

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**RÔLE DES IONS Ca²⁺ ET Mg²⁺ SUR LE REPLIEMENT DU SEGMENT C-TERMINAL DU
CANAL TRPC6 ET L'EFFET DES MUTATIONS R895C ET E897K RETROUVÉES CHEZ
LES PATIENTS ATTEINTS DE LA GLOMÉRULOSCLÉROSE FOCALE ET SÉGMENTAIRE**

Par

YOUSSEF GUEDRI

Département de Pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor* (Ph.D) en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada

Novembre 2018

Membres du jury de thèse :

Guylain Boulay, directeur de thèse, département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

Pierre Lavigne, co-directeur de thèse, département de biochimie, Université de Sherbrooke

Christine Lavoie, présidente du jury, département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

Guylain Boissonneault, évaluateur externe aux programmes, département de biochimie, Université de Sherbrooke

Rémy Sauvé, évaluateur externe à l'université, faculté de médecine, Université de Montréal

Table des matières

Liste des publications.....	7
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	12
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	13
Résumé.....	16
Introduction.....	17
1. La régulation du calcium au niveau cellulaire.....	17
2. La découverte des canaux TRP chez la drosophile.....	23
3. La grande famille des canaux TRPs	25
3.1 La sous-famille des canaux TRPMs	28
3.2 La sous-famille des canaux TRPVs	30
3.3 La sous-famille des canaux TRPPs	33
3.4 La sous-famille des canaux TRPMLs	34
3.5 La sous-famille des canaux TRPAs	34
3.6 La sous-famille des canaux TRPCs	35
4. Les canaux TRPC6.....	39
4.1 Organisation structurale des canaux TRPC6.....	39
4.2 Structure des canaux TRPC6 par Cryo-EM	42
4.2.1 Structure du domaine N-terminal TRPC6.....	44
4.2.2 Structure du domaine transmembranaire du canal TRPC6.....	47
4.2.3 Structure du domaine C-terminal TRPC6.....	49
4.3 Propriétés biophysiques des canaux TRPC6.....	51

4.4 Activation des canaux TRPC6.....	52
4.4.1 Activation via le diacylglycérol et les lipides membranaires.....	52
4.4.2 Activation des canaux TRPC6 suite à la stimulation aux récepteurs membranaires.....	53
4.4.3. Activation des canaux TRPC6 par stimulus mécanique	55
4.5 La régulation de l'activité des canaux TRPC6.....	56
4.5.1. Régulation des canaux TRPC6 par la protéine kinase C.....	56
4.5.2. Régulation des canaux TRPC6 par la protéine-tyrosine kinase de la famille Src...	58
4.5.3. Régulation des canaux TRPC6 par d'autres protéines kinases.....	58
4.6 Interaction du segment C-terminal du canal TRPC6 avec les protéines intracellulaires.....	59
4.6.1. Calmoduline / PIP ₃	59
4.6.2. S100A.....	60
4.7 Recyclage à la membrane du canal TRPC6.....	62
4.8. Inhibiteurs des canaux TRPC6.....	63
4.8.1. Les inhibiteurs non-spécifiques.....	63
4.8.2. Acide flufénamique.....	63
4.8.3. Hyperforine.....	64
4.9 L'expression des canaux TRPC6.....	65
5. La distribution des canaux TRP au niveau de la filtration rénale.....	66
5.1 L'implication des canaux TRPs dans la physiopathologie rénale.....	68
5.2. Activité des canaux TRPC6 au niveau des podocytes.....	68
6. Implication des canaux TRPC6 dans la lésion des podocytes.....	70
7. Mutations des canaux TRPC6 impliquées la FSGS.....	73
Objectif de l'étude.....	78

Matériels et méthodologie expérimentale.....	81
1. Expression et purification des protéines recombinantes.....	81
2. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	85
2.1 Principe de la technique de SEC	85
2.2 Courbe standard pour déterminer le poids moléculaire apparent	86
3. Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	86
3.1 Principe de la technique DLS.....	86
3.2 La distribution de la taille des rayons hydrodynamiques.....	90
3.3 Analyse des échantillons C-terminaux TRPC6 wt, R895C et E897K.....	92
4. Spectroscopie de Dichroïsme circulaire (CD).....	94
4.1 Le signal CD.....	94
4.2 Spectres CD des structures secondaires en hélices α , feuillets β ou repliement aléatoire.....	9
6	
4.3 Déconvolution des spectres CD en utilisant les algorithmes mathématiques	101
4.4 Étude CD de la stabilité thermodynamique de la structure secondaire des protéines.....	102
4.5 Méthodologie expérimentale pour l'étude CD.....	104
5. Culture cellulaire et signalisation calcique.....	105
5.1 Matériel pour les essais cellulaires.....	105
5.2 Fura-2.....	105
5.3 Biologie moléculaire.....	106
5.4 Culture cellulaire et transfection des ADNc.....	107
5.5 Les essais d'imagerie calcique.....	108
Résultats.....	110

1. Purification et détermination des états d'oligomérisation des segments C-terminaux de TRPC6.....	110
2. Analyse CD du spectre C-terminal TRPC6 wt et estimation des proportions des repliements en hélices α , feuillet β et aléatoire.....	117
3. Expression et purification du segment C-terminal TRPC6 avec la mutation E897K.....	120
4. Analyse CD de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6 E897K.....	120
5. Analyse CD de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6 R895C.....	123
6. Impact de la dénaturation thermique et chimique sur les segments C-terminaux TRPC6 wt, R895C et E897K	127
7. Stabilité chimique du repliement structural des segments C-terminaux TRPC6 wt, E897K et R895C.....	130
8. Effet des ions Na^+ sur la stabilité thermodynamique de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6.....	132
9. Effet des ions divalents sur la stabilité thermodynamique de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6.....	134
10. L'influence de la variation de concentration de Ca^{2+} sur la structure et la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 wt.....	138
11. L'influence de la variation de concentration de Ca^{2+} sur la structure et la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 E897K.....	141
12. L'influence de la variation de concentration de Ca^{2+} sur la structure et la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 R895C.....	144
13. L'impact de la variation de concentration de Mg^{2+} sur la structure et la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 wt.....	147

14. L'influence de la variation de concentration de Mg^{2+} sur la structure et stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 E897K.....	150
15. L'influence de la variation de concentration de Mg^{2+} sur la structure et la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 R895C.....	152
16. L'influence de la variation de concentration des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sur la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 wt.....	153
17. Influence des mutations E897K et R895C sur l'activité des canaux TPRC6 dans les cellules HEK-293.....	158
18. L'effet des ions Mg^{2+} sur l'activité des canaux TRPC6 de type sauvage dans les cellules HEK-293T.....	161
Discussion.....	174
Conclusion et perspectives.....	204
Remerciements.....	207
Références.....	209

Liste des publications

Cayouette S, Bousquet SM, Francoeur N, Dupre E, Monet M, Gagnon H, **Guedri YB**, Lavoie C, Boulay G. Involvement of Rab9 and Rab11 in the intracellular trafficking of TRPC6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Vol. 1803, pp. 805-812(2010).

Liste des figures

Figure 1: Présentation schématique de la régulation des ions Ca^{2+} via les différents transporteurs et canaux membranaires au niveau cellulaire	19
Figure 2: Découverte des canaux TRP chez la drosophile	24
Figure 3. Arbre phylogénétique des membres de la superfamille des canaux TRP.....	26
Figure 4: Représentation de la différence entre les segments N- et C-terminaux des différents membres des canaux TRP	27
Figure 5: Modèle tridimensionnel <i>in silico</i> des canaux tétramériques du canal TRPC6.....	41
Figure 6: Structure résolue par CryoEM du canal TRPC6h	43
Figure 7: Structure CryoEM du monomère du canal TRPC6h	45
Figure 8: Structure CryoEM du domaine intracellulaire du canal TRPC6m.....	46
Figure 9: Domaine transmembrane du canal TRPC6h	48
Figure 10: Structure et modèle du tétramère du segment C-terminal TRPC6.....	50
Figure 11: Schémas présentant la distribution des canaux TRP au niveau des différentes sections du néphron.....	67
Figure 12 : Micrographies électroniques à transmission des capillaires glomérulaires humains.....	69
Figure 13: Schéma de la signalisation calcique cellulaire et représentation des résidus R895 et E897 mutés au niveau du C-terminal de TRPC6 impliqués dans la FSGS	72
Figure 14: Représentation schématique d'une sous-unité du canal tétramérique TRPC6 avec les mutations répertoriées chez les patients atteints de la maladie FSGS	74

Figure 15 : Représentation de l'effet des mutants R895C et E897K sur la différence d'amplitude de courant enregistré des canaux TRPC6 dans des essais d'électrophysiologie cellulaire.....	75
Figure 16: Représentation des constructions d'ADNc codant pour les fragments C-terminal de TRPC6wt, R895C et E897K	82
Figure 17: Hélice α et le spectre d'absorption CD de son repliement à travers les longueurs d'onde de 170 à 250 nm	98
Figure 18: Feuillet β et le spectre d'absorption CD de son repliement à travers les longueurs d'onde de 170 à 250 nm	99
Figure 19: Structure aléatoire et le spectre d'absorption CD de son repliement à travers les longueurs d'onde de 170 à 250 nm	100
Figure 20: Schéma simplifié de la méthode d'expression et de purification des segments C-terminaux TRPC6 wt et les mutants R895C et E897K	112
Figure 21: Expression et purification du segment C-terminal TRPC6.....	113
Figure 22 : Tétramérisation du segment C-terminal TRPC6 wt et les mutants R895C et E897K.....	116
Figure 23 : Spectres CD du segment C-terminal TRPC6wt.....	119
Figure 24: Spectres CD du segment C-terminal TRPC6 E897K	122
Figure 25: Spectres CD du segment C-terminal TRPC6 R895C	125
Figure 26 : Compilation des courbes du contenu estimé en hélices α , feuillets β et structures aléatoires pour les segments C-terminal TRPC6 wt (●) le mutant E897K (●) et le mutant R895C (●) en fonction de leurs concentrations.....	126
Figure 27: Courbes de dénaturation thermique des segments C-terminal TRPC6 wt (●) le mutant E897K (●) et le mutant R895C (●).....	129

Figure 28: Courbes de dénaturation chimique au GuHCl des segments C-terminal TRPC6 wt (●) le mutant E897K (●) et le mutant R895C (●).....	131
Figure 29: Spectres CD du segment C-terminal TRPC6wt en présence d'ions Na ⁺	133
Figure 30: Spectres CD du segment C-terminal TRPC6wt en présence d'ions métalliques Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺ et Ca ²⁺	137
Figure 31: L'effet de la variation d'ions Ca ²⁺ sur le repliement et la stabilité thermodynamique structurale du segment C-terminal TRPC6 wt.....	140
Figure 32: L'effet de la variation d'ions Ca ²⁺ sur le repliement et la stabilité thermodynamique structurale du segment C-terminal TRPC6 E897K.....	143
Figure 33: L'effet de la variation d'ions Ca ²⁺ sur le repliement et la stabilité thermodynamique structurale du segment C-terminal TRPC6 R895C.....	146
Figure 34: L'effet de la variation d'ions Mg ²⁺ sur le repliement et la stabilité thermodynamique structurale du segment C-terminal TRPC6 wt.....	149
Figure 35: L'effet des ions Mg ²⁺ sur la stabilité thermodynamique des segments C-terminal TRPC6 E897K et R895C.....	151
Figure 36: Effet des ions Ca ²⁺ et Mg ²⁺ sur la variation du Tm° obtenus le segment C-terminal TRPC6 wt.....	153
Figure 37: L'effet complémentaire des ions Mg ²⁺ et Ca ²⁺ sur la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 wt.....	155
Figure 38: L'effet complémentaire des ions Mg ²⁺ et Ca ²⁺ sur la stabilité thermodynamique des segments C-terminal TRPC6 wt, E897K et R895C.....	157
Figure 39: L'impact de la surexpression des canaux TRPC6 de type sauvage et des canaux TRPC6 ayant la mutation E897K et R895C sur l'élévation du calcium intracellulaire.....	160

Figure 40: L'impact de l'élévation du magnésium extracellulaire sur l'entrée calcique basale des cellules HEK293.....	163
Figure 41: L'impact de l'élévation du magnésium extracellulaire sur l'entrée calcique des canaux TRPC6 wt surexprimés dans les cellules HEK293.....	165
Figure 42: L'impact de l'élévation du magnésium extracellulaire sur l'entrée calcique des canaux TRPC6 R895C surexprimés dans les cellules HEK293.....	167
Figure 43: L'impact de l'élévation du magnésium extracellulaire sur l'entrée calcique des canaux TRPC6 E897K surexprimés dans les cellules HEK293.....	169
Figure 44: L'entrée calcique via la chimère [CT4] TRPC6 comparativement aux canaux TRPC6 surexprimés dans les cellules HEK293.....	171
Figure 45: L'impact de l'élévation du magnésium extracellulaire sur l'entrée calcique des canaux chimériques [CT4] TRPC6 dans les cellules HEK293.....	173
Figure 46: Potentiel électrostatique du domaine cytoplasmique du canal TRPC6.....	183
Figure 47: Représentation des chaînes latérales des résidus R895 et E897 au niveau de la structure du tétramère du segment C-terminal TRPC6.....	189
Figure 48: Localisation des différentes mutations FSGS au niveau de la structure des domaines N- et C-terminaux cytoplasmiques de TRPC6.....	202
Figure 49: Localisation des différentes mutations FSGS au niveau de la structure du canal TRPC6h..	203

Liste des tableaux

Tableau 1: Distribution des mutations associées FSGS au niveau du domaine N-terminal et domaines transmembranes du canal TRPC6.....	200
Tableau 2: Distribution des mutations associées FSGS au niveau du domaine C-terminal et du canal TRPC6.....	201

Liste des abréviations

[Ca ²⁺] _i :	Concentration intracellulaire cytosolique de calcium
[Mg ²⁺] _i :	Concentration intracellulaire cytosolique de magnésium
ARD:	Domaine de répétition similaire à l'ankyrine (<i>ankyrin-like repeats domain</i>)
ATP:	Adenosine triphosphate
CaM:	Calmoduline
CCh:	Carbachol
CD:	Dichroïsme circulaire (<i>Circular Dichroism</i>)
CHO:	Cellules d'ovaires de hamster chinois (<i>Chinese hamster ovary</i>)
CIF:	Facteur d'influx calcique (<i>calcium influx factor</i>)
CIRB:	Site de liaison de la calmoduline et du récepteur de l'IP ₃ (<i>Calmodulin and IP₃ Receptor Binding site</i>)
CK2 :	Caséine kinase 2
CRAC :	Courant calcique active par la relâche de Ca ²⁺ (<i>Ca²⁺-release-activated Ca²⁺ current</i>)
CRYO EM :	Cryo-microscopie électronique
DAG:	1,2-diacylglycerol
EGF :	Facteur épidermal de croissance (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR :	Récepteur de l'EGF
ESRD :	Maladie rénale de stade final (<i>End Stage Renal Disease</i>)
FSGS :	Glomérulosclérose focale et segmentale (<i>focal and segmental glomerulosclerosis</i>)
GDP :	Guanosine diphosphate
GMP:	Guanosine monophosphate
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique
GPCR :	Récepteur couple à une protéine G (<i>G protein coupled receptor</i>)
GqPCR :	Récepteur couple à une protéine Gq (<i>Gq protein coupled receptor</i>)
GTP :	Guanosine triphosphate
HA :	Antigène de l'hémagglutinine (<i>hemagglutinin antigen</i>)
HBSS :	Solution saline tamponnée à l'Hepes (<i>Hepes buffered salt solution</i>)
HEK :	Cellules embryonnaires humaines de rein (<i>human embryonic kidney</i>)

I _{cat} :	Courant cationique non-sélectif
IP ₃ :	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IP ₃ R :	Récepteur de l'inositol 1,4, 5-trisphosphate
MS :	Spectrométrie de masse (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS :	Spectrométrie de masse en tandem
NCX :	Échangeur sodium/Ca ²⁺ (<i>Na⁺/Ca²⁺ eXchanger</i>)
NHE :	Échangeur sodium/protons (<i>Na⁺/H⁺ Exchanger</i>)
NOMPC :	<i>No mechanoreceptor potential C</i>
OAG:	1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC :	Protéine kinase C
PLC :	Phospholipase C
PMCA :	Pompe calcique ATPase de la membrane plasmique (<i>Plasma membrane calcium ATPase pump</i>)
RE :	Réticulum endoplasmique
ROC :	Canal activé suite à l'activation d'un récepteur (<i>receptor-operated channel</i>)
ROCE :	Entrée de Ca ²⁺ induite par l'activation d'un récepteur (<i>receptor-operated Ca²⁺ entry</i>)
RTK:	Récepteur tyrosine-kinase
SERCA :	Pompe calcique ATPase du réticulum sarcoplasmique endoplasmique (<i>Sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump</i>)
SOC :	Canal activé par la déplétion des réserves (<i>store-operated channel</i>)
SOCE :	Entrée de Ca ²⁺ induite par la déplétion des réserves (<i>store-operated Ca²⁺ entry</i>)
STIM1 :	<i>Stromal interacting molecule-1</i>
T _m :	Température de dénaturation. Maximum de la dérivée première des courbes de dénaturation thermiques
TRP :	Transient receptor potential
TRPA :	Transient receptor potential ankyrin
TRPC :	Transient receptor potential canonical
TRPM :	Transient receptor potential melastatin
TRPML :	Transient receptor potential mucolipin
TRPN :	Transient receptor potential NOMPC

TRPP : Transient receptor potential polycystin
TRPV : Transient receptor potential vanilloid
VSMC : Cellules musculaires lisses vasculaires (*vascular smooth muscle cells*)

Résumé

Les canaux TRPC6, canaux membranaires non sélectifs perméables aux ions Ca^{2+} , jouent un rôle important dans l'entrée calcique dans plusieurs processus cellulaires. Depuis la dernière décennie, plusieurs mutations au niveau de TRPC6 ont été identifiées et associées à une forme génétique de néphropathie: la glomérulosclérose focale et segmentaire (FSGS) (Somlo et al., 2000). La FSGS est une pathologie progressive qui mène vers un état de perte de fonction rénale causée par l'altération cellulaire des podocytes qui assurent le maintien de la fonction de filtration glomérulaire. Deux mutations au niveau du segment C-terminal TRPC6 de type gain de fonction, R895C et E897K, provoquent une augmentation de l'activité du canal TRPC6 menant à une augmentation de l'entrée du Ca^{2+} intracellulaire ce qui altère l'intégrité du cytosquelette des podocytes. L'implication du segment C-terminal TRPC6 dans la régulation de l'entrée du Ca^{2+} ainsi que dans la pathogenèse de la FSGS demeure peu comprise. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à comprendre le comportement structural et thermodynamique du segment C-terminal TRPC6, sa réactivité face à la variation d'ions physiologiques notamment les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} et vérifier l'impact des mutations R895C et E897K retrouvées chez les patients atteints de FSGS. Par des techniques spectroscopiques, nous avons démontré que le segment C-terminal TRPC6 s'organise en tétramère avec une structure secondaire majoritairement organisée en hélices α . Les mutations E897K et R895C n'affectent pas l'état d'oligomérisation du segment C-terminal TRPC6 ni la nature de son repliement. Nous avons également démontré que les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , d'une manière spécifique et concentration dépendante, interagissent avec la structure du segment C-terminal TRPC6 influençant sa stabilité thermodynamique. Les mutations E897K et R895C diminuent la sensibilité de la structure secondaire du C-terminal muté face à la variation d'ions Ca^{2+} et abolissent complètement sa sensibilité à la variation des ions Mg^{2+} . Cette découverte de la sensibilité du C-terminal TRPC6 au Mg^{2+} , nous a amenés à vérifier, au niveau cellulaire, le rôle qu'il pourrait jouer sur la variation d'entrée du Ca^{2+} via les canaux TRPC6. Au niveau cellulaire, nous avons démontré que la variation du Mg^{2+} intracellulaire modifie l'entrée des ions Ca^{2+} via les canaux TRPC6 et que cette réponse est grandement influencée par les mutations E897K ou R895C. En utilisant une chimère du canal TRPC6, nous avons pu démontrer que le segment C-terminal est impliqué dans la régulation de l'entrée d'ions Ca^{2+} via les canaux TRPC6. Ces résultats démontrent que la structure du segment C-terminal TRPC6 est sensible aux variations des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} afin d'assurer sa fonction dans le processus de régulation des canaux TRPC6 et que les mutants R895C et E897K affectent des résidus clés impliqués dans la sensibilité face à la variation ionique intracellulaire influençant ainsi l'activité du canal TRPC6.

