (chargée positivement à $\text{pH} \sim < 7$). Il semble qu'à pH acide, les glutamates et les arginines et l'histidine n'aient plus de lien (Thompson *et al.*, 2008). Les glutamates deviennent neutres et l'histidine devient chargée positivement, ce qui déstabiliserait les interactions de l'état fermé.

Dans le cas de l'état ouvert, malgré la distance qui grandit entre les sous-unités, peut-être que le type de déplacement peut rapprocher certaines régions de sorte qu'on obtient une conformation plus stable que celle fermée lorsque que l'environnement est à faible pH. Selon Miloshevsky *et al.*, la modélisation de la conformation ouverte indiquerait un faible couplage entre la partie intracellulaire des quatre hélices TM1 (externe) et TM2 (interne) (Miloshevsky & Jordan, 2007). Bien que la conformation ouverte du canal ne soit pas encore accessible, certaines expériences et simulations semblent démontrer que l'hélice TM2 subit une rotation horaire (vue de l'intérieur de la cellule) ainsi qu'un élargissement par rapport au centre du pore (Miloshevsky & Jordan, 2007; Perozo *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2008). Perozo *et al.* ont aussi trouvé un mouvement de rotation pour l'ouverture (Perozo *et al.*, 1999). Bien que la conformation ouverte semble éloigner les hélices TM2 les unes des autres, il est possible qu'à faible pH une interaction entre les hélices TM1 et TM2 des différentes sous-unités soit favorisée de sorte à stabiliser la conformation ouverte.

Avec la mutation H25R/E118A/E120A, Thompson *et al.* ont observé l'apparition de niveaux de sous-conductance (conductance intermédiaire ou réduite) plus

fréquemment que les autres mutants (Thompson *et al.*, 2008) sans pouvoir expliquer la raison. Supposant que les niveaux de sous-conductance sont causés par des ouvertures partielles (Chapman & VanDongen, 2005), ceci pourrait suggérer que un ou plusieurs de ces acides aminés pourraient être impliqués dans la stabilisation de l'état ouvert. Apparemment, c'est l'ajout de la mutation H25R au mutant E118A/E120A qui semble principalement introduire davantage l'apparition des niveaux de sous-conductance (Figure 4.3.).

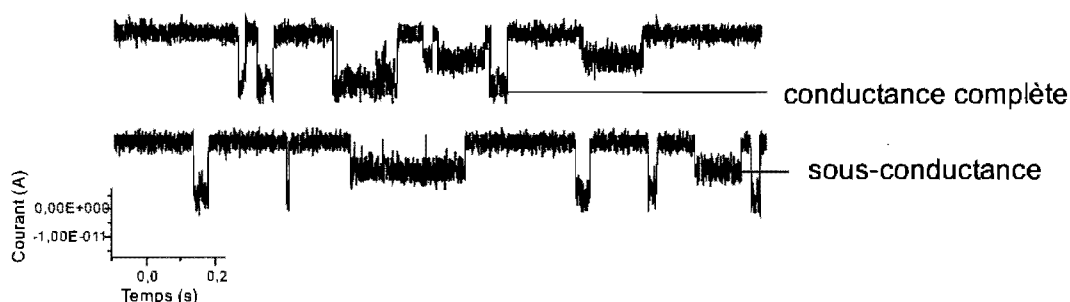


Figure 4.3. Sous-conductance. Exemple de courant avec un niveau de sous-conductance et un niveau de conductance complète

Il serait ainsi possible qu'un mécanisme de stabilisation de l'état ouvert implique l'histidine 25. Il existe un tryptophane à la position 113 (W113) et une phénylalanine à la position 114 (F114), non loin du glutamate de la position 118, qui pourraient stabiliser l'histidine dans la forme protonisée. Il a déjà été observé que le W113 pourrait possiblement interagir avec le H25 d'une même sous-unité (Yi *et al.*, 2001). Le lien tryptophane - histidine est un type d'interaction qui apparaît dans les protéines et qui est reconnu pour sa nature stabilisante (Loewenthal *et al.*, 1992). La phénylalanine peut faire le même type de lien, mais est un peu moins favorisé que le tryptophane. Étant donné que les deux aromatiques (tryptophane et phénylalanine) sont un à côté de l'autre, un pourrait se lier partiellement à l'histidine 25 de la même sous-unité, et l'autre pourrait se lier partiellement à l'histidine 25 de la sous-unité voisine, renforçant ainsi la conformation ouverte (Figure 4.4.). Par ailleurs, un mécanisme similaire de stabilisation de l'état ouvert par une interaction histidine protonisée – tryptophane a déjà été proposée pour le canal ionique M2 du virus