Mots clés : TRPC, calcium, FSGS, stabilité, stabilité thermodynamique, structure secondaire

Introduction

1. La régulation du calcium au niveau cellulaire

L'ion calcium (Ca^{2+}) a longtemps été considéré comme un élément structural jusqu'au milieu du vingtième siècle où les travaux de Weber et Ebashi ont présenté l'importance de son rôle dans la signalisation cellulaire (Ebashi et al., 1968; Weber et al., 1973). Depuis, la fonction du calcium comme second messenger a été largement étudiée pour son implication dans plusieurs processus cellulaires, notamment la transduction de signal, la transcription, la croissance et la différenciation cellulaire, la réaction aux stimuli physico-chimique et la mort cellulaire (Berridge et al., 2000). Les ions calcium sont présents au niveau de plusieurs compartiments cellulaires et leurs concentrations varient en réponse à des stimuli cellulaires, dans le but d'exercer une fonction cellulaire précise. La concentration du calcium de part et d'autre de la membrane cellulaire est dynamique (Pozzan et al., 1994). Il est bien établi dans la littérature que la concentration basale du calcium cytoplasmique est maintenue à environ 100 nM, soit 20 000 fois moins que la concentration extracellulaire et celle du réticulum endoplasmique (RE) qui est d'environ 2 mM (Clapham et al., 2007). Le maintien du niveau de Ca^{2+} intracellulaire (Ca^{2+}_i) est un processus complexe qui implique plusieurs mécanismes de régulation notamment les canaux ioniques membranaires, les protéines liant des ions calcium, des pompes ioniques ATP-dépendantes ainsi que des échangeurs ioniques membranaires (Pozzan et al., 1994; Blaustein et al., 1999) (Figure 1). Ces différents mécanismes contribuent à la régulation de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Clapham et al., 2007). La diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est assurée soit par un mécanisme de pompage du Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire, ou encore il est redirigé vers l'intérieur des organites de la cellule notamment le RE et la mitochondrie (Clapham et al., 2007). Le relargage du Ca^{2+}_i vers l'extérieur de la cellule est assuré par les pompes PMCA « *Plasma membrane calcium ATPase* » et les échangeurs NCX « *sodium and calcium exchanger* » au niveau de la membrane cellulaire (Blaustein et al., 1999). Les pompes PMCA assurent le

relargage du Ca^{2+}_i vers l'extérieur de la cellule par un transport actif utilisant de l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP afin de contrer le gradient électrochimique du Ca^{2+} (Pozzan et al., 1994). Le deuxième mécanisme pour diminuer la concentration du Ca^{2+}_i est suite au transport passif du Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire en échange avec des ions sodium (Na^+). Ce type de transport est assuré par l'échangeur membranaire NCX (Blaustein et al., 1999). En plus de transporter les deux ions Ca^{2+} et Na^+ de part et d'autre de la membrane plasmique, l'échangeur NCX est régulé par la différence de concentration de ces mêmes ions. En effet, l'activité de l'échangeur NCX est influencée par la variation de l'augmentation de l'entrée du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Pozzan et al., 1994; Clapham et al., 2007). Au niveau des organites cellulaires, un premier mécanisme permettant la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est assuré par les pompes SERCA « *sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase* » situées à la membrane du RE et utilisant l'ATP pour transporter le Ca^{2+} du milieu cytoplasmique vers la lumière du RE (Redondo et al., 2008). Finalement, les pompes calciques au niveau de la membrane des mitochondries mCU, *mitochondrial Calcium Uniporter*, transportent le Ca^{2+} de façon très sélective vers l'intérieur de la mitochondrie par transport passif en réponse au potentiel électrochimique négatif mitochondrial (Kirichok et al., 2004).

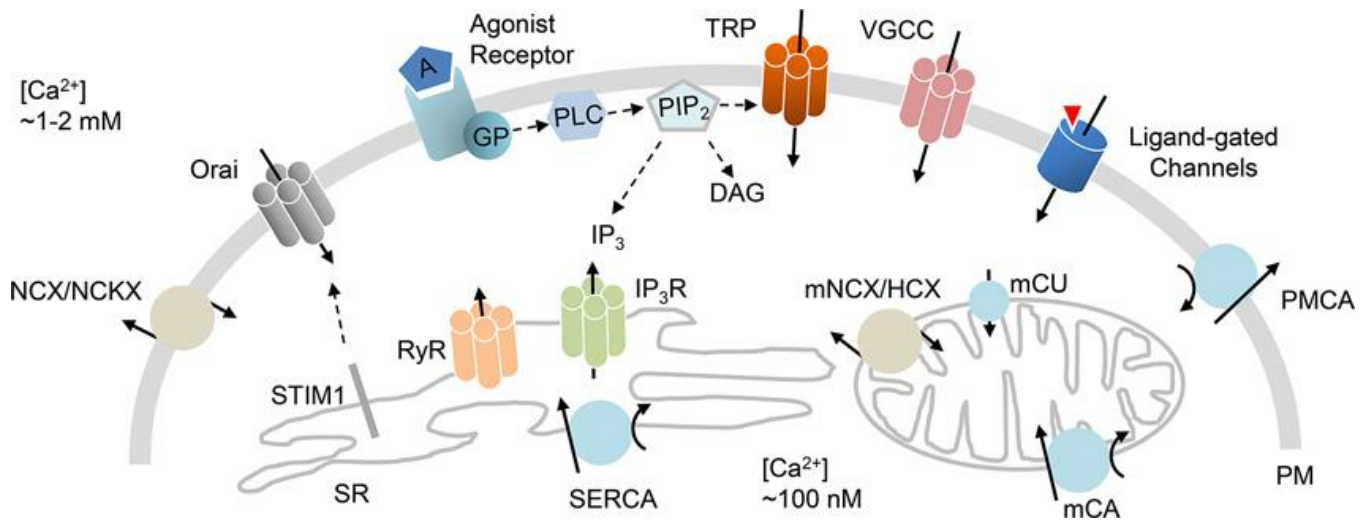


Figure 1: Présentation schématique de la régulation des ions Ca^{2+} via les différents transporteurs et canaux membranaires au niveau cellulaire. Canaux et échangeurs au niveau de la membrane cytoplasmique : NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; Orai : calcium release-activated calcium channel protein 1, TRP : Transient receptor potentiel; VGCC : Voltage-gated calcium channel; PMCA : Plasma membrane Ca^{2+} ATPase. Au niveau cytoplasmique : PLC : Phospholipase C; PIP_2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; DAG : diacylglycérol; IP_3 : inositol trisphosphate; IP_3R : récepteur canal à l'inositole trisphosphate; RYRs: récepteurs à ryanodine; STIM1 : Stromal interaction molecule 1 ;SR : reticulum sarcoplasmique; SERCA: Réticulum sarcoplasmique calcium ATPase; mCU : uniporteur mitochondrial Ca^{2+} ; mCa : transporteur Ca^{2+} ATPase; PMCA : plasma membrane calcium ATPase. (D'après Harraz et al., 2014. Neuroscience mini reviews).

L'élévation du $[Ca^{2+}]_i$ est principalement due à la dynamique d'ouverture des canaux perméables au calcium qui sont présents à la fois au niveau de la membrane cytoplasmique et au niveau des membranes entourant les organites de la cellule. La relâche du Ca^{2+} des réserves intracellulaires des RE ou RS vers le cytoplasme est assurée principalement par deux types de canaux membranaires, notamment les récepteurs canaux à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃R) et les récepteurs à la ryanodine (RyR) (Clapham et al., 2007). Les récepteurs canaux IP₃R vont favoriser une conformation ouverte lors de leurs liaisons au second messenger l'IP₃. L'activation des canaux IP₃R est régulée par les niveaux de la $[Ca^{2+}]_i$ et celle de la lumière du réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique (Boulay et al., 1999). L'ouverture du récepteur canal IP₃R est maintenue jusqu'à l'augmentation de la concentration intraluminal de Ca^{2+} au-delà de 1mM (Boulay et al., 1999). Une fois cette concentration limite dépassée, l'IP₃R adopte une conformation fermée (Boulay et al., 1999). Les récepteurs à la ryanodine sont très similaires aux récepteurs IP₃R tant au niveau structural que fonctionnel. Les RyRs diffèrent des IP₃Rs par leurs mécanismes d'activation/inhibition du canal (Zbidi et al., 2011). Les RyRs requièrent dix fois plus de concentration lumineuse du Ca^{2+} pour passer d'une conformation ouverte à une conformation fermée du canal (Zucchi et al., 1997). Une deuxième différence réside dans leurs niveaux d'expression: les IP₃Rs sont exprimés dans la plupart des tissus tandis que les RyRs sont principalement exprimés dans les cellules excitables (tissus musculaires et nerveux) (Zucchi et al., 1997; Meyer et al., 2002).

Les canaux perméables au calcium au niveau de la membrane cytoplasmique diffèrent à la fois au niveau de leur conformation et au niveau de leur activation. Par ailleurs, on en compte plusieurs types notamment les canaux voltage dépendant VOC (*voltage operated channels*), les canaux second messenger dépendant SMOC (*second messenger operated channels*), les canaux sensibles aux réserves intracellulaires SOC

(*store operated channels*) qui sont retrouvés principalement dans les cellules non excitables, les canaux sensibles (canaux ioniques mécanosensibles) au stress mécanique membranaire MSOC (*mechanically stress operated channels*) et les canaux couplés à des récepteurs ROC (*receptor operated channels*) (Parekh et al., 2005). Les VOC sont retrouvés au niveau des cellules excitables notamment les cellules neuronales et musculaires, et sont activés par la dépolarisation de la membrane cytoplasmique (Hopf et al., 1996; Zamponi et al., 2014). Les canaux sensibles aux réserves intracellulaires (SOC) sont sensibles à la déplétion des niveaux de Ca^{2+} du RE (Prakriya et al., 2015). Leurs mécanismes d'ouverture sont médiés par l'interaction des protéines STIM (*stromal interaction molecule*) qui jouent un rôle de capteur de calcium au niveau du RE avec les sous-unités des protéines Orai (*calcium release-activated calcium channel protein*), formant ainsi un complexe canonique membranaire permettant l'entrée des ions Ca^{2+} (Varnai et al., 2009). En effet, ce processus est initié en réponse à l'activation de la phospholipase C (PLC) qui va générer l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) par l'hydrolyse du phosphatidyl 1, 4-bisphosphate (PIP_2) (Ju et al., 2010). L' IP_3 va lier son récepteur à l' IP_3 (IP_3R) retrouvé au niveau du RE pour permettre son ouverture et la sortie du Ca^{2+} vers le milieu cytoplasmique en suivant le gradient électrochimique (Albert et al., 2003). Cette déplétion du Ca^{2+} de la lumière du RE va engendrer l'oligomérisation des protéines STIM et leur migration à proximité de la membrane cytoplasmique. Ceci va permettre une interaction entre STIM et les protéines Orai et de l'activer (Zbidi et al., 2011). Les canaux couplés à des récepteurs ROC sont présents dans de nombreux types cellulaires. L'ouverture de ce type de canal se fait suite à une cascade de réactions cellulaires en réponse à la stimulation d'un récepteur couplé à une protéine Gq (GqPCR) ou d'un récepteur tyrosine-kinase (RTK) (Liao et al., 2007). La liaison de l'agoniste au GqPCR engendre un changement conformationnel menant à l'activation de la protéine Gq hétérotrimérique, composée des sous-unités α , β et γ (Gilman et al., 1987). La sous-unité α activée échange son GDP pour un GTP, ce qui mène à la dissociation de la sous-unité α des sous-unités $\beta\gamma$ (Gilman et al., 1987). La sous-

unité α -GTP peut alors activer la phospholipase C β (PLC β) (Gilman et al., 1987). Les agonistes des RTK activent également la phospholipase C de type γ selon un mécanisme différent (Liao et al., 2007). Suite à la liaison de l'agoniste à son récepteur de type RTK, cette liaison va engendrer un changement conformationnel qui passe d'une forme globulaire de la portion extracellulaire du récepteur à une conformation linéaire de cette portion afin de favoriser la dimérisation de ce dernier (Liao et al., 2007). Cette dimérisation va engendrer l'autophosphorylation en *trans* des résidus tyrosine qui par le fait même amène à l'activation de la PLC γ (Beskina et al., 2007). Comme mentionné plus haut, l'hydrolyse du PIP $_2$ va produire le diacylglycérol (DAG) et l'IP $_3$. La liaison de l'IP $_3$ à son récepteur canal l'IP $_3$ R situé à la membrane du RE va permettre la sortie du Ca $^{2+}$ de la lumière du RE vers le cytoplasme ce qui constitue la première phase de la mobilisation calcique cellulaire (Zucchi et al., 1997; Beskina et al., 2007). La deuxième vague de mobilisation du Ca $^{2+}$ est assurée par l'activation des canaux perméables au calcium de la famille TRPC (*transient receptor potential canonical*), afin de permettre l'entrée du Ca $^{2+}$ extracellulaire vers le milieu cytoplasmique (Parekh et al., 2005).

Il existe également des protéines intracellulaires liant le Ca $^{2+}$ appelées : CaBP (*calcium binding protein*) (Kretsinger et al., 1976; Yanez et al., 2012). Ces protéines vont adopter des structures avec un repliement majoritairement organisé en hélices α afin d'exercer une fonction de capteur ou de tamponner les ions Ca $^{2+}$ au niveau cytoplasmique (Kretsinger et al., 1976). Les CaBP sont caractérisés par une spécificité partielle de liaison aux ions Ca $^{2+}$ avec une faible liaison à d'autres partenaires protéiques Ca $^{2+}$ -dépendants et assurent principalement la fonction de détection des variations de concentration du Ca $^{2+}_i$ dans le processus de régulation de la signalisation calcique (Yanez et al., 2012). Les CaBP exercent le rôle de capteur calcique en favorisant un changement conformationnel lors de la liaison aux ions Ca $^{2+}$ qui se fait via une organisation de type *Ef-hand* (Schwaller et al., 2010). Il en résulte une exposition d'une surface hydrophobe nécessaire pour assurer la liaison à des protéines effectrices impliquées dans la signalisation

calcique (Schwaller et al., 2010). Parmi les CaBP liant le Ca^{2+} libre, on retrouve la troponine C (Ebashi et al., 1968), la parvalbumine (Berchtold et al., 1984), la calmoduline (CaM) (Chin et al., 2000), la calbindine D (Leathers et al., 1990), les protéines de la famille S100 (Marenholz et al., 2004), la calséquestrine et la calréticuline (Bataille et al., 1994).

2. La découverte des canaux TRP chez la drosophile

La découverte des canaux TRP remonte aux travaux du groupe de Manning en 1969, qui ont permis d'identifier une mutation récessive sur le troisième chromosome de la Drosophile (*Drosophila melanogaster*) présentant un phénotype anormal au niveau de l'électrorétinogramme (ERG) (Cosens et al., 1969) (Figure 2). Lors d'une exposition à un stimulus lumineux, ce mutant présente une activation faible et de type transitoire des cellules photoréceptrices comparativement au même stimulus chez les drosophiles de type sauvage (Cosens et al., 1969). En 1975, les travaux du groupe de Minke ont démontré que cette mutation affecte une protéine située à la fin de la cascade de transduction du signal (Minke et al., 1975). Lors de l'activation des cellules photoréceptrices, il se produit un changement du potentiel membranaire, qui est appelé en anglais « Receptor Potentiel ». Le phénotype cellulaire de ce mutant produit une activation transitoire du potentiel membranaire du photorécepteur appelé « Transient Receptor Potentiel (TRP) » (Minke et al., 1975). Vingt ans plus tard, le groupe de Montell et Rubin a publié des travaux menant au clonage du gène TRP en réponse au phénotype étudié de la drosophile. Ils ont démontré l'expression ainsi que la caractérisation de la protéine TRP comme étant un canal transmembranaire perméable aux ions Ca^{2+} (Montell et al., 1989). Ces travaux ont mené à la découverte par le groupe de Kelly en 1992 du canal TRPL, *transient receptor potentiel-like*, représentant un homologue des TRPs chez la drosophile (Phillips et al., 1992). Quatre années plus tard, le groupe de Zuker a développé une drosophile ayant subi une double mutation *trp⁻/trp⁻* et qui possède un phénotype de cécité, menant ainsi à

l'association de ces canaux à la transduction visuelle des cellules photoréceptrices suite à un stimulus lumineux (Niemeyer et al., 1996)

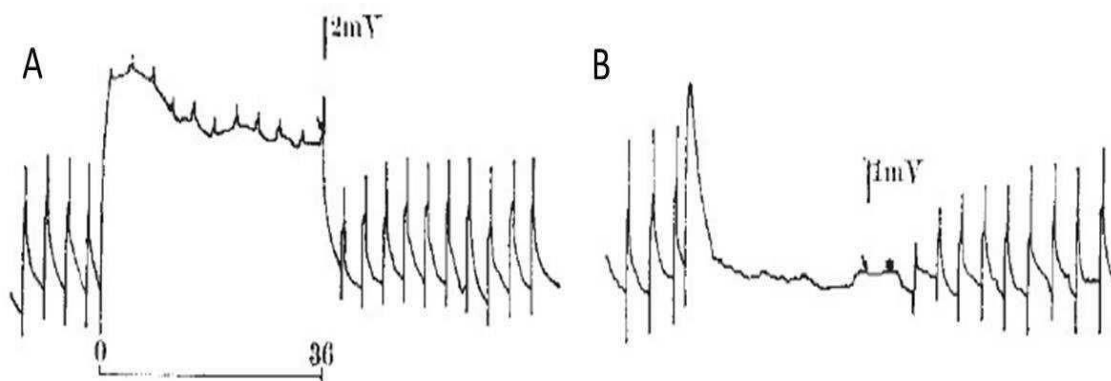


Figure 2. Découverte des canaux TRP chez la drosophile. Illustration de l'enregistrement l'amplitude maximale enregistrée au niveau des cellules photoréceptrices de la drosophile suite à la réponse à l'exposition lumineuse pendant 240 ms suivi d'une période d'adaptation (en seconde). La drosophile sauvage WT (A) et mutante *trp* (B). (D'après Cosens et Manning, 1969, *Nature*)

3. La grande famille des canaux TRPs

Le clonage des gènes de TRP et TRPL chez la drosophile a permis de découvrir une nouvelle superfamille de canaux ioniques, impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires. À ce jour, on dénombre plus de 100 gènes codant pour des canaux TRPs exprimés chez plusieurs espèces animales. Chez l'homme, les gènes des canaux TRPs varient en longueur, allant de 11.4 à 911 kb, avec un nombre d'exons allant de 11 à 39 (Nilius et al., 2011). Ces gènes sont responsables de l'expression d'une superfamille de TRPs composée de vingt-huit membres. Ils sont classés selon leur homologie de séquence et non pas par leur sélectivité ionique ou leur réponse à des ligands spécifiques (Clapham et al 2001). Selon cette classification, on retrouve sept sous-familles : les TRPM (*melastatin*), les TRPV (*vanilloid*), les TRPP (*polycystin*), les TRPML (*mucoipin*), les TRPA (*ankyrin*), et les TRPC (*canonical*). On y retrouve aussi la sous-famille des TRPN (*NOMPC, no mechanopotential*), qui n'est pas exprimée chez les mammifères (Nilius et al., 2011) (Figure 3).

Les TRPs sont des canaux transmembranaires perméables aux ions mono- ou divalents et possèdent plusieurs homologies au niveau de leurs organisations structurales. Les canaux TRPs possèdent six domaines transmembranaires (S1 à S6) avec un pore formé entre le cinquième (S5) et le sixième (S6) segment (Venkatachalam et al., 2007). Ces domaines sont délimités par des segments N- et C-terminal intracellulaires, dont la longueur varie selon la famille (Pedersen et al., 2005) (Figure 4). Pour former des canaux fonctionnels, les canaux TRPs vont favoriser des structures en homo ou en hétéro-tétramères (Hofmann et al., 2002). Selon la sous-famille de canaux, les TRPs peuvent être des canaux perméables aux ions cationiques monovalents, comme le Na^+ , et aux ions cationiques divalents, comme le Ca^{2+} et/ou le Mg^{2+} . La sélectivité ionique varie grandement d'un canal à l'autre. Les canaux TRPM sont des canaux présentant la plus faible sélectivité pour le Ca^{2+} avec un ratio relatif P_{Ca} sur $P_{\text{Na}} \sim 0,3$ (Hofmann et al., 1999). Les canaux les plus sélectifs aux ions Ca^{2+} sont les canaux TRPV5 et TRPV6 avec des ratios $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$

de plus de 100 et les canaux TRPC ont une sélectivité variable allant jusqu'à un ratio de P_{Ca}/P_{Na} de 5 (Hofmann et al., 2002). Dû à leur expression dans plusieurs types de tissus, les canaux TRPs sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques ayant un rôle majeur dans la transduction des signaux et dans la fonction biologique cellulaire.