Influenza A (Okada *et al.*, 2001). L'arginine, qui remplace l'histidine protonisée dans les expériences de Thompson, peut interagir aussi avec le tryptophane avec l'interaction cation- π (Gallivan & Dougherty, 1999). On ne peut cependant pas vraiment comparer leur force d'interaction étant donné la structure inconnue de l'état ouvert pour le canal KcsA. Il est cependant fort probable que les interactions ne soient pas identiques, ce qui expliquerait en partie la différence dans les mesures de courant (occurrence élevée des niveaux de sous-conductance avec le triple mutant de Thompson). Le mécanisme que je propose ici pourrait se vérifier en remplaçant soit le W113 ou soit le F114 ou même les deux. On pourrait construire des mutants réduisant d'éventuelles interactions avec l'histidine en remplaçant le tryptophane par une phénylalanine ou, avec un changement plus important, par une alanine. On pourrait aussi remplacer la phénylalanine par une alanine directement. S'il s'agit de ce mécanisme, l'état ouvert devrait être moins stable, et devrait donc déplacer la courbe de probabilité d'ouverture vers des valeurs de pH plus petites. La probabilité d'ouverture maximale pourrait aussi s'en retrouver diminuée.

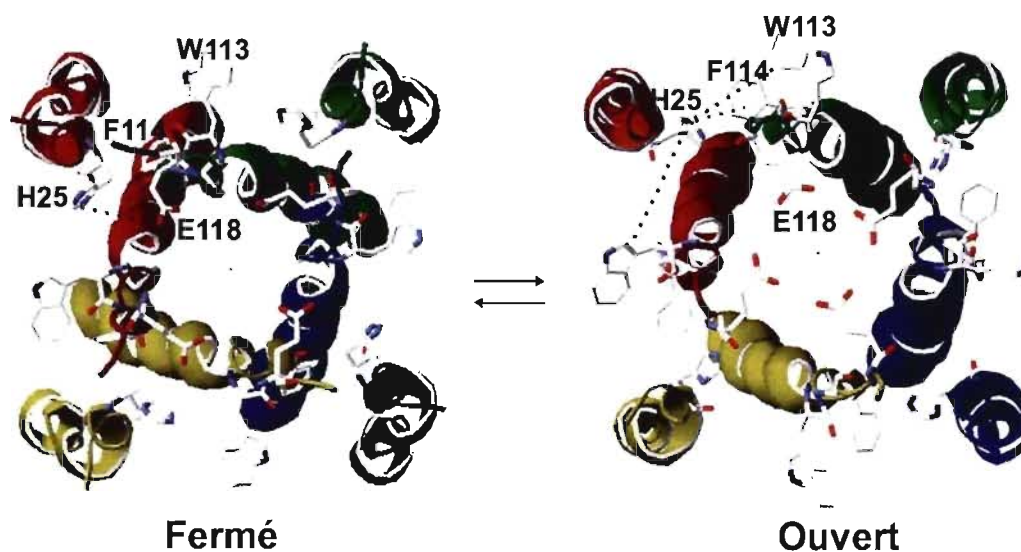


Figure 4.4. Nouveau modèle de stabilisation de l'état ouvert. À gauche : modèle de stabilisation de l'état fermé de Thompson et al. (2008). Seulement le lien entre le H25 et le E118 est montré. À droite : Modèle proposé de stabilisation de l'état ouvert. Un lien partiel entre le H25, le W113 et le F114 apparaît. Il est possible qu'un lien partiel entre le H25 et le W113 d'une même sous-unité existe aussi.

4.3. *Les traces de fluorescence*

En ce qui concerne les traces expérimentales de fluorescence, il est essentiel de s'interroger sur leur validité et sur les erreurs possibles. D'abord, les deux états de fluorescence reliés à deux états d'une sous-unité marquée ont été démontrés par Blunck et al. (2006) par des mesures de temps de vie de fluorescence. Blunck et al. ont observé que l'état de fluorescence où le temps de vie est plus grand (haute intensité de fluorescence) correspondrait à l'état fermé d'une sous-unité, alors que le temps de vie plus court (faible intensité de fluorescence) correspondrait à l'état ouvert d'une sous-unité. Les mesures ont été prises sur un ensemble de canaux dans des vésicules lipidiques, mais le temps de vie est indépendant du nombre de canaux présents, ce qui valide l'application de leurs résultats en canaux unitaires.

Cependant, en canaux unitaires, il ne faut pas oublier que l'on observe directement les caractéristiques d'émission des fluorophores. Donc, si l'émission de fluorescence d'un fluorophore peut varier d'intensité sans que la sous-unité associée n'ait bougé, on pourrait détecter un faux mouvement de cette sous-unité. C'est un phénomène appelé « blinking », où la fluorescence d'un fluorophore arrête et repart intrinsèquement. Ce peut être par exemple que le fluorophore se promène entre les états singulets et triplets (Rasnik *et al.*, 2006). Sur un ensemble de canaux, l'effet n'apparaît pas pour le fluorophore tétraméthylrhodamine étant donné la stabilité de ce fluorophore. Par contre, lorsqu'on travaille en canaux unitaires et que chacune des transitions est importante, même si le processus ne se produit pas souvent, il faut en tenir compte.

Puisque le « blinking » est un processus intrinsèque pour chacun des quatre fluorophores, ce type de transition apparaît de façon aléatoire, sans couplage entre les fluorophores. Ainsi, le « blinking » ne peut que contribuer à réduire le niveau de coopérativité observé dans nos traces de fluorescence. Par exemple, si les quatre sous-unités sont fermées et qu'il n'y a pas eu de photoblanchiment, la fluorescence sera au niveau de fluorescence le plus élevé. Si le phénomène de « blinking » survient

pour un des quatre fluorophores, on pourrait détecter à un certain moment une fausse ouverture suivie d'une fausse fermeture d'une sous-unité. Ce type de mouvement est considéré comme indépendant, puisque cette ouverture n'a pas engendré l'ouverture des autres sous-unités. Le niveau de coopérativité devient alors plus petit que ce qu'il est en réalité.

Les résultats montrent que dans le cas du tétraméthylrhodamine, le phénomène de « blinking » peut apparaître dans les expériences, mais à un taux estimé relativement faible (~13%). Donc, même si la coopérativité est possiblement sous-estimée, la différence ne devrait pas être énorme.

Un autre aspect important des traces de fluorescence est la présence de photoblanchiment. Un fluorophore peut ainsi perdre de façon permanente ses propriétés fluorescentes avec ce phénomène. Le photoblanchiment a un bon et un mauvais côté dans le cadre de nos expériences. Il peut d'abord servir de contrôle pour la qualité du marquage et pour vérifier qu'il s'agit d'un seul canal, et non un agglomérat. Un canal parfaitement marqué subirait le phénomène dans un nombre maximal de quatre étapes puisqu'il y aurait quatre sous-unités marquées et non photoblanchies. Le photoblanchiment réduit par contre notre temps d'observation à environ 30 à 45 secondes, ce qui réduit le nombre d'événements détectés. Ainsi, on doit prendre un très grand nombre de mesures pour compenser ce court temps d'observation pour avoir une bonne statistique. C'est d'ailleurs la principale raison pour laquelle les résultats de probabilité d'ouverture et de couplage varient beaucoup d'une expérience à une autre. Aussi, il est plus difficile pour notre modèle de converger et de trouver les valeurs exactes avec moins d'événements. L'algorithme emploie des calculs probabilistes, ce qui rend la modélisation plus fiable s'il y a un grand nombre d'événements.