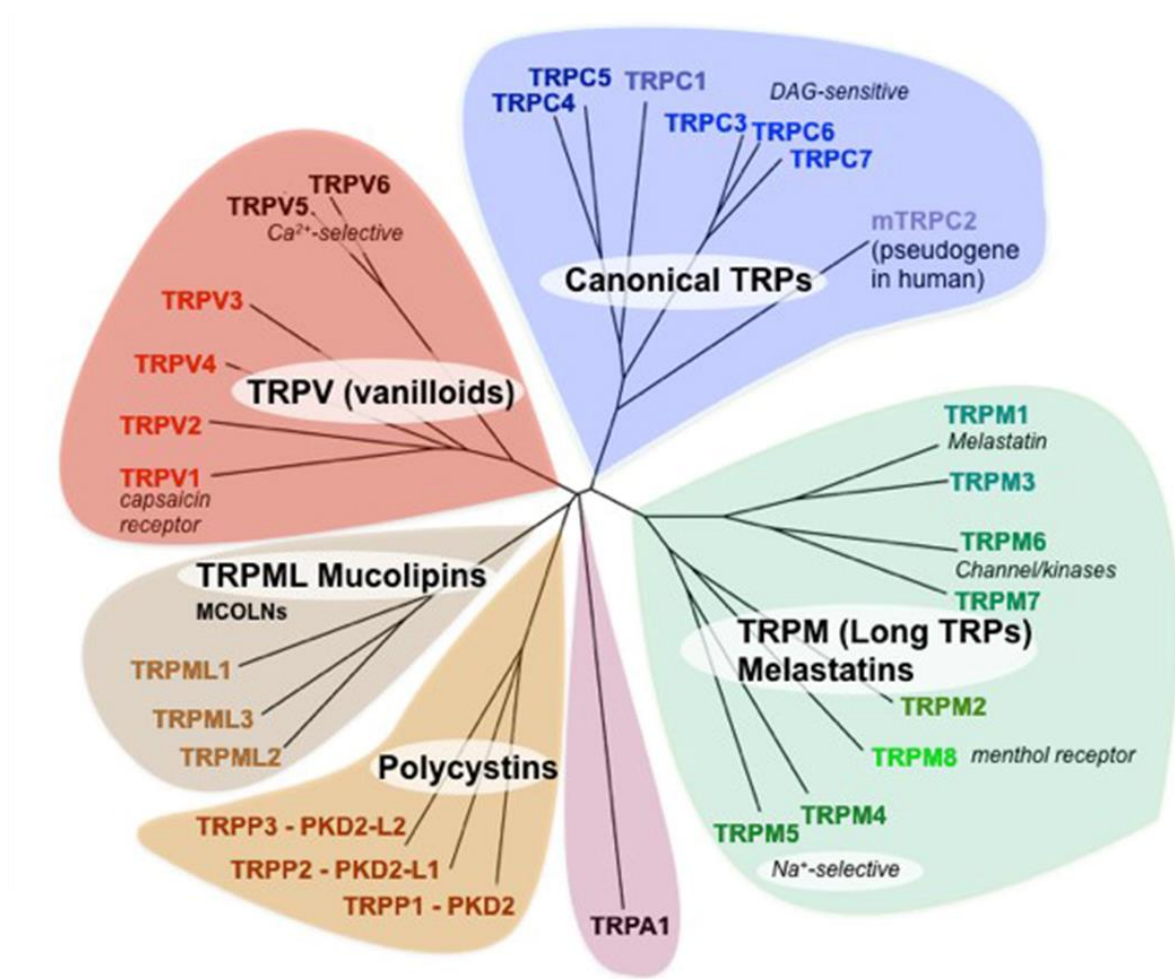


Figure 3. Arbre phylogénétique des membres de la superfamille des canaux TRP. Schémas représentant les différentes sous-familles des canaux TRPs avec leurs membres respectifs (D'après Clapham, 2007, *Cell*)

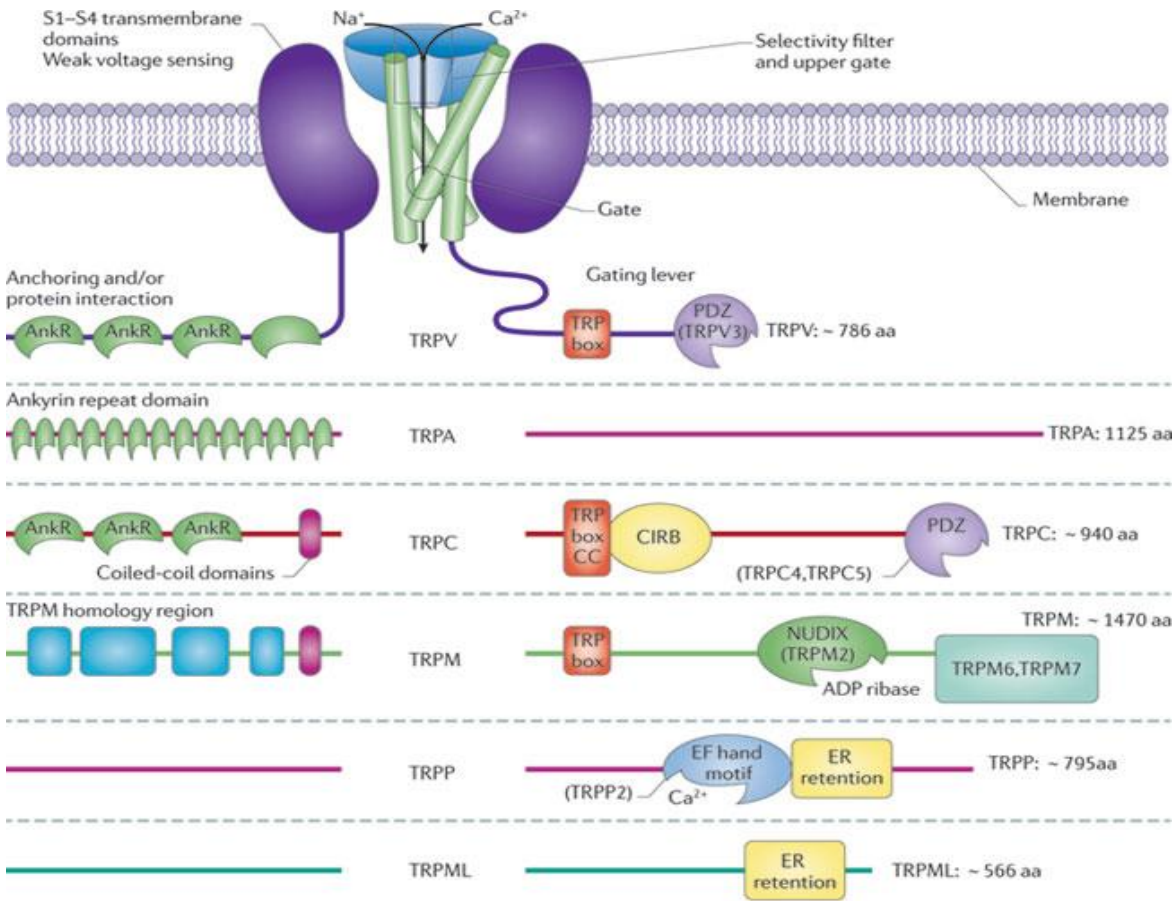


Figure 4: Représentation de la différence entre les segments N- et C-terminaux des différents membres des canaux TRP. TRPV : Transient receptor potential vanilloid channels, TRPA : Transient receptor potential Ankyrin channels, TRPC : Transient receptor potential canonical channels, TRPM : Transient receptor potential melastatin channels, TRPP : Transient receptor potential polycystin channels, TRPML : Transient receptor potential mucolipin channels, AnkR : Ankyrin repeat, PDZ : domaine PDZ, CIBR : Calmodulin and IP₃ binding region, NUDIX : NUDIX domain. (D'après Moran et al., Nature Reviews 2011)

3.1 La sous-famille des canaux TRPMs

Sur la base de leur homologie de séquence, les membres de la sous-famille TRPM peuvent être divisés en trois groupes : TRPM 1 et 3, TRPM 4 et 5 ainsi que TRPM6 et 7 (Grimm et al., 2003). Les canaux TRPM2 et TRPM8 représentent structurellement des canaux distincts des autres TRPMs (Grimm et al., 2003). Les canaux TRPMs possèdent 6 domaines transmembranaires avec un segment N-terminal intracellulaire dépourvu de répétition à l'ankyrine et un segment C-terminal avec des domaines fonctionnels enzymatiques (Grimm et al., 2003). En effet, TRPM2 possède au niveau de son segment C-terminal un domaine fonctionnel appelé NUDT9 (*nudix-type motif 9*) ayant une activité ADP-ribose pyrophosphatase (Perraud et al., 2001). Les canaux TRPM6 et TRPM7 ont un domaine α -sérine/thréonine kinase fonctionnel situé au niveau du segment C-terminal (Oancea et al., 2006). Les canaux TRPMs ont une perméabilité variable aux ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , allant de l'imperméabilité aux ions Ca^{2+} pour TRPM4 et 5 à une très grande perméabilité aux ions Ca^{2+} et Mg^{2+} pour TRPM6 et 7 (Xu et al., 2001). Au niveau cellulaire, TRPM1 est en mesure de former des canaux ioniques non sélectifs impliqués principalement dans le mécanisme de dépolarisation photonique des cellules bipolaires de la rétine (Nakamura et al., 2010). Au niveau de l'épiderme, TRPM1 est exprimé au niveau des extrémités dendritiques des cellules mélanocytaires et impliqué dans le processus cellulaire de la sécrétion de mélanine (Oancea et al., 2009). La régulation de TRPM1 semble être en relation avec la déplétion du PIP_2 au niveau de la membrane cytoplasmique et de l'inhibition de la PLC (Rampino et al., 2011). TRPM2 est principalement exprimé dans les cellules de la moelle osseuse, les cellules phagocytaires du système immunitaire, les cellules β pancréatiques, les cellules neuronales et les cardiomyocytes (Yamamoto et al., 2008). En présence d'un agent pathogène, les cellules phagocytaires produisent des dérivés réactifs de l'oxygène ROS (*reactive oxygen species*) amenant à l'activation des canaux TRPM2 qui vont permettre l'entrée du Ca^{2+} nécessaire à la migration cellulaire et la production de chimiokines (Yamamoto et al., 2008). En réponse à la glycémie

sanguine, TRPM2 exprimés au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules β pancréatiques vont jouer un rôle essentiel dans le processus de sécrétion de l'insuline (Uchida et al., 2011). La régulation des canaux TRPM2 est aussi associée à des états pathologiques qui influencent le processus d'apoptose cellulaire (Nilius et al., 2007). Dans certaines situations pathologiques de neurodégénérescence, notamment dans la maladie d'Alzheimer, on observe une surproduction des ROS en réponse à un stress oxydatif menant à l'augmentation de l'activité des canaux TRPM2 (Xie et al., 2010). Il a été également démontré que la perte de l'activité des canaux TRPM2, causée par des mutations au niveau du pore du canal, a été identifiée chez des patients atteints de la sclérose latérale amyotrophique et dans l'état de démence chez les patients parkinsoniens (Hermosura et al., 2008). TRPM3 est un canal non sélectif perméable aux ions Ca^{2+} . Il est grandement exprimé au niveau des neurones sensoriels et son activation par les neurostéroïdes prégnénone sulfate induit une sensation de douleur chez la souris (Vriens et al., 2011). Il est également exprimé de façon prédominante au niveau du rein, mais est aussi exprimé au niveau des ovaires, des testicules et de la moelle épinière (Lee et al., 2003; Grimm et al., 2003). Tout comme TRPM2, TRPM3 est exprimé dans les cellules β pancréatiques et son activation est en réponse au neurostéroïde prégnénone sulfate qui induit une sécrétion d'insuline (Wagner et al., 2010). TRPM4 est un canal non sélectif activé par les variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et perméable aux ions K^+ et Na^+ seulement (Guinamard et al., 2002). L'activation de TRPM4 affecte plusieurs fonctions cellulaires suite à la dépolarisation membranaire. Au niveau du système immunitaire, TRPM4 est impliqué dans les mécanismes cellulaires notamment la migration des cellules de type T ainsi qu'au niveau des cellules mastocytaires par leur implication dans le processus de dépolarisation membranaire (Shimizu et al., 2009; Vennekens et al., 2007). TRM4 est exprimé au niveau cardiaque à la fois dans les cardiomyocytes avec un rôle dans la régulation contractile cardiaque (Guinamard et al 2002) et au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux jouant un rôle dans le processus de la vasoconstriction artérielle

(Murakami et al., 2003). Il est aussi exprimé au niveau du tractus gastro-intestinal (Nilius et al., 2003). Au niveau physiopathologique, TRPM4 est impliqué dans les maladies reliées à l'hypertension (Mathar et al., 2010), dans le processus d'anaphylaxie médié par les IgE⁶⁴ ainsi que dans la dérégulation de conduction cardiaque (Kruse et al., 2009). TRPM5 forme un canal perméable aux ions cationiques suite à l'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ en jouant un rôle important au niveau de l'activation des cellules gustatives (Mattes et al., 2011). Les canaux TRPM6 et TRPM7 sont perméables aux ions Mg^{2+} et la régulation de ces canaux est contrôlée par la variation des concentrations intracellulaires de Mg^{2+} libre ou liée à l'ATP (MgATP) (Li et al., 2006). Ces canaux sont principalement exprimés au niveau des cellules épithéliales du gros intestin et des canaux des tubules contournés distaux des reins où ils sont impliqués dans le processus de réabsorption du Mg^{2+} (Lainez et al., 2014; Voets et al., 2004). Les canaux TRPM6 et TRPM7 possèdent également un rôle important dans la régulation du Mg^{2+}_i dans les cellules pulmonaires et des cellules des testicules (Van der Wijst et al., 2014). TRPM8 est un canal homotétramérique perméable aux ions Na^+ et Ca^{2+} créant un effet de dépolarisation membranaire qui va générer un potentiel d'action principalement dans les cellules du système nerveux, mais également dans les cellules de la prostate (Zhang et al., 2004). TRPM8 est activé par le froid et par des agents donnant une sensation de fraîcheur comme le menthol ou des agents agonistes synthétiques comme l'iciline (Peier et al., 2002).

3.2 La sous-famille des canaux TRPVs

La sous-famille des TRPVs comprend six membres de TRPV1 à TRPV6, qu'on peut également diviser selon leur sélectivité fonctionnelle en deux sous-groupes; d'une part, TRPV1 à 4 et d'autre part TRPV5 et 6 (Gunthorpe et al., 2002). Au niveau structural, les canaux TRPV sont composés de six domaines transmembranaires avec deux segments N- et C-terminaux intracellulaires. Les canaux TRPV partagent quelques similitudes avec les canaux potassiques et forment des canaux tétramériques (Alexander et al.,

2004). Les canaux TRPV 1 à 4 sont activés par la sensation de chaleur avec une faible sélectivité aux ions Ca^{2+} et un ratio de perméabilité ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$) qui varie entre 1 à 10 respectivement. Les canaux TRPV 1 à 4 jouent également le rôle de capteurs chimiques pour une variété de ligands endogènes (Caterina et al., 1997). TRPV1 est perméable aux ions Ca^{2+} suite à leur activation en présence de composés vanilloïdes comme la capsaïcine, composé actif du piment, mais également via des ligands endogènes comme l'anadamide (N-arachidonoyléthanolamide), un neurotransmetteur cannabinoïde retrouvé au niveau cérébral (Zygmunt et al., 1999) ainsi qu'en présence des dérivés appartenant à la famille des eicosanoïdes (Hwang et al., 2000). La majorité des canaux TRPV1 sont exprimés au niveau des terminaisons nerveuses nociceptives impliquées dans la perception thermosensorielle. Étant donné leurs localisations au niveau des neurones sensoriels, les canaux TRPV1 sont également activés par l'élévation de température $\geq 43^\circ\text{C}$, ce qui explique la sensation de chaleur en consommant la capsaïcine (Hayes et al., 2000). Fait intéressant pour ce type de canaux, ces différents stimuli ont un effet additif ou amplifiant de l'ouverture des canaux TRPV1 ce qui leur donne une caractéristique d'intégration de signaux (Puntambekar et al., 2004). Cette forme de signal activateur confère à ce type de canal un rôle important dans différents états pathologiques. L'hyperalgésie thermique en réponse à un état d'inflammation implique les canaux TRPV1 qui sont stimulés à la fois par les stimuli thermiques et chimiques, résultant en une sensation de chaleur locale. Au niveau du système urinaire, les canaux TRPV1 sont exprimés au niveau de l'urothélium et participent activement dans la réponse aux tensions de la vessie (Apostolos et al., 2005). TRPV2 partage plusieurs similitudes au niveau structurel avec TRPV1. TRPV2 est principalement exprimé dans les neurones nocicepteurs thermosensibles (Lewiner et al., 2004). Malgré cette similitude, TRPV2 n'est pas activé par les mêmes ligands chimiques qui activent TRPV1. En revanche, TRPV2 peut être activé à des températures supérieures à 53°C (Caterina et al., 1999). Au niveau du muscle lisse vasculaire, TRPV2 est également impliqué dans la réponse à l'hypotonie et l'étirement mécanique vasculaire (Muraki et al.,

2003). TRPV3, tout comme TRPV1, est thermosensible ($\geq 30^{\circ}\text{C}$) et principalement exprimé au niveau des terminaisons nerveuses sensorielles, soit aux mêmes sites d'expression que les canaux TRPV1 (Smith et al., 2002). Cette co-expression peut laisser croire à une possible hétéro-tétramérisation avec les sous-unités TRPV1 pour former des canaux fonctionnels avec une perméabilité aux ions Ca^{2+} différente (Xu et al., 2002). L'expression de TRPV3 a été également retrouvée au niveau de la peau et plus particulièrement dans les kératinocytes (Peier et al., 2002). TRPV3 est activé lors de la sensation de température plus douce avoisinant la température corporelle et par l'huile de camphre composé qui active spécifiquement les canaux TRPV3 (Moqrich et al., 2005; Xu et al., 2005). Le 2-aminoéthoxy diphenyl borate (2-APB) est un agoniste synthétique permettant l'ouverture des canaux TRPV3, mais qui joue un rôle inhibiteur pour les récepteurs canaux à l' IP_3 (Moqrich et al., 2005). Le dérèglement de l'activité de TRPV3 fait partie du processus d'hyperalgésie dans le processus inflammatoire et également impliqué dans la sensibilité cutanée (Xu et al., 2006). Le type de canal TRPV le plus grandement exprimé dans les tissus humains est le canal TRPV4 qui est exprimé au niveau du cœur, de l'endothélium, du cerveau, du foie, du placenta, des poumons, de la trachée et des glandes salivaires (Delany et al., 2001). Une plus grande expression a été observée au niveau des muscles lisses des bronches (Jia et al., 2004). Au niveau cérébral plus particulièrement au niveau des neurones de l'organe circumventriculaire, ainsi qu'au niveau des épendymocytes du plexus choroïdes (Liedtke et al., 2000). TRPV4 est activé par le bourgeonnement cellulaire, en réponse à l'acide 5',6'-epoxyeicosatriénoïque (Watanabe et al., 2002). Les propriétés fonctionnelles des canaux TRPV5 et 6 se différencient des autres canaux TRPV par leurs caractères hautement sélectifs pour les ions Ca^{2+} (Schoeber et al., 2007). TRPV6 est aussi exprimé dans plusieurs types de tissus, alors que TRPV5 est principalement exprimé au niveau du rein plus particulièrement au niveau du tubule contourné distal (Van de Graaf et al., 2006; Vriens et al., 2009). Ils sont impliqués dans l'absorption intestinale du Ca^{2+} , la réabsorption du Ca^{2+} par les tubules rénaux et dans le transport du

Ca²⁺ du placenta vers le fœtus (Suzuki et al., 2008). La variation de la [Ca²⁺]_i est responsable de la régulation des canaux TRPV5 et 6. Malgré qu'en conditions physiologiques normales ces canaux soient sélectifs au Ca²⁺, il se produit qu'en absence de Ca²⁺ extracellulaire ces canaux peuvent devenir perméables aux ions Na⁺. Cette perméabilité ionique provoque un ratio molaire ionique anormal à l'intérieur de la cellule (Vriens et al., 2009). Cette propriété des canaux TRPV 5 et 6 joue un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre ionique cellulaire particulièrement dans les cellules épithéliales (Vriens et al., 2009).

3.3 La sous-famille des canaux TRPPs

La sous-famille des polycystines, communément appelée TRPP, est composée d'un groupe de canaux non homogènes qui peut se diviser en deux sous-groupes selon leur homologie de structure; les canaux TRPP1 (*PKD1-like*) et les canaux TRPP2 (*PKD2-like*). Les canaux TRPP1 sont constitués de 11 domaines transmembranaires avec un long segment N-terminal à l'extérieur de la membrane cellulaire (Delmas et al., 2004). Ce segment comprend plusieurs motifs d'adhésion cellulaire et impliquée dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice (Delmas et al., 2004). Le segment C-terminal quant à lui est situé au niveau intracellulaire avec un domaine *coiled-coil* impliqué dans l'interaction avec le segment C-terminal des canaux TRPP2 (Delmas et al., 2004). Les membres du groupe TRPP2 ressemblent d'un point de vue structurel aux autres canaux TRP, avec des segments N et C-terminaux intracellulaires séparés par six domaines transmembranaires (Delmas et al., 2005). Le segment C-terminal comprend un domaine *coiled-coil* impliqué dans l'interaction avec d'autres partenaires protéiques et la formation du canal. Également, les canaux TRPP2 et TRPP3 possèdent dans leurs segments C-terminal un motif *EF-hand* qui est capable de coordonner les ions Ca²⁺ et qui pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'ouverture de ce canal

(Delmas et al., 2004). TRPP2 est perméable au Ca^{2+} et possède une plus grande sélectivité que les canaux TRPP3 (Delmas et al., 2005). TRPP2 semble jouer un rôle important dans la perception des goûts par les cellules gustatives, principalement au niveau des goûts acidulés (Delmas et al., 2004). Il est connu dans la littérature que les sous-unités TRPP1 peuvent s'associer avec les sous-unités de TRPP2 pour former des canaux fonctionnels hétéromériques et transloquer à la membrane cellulaire (Hanaoka et al., 2000). Ces canaux sont principalement exprimés au niveau des structures ciliaires des cellules de l'épithélium rénal jouant un rôle de mécanosenseur pour la détection de la variation du flux urinaire (Nauli et al., 2003).

3.4 La sous-famille des canaux TRPMLs

La sous-famille des canaux TRPML comporte trois membres, soient TRPML1, TRPML2 et TRPML3. Comparé aux autres TRP, ce sont de petites protéines d'environ 600 acides aminés (Bach et al., 2001). TRPML1 est largement exprimé dans la plupart des types cellulaires et démontre une plus grande expression au niveau de la membrane des endosomes et des lysosomes (LaPlante et al., 2004). TRPML1 est perméable au H^+ et contribue à la régulation du degré d'acidité dans ces organites (Grace et al., 2011). TRPML2 est impliqué au niveau du transport intracellulaire des protéines membranaires en association avec les protéines ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*) (Karacsonyi et al., 2007). Tout comme TRPML1, TRPML3 joue un rôle dans la régulation de l'acidification dans la lumière des endosomes lors du processus d'endocytose cellulaire (Noben-Trauth et al., 2011).