Mais qu'est-il possible de faire pour réduire les événements de « blinking » et de photoblanchiment? Si on cherche à réduire le niveau d'oxygène dans la solution, on pourrait réduire le taux de photoblanchiment étant donné que l'oxygène est le

principal responsable de ce phénomène. Par contre, l'oxygène diminue aussi le niveau de « blinking », étant un agent réduisant l'impact des états triplets (« triplet state quencher ») (Rasnik *et al.*, 2006). Un moyen qui semble efficace apparaît dans l'étude de Rasnik *et al.*, qui ont jumelé un agent réducteur d'oxygène pour réduire le photoblanchiment au Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) pour réduire le « blinking ». Il faudrait cependant s'assurer que le Trolox n'intervient pas dans l'activité du canal. Selon leur étude, le Trolox n'aurait pas d'impact sur l'activité de divers systèmes biologiques, ce qui en fait un potentiel produit à utiliser dans les expériences de fluorescence.

Un dernier élément important à considérer est l'effet du pH sur le fluorophore. Il est possible que le pH influence l'intensité émise du fluorophore. Cependant, ce serait un changement statique qui n'aurait pas d'influence sur la cinétique des transitions. Pour les transitions que nous avons étudiées, l'impact serait donc un changement dans la différence d'intensité entre deux niveaux. Nous avons en fait observé une différence légèrement plus grande à faible pH.

4.4. Modèle coopératif

Le modèle qui a été construit pour analyser les traces de fluorescence représente les états de fluorescence observés et les transitions entre ces derniers. Puisqu'on n'a pas accès directement à la conformation de la protéine, on doit se fier à la mesure indirecte de fluorescence pour associer des conformations possibles. Celles-ci sont illustrées par les états du modèle, et c'est pourquoi on le qualifie de modèle de Markov caché (« Hidden Markov model »).

Par le fait même qu'il s'agit d'un modèle de Markov caché, on fait l'hypothèse de plusieurs choses dans celui-ci, sans vraiment pouvoir démontrer qu'il représente le réel mécanisme. Par exemple, afin de ne pas compliquer le modèle, le facteur multiplicatif de couplage est considéré le même pour l'ouverture et la fermeture, alors

que rien ne prouve qu'ils soient identiques. En fait, si l'énergie de stabilisation de l'état fermé est différente de l'énergie de stabilisation de l'état ouvert (si elle existe), le couplage est probablement différent pour l'ouverture et la fermeture. De plus, il serait possible que le facteur de couplage puisse être différent après une, deux ou trois ouvertures/fermetures. Le modèle qui a été construit ne dévoile pas nécessairement la vraie valeur de couplage, mais donne plutôt une idée globale du système. Afin de démontrer un certain couplage, le modèle est cependant suffisant.

En fait, si on ajoutait des paramètres libres dans le modèle pour tester d'autres mécanismes, la convergence serait certainement meilleure, mais ce pourrait être seulement la conséquence d'un plus haut degré de liberté du modèle. Le modèle peut en fait converger plus rapidement avec moins de paramètres libres et la comparaison de convergence entre les différents facteurs de couplage donne quand même une très bonne idée du couplage global. De plus les simulations du modèle sont en très bon accord avec les données expérimentales.

4.5. Courbes de probabilité d'ouverture

Tels que les résultats le montre, la courbe de probabilité d'ouverture à partir de la fluorescence montre la même dépendance au pH que la probabilité d'ouverture des courants, mais les valeurs sont beaucoup plus petites à pH 3 et 4 que ce qui a été précédemment publié avec le courant du mutant E71A (Chakrapani *et al.*, 2007a; Chakrapani *et al.*, 2007b; Cordero-Morales *et al.*, 2006b; Thompson *et al.*, 2008). Avec ce mutant de KcsA, la probabilité d'ouverture à faible pH (pH<5) devrait être près de l'unité. Si on assume que les sous-unités sont indépendantes, nous avons plutôt calculé une moyenne d'environ 0.25 pour une seule sous-unité à partir des traces de fluorescence. Cette probabilité est calculée à partir de l'équation suivante : $(P_o = 1 - P_{ac}^{1/N})$, où P_{ac} est la probabilité que toutes les sous-unités soient fermées (temps passé dans l'état de fermeture complète en fluorescence sur temps total) et N est le nombre de sous-unités détectables par fluorescence (fluorophores non

photoblanchis). Si le canal nécessite l'ouverture des quatre sous-unités pour être conducteur et que ces dernières sont indépendantes, la probabilité d'ouverture devient $0.25^4 \sim 0.0039$, ce qui est très faible. Par contre, rien ne dit que l'ouverture des quatre sous-unités est nécessaire.

Pour considérer un certain degré de coopérativité dans la probabilité d'ouverture, on se fie plutôt à la modélisation. Après avoir trouvé le facteur de couplage et les taux de transition entre les états pour une trace de fluorescence, les valeurs sont utilisées afin de calculer la probabilité d'ouverture d'une sous-unité $\left(\frac{\alpha}{\alpha + \beta}\right)$. Ces valeurs sont généralement plus élevées que celles calculées en n'assumant aucune coopérativité ($P_o = 1 - P_{ac}^{1/N}$), et semblent se rapprocher de la probabilité d'ouverture que nous avons mesurée avec les courants en bicouche lipidique planaire. D'ailleurs, les courants mesurés ne montrent pas une probabilité d'ouverture aussi élevée que ce qui a été précédemment publié (Chakrapani *et al.*, 2007b; Thompson *et al.*, 2008), ce qui suggère que des éléments du système pourraient réduire notre probabilité d'ouverture.

Une première possibilité évidente serait l'absence de lipides chargés dans les membranes supportées de nos expériences. Selon une étude de Heginbotham *et al.*, la présence de lipides chargés serait essentielle à l'activité du canal (Heginbotham *et al.*, 1998). Nos membranes supportées semblaient cependant stables seulement en présence de PC, qui est un lipide non chargé. Peut-être aussi qu'un mélange avec des lipides chargés pourrait fonctionner, et que les problèmes de stabilité rencontrés aient été causés par une mauvaise qualité de certains lipides chargés. Une autre possibilité est que nos mutants réduisent la probabilité d'ouverture du canal tout en étant fonctionnels et en démontrant une dépendance au pH. Il est aussi possible que la présence de fluorophores réduise aussi la probabilité d'ouverture, mais des mesures en électrophysiologie avec et sans marqueur montrent que l'impact est relativement faible (négligeable).

Un autre aspect à considérer est que les canaux sont à proximité de la lamelle de verre. Il est donc possible qu'il y ait certaines interactions qui pourraient réduire le mouvement des canaux. Peut-être aussi qu'une conformation pourrait être favorisée si ces interactions entrent en compétition avec les interactions intermoléculaires. Par exemple, une interaction pourrait stabiliser davantage l'état fermé, de sorte à contribuer à diminuer la probabilité d'ouverture.

Selon l'étude de Thompson et al. (2008), les canaux pourraient avoir une direction préférentielle en bicouche. Dans cette étude, les canaux s'inséraient dans une bicouche lipidique plane avec le côté intracellulaire vers le côté *trans* (vers le bas) dans 90% des expériences. Puisque la protéine va largement au-delà de la membrane du côté intracellulaire, il est probable que l'interaction protéine-verre soit forte de ce côté. Ainsi, la majorité des canaux seraient ralentis ou totalement immobilisés par cette interaction. Il est clair que la coopérativité calculée serait dans ce cas sous-estimée.

4.6. Comment améliorer le système

Comme il vient d'être expliqué, le système de mesure en bicouches supportées peut amener certaines erreurs. De plus, bien qu'on puisse retirer de l'information sur la conformation de la protéine, l'information sur la conduction est absente. Idéalement, on devrait donc avoir un système capable de mesurer le courant en électrophysiologie tout en mesurant la fluorescence en canal unitaire (à haute résolution). De plus, on cherche à éviter toute interaction possible avec le verre. Les résultats de la section 3.2. montrent bien que des mesures simultanées de fluorescence et de courant en canal unitaire sont possibles.

Les informations recueillies permettraient de savoir combien de sous-unités sont nécessaires à la conduction et si les niveaux de sous-conductance peuvent être corrélés à des ouvertures partielles du canal (1 à 3 sous-unités). De plus, on pourrait

utiliser facilement des lipides chargés, de sorte que l'activité du canal se rapproche de ce qui a été précédemment publié. L'environnement serait aussi en général plus physiologique, ayant une solution circulant de chacun des deux côtés de la membrane lipidique.