3.5 La sous-famille des canaux TRPAs

TRPA1 constitue le seul membre de la famille TRPA. Ce canal est principalement exprimé au niveau du système nerveux, notamment dans les ganglions spinaux (Corey et al., 2004), les ganglions trigéminaux

(Nagata et al., 2005) et les follicules pileux (Corey et al., 2004). TRPA1 a une caractéristique particulière au niveau du segment N-terminal, soit la présence de quatorze motifs de répétitions à l'ankyrine. Ce segment est impliqué dans l'interaction protéine-protéine et dans le processus de mécanosensation (Story et al., 2003). TRPA1 est thermosensible et activé en réponse à une sensation de froid extrême à partir de température de -17°C (Bautista et al., 2006). Des ligands chimiques peuvent également activer les canaux TRPA1. Ces ligands sont des isothiocyanates (l'agent actif dans la moutarde), le wasabi, le raifort, le salicylate de méthyle, l'aldéhyde cinnamique (composé principal de l'essence de la cannelle), l'allicine (composé organo-sulfuré abondant dans l'ail), acroléine (irritant majeur présent dans la fumée de cigarette) et finalement le cannabinoïde Δ -9-tétrahydrocannabinol (THC) qui possède des propriétés psychoactives (Bandell et al., 2004).

3.6 La sous-famille des canaux TRPCs

Chez les mammifères, la sous-famille des TRPC comprend sept membres (TRPC1 à TRPC7). Cependant, TRPC2 qui est exprimé au niveau de l'organe voméro-nasal pour exercer la fonction essentielle de détection des phéromones (Lucas et al., 2003), est un pseudogène chez l'humain. Les sept canaux TRPCs possèdent tous six domaines transmembranaires (S1 à S6), un pore formé entre les domaines transmembranaires S5 et S6 ainsi que des segments N et C-terminaux intracellulaires (Philipp et al., 2000). Le segment C-terminal comprend un domaine TRP situé en aval du domaine transmembranaire S6 comprenant un segment CIBR (*calmodulin and IP₃ binding region*) impliqué dans la liaison de la portion N-terminal de l'IP₃R et de la calmoduline (CaM) (Hofmann et al., 2002). Les canaux TRPC, à l'exception des canaux TRPC2, peuvent se regrouper en deux groupes selon leur homologie de séquence et leur capacité de s'assembler pour former des canaux hétérotétramérique (Hofmann et al., 1999): le premier groupe est constitué des canaux TRPC1, 4 et 5 et le deuxième groupe des canaux TRPC3, 6 et 7.

L'activation de l'ouverture des canaux TRPC est en réponse à une stimulation d'un récepteur couplé à une protéine G (GPCR) ou un récepteur tyrosine kinase, qui par conséquent active différentes isoformes de PLC (Hofmann et al., 1999). Plusieurs études ont démontré que les canaux TRPC3, 6 et 7 peuvent être activés par une forte concentration de diacylglycérol (DAG) *in vitro*. Cette action du DAG est indépendante de la stimulation de la protéine kinase C (PKC), ce qui suggère que le DAG exerce un rôle dans la régulation de l'activité de ces canaux (Hofmann et al., 1999). Les canaux TRPC1, 4 et 5 sont aussi activés suite à l'activation de la PLC, mais ils ne sont pas stimulés par le DAG (Schaefer et al., 2000). TRPC1 est exprimé de façon ubiquitaire alors que les canaux TRPC4 et TRPC5 sont exprimés de façon importante au niveau du cerveau, notamment au niveau de l'hippocampe, du cortex cérébral, du bulbe olfactif, des amygdales, du cœur, des poumons, du foie, de la rate et des testicules (Venkatachalam et al., 2007).

TRPC1 est le premier membre de la famille des TRPCs qui a été identifié par les groupes de Wes *et al.* (Wes et al., 1995) et Zhu *et al.* (Zhu et al., 1995). TRPC1 partage 38% d'homologie de séquence avec son homologue dtrp des invertébrés (Zitt et al., 1996). Le plus haut niveau d'homologie est situé au niveau de la région transmembranaire du canal. Le segment N-terminal contient deux motifs; un premier constitué de quatre domaines à répétition à l'ankyrine et un deuxième qui forme un domaine de type *coiled-coil* (Hofmann et al., 2000). Le segment C-terminal de TRPC1 possède un faible niveau d'homologie avec les TRPs des invertébrés, mais une forte homologie avec la protéine dystrophine, une protéine de la membrane des fibres musculaires (Hofmann et al., 2000). TRPC1 peut former un canal homotétramérique de type SOC (*store operated channel*), dont l'activation est régulée par la déplétion des réserves internes en Ca^{2+} . De plus TRPC1 peut être activé en réponse à un étirement mécanique membranaire (Lintschinger et al., 2000). Les monomères TRPC1 peuvent aussi s'assembler avec les monomères TRPC4 ou TRPC5 pour former des canaux fonctionnels hétéro-tétramériques avec un potentiel de courant plus élevé que celui

généralisé par la surexpression des canaux homo-tétramériques TRPC4 ou des canaux homo-tétramériques TRPC5 (Hong et al., 2015). Ces canaux hétéro-tétramériques sont principalement exprimés dans la membrane des cellules neuronales de l'hippocampe au niveau du corps cellulaire et en périphérie principalement au niveau des dendrites et axones (Davare et al., 2009).

Les canaux TRPC4 et TRPC5 présentent une homologie de séquence de l'ordre de 65% (Ramsey et al., 2006). Le segment C-terminal de ces canaux comprend un motif de liaison PDZ (*postsynaptic density 95/disc-large/zona occludens*) impliqué dans l'interaction avec des protéines d'échafaudage et dans la formation de complexes protéiques membranaires (Wang et al., 1998). Au niveau fonctionnel, la régulation des canaux TRPC4 et TRPC5 est en réponse à l'activation des protéines GPCR couplées à la sous-unité $\alpha_{q/11}$ (Okada et al., 1998). L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire induit une forte augmentation de l'activité du canal TRPC5, mais exerce un moins grand impact sur l'activité de TRPC4 (Blair et al., 2009). L'augmentation du Mg^{2+} intracellulaire peut induire la diminution voir l'inhibition du courant ionique des canaux TRPC5 (Obukhov et al., 2008). De plus la phosphorylation de la PKC inhibe complètement l'activité de ces canaux (Ordaz et al., 2005).

Pour le deuxième groupe, les canaux TRPC3, TRPC6 et TRPC7 possèdent 78% d'homologie au niveau de leur séquence en acides aminés (Onohara et al., 2006). L'activation de ces canaux est en réponse à la stimulation du récepteur de type GPCR couplé à la sous-unité $\alpha_{q/11}$ ou par l'action directe du diacylglycérol ou son analogue, l'1-oleoyl-2-acétyl-sn-glycérol (OAG) (Hofmann et al., 1999). Les sous-unités monomériques TRPC3, 6 et 7 peuvent s'associer pour former des canaux hétéro-tétramériques ayant une sélectivité relativement faible pour le Ca^{2+} et le Na^{+} , mais dont l'activité est grandement sensible aux variations de $[Ca^{2+}]$ intracellulaire (Hofmann et al., 1999). TRPC3 est principalement exprimé dans le cerveau plus particulièrement au niveau du cervelet et de l'hippocampe, en plus d'être exprimé au niveau

cardiaque (Vasquez et al., 2004). TRPC3 peut être activé par le DAG indépendamment de la déplétion des réserves internes cellulaires de Ca^{2+} (Hofmann et al., 1999). La phosphorylation joue un rôle important au niveau de la régulation des canaux TRPC3. En effet, la diminution de l'activité de TRPC3 est en réponse à la phosphorylation d'un résidu sérine (S712) au niveau du segment C-terminal par la protéine kinase de type C (PKC) (Trebak et al., 2005), par la phosphorylation des résidus sérine (S263) ou thréonine (T11) en N-terminal par la protéine kinase de type G (PKG) (Trebak et al., 2005). TRPC3 interagit avec les protéines transmembranaires de la famille SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*) dont les protéines syntaxin et SNAPs (*soluble NSF Attachment Protein*) jouant un rôle au niveau du *trafficking* du canal et de son ancrage à la membrane (Singh et al., 2004).

Chez l'humain, TRPC7 est exprimé principalement au niveau du système nerveux central et des tissus périphériques (glande pituitaire, reins, intestins et prostate) (Riccio et al., 2002). Chez les rongeurs, l'ARNm de TRPC7 a été détecté au niveau des cellules épithéliales de l'artère coronaire (Yip et al., 2004), des kératinocytes (Cai et al., 2005) et au niveau du tissu pulmonaire (Finney-Hayward et al., 2010). La régulation de l'activité de TRPC7 est médiée par le niveau de production de DAG sous l'influence de l'activité catalytique de la PLC et ce indépendamment de la déplétion du Ca^{2+} intracellulaire (Okada et al., 1999). TRPC7 peut également être activé par l'action du PIP_2 ou l'ATP, mais pas par l' IP_3 (Lemonnier et al., 2008). À l'inverse, la déplétion du PIP_2 par l'action des PIP phosphatases inhibe l'activité des canaux TRPC7 (Lemonnier et al., 2008). Ces rôles opposés du PIP_2 sur l'activité des canaux TRPC7 peuvent être expliqués par la caractéristique des canaux TRPC7 de former des canaux homo-tétramériques ou hétéro-tétramériques avec les canaux TRPC6, amenant probablement des réponses différentes face au PIP_2 (Ju et al., 2010). L'activité des canaux TRPC7 est diminuée lors de l'élévation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (Shi et al., 2004) et également lors de la liaison de la calmoduline sur le segment C-terminal du

canal TRPC7 (Lemonnier et al., 2006). Cette régulation de TRPC7 semble jouer un rôle dans l'apparition d'affections neurologiques, notamment dans le cas de crises d'épilepsie (Kevin et al., 2014).

4. Les canaux TRPC6

Les premiers essais d'isolation d'ADN complémentaires codants pour le canal TRPC6 ont été effectués au niveau du cerveau de souris (Boulay et al., 1997) puis la version humaine a été isolée à partir du placenta (Hofmann et al., 1999). Chez l'humain, le gène qui code pour TRPC6 est situé sur le chromosome 11q21-22, possède 13 exons et code pour une protéine de 931 acides aminés (D'Esposito et al., 1998). Chez la souris, le gène homologue des canaux TRPC6 est situé sur le chromosome 9 et code pour une protéine de 930 acides aminés (D'Esposito et al., 1998).

4.1 Organisation structurale des canaux TRPC6

TRPC6 favorise la formation de canaux homo- ou hétéro-tétramériques, en s'oligomérisant avec TRPC3 et 7. L'homotétramère de TRPC6 a une perméabilité non sélective pour les ions Ca^{2+} suite à l'activation des récepteurs de type GPCR couplés aux sous-unité $G_{q/11}$ ou suite à l'action du DAG (ou analogue OAG) (Hofmann et al., 1999). Au niveau structural, les canaux TRPC6 partagent la même organisation structurale avec six domaines transmembranaires (S1 à S6), qui comprend la formation du pore entre le segment S5 et S6, et des segments N et C-terminaux situés au niveau intracellulaire (Hofmann et al., 1999). On retrouve deux sites de glycolysation au niveau des canaux TRPC6, notamment sur les résidus Asn en position 473 et 561 situés au niveau de la première et la deuxième boucle extracellulaire respectivement (Dietrich et al., 2007). Également, des études ont identifié plusieurs résidus comme site de phosphorylation par la PKC notamment les sérines en position 768 (S6) (Kim et al., 2005), 448 (Bousquet et al., 2010) et 814 (Bousquet et al., 2011) (C-terminal) ainsi que la thréonine en position 69 (N-terminal)

(Takahashi et al., 2008). Au niveau du segment intracellulaire N-terminal de TRPC6, on retrouve 4 domaines de répétition à l'ankyrines impliqués dans le processus d'interaction protéine-protéine et avec d'autres segments ankyrines appartenant aux monomères de la famille des TRPCs, par exemple TRPC3 et TRPC4 lors de la formation d'un canal hétéro-tétramérique (Lepage et al., 2006) (figure 5). Des études menées dans notre laboratoire ont également démontré que le domaine à répétition à l'ankyrine interagit avec le segment C-terminal intracellulaire pour former un canal tétramérique fonctionnel (Lepage et al., 2006). Le domaine à répétition à l'ankyrine est également impliqué dans l'interaction avec des protéines cellulaires, notamment la protéine SNF8, composante du complexe endosomal *sorting complex for transport-II* (ESCRT-II). L'interaction du domaine de répétition à l'ankyrine avec SNF8 provoque une augmentation de l'activité du canal TRPC6 en réponse à un stimulus comme le CCh (Carrasquillo et al., 2012). Le domaine de répétition à l'ankyrine interagit avec d'autres protéines cellulaires notamment la calpaïne dans le processus de dégradation du canal TRPC6 au niveau des cellules neuronales (Wanlu et al., 2010). D'autres protéines appartenant à la famille des dynamines MxA interagissent avec le domaine de répétition à l'ankyrine ce qui provoque une augmentation de l'activité du canal TRPC6 (Lussier et al., 2005). Au niveau du segment intracellulaire C-terminal du canal TRPC6, on retrouve un segment appelé « TRP Box » ayant une séquence caractéristique EWKFAR conservée à travers la famille des TRPC (Venkatachalam et al., 2007). On retrouve également un domaine appelé CIRB (*calmodulin and IP₃ receptor binding*) qui, comme son nom l'indique, lie d'une façon compétitive la portion cytoplasmique du récepteur canal à l'IP₃ et la calmoduline (Dietrich et al., 2007; Vasquez et al., 2004; Kwon et al., 2007). Pour former un canal fonctionnel, le canal TRPC6 va s'assembler dans une organisation homo- ou hétéro-tétramérique impliquant les canaux TRPC3 ou TRPC7 (Lepage et al., 2006). Les canaux TRPC6 peuvent aussi former des complexes multimériques avec des partenaires protéiques, notamment la PKC dans la plupart des types cellulaires, la *FK506-binding-protein 12KDA* (FKBP12) au niveau des cellules des

glandes médullosurrénales (Kim et al., 2005), avec PTEN au niveau des cellules endothéliales des artères pulmonaires et la podocine au niveau des podocytes (Kini et al., 2010; Winn et al., 2005).

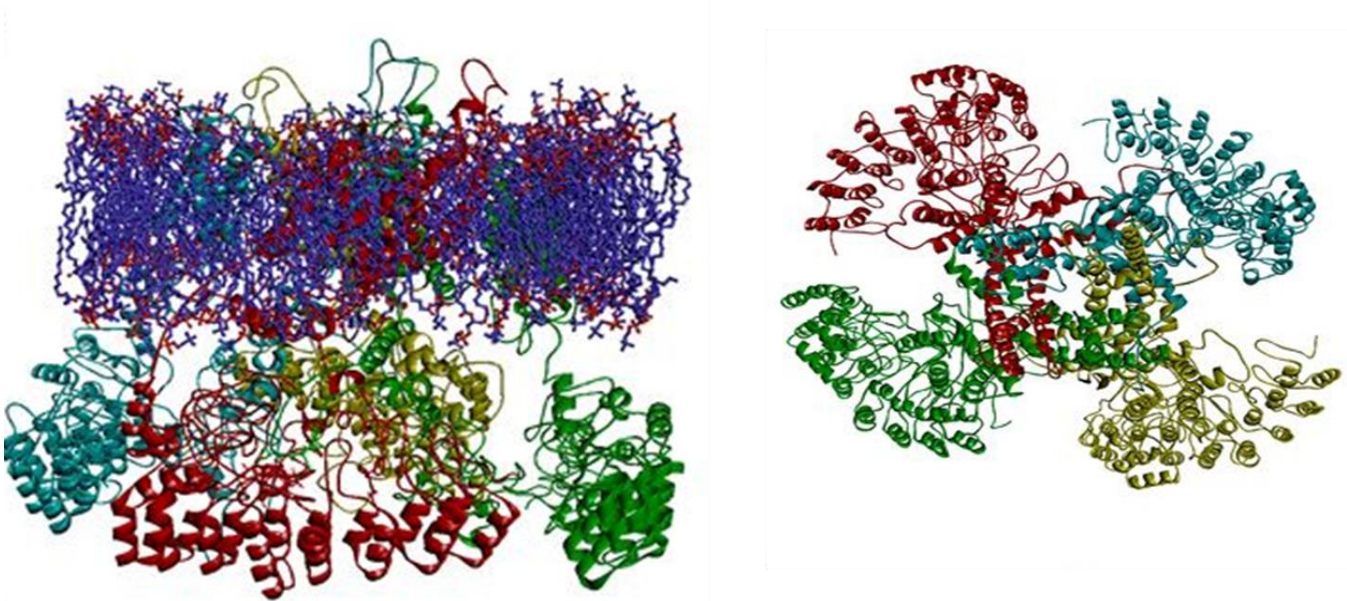


Figure 5: Modèle tridimensionnel *in silico* des canaux tétramériques du canal TRPC6. Quatre monomères (couleurs) de TRPC6 sont organisés en tétramère. Modèle généré par modélisation, utilisant MODELER, en se basant sur l'homologie de séquence des canaux TRPC6 alignés à partir des résidus des répétitions à l'ankyrine et dont la structure a été modélisée à partir des structures des canaux TRPV1 (1N11, 1NW1, 3UI2, 4DXW, 4F4L, et 4F6R) et des canaux Kv1.2 (PDB : 2R9R). (D'après Riehle. JASN 2016)

4.2 Structure des canaux TRPC6 par Cryo-EM

Lors de la finalisation de ma rédaction de thèse, le groupe de Tang en juillet 2018 a publié la structure du canal TRPC6 de type humain (TRPC6h) et le groupe de Azumaya en Mai 2018 la structure du canal TRPC6 de souris (TRPC6m), deux structures résolues via la technique de cryo-microscopie électronique (cryo-EM) (Tang et al., 2018; Azumaya et al., 2018). La structure du canal TRPC6h a été obtenue avec une résolution de 3,8 Å, résolution suffisante pour permettre de modéliser 670 des 931 résidus du canal. Les résidus restants sont dans une forme désordonnée en raison de leurs hauts niveaux de flexibilité ce qui ne permettait pas de résoudre d'une façon convenable la structure complète du canal. Le canal TRPC6h forme un tétramère qui occupe une superficie de $75 \times 75 \times 150 \text{ \AA}^3$ dans l'espace tridimensionnel. Un arrangement de quatre monomères symétriquement arrangés présente une architecture à deux niveaux : un premier niveau transmembranaire et un deuxième cytoplasmique (figure 6). L'axe de rotation central du canal est perpendiculaire aux deux niveaux. Le domaine cytoplasmique est d'une forme de cloche inversée avec l'ouverture faisant face à la membrane (Tang et al., 2018).

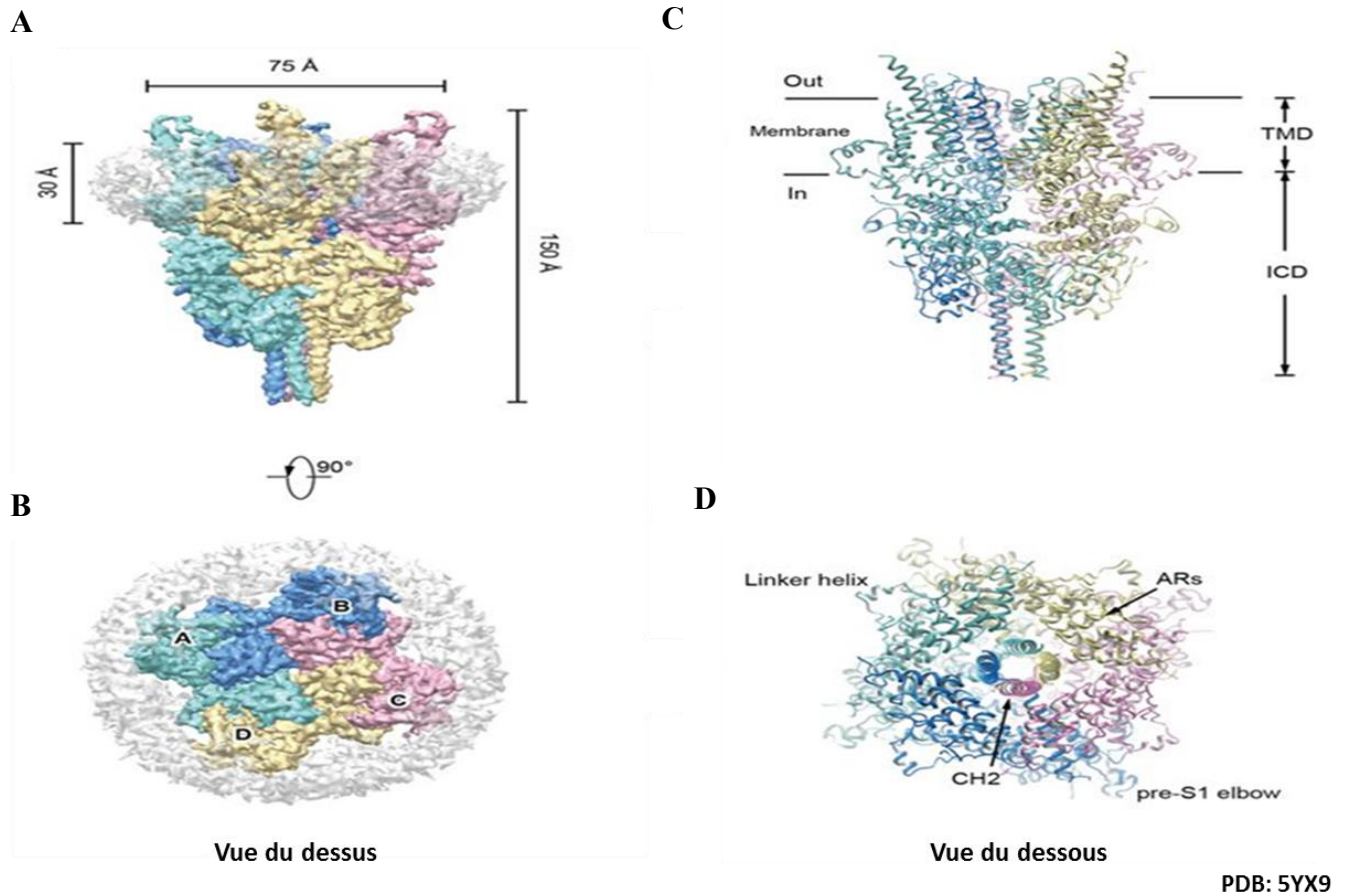


Figure 6: Structure résolue par CryoEM du canal TRPC6h. **A)** La structure CryoEM du canal TRPC6 avec une vue latérale et les dimensions de la structure en Å **B)** la structure tétramérique du canal TRPC6 avec une vue du dessus. **C)** Organisation structurale du canal tétramère TRPC6 avec la localisation cellulaire de chaque portion du canal. **D)** Vue du dessous du canal TRPC6. TMD : Domaine transmembranaire, ICD : domaine intracellulaire. ARs : domaines à répétitions à l'ankyrine. CH2 : Hélice verticale du domaine C-terminal. (D'après Tang et al., Nature 2018)

4.2.1 Structure du domaine N-terminal TRPC6

Dû à sa grande flexibilité, le groupe de Tang n'a pas résolu la structure du fragment composée des premiers 71 résidus du segment N-terminal qui ont été éliminés de l'expression de la protéine analysée par cryo-EM (Tang et al., 2018). Les auteurs ont remarqué que la délétion de ce fragment n'a pas eu d'effet sur l'assemblage du tétramère ni au niveau de la dépolarisation de la membrane suite à l'induction par l'OAG. Cette observation indique que les premiers 71 résidus flexibles du segment N-terminal ne sont pas nécessaires à l'assemblage et à l'ouverture du canal TRPC6 humain (Tang et al., 2018). Cette observation a été également rapportée dans les travaux du groupe Azumaya qui a délaissé les 94 premiers résidus du segment N-terminal afin de permettre la résolution de la structure du TRPC6m (Azumaya et al., 2018). Quatre répétitions à l'ankyrine (S96-A243) et les hélices du fragment de liaison (linker) (LH, résidus : N256-E393) constituent le segment N-terminal du canal TRPC6h analysé (figure 7). On retrouve également trois hélices qui forment la liaison entre le segment N-terminal et le domaine transmembranaire. Dans une organisation tétramérique, les résidus de la boucle N-terminal (85-94) interagissent avec le domaine de liaison (linker) de la sous-unité avoisinante (figure 7 et 8) (Tang et al., 2018; Azumaya et al., 2018). Le domaine de liaison interagit également avec les domaines de liaison des sous-unités adjacentes. Des travaux dans notre laboratoire mené par Pascale Lepage, ont démontré des résultats semblables au niveau de l'oligomérisation des canaux TRPC4. Par des essais de GST-pull down, il a été démontré que le domaine de répétition à l'ankyrine (résidus 1 à 304) du segment N-terminal du monomère TRPC4 interagit à la fois avec les résidus du deuxième au quatrième domaine à l'ankyrine (87 à 172) et les résidus du domaine entre le premier domaine transmembranaire et le quatrième domaine à l'ankyrine (254 à 304) du monomère suivant pour former le canal TRPC4 tétramérique (Lepage et al., 2006).