Ces expériences sont cependant difficiles à réaliser en canal unitaire, d'autant plus si les canaux sont en mouvement dans la bicouche. Les expériences en bicouches supportées ont permis d'élaborer les bases de la technique de fluorescence employée. Les expériences en bicouche non supportée constituent donc la suite logique des expériences effectuées pour ce mémoire.

5. Conclusion

L'étude des mécanismes d'ouverture et de fermeture des canaux potassiques est fondamentale pour bien comprendre leur fonctionnement au niveau moléculaire. Nous avons développé une méthode employant la spectroscopie de fluorescence en canaux unitaires permettant de détecter le déplacement de chacune des quatre sous-unités. Il est ainsi possible d'analyser la cinétique qui les relie, à savoir si elles agissent indépendamment les unes des autres ou si des interactions permettent des mouvements coopératifs. Une analyse avec un modèle de Markov caché permet d'évaluer une énergie de couplage de 2,0 à 2,7 $k_B T$. Il y aurait donc un certain degré de coopérativité entre les sous-unités et il est possible que cette valeur soit sous-estimée. La proximité entre le verre et les canaux pourraient entre autres réduire le mouvement, de sorte à réduire la valeur de couplage observée. Le phénomène de « blinking » réduit aussi cette valeur puisque chacun des quatre fluorophores subit indépendamment ce processus. Le couplage proviendrait d'interactions entre les sous-unités et elles pourraient donc stabiliser l'état fermé et l'état ouvert. Thompson et al. ont montré la présence de certains résidus pouvant stabiliser l'état fermé, mais ils n'ont proposé aucun modèle de stabilisation de l'état ouvert. Il semble que des interactions entre différentes sous-unités impliquant l'histidine en position 25 ainsi

que des glutamates et des arginines au « helical bundle crossing » pourraient renforcer l'état fermé. Le modèle que j'ai proposé pour stabiliser l'état ouvert devra être testé par mutagenèse dirigée des acides aminés aromatiques aux positions 113 et 114, de sorte à réduire d'éventuelles interactions cation- π avec l'histidine 25 (H25) protonisée. Des mesures de courant en électrophysiologie pourraient donner de l'information sur la stabilité de l'état ouvert relativement au canal à l'état sauvage. Afin d'acquérir de l'information sur la conformation du canal en plus de son état de conductance, il faudra mesurer la fluorescence simultanément au courant. De plus, l'expérience pourrait se faire avec le triple mutant de Thompson (H25R/E118A/E120A), qui devrait faire apparaître plus fréquemment les niveaux de sous-conductance (conductance réduite). Finalement, il est important de mentionner que notre méthode peut aussi s'appliquer à d'autres canaux ou d'autres protéines membranaires, comme des cotransporteurs.

6. Bibliographie

Aggarwal SK & MacKinnon R (1996). Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* **16**, 1169-1177.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, & Walter P (2002). *Molecular biology of the cell*, 4th ed. Garland Science, New York.

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

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

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

Berliner LJ (1983). The spin-label approach to labeling membrane protein sulfhydryl groups. *Ann N Y Acad Sci* **414**, 153-161.

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

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

Blunck R, Starace DM, Correa AM, & Bezanilla F (2004). Detecting rearrangements of shaker and NaChBac in real-time with fluorescence spectroscopy in patch-clamped mammalian cells. *Biophys J* **86**, 3966-3980.

Cha A & Bezanilla F (1998). Structural implications of fluorescence quenching in the Shaker K⁺ channel. *J Gen Physiol* **112**, 391-408.

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

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

Chanda B, Asamoah OK, Blunck R, Roux B, & Bezanilla F (2005). Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* **436**, 852-856.

Chapman ML & VanDongen AM (2005). K channel subconductance levels result from heteromeric pore conformations. *J Gen Physiol* **126**, 87-103.

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

Cordero-Morales JF, Cuello LG, Zhao Y, Jogini V, Cortes DM, Roux B, & Perozo E (2006b). Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 311-318.

- Cuello LG, Romero JG, Cortes DM, & Perozo E (1998). pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K⁺ channel. *Biochemistry* **37**, 3229-3236.
- Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, & MacKinnon R (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Eddy SR (2004). What is a hidden Markov model? *Nat Biotechnol* **22**, 1315-1316.
- Eggeling C, Widengren J, Rigler R, & Seidel CAM (1998). Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis. *Analytical Chemistry* **70**, 2651-2659.
- Gallivan JP & Dougherty DA (1999). Cation-pi interactions in structural biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9459-9464.
- Griffiths DJ (2004). *Introduction to Quantum Mechanics*, 2nd ed., pp. 1-480. Benjamin Cummings.
- Gruber HJ, Kada G, Pragl B, Riener C, Hahn CD, Harms GS, Ahrer W, Dax TG, Hohenthanner K, & Knaus HG (2000). Preparation of thiol-reactive Cy5 derivatives from commercial Cy5 succinimidyl ester. *Bioconjug Chem* **11**, 161-166.
- Gulbis JM & Doyle DA (2004). Potassium channel structures: do they conform? *Curr Opin Struct Biol* **14**, 440-446.
- Heginbotham L, Abramson T, & MacKinnon R (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* **258**, 1152-1155.
- Heginbotham L, Kolmakova-Partensky L, & Miller C (1998). Functional reconstitution of a prokaryotic K⁺ channel. *J Gen Physiol* **111**, 741-749.
- Heginbotham L, LeMasurier M, Kolmakova-Partensky L, & Miller C (1999). Single *streptomyces lividans* K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J Gen Physiol* **114**, 551-560.

Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, & MacKinnon R (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* **66**, 1061-1067.

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

Hodgkin AL & Huxley AF (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **117**, 500-544.

Hodgkin AL, Huxley AF, & KATZ B (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**, 424-448.

Hoshi T, Zagotta WN, & Aldrich RW (1994). Shaker potassium channel gating. I: Transitions near the open state. *J Gen Physiol* **103**, 249-278.

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

Keynes RD & Rojas E (1974). Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon. *J Physiol* **239**, 393-434.

Lakowicz JR (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third ed., pp. 1-954. Springer, Singapore.

Ledwell JL & Aldrich RW (1999). Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J Gen Physiol* **113**, 389-414.

Liu YS, Sompornpisut P, & Perozo E (2001). Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state. *Nat Struct Biol* **8**, 883-887.

Loewenthal R, Sancho J, & Fersht AR (1992). Histidine-aromatic interactions in barnase. Elevation of histidine pK_a and contribution to protein stability. *J Mol Biol* **224**, 759-770.

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

MacKinnon R, Cohen SL, Kuo A, Lee A, & Chait BT (1998). Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* **280**, 106-109.

Mannuzzu LM, Moronne MM, & Isacoff EY (1996). Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* **271**, 213-216.

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

Miloshevsky GV & Jordan PC (2007). Open-state conformation of the KcsA K⁺ channel: Monte Carlo normal mode following simulations. *Structure* **15**, 1654-1662.

Mueller P & Rudin DO (1963). Induced excitability in reconstituted cell membrane structure. *J Theor Biol* **4**, 268-280.

Mukherjee S & Mitra S (2005). Hidden Markov Models, grammars, and biology: a tutorial. *J Bioinform Comput Biol* **3**, 491-526.

Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, & . (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**, 121-127.

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

Okada A, Miura T, & Takeuchi H (2001). Protonation of histidine and histidine-tryptophan interaction in the activation of the M2 ion channel from influenza a virus. *Biochemistry* **40**, 6053-6060.

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

Pathak M, Kurtz L, Tombola F, & Isacoff E (2005). The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel. *J Gen Physiol* **125**, 57-69.

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

Perozo E, Cortes DM, & Cuello LG (1999). Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating. *Science* **285**, 73-78.

Pozharski EV, McWilliams L, & MacDonald RC (2001). Relationship between turbidity of lipid vesicle suspensions and particle size. *Anal Biochem* **291**, 158-162.

Rabiner LR (1989). A Tutorial on Hidden Markov-Models and Selected Applications in Speech Recognition. *Proceedings of the Ieee* **77**, 257-286.

Rasnik I, McKinney SA, & Ha T (2006). Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat Methods* **3**, 891-893.

Rohatgi-Mukherjee KK (1978). *Fundamentals of Photochemistry*, pp. 1-362. John Wiley & Sons.