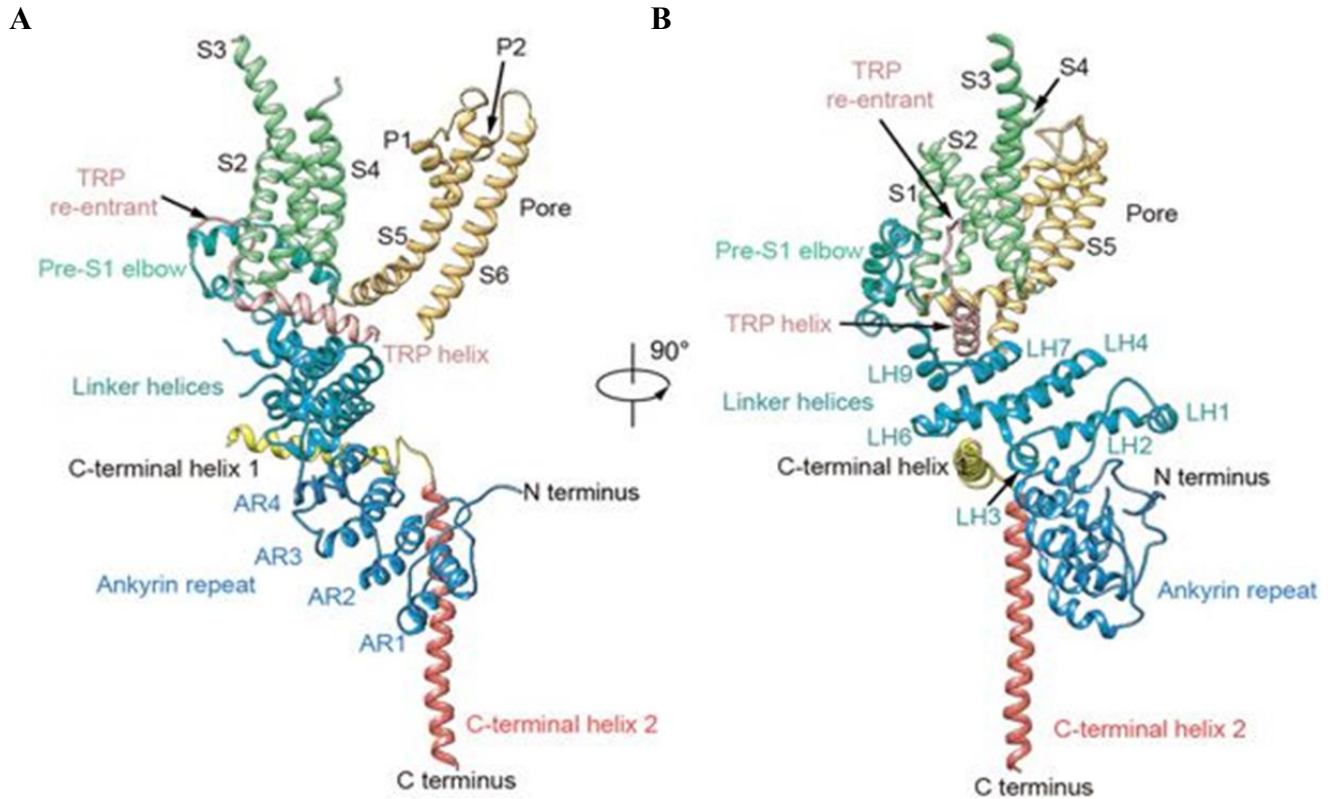


Figure 7: Structure CryoEM du monomère du canal TRPC6h. **A)** Structure d'un seul monomère du canal TRPC6h (rouge : C-terminal; bleu : domaines à répétition à l'ankyrine (AR) 1 à 4; bleu : domaine entre le AR et le premier domaine transmembranaire (S1) (LH 1 à 9); vert et jaune : domaines transmembranaires (S1 à S6)). **B)** Rotation de la structure pour une deuxième vue latérale (90°) du monomère TRPC6h (D'après Jang et al., Nature 2018)

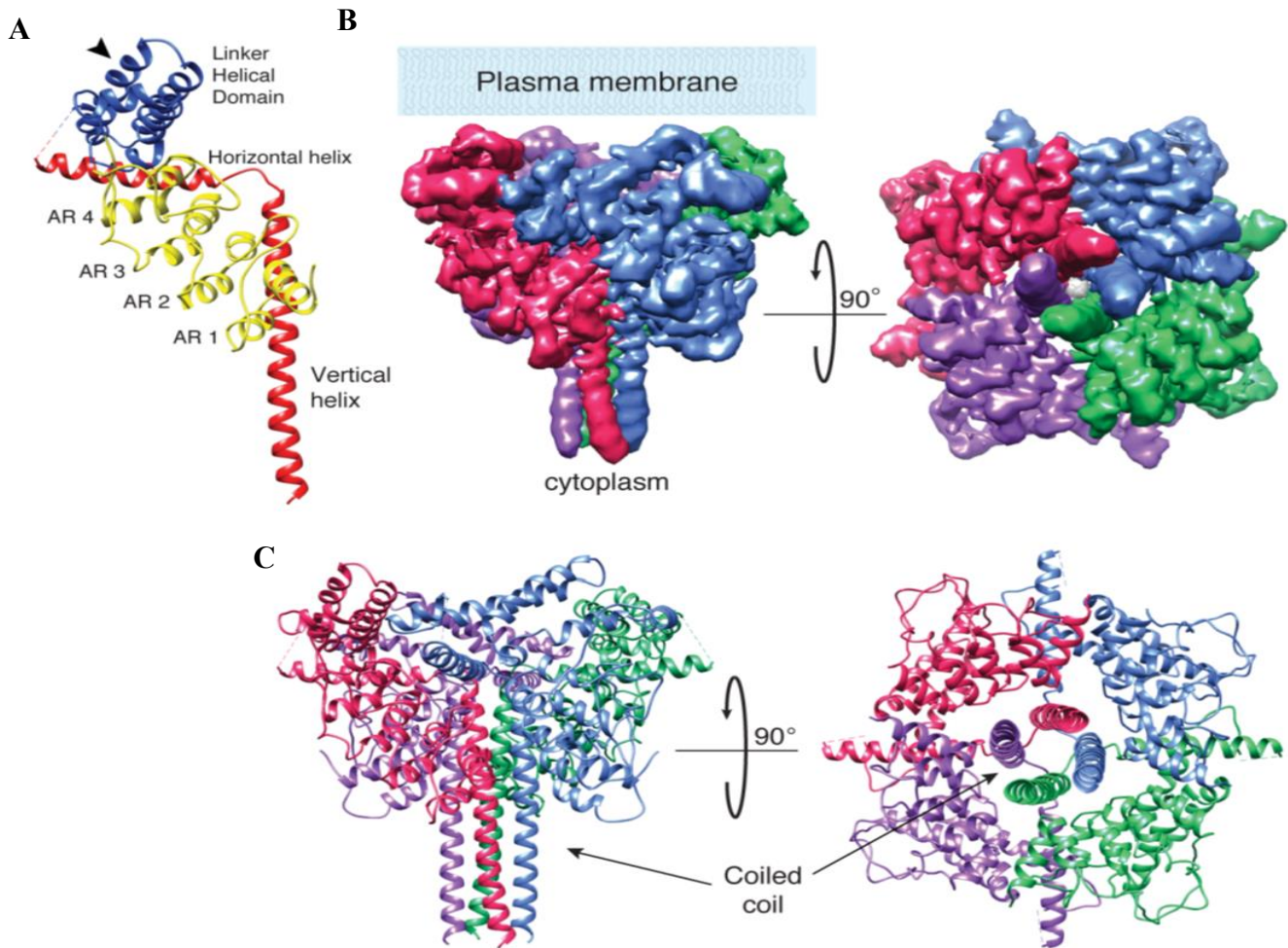


Figure 8: Structure CryoEM du domaine intracellulaire du canal TRPC6m. A) Structure d'un seul monomère des segments N- et C-terminaux TRPC6m (rouge : C-terminal; jaune : Domaines à répétition à l'ankyrine (AR) 1 à 4; bleu : domaine entre le AR et le premier domaine transmembrane (S1)). B) Représentation de l'organisation du tétramère du domaine cytoplasmique (N- et C-terminaux) (chaque couleur représente un monomère). C) Structure du domaine cytoplasmique tétramérique (D'après Azumaya et al., JBC 2018)

4.2.2 Structure du domaine transmembranaire du canal TRPC6

Comme mentionnée précédemment, les monomères des canaux TRPC6 possèdent six domaines transmembranaires, S1 à S6 avec la formation du pore entre le domaine S5 et S6. Au niveau de la structure du groupe Tang, les domaines S1 à S4 forment de longues hélices qui se situent dans la membrane cytoplasmique avec les segments S5 et S6 qui forment le pore (Figure 9) (Tang et al., 2018 ; Azumaya et al., 2018). Une particularité au niveau du canal TRPC6 c'est au niveau de l'hélice S3 qui forme une hélice plus longue que celle caractérisée au niveau des autres canaux TRPs et ce d'environ trois tours au niveau de son extrémité extracellulaire C-terminale (Tang et al., 2018). L'hélice et la boucle de pore interagissent avec les hélices S5-S6 ce qui pourrait servir de base structurelle à l'élaboration du couplage entre chaque monomère pour former le pore. Le profil d'ouverture du pore présente un rayon de rétrécissement le plus étroit de 0,96 Å, ce qui est inférieur à celui des ions sodium déshydratés (Tang et al., 2018). Il faut noter que le groupe de Tang a étudié la structure du canal TRPC6 dans un état fermé avec un inhibiteur spécifique le (2-(benzo[d][1,3] dioxol-5-ylamino)thiazol-4-yl)((3 S,5R)-3,5-dimethylpiperidin-1-yl)methanone ou BTDM (Tang et al., 2018). Les résidus polaires N₇₂₈ et Q₇₃₂ et le résidu hydrophobe I₇₂₄ s'alignent avec la fermeture du pore et forment les parois de l'ouverture du pore vers le côté cytoplasmique (figure 9). Au niveau extracellulaire, le résidu chargé négativement E₆₈₇ est situé sur le côté supérieur du pore. Ce résidu peut jouer un rôle dans la sélectivité ionique au niveau du pore dû au fait qu'au niveau des canaux TRPC3 un résidu homologue le E₆₃₀ est situé au même endroit et il est impliqué dans le processus de perméabilité des ions divalents au niveau du canal (Lichtenegger al., 2013).

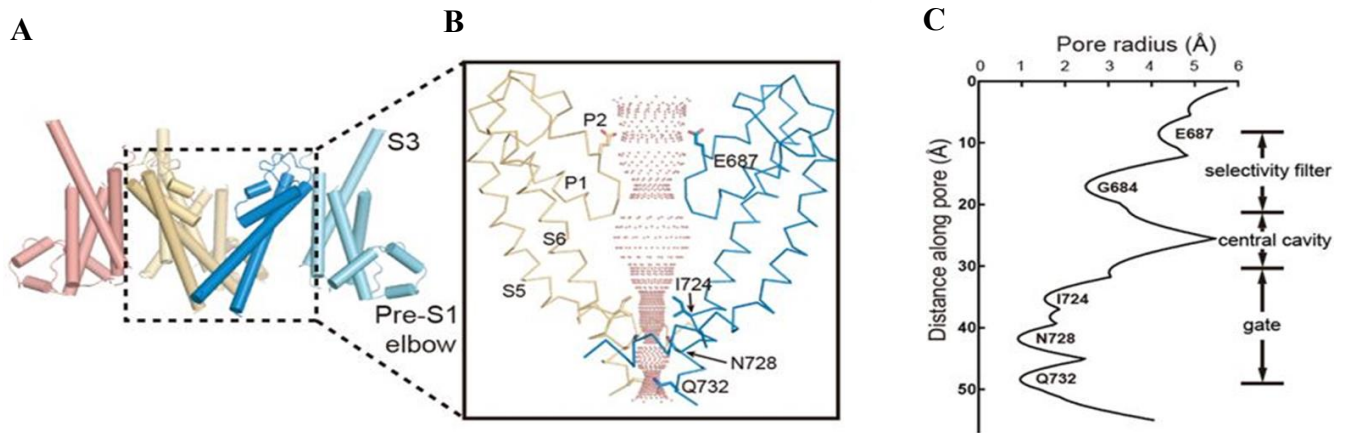


Figure 9: Domaine transmembrane du canal TRPC6h. A) Vue latérale du domaine transmembrane (TMD) du canal TRPC6h (chaque couleur représente un monomère composé de six domaines transmembranes du canal TRPC6h) B) Région ionique comprise entre le domaine transmembrane S5 et S6 C) Distance radiale en Å des résidus au niveau du domaine du pore du canal TRPC6h. (D'après Tang et al., Nature 2018)

4.2.3 Structure du domaine C-terminal TRPC6

Le groupe de Tang a caractérisé la structure du C-terminal TRPC6h des résidus R₈₅₃ à S₉₃₁. Le segment C-terminal de TRPC6 s'organise en deux longues hélices dont une première s'étend horizontalement à partir de la périphérie vers le centre du canal et se connecte à la deuxième hélice en position verticale en formant un angle de 90° (Tang et al., 2018). Cet arrangement a été également observé au niveau de la structure du segment C-terminal TRPC6m Azumaya et al., 2018). Les résidus L766 à P852 situés en avant de l'hélice horizontale sont des résidus avec une structure désordonnée qui contient le domaine CIBR. L'organisation des quatre segments C-terminaux de TRPC6 forme un tunnel vertical composé des quatre hélices qui resserrent encore davantage le tétramère formé; assemblage semblable à l'organisation observée dans les canaux TRPA1 et TRPM (Paulsen et al., 2015; Paige et al., 2017). Les quatre connexions entre les hélices horizontales et verticales de chaque monomère s'entrecroisent d'une manière étroite pour former une structure en forme de nœud sur le haut de la face membranaire de l'hélice verticale. Cette organisation est particulièrement unique comparativement aux canaux TRP (figure 10) (Tang et al., 2018 Azumaya et al., 2018).

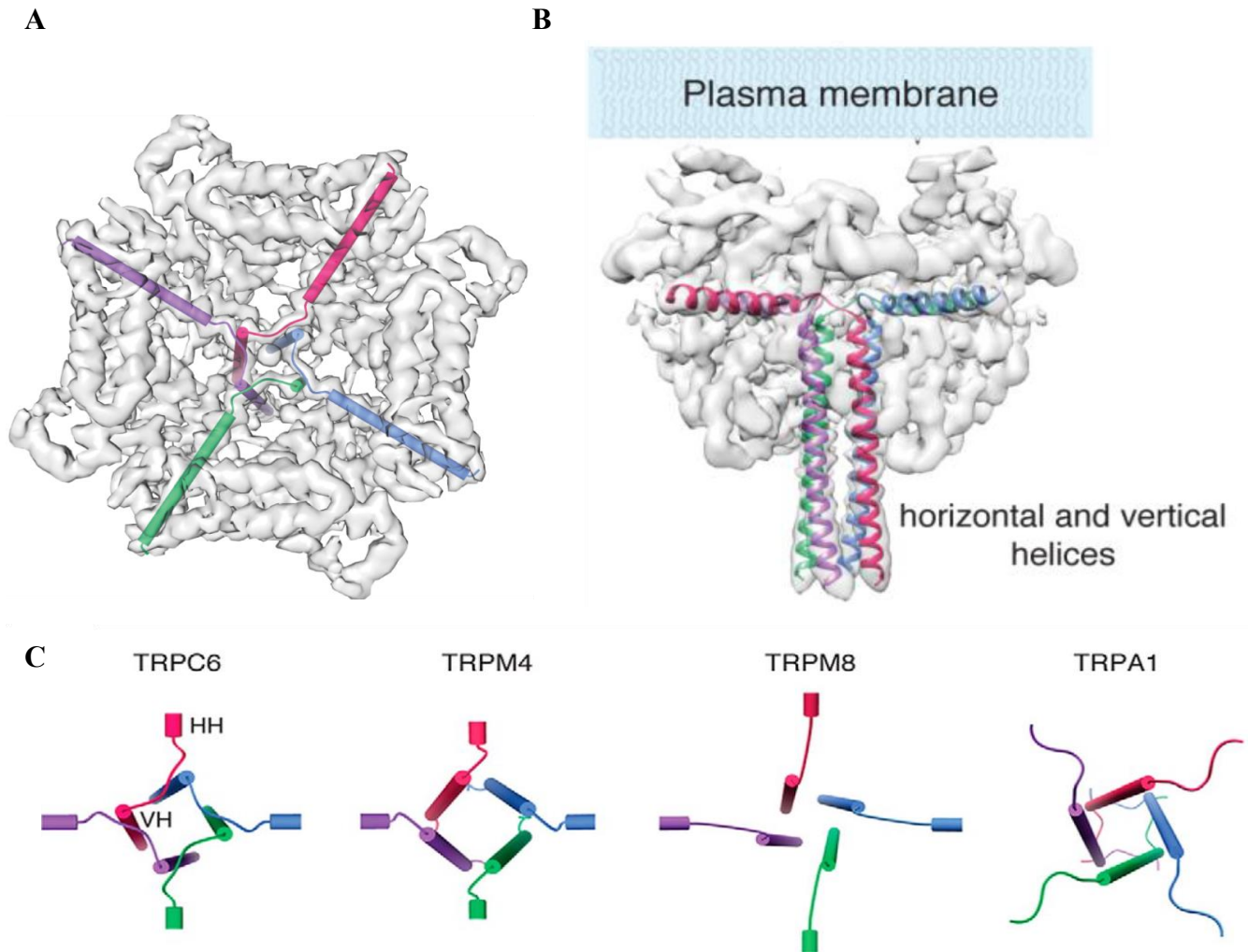


Figure 10: Structure et modèle du tétramère du segment C-terminal TRPC6. A) Une vue du dessus du niveau de la membrane du tétramère du segment C-terminal TRPC6 représenté en cylindres. B) Vue frontale du tétramère du segment C-terminal représenté selon sa structure en hélices α C) Comparaison du croisement des liens entre les hélices horizontales (HH) et verticales (VH) des quatre C-terminaux des canaux TRPC6, TRPM4, TRPM8 et TRPA1 (D'après Azumaya. JBC 2018).