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

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

Roux B & MacKinnon R (1999). The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* **285**, 100-102.

Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, & Bezanilla F (1996). Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* **16**, 1159-1167.

Shimizu H, Iwamoto M, Konno T, Nihei A, Sasaki YC, & Oiki S (2008). Global twisting motion of single molecular KcsA potassium channel upon gating. *Cell* **132**, 67-78.

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

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

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

Thompson AN, Posson DJ, Parsa PV, & Nimigean CM (2008). Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6900-6905.

Turro NJ (1978). *Modern Molecular Photochemistry*, pp. 1-628. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park.

Ulbrich MH & Isacoff EY (2007). Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat Methods* **4**, 319-321.

Uysal S, Vasquez V, Tereshko V, Esaki K, Fellouse FA, Sidhu SS, Koide S, Perozo E, & Kossiakoff A (2009). Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6644-6649.

Valeur B (2004). *Invitation à la fluorescence moléculaire*, pp. 1-202. De Boeck.

Widmaier EP, Raff H, & Strang KT (2005). *Vander's Human Physiology, The Mechanisms of Body Function*, 10th ed., pp. 1-827. McGraw-Hill Science/Engineering/Math, New York.

Yi BA, Minor DL, Jr., Lin YF, Jan YN, & Jan LY (2001). Controlling potassium channel activities: Interplay between the membrane and intracellular factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11016-11023.

Zagotta WN, Hoshi T, & Aldrich RW (1994a). Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J Gen Physiol* **103**, 321-362.

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

Zheng J, Vankataramanan L, & Sigworth FJ (2001). Hidden Markov model analysis of intermediate gating steps associated with the pore gate of shaker potassium channels. *J Gen Physiol* **118**, 547-564.

Zimmer J, Doyle DA, & Grossmann JG (2006). Structural characterization and pH-induced conformational transition of full-length KcsA. *Biophys J* **90**, 1752-1766.

7. Annexe I

Dans l'article figurant dans section « Résultats », mon nom apparaît en tant que deuxième auteur. Lorsque je me suis impliqué dans le projet, des mesures de fluorescence en bicouche supportée avait déjà été prises par Dr. Rikard Blunck et nos collaborateurs de Chicago. Ils ont donc construit un montage expérimental et déterminé certains paramètres expérimentaux (concentration de protéines, ratio protéine-lipide) ainsi que la méthode de marquage des protéines. Les données qu'ils ont pu recueillir ont été utilisées pour le calcul du « dwell time » et en partie pour la figure 2 de l'article. Les autres résultats et figures de l'article reflètent des données que j'ai accumulées pour mon projet de maîtrise.

Ma participation à l'article est donc principalement relative aux expériences et aux analyses. Le design de la recherche et des modèles est plutôt réservé à Rikard Blunck, qui a rédigé l'article, et à Francisco Bezanilla. J'ai cependant aussi travaillé à améliorer les paramètres expérimentaux, que ce soit pour les mesures de fluorescence ou pour les mesures de courant en canal unitaire. J'ai par exemple amélioré le système en réduisant le bruit de fond des traces de fluorescence à un niveau très faible, de sorte que ces dernières soient très nettes ($\Delta F/F > 40\%$).

ACCORD DES COAUTEURS

Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Hugo McGuire
M.Sc. Physique (2-200-1-0) – Option Biophysique et physiologie moléculaire

2. Description de l'article

Rikard Blunck, Hugo McGuire, H. Clark Hyde, Francisco Bezanilla.
« Fluorescence detection of the movement of single KcsA subunits reveals cooperativity »
Proc Natl Acad Sci U S A (PNAS). Publié le 23 décembre 2008 : vol. 105 ; no. 51 ; p. 20263-20268

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hugo McGuire** inclut cet article dans son **mémoire de maîtrise** qui a pour titre « **Étude du couplage entre les sous-unités du canal potassique KcsA par des mesures de spectroscopie de fluorescence en canaux unitaires** ».

Rikard Blunck

Coauteur

Signature

Date

4/30/2009

H. Clark Hyde

Coauteur

Signature

Date

4/27/2009

Francisco Bezanilla

Coauteur

Signature

Date

4/27/2009