4.3 Propriétés biophysiques des canaux TRPC6

Le canal TRPC6 unitaire affiche une conductance de 28-37 pS avec une perméabilité ionique relative P_{Ca}/P_{Na} des canaux TRPC6 d'environ 5 fois (Hofmann et al., 1999; Inoue et al., 2001; Pederson et al., 2005)

Les ions Na^+ jouent un rôle dans la régulation de l'entrée des ions Ca^{2+} à travers la membrane plasmique via le caractère non sélectif des canaux TRPC6, mais également par l'implication des canaux de type Ca^{2+} voltage-dépendant (VGCC), des Ca^{2+} -ATPases ou des échangeurs Na^+/Ca^{2+} membranaires (NCX). Au niveau des cellules du muscle lisse A7r5, l'augmentation de l'entrée du Ca^{2+} via l'activation des canaux TRPC6 endogènes par le DAG est bloquée par un puissant inhibiteur la nimodipine, un agent utilisé dans la prévention de spasmes artériels, qui agit sur les canaux Ca^{2+} voltage dépendant de type L (Soboloff et al., 2005). Cette réponse indique que l'entrée non sélective du Na^+ via les canaux TRPC6 induit une dépolarisation membranaire ce qui par l'effet même active l'entrée du Ca^{2+} à travers les canaux VGCC de type L (Soboloff et al., 2005). Il a été également observé que dans des conditions d'excès de Na^+ extracellulaire, le Ca^{2+} contribue faiblement (~4-5 %) au courant enregistré au niveau des cellules rénales embryonnaires HEK-293. Ces conditions impliquent que les canaux de type VGCC permettent l'entrée du Ca^{2+} et l'activation des canaux TRPC6 le rend perméable au ions Na^+ au détriment des ions Ca^{2+} ce qui provoque une dépolarisation de la membrane (Estacion et al., 2004). Dans un mode normal en présence d'une réduction du Na^+ extracellulaire, les échangeurs membranaires NCX participent dans un mécanisme d'expulsion des ions Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire contre le gradient de concentration. Ce mécanisme utilise l'énergie générée par l'entrée du Na^+ dans la cellule selon un gradient électrochimique favorable (3 Na^+ :1 Ca^{2+}) et produit par le Na^+/K^+ ATPase. Cependant, avec une concentration cytosolique élevée de Na^+ et selon l'état de dépolarisation de la membrane, le flux de NCX médié par le Ca^{2+} diminue passer dans un mode inverse passant d'un état d'expulsion des ions Ca^{2+} et vers un état d'entrée de Ca^{2+}

(Blaustein et al., 1999). La perméabilité au Na⁺ des canaux TRPC couplés NCX en mode inverse est un mécanisme important dans la signalisation calcique ce qui influence l'état du potentiel membranaire qui influence le sens du fonctionnement de l'échangeur. Un potentiel de membrane plus négatif que -40 mV favorise le mode normal de l'échangeur alors que le potentiel plus positif favorise le mode inversé (Eder et al., 2005; Lemos et al., 2007; Fellner et al., 2008). Au niveau des cellules du cerveau et rénal de rat, il a été démontré que les canaux TRPC6 et TRPC5 interagissent avec Na⁺/K⁺-ATPase pour former un potentiel complexe impliqué dans le transport ionique membranaire (Goel et al., 2005).

4.4 Activation des canaux TRPC6

4.4.1 Activation via le diacylglycérol et les lipides membranaires

Les canaux TRPC6 peuvent être activés en réponse au DAG ou de ces analogues comme le 1-oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (OAG), le 1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycerol (SAG) et aussi par l'inhibiteur DAG lipase RHC80267 (Hofmann et al., 1999). Le DAG peut être métabolisé par la DAG lipase pour produire l'acide arachidonique qui peut activer et moduler un large éventail de canaux ioniques (Meves et al., 1994), comme les canaux *Drosophila* TRP, TRPL (Chyb et al., 1999), TRPV4 (Watanabe et al., 2003), TRPM5 (Oike et al., 2006) et les canaux TRPC4 (Wu et al., 2002). Les canaux TRPC6 peuvent également être activés par l'acide arachidonique et son métabolite l'acide 20-hydroxyéicosatétraénoïque (20-HETE) (Basora et al., 2003). Acide époxyéicosatriénoïque (EET), un autre métabolite synthétisé à partir de l'acide arachidonique par le cytochrome P450 epoxygénase, stimule la translocation des canaux TRPC6 à la membrane plasmique (Fleming et al., 2007; Keseru et al., 2008).

Le phosphatidylinositol phosphate (PIP) est reconnu depuis longtemps pour son rôle dans le processus de régulation des canaux TRPs. Par exemple, le précurseur DAG et le substrat PIP₂, un modulateur essentiel de divers types de canaux ioniques et de transporteurs d'ions (Hilgemann et al., 2005; Suh et al., 2008),

régulent positivement ou négativement plusieurs canaux TRP (Hardie et al., 2007; Nilius et al., 2008). Les effets du PIP₂ sur les canaux TRPC6 ne sont pas encore bien compris. Il a été démontré que le PIP₂ n'a aucun effet sur l'activation des canaux TRPC6 (Hofmann et al., 1999), cependant d'autres travaux ont démontré que le PIP₂ peut directement activer les membres de la sous-famille TRPC3/6/7 (Lemonnier et al., 2008). Le PIP₂ peut stimuler l'activité du canal TRPC6 par le biais d'interaction avec le site CIBR du segment C-terminal TRPC6 (Kwon et al., 2007). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃), un produit lipidique du PIP₂ catalysé par la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), a un effet activateur sur la régulation du canal TRPC6 (Tsegn et al., 2004). Cette interaction rentre en compétition avec l'association de la CaM au segment C-terminal TRPC6 ce qui déclenche l'activation du canal (Kwon et al., 2007). Toutefois, une étude a démontré une action inhibitrice puissante de la PIP₂ sur les canaux TRPC6 natifs exprimés dans les myocytes de l'artère mésentérique (Albert et al., 2008). Outre que le DAG, l'hydrolyse du PIP₂ produit l'IP₃ qui a été démontré, avoir une implication au niveau de la régulation des canaux TRPC6 en augmentant l'ouverture des canaux TRPC6 en réponse à l'OAG dans les myocytes de veines portes de lapin (Albert et al., 2003). Au niveau des cellules de la veine porte, l'action activatrice de l'IP₃ sur les canaux TRPC6 est en conséquence de son pouvoir de lever l'inhibition du PIP₂ sur les canaux TRPC7 qui forment des canaux hétéro-tétramériques avec les canaux TRPC6 (Ju et al., 2010).

4.4.2 Activation des canaux TRPC6 suite à la stimulation aux récepteurs membranaires

De nombreux travaux ont démontré que les canaux TRPC6 sont activés en réponse à une stimulation des récepteurs de type GPCR, RTK et récepteurs cytokines. L'activation des deux premiers groupes de récepteurs active par l'effet même la voie de signalisation de la PLC menant à la production du DAG, tandis que l'activation du récepteur à l'interleukine-1, un récepteur cytokine, génère également du DAG

(Beskina et al., 2007). L'activation des GPCR provoque l'augmentation de la translocation des canaux TRPC6 à la membrane (Cayouette et al., 2004; Fleming et al., 2007).

Des travaux utilisant différentes isoformes clonées de TRPC6 suggèrent que certains acides aminés présents dans l'extrémité N-terminal de TRPC6 sont importants pour l'activation par le DAG, mais ne sont pas nécessaires pour l'activation via le carbachol (Zhang et al., 2001). L'activation des récepteurs muscariniques à l'acétylcholine stimule la formation d'un complexe multiprotéique qui peut être composé du récepteur muscarinique, des canaux TRPC6, de l'immunophiline FKBP12, la calcineurine, la CaM et la protéine kinase C (PKC) (Kim et al., 2005). Par conséquent, DAG seul n'est pas suffisant pour l'activation du canal TRPC6, mais d'autres protéines peuvent agir en synergie avec le DAG pour stimuler l'activité du canal (Estacion et al., 2004).

Même si le caractère ROC (mais pas SOC) des canaux TRPC6 est assez clair, l'affinité élevée entre TRPC6 et l'IP₃R a été prouvée expérimentalement (Tang et al., 2001). Plusieurs études ont démontré une interaction directe entre l'extrémité C-terminale de TRPC et l'extrémité N-terminus du IP₃R (Kiselyov et al., 1998; Boulay et al., 1999), et démontré être impliquée dans le processus de régulation de l'entrée du Ca²⁺. De plus, l'exocytose pour l'insertion des canaux TRPC6 à la membrane plasmique a lieu lors de la déplétion des réserves intracellulaires de Ca²⁺ (Cayouette et al., 2004). Ce dernier mécanisme peut s'expliquer par le couplage conformationnel entre TRPC6 et IP₃R

bien que TRPC6 soit communément décrit comme un ROC, plusieurs auteurs ont rapporté qu'il peut fonctionner comme un SOC. L'expression d'Orai dans des cellules HEK exprimant TRPC6 compose le courant *I_{CRAC}* (Liao et al., 2008), tandis que TRPC6, avec les protéines TRPC1 et Orai, forme le SOC dans les cellules neutrophiles HL-60 (Brechard et al., 2008).. De plus, dans les cellules plaquettaires, TRPC6 joue un double rôle, un premier en tant que canal non capacitatif perméable aux Ca²⁺ (NCCE) régulé par le DAG et un deuxième en tant que composante du SOC régulé par la PIP₂ (Jardin et al., 2008). Ces

derniers ont également démontré que via l'interaction avec le complexe Orai-STIM ou TRPC3 que TRPC6 participe au SOCE ou au NCCE respectivement (Jardin et al., 2009). Il est intéressant de noter que la stimulation par la thrombine ou épuisement des réserves intracellulaires de Ca^{2+} améliore l'interaction entre TRPC6 et Orai-STIM tandis que le DAG déplace TRPC6 d'Orai et STIM et induit son association avec TRPC3 (Jardin et al., 2009).

4.4.3. Activation des canaux TRPC6 par stimulus mécanique

Les canaux TRPC6 peuvent être activés par des stimuli mécaniques indépendamment de la PLC, qui fonctionnent en tant que senseurs du niveau de l'étirement membranaire induit par un stress mécanique ou osmotique (Spasova et al., 2006). En coopérant avec TRPC1 et TRPV4, les canaux TRPC6 assurent la médiation de l'hyperalgésie mécanique et la sensibilité nociceptrice au niveau des neurones ganglionnaires de la racine dorsale, mais son implication dans le rôle de transducteur du stimulus mécanique demeure peu comprise (Alessandri-Haber et al., 2009). De plus, certains GPCR peuvent être activés mécaniquement et sont les composantes essentielles de la mécanosensation dans les cellules du muscle vasculaire lisse qui fonctionnent comme des capteurs de l'étirement de la membrane conduisant à l'activation des canaux TRPC6 (ainsi que TRPC3 et TRPC7) (Medros et al., 2008; Yasuda et al., 2008). De plus, une étude a démontré que les canaux TRPC6 ne sont pas activés directement par les stimuli mécaniques (Inoue et al., 2009), mais plutôt, une fois le récepteur activé, les canaux deviennent mécanosensible par la production de 20-HETE (Inoue et al., 2009). Ce phénomène est inhibé par le peptide GsMTX-4, un inhibiteur des canaux mécanosensibles, qui bloque par le fait même l'activation des canaux TRPC6 (Inoue et al., 2001)

4.5 La régulation de l'activité des canaux TRPC6

La voie classique de régulation des canaux TRPC6, comme pour l'ensemble des canaux TRPC, est en réponse à l'activation d'un GPCR produisant l'activation de la PLC β et menant à la production du DAG qui va exercer un rôle sur l'ouverture du canal TRPC6 (Cayouette et al., 2004). Dépendamment du type cellulaire, on peut retrouver plusieurs GPCR qui exercent ce rôle d'activateur des canaux TRPC6 : par exemple, au niveau des myocytes de la veine porte on retrouve les récepteurs adrénergiques α 1 (Inoue et al., 2001); au niveau des cardiomyocytes les récepteurs à l'angiotensine II (AT1) (Onohara et al., 2006; Saleh et al., 2006); les cellules neuronales du système nerveux sympathique avec les récepteurs à la bradykinine B2 et les récepteurs muscariniques M1 (Delmas et al., 2002), les cellules CHO avec les récepteurs à l'histamine H1 (Hofmann et al., 1999), les cellules HEK293 avec les récepteurs muscariniques M3 (Estacion et al., 2004), les cellules COS avec les récepteurs muscariniques M5 (Lemonnier et al., 2006), les cellules A7r5 avec les récepteurs à la sérotonine; et les cellules endothéliales avec les récepteurs de la thrombine (PAR-1) (Singh et al., 2007). Des récepteurs de type RTK notamment, PDGF (Jung et al., 2002), EGF (Hisatsune et al., 2004) ou VEGF (Pocock et al., 2004) par leurs activités de phosphorylation de la PLC γ qui résultent en une production du DAG ce qui entraîne par conséquent l'activation des canaux TRPC6 (Beskina et al., 2007). L'activité des canaux TRPC6 est également influencée par l'action d'analogues pharmacologiques du DAG, notamment le 1-oléoyl-2-acétyl-sn-glycérol (OAG) et également par le 1-stéaroyl-2-arachidonoyl-sn-glycérol (SAG) qui entraînent l'ouverture des canaux TRPC6 sans être sous le contrôle de l'activité de la PKC (Tu et al., 2009).

4.5.1. Régulation des canaux TRPC6 par la protéine kinase C

Étant donné que le DAG est un activateur physiologique de certains PKC, la contribution de PKC sur l'effet du DAG au niveau des canaux TRPC6 a été étudiée. Un effet de DAG indépendant de la PKC sur

les canaux TRPC6 exprimés au niveau des cellules CHO avec les activateurs PKC comme le phorbol-12,13-didécanoate (PDD) ou le phorbol-12-myristoyl-13-acétate (PMA), n'a pas pu produire une augmentation de l'entrée Ca^{2+} (Estacion et al., 2004). Il a été également démontré que la baisse de la régulation de PKC par un long prétraitement avec l'esters de phorbol ou son inhibition avec les inhibiteurs de la PKC (comme la staurosporine, le bisindolylmaléimide I ou la calphostine C) n'affecte pas l'activation des canaux TRPC6 par le DAG (Hofmann et al., 1999). Bien que ces résultats aient été confirmés, certaines études démontrent l'implication de la PKC dans l'inactivation des canaux TRPC6 (Okada et al., 2001). Il a été démontré un autre effet différent de l'activation de la PKC sur l'activation les courants de TRPC6 : PMA n'a pas d'effet significatif sur les courants activés par le DAG ce qui essentiellement élimine la régulation par la stimulation des récepteurs (Estacion et al., 2004). De plus, le temps d'inactivation des courants mesurés des canaux TRPC6 est considérablement retardé par l'inhibition de la PKC via la calphostine C (Shi et al., 2004). En effet, la phosphorylation de PKC à des sites de phosphorylation identifiés localisés à proximité du segment C-terminal du canal TRPC6, Ser⁷⁶⁸, est corrélée avec l'inhibition du canal (Kim et al., 2005). L'activité des canaux TRPC6 peut être finement régulée grâce aux cycles de phosphorylation/déphosphorylation par la formation de complexe multiprotéique centré sur le canal TRPC6 contenant la PKC et la calcineurine, qui respectivement phosphoryle et déphosphoryle les canaux TRPC (Kim et al., 2005).

La voie PKC, activée par DAG, peut présenter une rétrorégulation des canaux TRPC. Dans les myocytes de l'artère mésentérique, un faible niveau de DAG active les canaux TRPC6 alors que des niveaux élevés de DAG inhibent ces mêmes canaux via une voie dépendante de la PKC (Saleh et al., 2006). Cette double action indépendante et dépendante de la PKC du DAG a également été observée dans la régulation des canaux TRPC3, canaux avec lesquels les canaux TRPC6 peuvent hétérotéramériser (Venkatachalam et al., 2003).

4.5.2. Régulation des canaux TRPC6 par la protéine-tyrosine kinase de la famille Src

La phosphorylation des tyrosines par les protéines-tyrosines kinases (PTK) de type Src est impliquée dans la régulation de l'activité du canal TRPC6 (Hisatsune et al., 2004). Fyn, membre de la famille Src PTK, interagit avec les canaux TRPC6 et augmente l'activité du canal via la phosphorylation des tyrosines (Hisatsune et al., 2004). De plus, les facteurs de croissance sont connus pour stimuler la RTK comme le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) (Hisatsune et al., 2004) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Jung et al., 2002) ce qui en résulte l'activation des canaux TRPC6. L'inhibition spécifique de la PTK de la famille Src par des inhibiteurs PP2 ou SU6656 supprime l'activation des canaux TRPC6 (Hisatsune et al., 2004; Soboloff et al., 2005). Des mutations au niveau des sites de phosphorylation des canaux TRPC6 n'altèrent pas l'activation du canal et les canaux TRPC6 peuvent toujours être activés dans les cellules déficientes de PTK (Kawasaki et al., 2006). Au niveau des podocytes, il a été démontré que le knockdown de Fyn supprime la phosphorylation des canaux TRPC6 et par l'effet même diminue le processus d'apoptose médié par le TGF- β 1 sans influencer le niveau d'expression des canaux TRPC6 à la surface membranaire (Yu et al., 2018)

4.5.3. Régulation des canaux TRPC6 par d'autres protéines kinases

Au niveau des cellules plaquettaires humaines, TRPC6 peut être phosphorylé par une protéine kinase AMPc- ou GMPc-dépendant (respectivement via PKA et PKG), mais la phosphorylation ne semble pas affecter l'activité du canal (Hassock et al., 2002). Dans un système d'expression hétérologue dans les cellules HEK-293 et les myocytes vasculaires A7r5, les canaux TRPC6 sont négativement régulés par la voie NO-cGMP-PKG, probablement par un site de phosphorylation au niveau du segment N-terminal

(Thr⁶⁹) (Takahashi et al., 2008). De plus, la phosphorylation Ca²⁺-CaM dépendant impliquant la CaM kinase II est essentielle pour l'activation de la TRPC6 (Shi et al., 2004).

4.6 Interaction du segment C-terminal du canal TRPC6 avec les protéines intracellulaires

4.6.1. Calmoduline / PIP₃

Au niveau du segment intracellulaire C-terminal du canal TRPC6, on retrouve un segment appelé « TRP Box » ayant une séquence caractéristique EWKFAR conservée à travers la famille des TRPC (Venkatachalam et al., 2007). On retrouve également un domaine appelé CIRB (*calmodulin and IP₃ receptor binding*) qui, comme son nom l'indique, lie d'une façon compétitive la portion cytoplasmique du récepteur canal à l'IP₃ et la calmoduline (Vasquez et al., 2004; Dietrich et al., 2007; Kwon et al., 2007). Également ce domaine permet la liaison au PIP₃ et interfère directement avec la liaison à la CaM du canal TRPC6 (Young et al., 2007). Des mutations au niveau du domaine CIRB permettent de réguler l'interaction de la CaM et PIP₃ ce qui entraîne respectivement une augmentation ou une suppression du potentiel de courant du canal TRPC6 (Young et al., 2007). La compétitivité du PIP₃ avec l'interaction de CaM au C-terminal de TRPC6 est causée par le fait que le site de liaison PIP₃ et de la CaM se chevauche (D₈₄₂ à L₈₆₈ pour le PIP₃ et les résidus F₈₄₃ à D₈₇₃ pour la CaM) (Young et al., 2007). Des résidus clés sont importants dans la régulation fine de ces interactions. Il a été démontré que la mutation R853Q diminue la liaison du PIP₃ au segment C-terminal TRPC6 par contre la mutation R865Q provoque l'effet inverse. Dans des essais d'électrophysiologies, la mutation R853Q diminue l'amplitude de courant mesuré par le canal TRPC6 et une augmentation de l'amplitude de courant est mesurée lors de la présence de la mutation R865Q. Il faut noter que ces effets sont causés par la perturbation de la liaison de la CaM plutôt qu'à des effets de surexpression du canal TRPC6 à la surface membranaire, car les mutations de TRPC6 n'avaient

aucun impact sur le niveau d'expression ou de distribution à la membrane des canaux TRPC6 (Young et al., 2007).

Malgré le potentiel de liaison plus élevé du PIP₃ par rapport au PIP₂ pour réduire la liaison du C-terminal TRPC6 à la CaM, il faut se rappeler que le PIP₂ est beaucoup plus abondant que le PIP₃ dans la plupart des membranes cellulaires. Les niveaux de PIP₂ changent en fonction de l'activité de la phospholipase C. L'augmentation de l'activité de la phospholipase C diminue la concentration de PIP₂ et entraîne une régulation négative qui par conséquent, augmente l'effet inhibiteur de la CaM sur le canal TRPC6. Il a été démontré que les canaux TRPC6 sont activés dans les neutrophiles par une voie qui entraîne une stimulation de la phosphatidylinositol 3-kinase (IP3-kinase) (McMeekin et al., 2006). Une élévation de l'activité de l'IP3-kinase augmente le courant mesuré du canal TRPC6 en raison de l'action du PIP₃ qui par conséquent, va diminuer l'action inhibitrice de Ca²⁺/CaM sur le canal. Une augmentation de la liaison Ca²⁺/CaM résulterait à une augmentation de l'activité de la phospholipase C et de l'entrée du Ca²⁺ à travers le canal TRPC6. Ainsi, le contrôle de PIP₃ sur la régulation de liaison de la CaM fournit un mécanisme pour l'intégration de la régulation des canaux par PIP₃ et Ca²⁺/CaM (Young et al., 2007). Néanmoins, la régulation de TRPC6 par CaM est complexe, il a été suggéré que l'activité du canal TRPC6 augmente suite à la phosphorylation par la protéine kinase II dépendante de CaM (Shi et al., 2004). TRPC6 peut également s'associer à la calcineurine une phosphatase Ca²⁺-CaM (Kim et al., 2005).

4.6.2. S100A

S100A1 est une protéine dimérique liant le calcium qui est fortement exprimée dans les cardiomyocytes, mais aussi dans les muscles à contractions lentes et rapides, le cerveau et les neurones de l'hippocampe (Zimmer et al., 2005). Ces protéines jouent un rôle de tampon cellulaire de calcium et sont impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires (Wright et al., 2009). Les S100A contiennent deux

motifs de type EF-hand qui sont en mesure de coordonner les ions Ca^{2+} , provoquant un changement de conformation en déplaçant une hélice qui expose une large surface hydrophobe afin de permettre à la protéine d'interagir avec une variété de protéines cibles et de canaux ioniques (Santamaria et al., 2006; Zimmer et al., 1995). Contrairement à la CaM, le premier motif EF-hand lie le Ca^{2+} avec une affinité plus faible que la seconde séquence EF-hand (Rustandi et al., 2001; Wright et al., 2005). Au niveau des canaux TRPC6, la protéine S100A1 se lie au domaine C-terminal TRPC6 d'une manière calcium dépendant (Bily et al., 2013). Cette liaison est située au niveau du CIBR et peut être en compétition avec la liaison de la CaM au segment C-terminal du canal TRPC6 (Bily et al., 2013).

La régulation de l'activité des canaux TRPC6 peut être aussi affectée par la glycosylation au niveau de la deuxième boucle extracellulaire du canal sur les résidus asparagine (Asn) en position 473 et 561 (Dietrich et al., 2003) ou par la phosphorylation des résidus tyrosine du segment N-terminal du canal TRPC6 par l'action des proto-oncogènes protéiques Fyn (Hisatsune et al., 2004). Au niveau des myocytes de type A7r5 de l'aorte thoracique, il a été démontré que la kinase de type protéine kinase G (PKG) diminue l'activité du canal TRPC6 par son action de phosphorylation sur le résidu Thr69 (Takahashi et al., 2008). La déplétion du site de glycosylation de TRPC6 situé au niveau de la deuxième boucle extracellulaire rend le canal constitutivement actif (Dietrich et al., 2003). De plus, de récentes études dans un modèle cellulaire du muscle lisse vasculaire ont démontré que la régulation de l'activité du canal TRPC6 peut être influencée par un stress mécanique sur la membrane de la cellule, notamment suite à un étirement induit par une pression. Selon le type cellulaire, il a été observé que la présence de Ca^{2+} à de faibles concentrations peut exercer un effet potentiateur de l'activité du canal TRPC6, notamment dans les cellules HEK293 (Inoue et al., 2001). À de fortes concentrations, le Ca^{2+} extracellulaire peut diminuer l'activité des canaux TRPC6, tel qu'observé dans les cellules A7r5 (Jung et al., 2002).

4.7 Recyclage du canal TRPC6

Le trafic intracellulaire des canaux TRPC6 est un processus de régulation important pour leurs activations (Cayouette et al., 2007). Des études ont démontré que les canaux TRPC transloquent vers la membrane plasmique lorsqu'un récepteur GPCR ou un récepteur tyrosine kinase est activé (Sing et al., 2004; Bezzerides et al., 2004; Cayouette et al., 2004). Au niveau des cellules HEK293, notre laboratoire a démontré que les canaux TRPC6 sont situés dans des cavéoles submembranaires (CRM) qui fusionnent avec la membrane suite à la déplétion du RE en réponse à une stimulation hormonale ou à la thapsigargine (Cayouette et al. 2004). Ces domaines CRM ont une capacité intrinsèque de concentrer plusieurs protéines qui jouent un rôle important dans la transduction du signal et permettre leur trafficking à la membrane (Razani, B., Woodman, S.E, and Lisanti, M.P. (2002) *Pharmacol Rev* 54,431-467). La vidange du RE joue un rôle dans la translocation des canaux TRPC6 à la membrane, mais ne mène pas automatiquement à l'activation du canal (Cayouette et al. 2004; Smyth et al. 2006). Il a été démontré que l'expression membranaire et l'activité des canaux TRPC6 sont influencées par Rab 9 et 11 et non pas par Rab4. Les protéines Rab11, protéines G impliquées dans les voies d'endocytose et d'exocytose, sont bien connues pour leurs implications dans le transport à destination et en provenance du réseau *trans-Golgi* ainsi que les endosomes de recyclage (Schwartz et al., 2007; Lombardi et al., 1993; Urbe et al., 1993). Rab4 participe au transport des endosomes précoces vers la membrane plasmique et contrôle la voie de recyclage rapide. Les protéines pourraient être recyclées à la surface de la cellule par une voie " rapide " directe ou par une voie " lente " parallèle à travers le réseau trans-Golgi et du recyclage des endosomes (Lampson et al., 2001; Sheff et al., 1999; Ren et al., 1998; Sonnichsen et al., 2000). La voie de recyclage rapide est principalement contrôlée par Rab4. La surexpression de Rab4 n'a aucun effet sur l'expression de TRPC6 à la membrane plasmique. D'autre part, la voie de recyclage lente impliquant Rab9 et Rab11

permet à TRPC6 d'être recyclé au niveau de la membrane plasmique par la voie contrôlée via Rab11 (Cayouette et al., 2010).

4.8. Inhibiteurs des canaux TRPC6

4.8.1. Les inhibiteurs non-spécifiques

À ce jour, il n'existe pas d'inhibiteurs spécifiques disponibles pour les canaux TRPC6. TRPC6 peut être bloqué par des inhibiteurs non spécifiques notamment le cadmium (Cd^{2+}), le lanthanum (La^{3+}) et le gadolinium (Gd^{3+}). La concentration inhibitrice de 50% (IC_{50}) pour Cd^{2+} , La^{3+} et Gd^{3+} sont respectivement de $253\mu\text{M}$, $4\mu\text{M}$ et $1.9\mu\text{M}$ (Inoue et al., 2001). TRPC6 peut également être bloqué par certains bloqueurs organiques tel que SKF96365 (Inoue et al., 2001), l'amiloride (Inoue et al., 2001) et 2-APB (Clapham et al., 2007).

4.8.2. Acide flufénamique

L'acide flufénamique (FFA), un anti-inflammatoire non stéroïdien appartenant à la famille des fénamates, est souvent utilisé comme inhibiteur non spécifique des canaux cationiques et anioniques. Au niveau des cellules HEK et des cellules musculaires lisses de la veine porte du lapin exprimant TRPC6, FFA augmente de manière réversible le courant mesuré des canaux TRPC6, alors qu'en fonction de la concentration, il inhibe les canaux TRPC3 et TRPC7 (Inoue et al., 2001). Cette particularité permet au FFA d'être utilisé comme un outil pharmacologique pour différencier TRPC6 des canaux TRPC3 et TRPC7 (Jung et al., 2002; Carter et al., 2006; Hill et al., 2006; Saleh et al., 2006). Cependant, l'effet potentiateur de FFA sur les courants produits par l'effet du 20-HETE n'a pas été observé dans des cellules HEK exprimant TRPC6 (Basora et al., 2003). Bien que l'utilisation de la FFA comme régulateur positif des canaux TRPC6 reste controversée, un travail récent a confirmé que le FFA est un outil pour l'étude de

la signalisation du calcium médiée par TRPC6 dans les podocytes humains et les cellules HEK (Foster et al., 2009).

4.8.3. Hyperforine

L'hyperforine, un dérivé d'acylphloroglucionol polyprénylé bicyclique, est le principal constituant actif de l'*Hypericum perforatum* (Millepertuis perforé). L'hyperforine a des propriétés antidépresseurs. Il s'agit d'un inhibiteur du recaptage des neurotransmetteurs à large spectre qui agit sur l'activité de l'absorption synaptosomale de la sérotonine, dopamine, noradrénaline, glutamate et de l'acide gamma-aminobutyric (GABA) (Chatterjee et al., 1998; Beerhues et al., 2006). D'autres effets cellulaires différents de l'hyperforine avec un intérêt pharmacologique potentiel ont été découverts, notamment ses effets sur le précurseur du β -amyloïde et sur l'inflammation, ainsi qu'un effet antibactérien, un effet antitumoral et antiangiogénique (Medina et al., 2006).

À des concentrations de l'ordre du nanomolaire, l'hyperforine induit une inhibition significative de divers canaux ioniques (Chatterjee et al., 1999; Krishtal et al., 2001), mais peut activer les canaux de type NSCC (Non-selective cation channels) (Treiber et al., 2005). Ces derniers auteurs révèlent que l'hyperforine active les canaux TRPC6 dans les cellules PC12 et HEK sans activer les autres isoformes des canaux TRPC (Leuner et al., 2007). L'hyperforine est désormais un outil pharmacologique puissant pour l'étude des canaux TRPC6.

4.9 L'expression des canaux TRPC6

Les canaux TRPC6 sont exprimés dans plusieurs types cellulaires, mais plus particulièrement au niveau du système cardiovasculaire (Welsh et al., 2002), au niveau pulmonaire (Antigny et al., 2011), au niveau de la peau (Leuner et al., 2011), du système nerveux (Mizuno et al., 1999) ainsi qu'au niveau rénal (Winn et al., 2005). Au niveau du système cardiovasculaire, et plus particulièrement dans les cellules du muscle lisse vasculaire, les canaux TRPC6 jouent un rôle important dans l'homéostasie calcique en réponse à l'activation des récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques (Inoue et al., 2001). Chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire idiopathique, une surexpression des canaux TRPC6 a été observée au niveau de la membrane des cellules du muscle lisse vasculaire ce qui cause une augmentation de l'entrée Ca^{2+} intracellulaire provoquant ainsi une augmentation de la résistance artérielle pulmonaire (Yu et al., 2004; Kuwahara et al., 2006). TRPC6 est également impliqué au niveau de la formation d'œdème pulmonaire durant le processus de vasoconstriction lors d'hypoxie au niveau des alvéoles pulmonaires (HPV) (Weissmann et al., 2006). L'expression des canaux TRPC6 est également présente au niveau des érythrocytes qui, par leurs activités calciques, participent au processus de survie cellulaire (Clapham et al., 2007). On retrouve également une expression importante des canaux TRPC6 au niveau des plaquettes. La régulation des canaux TRPC6 dans ce type cellulaire est assurée par un processus de phosphorylation impliquant la cAMP-protéine kinase dépendante (cAMP-PK) qui lors de son activation inhibe l'entrée du Ca^{2+} via les canaux TRPC6 en réponse à la thrombine (Hassock et al., 2002). Au niveau de la peau, TRPC6 est exprimé dans les kératinocytes, où son activation est impliquée au niveau des processus de différenciation et de prolifération de ces cellules (Muller et al., 2008). Au niveau du système nerveux, TRPC6 est exprimé principalement au niveau du système nerveux central. Il joue un rôle dans la croissance dendritique et la formation des synapses neuronales ainsi que dans la survie neuronale (Zhou et al., 2008). Au niveau du cervelet, l'expression d'une forme dominant-négatif du canal TRPC6 au niveau des cellules granulaires

inhibe l'effet du BDNF, *brain derived neurotrophic factor*, sur la croissance des cônes neuronaux (Li et al., 2005). En réponse à l'activation des récepteurs à l'interleukine 1, TRPC6 participe à la régulation calcique des astrocytes (Beskina et al., 2007). La variation de l'expression de TRPC6 et de son interaction avec la préséniline ont été des facteurs importants dans la pathogenèse de la forme familiale de la maladie d'Alzheimer (Lessard et al., 2005).

5. La distribution des canaux TRP au niveau de la filtration rénale

Les canaux TRP sont exprimés dans plusieurs segments du néphron (Figure 11). Les canaux TRPCs sont présents au niveau du glomérule et des tubules rénaux. Plus spécifiquement, les canaux TRPC1 sont exprimés au niveau du mésenchyme glomérulaire, du tubule proximal, de l'anse de Henlé et des parties descendante et ascendante (Goel et al., 2006). Les canaux TRPC3 et TRPC6 sont principalement exprimés au niveau des podocytes et des cellules principales du tubule collecteur (Goel et al., 2006). Le canal TRPM6 est hautement exprimé dans le tubule contourné distal (Groenestege et al., 2006). Les membres de la famille des canaux TRPP sont retrouvés dans les cilia primaires des cellules épithéliales rénales au niveau du tubule contourné distal et du tubule collecteur (Hannaoka et al., 2004). TRPV1 est présent au niveau des neurones sensoriels du rein (Wimalawansa et al., 1996), TRPV4 est exprimé principalement dans les parties descendantes et ascendantes de la Hanse de Henlé ainsi qu'au niveau du tubule contourné distal (Tian et al., 2004), tandis que les canaux TRPV5 et TRPV6 sont exprimés au niveau du tubule contourné distal et de la portion corticale du tubule collecteur (Hoenderop et al., 2000). TRPM3 est majoritairement exprimé au niveau de l'épithélium du tubule collecteur (Lee et al., 2003).

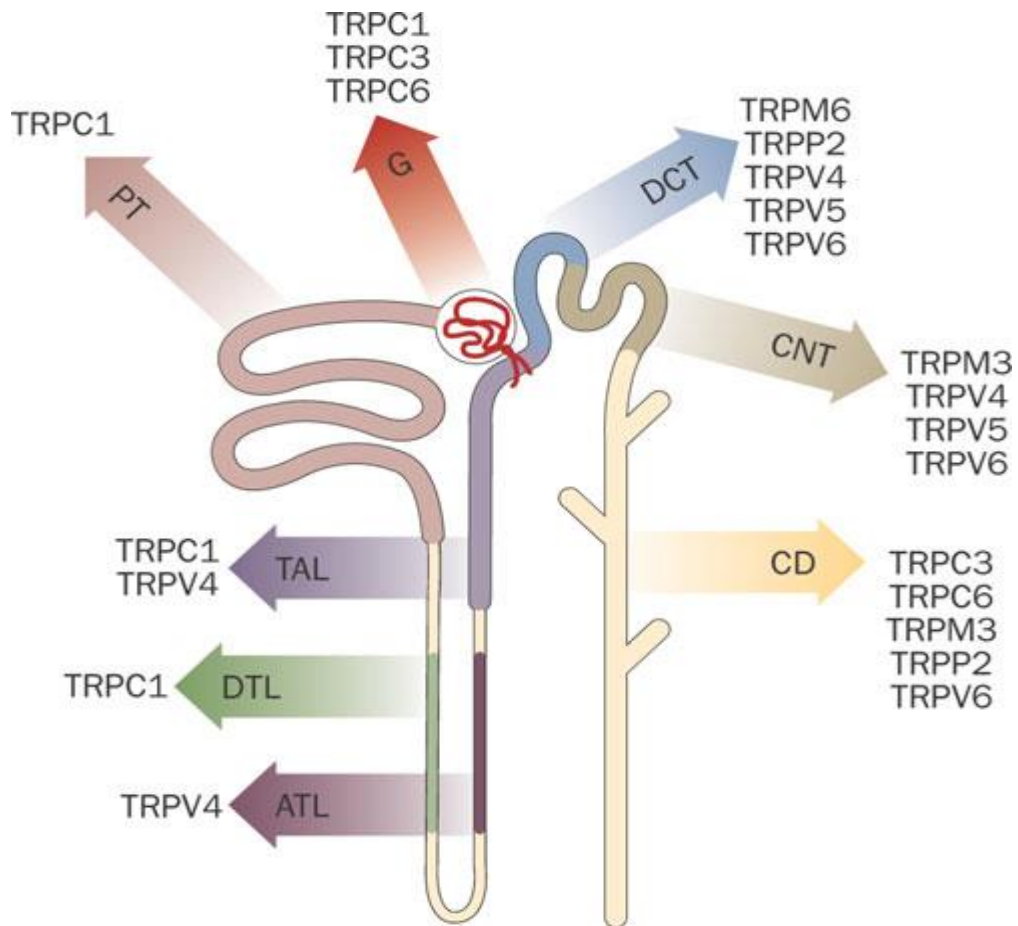


Figure 11: Schémas présentant la distribution des canaux TRP au niveau des différentes sections du néphron. ATL : Portion fine ascendante de l'anse de Henlé, CD : tubule collecteur, CNT : tubules connecteurs, DCT tubule contourné distal, DTL : la portion fine descendante de l'anse de Henlé, G : glomérule, PT : tubule contourné proximal (D'après Woudenberg-Vrenken, Nat Rev Nephrol 2009)

5.1 L'implication des canaux TRPs dans la physiopathologie rénale

Plusieurs canaux ioniques et transporteurs sont cruciaux pour assurer les fonctions de filtration, de sécrétion et de réabsorption des électrolytes afin de maintenir une homéostasie. Dans les dernières années, plusieurs groupes de recherche se sont intéressés sur l'implication des canaux TRPs dans la filtration rénale. L'origine de cet intérêt a pris naissance suite à la découverte de plusieurs mutations au niveau des gènes codant pour trois types de canaux TRP différents impliqués dans la physiopathologie néphropathique (Guderman et al., 2005). Des mutations au niveau du gène *PKD1* (qui code pour les canaux TRPP1) et *PKD2* (codant pour les canaux TRPP2) surviennent avec une plus grande fréquence chez les individus atteints d'une complication rénale appelée : « polykystose rénale de type dominant » (Wu et al., 2000; Chang et al., 2008). Des mutations de type « perte de fonction » au niveau des canaux TRPM6 sont également associées avec une hypomagnésémie et une hypocalcémie secondaire (HSH), un désordre autosomal récessif (Schlingmann et al., 2002; Chubanov et al., 2004). Finalement, des mutations de type délétion ou substitution au niveau des gènes codant pour les canaux TRPC6 résultent en une forme héréditaire autosomale dominante de la glomérulosclérose focale et segmentaire (FSGS), une lésion affectant le glomérule qui mène à un niveau progressif de perte de la fonction rénale (Sonneveld et al., 2014).

5.2. Activité des canaux TRPC6 au niveau des podocytes

Le glomérule rénal est une structure hautement spécialisée qui assure une filtration sélective du plasma afin de préserver les protéines essentielles dans le sang. Le glomérule se compose de trois couches: des cellules endothéliales du capillaire glomérulaire fenestré, la membrane basale glomérulaire (MBG) enrichie en glycosaminoglycanes chargés négativement, un réseau de cellules spécialisées, les podocytes, qui entourent via leurs processus pédiculaires les capillaires glomérulaires (Reiser et al., 2005). Les

podocytes sont des cellules épithéliales hautement différenciées qui recouvrent la couche externe de GBM (figure 12). L'espace entre les pédicelles forme le diaphragme de filtration (SD). La régulation de l'ouverture du diaphragme de filtration est assurée par l'élasticité réactionnelle des pédicelles assurée par la coordination et la régulation complexe du réseau de protéines en relation avec le cytosquelette des podocytes (Huber et al., 2001). L'interférence dans la régulation de ce complexe de protéines amène à l'effacement des pédicelles, diminution de l'efficacité du diaphragme de filtration et une protéinurie. Des lésions au niveau des podocytes ont été observées dans de nombreux modèles cellulaires humains et expérimentaux de maladies glomérulaires, notamment dans la maladie à changement minimal (MCD), glomérulosclérose segmentaire focale (FSGS), glomérulonéphrite membraneuse (MGN) et la néphropathie diabétique (Reiser et al., 2005).

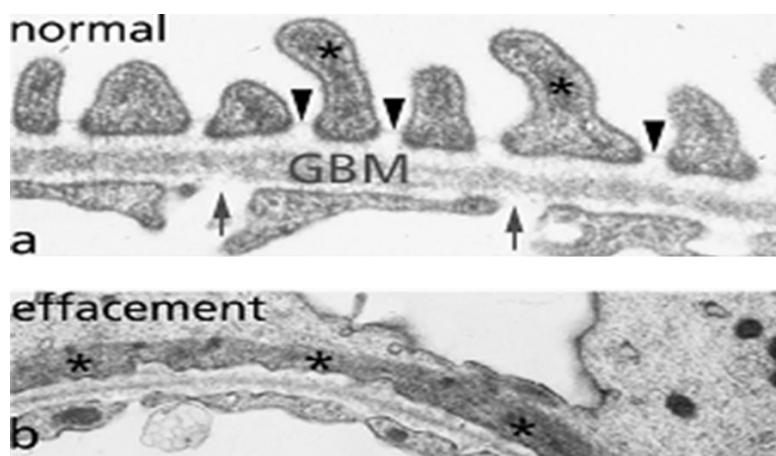


Figure 12 : Micrographies électroniques à transmission des capillaires glomérulaires humains.

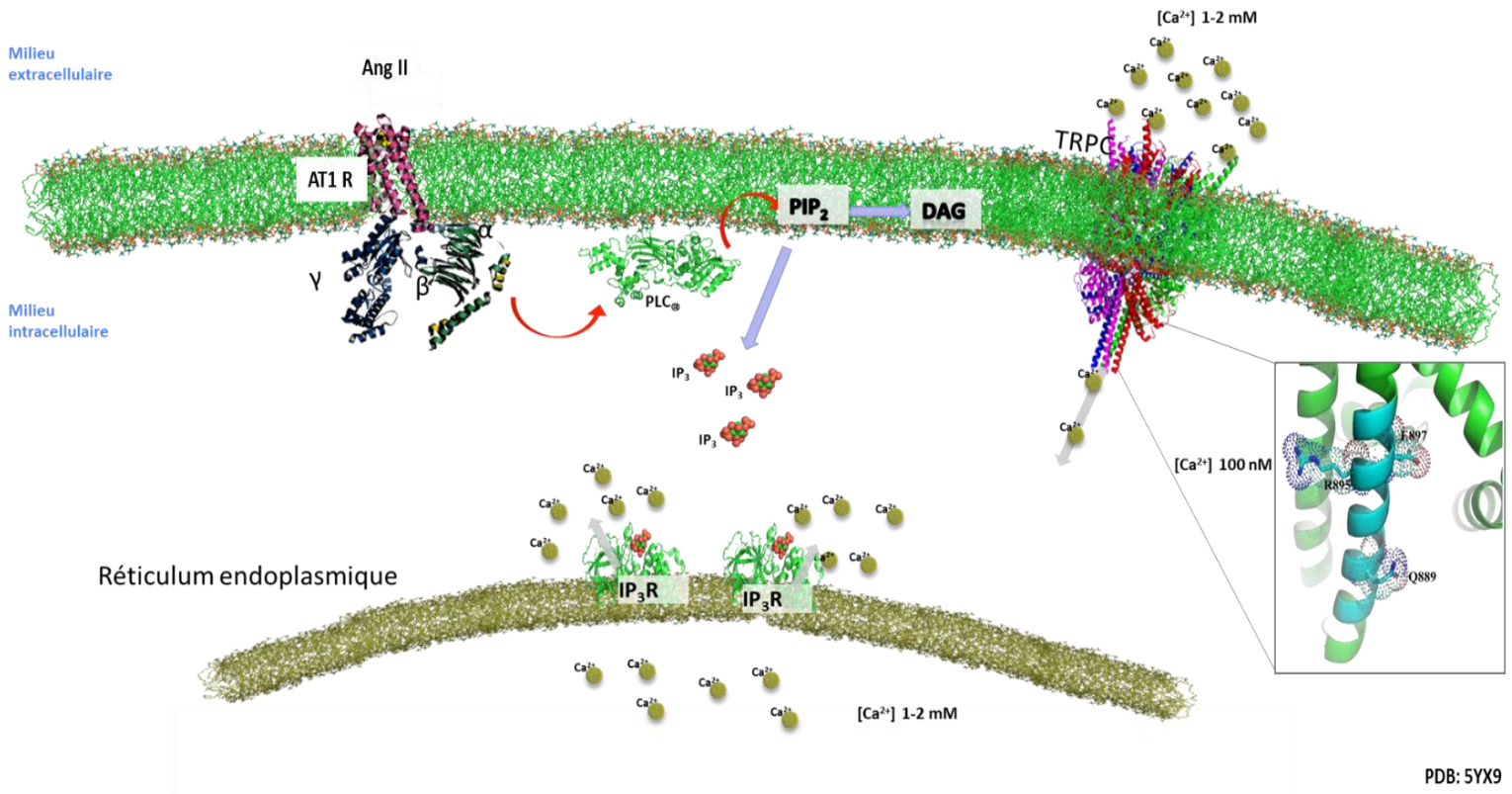
Les flèches indiquent les fenestrations des cellules endothéliales du vaisseau sanguin, les triangles indiquent les fentes de filtration entre les pédicelles et les astérisques indiquent les filaments d'actine dans le cytoplasme des podocytes. GBM : Membrane basale glomérulaire (a) Normal : notez les filaments d'actine concentrés dans les processus podocytaires du pied. (b) Effacement en états protéinuriques FSGS. (D'après Peter et al., 2010)

Les canaux TRPC6 sont fortement exprimés au niveau des podocytes et principalement au niveau des pédicelles. Dans les podocytes, l'activité des canaux TRPC6 est potentialisée de façon importante en réponse à des modifications de glycosylation et de phosphorylation, ou encore suite à des pressions mécaniques (Hisatsune et al., 2004; Dietrich et al., 2003). Alors que le canal lui-même n'est pas intrinsèquement mécanosensible, TRPC6 peut interagir avec la podocine, une protéine spécifique aux podocytes, pour acquérir des propriétés mécanosensibles (Huber et al., 2006). Cette réponse aux variations de pression a été démontrée par l'implication des canaux TRPC6 dans un complexe mettant en relation des protéines mécanosensibles incluant la néphrine (Reiser et al., 2005; Huber et al., 2001), NOX2 (Kim et al., 2013), PLC- γ 1 (Kanda et al., 2011) et F-actin (Jiang et al., 2011). Une augmentation soutenue de la pression hydrostatique au niveau des capillaires glomérulaires peut causer des dommages au niveau des podocytes, menant à une protéinurie (Endlich et al., 2012). L'élévation de la pression sanguine, particulièrement en réponse à l'augmentation du niveau de l'angiotensine II circulante (Ang II), est déterminante dans le développement de la glomérulopathie rénale et aux symptômes de protéinurie (Ma et al., 2001).

6. Implication des canaux TRPC6 dans la lésion des podocytes

Plusieurs groupes de recherche ont observé dans des situations cliniques de néphropathies, une augmentation de l'expression membranaire des canaux TRPC6 et de leurs activités en réponse à l'Ang II (Ilatovskaya et al., 2014) (figure 13). Au niveau des podocytes, la voie de signalisation impliquant AT₁R_{Gq/11}-PLC produit le DAG qui peut directement ou indirectement via la stimulation de NOX2 et la production des espèces d'oxygène réactives (ROS), augmenter l'activité du canal TRPC6 (Anderson et al., 2014). L'entrée de Ca²⁺ dans les podocytes, médiée par les canaux TRPC6, active la Ca²⁺-sérine/thréonine phosphatase calcineurine, qui à son tour va stimuler le facteur nucléaire des lymphocytes

T (NFAT) (Nijenhuis et al., 2011). NFAT est capable d'augmenter le niveau d'ARNm de TRPC6 menant à une augmentation de l'expression de TRPC6 à la membrane et par l'effet même une plus grande entrée de Ca^{2+} . Ce mécanisme déclenche un effacement des pédicelles et le processus d'apoptose des podocytes. De plus, l'Ang II peut également promouvoir l'expression de TRPC6 de manière dépendante de ERK1/2-NF- κ B (Zhang et al., 2009). Il a été démontré que l'inhibition des récepteurs AT_1R par le losartan provoque une diminution de l'expression de TRPC6 au niveau de la membrane et ce qui présente un rôle bénéfique pour les podocytes (Chi et al., 2015). Le diabète sucré de type 1, menant à la néphropathie diabétique, est aussi associé à la perte d'intégrité des podocytes affectant par conséquent la fente de filtration entre les pédicelles (Diez-Sampedro et al., 2011). Ceci a été observé, *in vitro*, l'élévation du glucose extracellulaire entraîne l'augmentation de l'expression membranaire des canaux TRPC6 ce qui augmente l'entrée du Ca^{2+} dans les podocytes en cultures (Jefferson et al., 2008). Également, l'expression de TRPC6 est augmentée dans les podocytes provenant des rats traités à la streptozotocine (STZ), qui est un modèle animal pour l'étude du diabète sucré de type 1 (Sonneveld et al., 2014). Une exposition prolongée à une forte concentration de glucose cause aussi une augmentation de l'expression de la rénine au niveau des podocytes, menant une augmentation de la production locale d'Ang II (Durvasula et al., 2008), générant des ROS qui à leur tour augmentent l'activité des canaux TRPC6 (Thilo et al., 2014).



PDB: 5YX9

Figure 13: Schéma de la signalisation calcique cellulaire et représentation des résidus R895 et E897 mutés au niveau du C-terminal de TRPC6 impliqué dans la FSGS. L'activation du récepteur à l'angiotensine (AT1R) suite à liaison de l'agoniste l'angiotensine II (AngII) active la phospholipase C (PLC) pour hydrolyser le phosphatidylinositol-4,5bisphosphate (PIP₂) en deux seconds messagers l'inositol trisphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). L'IP₃ se lie à son récepteur-canal à l'IP₃ (IP₃R) pour permettre la relâche de Ca²⁺ du RE. Le DAG va activer le canal TRPC6 membranaire pour mettre son ouverture et permettre l'entrée du Ca²⁺ vers le milieu cytoplasmique.

7. Mutations des canaux TRPC6 qui causent la FSGS

Plusieurs études ont démontré l'implication de TRPC6 depuis la découverte récente de mutations de type « gain-de fonction » au niveau des segments N et C-terminal des canaux TRPC6, causant la forme héréditaire de la glomérulosclérose focale et segmentaire chez l'humain (FSGS) (Winn et al., 2005). Les patients atteints de FSGS présentent des symptômes cliniques d'une insuffisance rénale, une protéinurie, une hypoalbuminurie et une hypertension. L'état des patients FSGS peut progresser vers un stade clinique de perte de la fonction rénale à un stade final (*End Stage Kidney Disease*) (Heeringa et al., 2009). Jusqu'à aujourd'hui, la littérature entourant les mutants identifiés au niveau des canaux TRPC6 chez les patients FSGS a pu regrouper l'identification de six mutations de type non-sens au niveau du segment N-terminal des TRPC6 : G109S, P112Q, M132T, N143S et S270T qui jouent un rôle au niveau de la perturbation de l'entrée du Ca^{2+} via les mécanismes de l'augmentation d'expression membranaire de TRPC6 en influençant la fonction des domaines à répétition à l'ankyrine du segment N-terminal (Winn et al., 2005; Heeringa et al., 2009) (Figure 14). Au niveau du segment C-terminal de TRPC6, on retrouve quatre mutations identifiées chez les patients FSGS : K874*, Q889K, R895C et E897K, seulement les mutations R895C et E897K présentent une augmentation de l'activité de TRPC6, qui résulte en une augmentation de l'entrée de Ca^{2+} au niveau des podocytes (Reiser et al., 2005) (Figure 15). Cela résulte en une augmentation excessive du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ qui affecte l'organisation du cytosquelette cellulaire provoquant une réaction physiologique d'effacement des pédicelles suivi du détachement des podocytes de la membrane basale glomérulaire et la glomérulosclérose (Moller et al., 2009) .

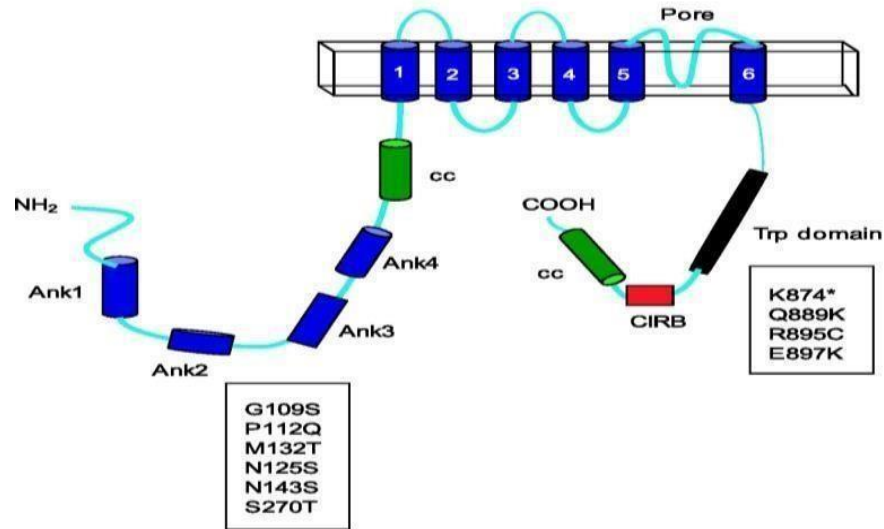


Figure 14: Représentation schématique d’une sous-unité du canal tétramérique TRPC6 avec les mutations répertoriées chez les patients atteints de la maladie FSGS. Une sous-unité monomérique du canal TRPC6 présentant les mutations répertoriées au niveau du segment N-terminal (rectangle de gauche) et les mutations répertoriées au niveau C-terminal du canal TRPC6 (rectangle de droite). Localisation des mutations ; au niveau du N-terminal : G109S et P112Q (premier domaine de répétition à l’ankyrine), N125S et M132T (lien entre le premier et deuxième domaine de répétition à l’ankyrine), N143S (deuxième domaine de répétition à l’ankyrine), S270T (avant le premier domaine transmembranaire). Au niveau du C-terminal : K874*, Q889K, R895C, E897K (domaine coiled-coil). Ank : répétition à l’ankyrines, CC : coiled-coil domain like, CIRB : domaine de liaison de la CaM et l’IP3R, Trp domain : domain de liaison des TRP (D’après Truart et Reiser, **2010**, *American Journal of Physiology*)

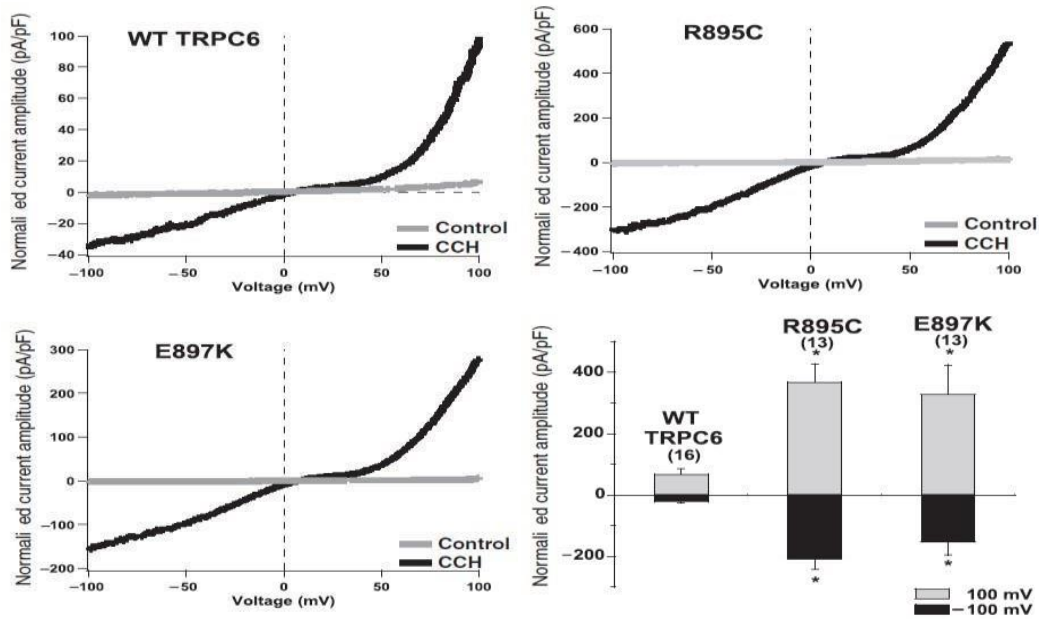


Figure 15 : Représentation de l'effet des mutants R895C et E897K sur la différence d'amplitude de courant enregistré des canaux TRPC6 dans des essais d'électrophysiologie cellulaire. Pour étudier l'effet des mutations de TRPC6 sur la fonction du canal, l'équipe Reiser et al. a exprimé la forme sauvage ainsi que les deux formes mutantes R895C et E897K dans des cellules HEK293T-M1 transfectées avec le récepteur muscarinique (M1). Ils ont enregistré les courants TRPC6 avant et après la stimulation des récepteurs M1 avec du carbachol. Les courants enregistrés des cellules transfectées avec les mutants R895C et E897K ont été largement plus élevés que celui de TRPC6 de forme sauvage (Reiser et al., 2005)

Dans des modèles de souris transgéniques ayant un phénotype de surexpression des formes mutées de TRPC6, le groupe de Ruiz a démontré que la surexpression des canaux TRPC6 avec la mutation E897K au niveau du C-terminal et la surexpression des canaux TRPC6 au niveau des podocytes étaient des facteurs suffisants pour induire des lésions glomérulaires et une protéinurie similaire au profil clinique observé dans la FSGS (Krall et al., 2010). De plus, dans des cellules podocytaires en culture primaire surexprimant de façon transitoire TRPC6, l'activité cellulaire est remarquablement déséquilibrée avec une altération du réarrangement du cytosquelette caractérisé par une distribution anormale des protéines F-actin intracellulaires (Jiang et al., 2011). La FSGS peut également être causée suite à des mutations ou délétions au niveau de plusieurs d'autres gènes codant pour des protéines du cytosquelette des podocytes comme α -actinine, laminine β 2 ou des protéines associées à TRPC6, notamment la néphrine et la podocine (Woroniecki et al., 2007). La podocine contribue au rôle de mécanosenseur au niveau de la membrane des podocytes qui, suite à une pression sur les pédicelles, active TRPC6 (Huber et al., 2007). Le *knockdown* du gène codant pour la podocine amène à une augmentation remarquable de l'activité de TRPC6 suite à un stimulus mécanique d'étirement de la membrane des podocytes ce qui abolit complètement l'activation des canaux TRPC6 en réponse aux analogues du DAG (Anderson et al., 2013). Des études au niveau des cellules Hela, ont démontré que la podocine coimmunoprécipite avec le canal TRPC6 et que la surexpression de la podocine n'augmente pas l'expression du canal TRPC6, mais plutôt son activité (Tobias et al., 2004). Également il a été démontré que la régulation du canal TRPC6 via podocine était cholestérol dépendant (Tobias 2004). La néphrine est une protéine appartenant au complexe du cytosquelette des podocytes, principalement au niveau des pédicelles, qui joue un rôle au niveau de la régulation de l'ouverture de la fente de filtration (Verma et al., 2003). Dans des cellules HEK293T, il a été démontré par le groupe d'Hattori que l'action de phosphorylation de Fyn augmente l'expression des canaux TRPC6, un processus inhibé par la néphrine (Kanda et al., 2011). Au niveau des canaux TRPC6

mutés (R895C ou E897K), l'expression de ces canaux était insensible à l'action de la néphrine processus causé par la diminution de l'affinité de la néphrine au segment C-terminal muté (Kanda et al., 2011). Également, Fyn joue un rôle dans l'augmentation de l'activité des canaux TRPC6, une activité qui est supprimée par l'action de la néphrine (Kanda et al., 2011). Au niveau des canaux TRPC6 mutés, la néphrine n'a aucune action au niveau de la diminution de l'activité de ces canaux (Kanda et al., 2011).

L'objectif de l'étude

L'expression et la régulation des canaux TRPC6 jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie calcique dans les podocytes afin d'assurer leurs fonctions de première barrière dans le processus de la filtration rénal. Dans des situations pathologiques qui affectent l'intégrité des podocytes, on observe un processus physiologique d'effacement des pédicelles qui en majeure partie est en réponse à une augmentation excessive de la $[Ca^{2+}]_i$. Un premier mécanisme qui provoque l'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ est suite à l'augmentation du niveau d'expression du canal TRPC6 à la membrane cytoplasmique des podocytes via l'action du NFAT (Nijenhuis et al., 2011). Ce mécanisme provoque une cascade réactionnelle qui mène à la déphosphorylation de la synaptopodyne et une dérégulation du cytosquelette des pédicelles. Un deuxième mécanisme qui provoque l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est en réponse à une suractivation de la podocine qui, de par son interaction, provoque une augmentation du temps d'ouverture du canal TRPC6. Cette augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ provoque la dérégulation de la néphrine influençant directement la fente de filtration glomérulaire (Anderson et al., 2013). Depuis la dernière décennie, TRPC6 a été aussi associé à une forme de néphropathie héréditaire, la FSGS. Cette lésion provoque également un effacement des pédicelles dû à une dérégulation de la $[Ca^{2+}]_i$. Plusieurs mutations ont été identifiées et associées à cette pathologie principalement positionnée au niveau des segments N- et C-terminaux cytoplasmiques du canal TRPC6 entraînant des mutations de type non-sens, gain de fonction ou troncation du canal (Reiser et al., 2005). Parmi ces mutants TRPC6, trois d'entre eux (P112Q, R895C, E897K) sont des mutations de type gain de fonction, qui entraînent une augmentation de l'amplitude du courant Ca^{2+} au niveau cellulaire. La mutation P112Q est une mutation du segment N-terminal TRPC6 qui provoque une augmentation de l'expression du canal à la membrane ce qui se traduit par une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$. Les mutations R895C et E897K du C-terminal n'influencent pas le niveau d'expression, mais plutôt augmentent l'activité du

canal muté TRPC6 au niveau cellulaire. Ces observations suggèrent que le C-terminal TRPC6 joue un rôle au niveau de la régulation de l'activité du canal soit via une plus grande ouverture du canal ou par la diminution d'interaction avec des protéines qui diminuent son activité comme la CaM. Un point commun entre ces observations c'est que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ perturbe plusieurs protéines au niveau du podocyte qui provoque l'effacement des pédicelles, mais nous avons peu d'information sur l'impact du calcium sur la structure du C-terminal TRPC6. Dans les cas de la FSGS, les études menées jusqu'à aujourd'hui n'expliquent pas l'impact des mutations R895C et E897K sur la structure et la dynamique réactionnelle du C-terminal du canal TRPC6. Malgré les avancées récentes en matière de cartographie de la structure du C-terminal TRPC6, nous avons encore des informations fragmentées sur la structure complète du C-terminal TRPC6 et également de sa dynamique réactionnelle afin de mieux corrélérer sa structure avec sa fonction physiologique et physiopathologique. Dans cette présente étude nous sommes penchés sur ces questions en caractérisant la dynamique structurale du segment C-terminal du canal TRPC6 ainsi que sa réactivité ionique aux ions Ca^{2+} . Au niveau des mutations associées à la FSGS, nous nous sommes intéressés à comprendre l'impact des mutations R895C et E897K à la fois sur le repliement et la dynamique réactionnelle ionique du segment C-terminal TRPC6. Au niveau cellulaire, l'investigation du rôle du C-terminal a également été vérifiée sur trois plans : premièrement en vérifiant la différence d'entrée calcique à travers le canal TRPC6 de type sauvage et muté (R895C ou E897K), également en vérifiant si les mutants du segment C-terminal influencent la sélectivité de l'entrée du Ca^{2+} via le canal TRPC6 en présence d'une compétitivité ionique avec un autre ion physiologique comme le Mg^{2+} . Enfin, nous avons utilisé une chimère du canal TRPC6 afin de valider le rôle du segment C-terminal dans le processus de la sélectivité et la régulation de l'activité du canal TRPC6. Ce projet s'installe dans un objectif de mieux comprendre, au niveau moléculaire et structural, l'impact des mutations observées au niveau des canaux TRPC6 chez des patients atteints de la forme héréditaire de la FSGS et également

d'approfondir nos connaissances sur le rôle du C-terminal dans la régulation de l'activité du canal TRPC6 qui est exprimé dans plusieurs types cellulaires et impliqué dans plusieurs processus physiopathologiques importants.

Matériels et méthodologie expérimentale

1. Expression et purification des protéines recombinantes

Pour réaliser cette étude, les fragments d'ADNc codants pour le segment C-terminal de TRPC6 humain (M⁸⁰¹ à R⁹³¹) ont été générés par PCR pour y induire un site *Nde I* dans la partie 5' et un site *Xho I* dans la partie 3'. Les fragments PCR obtenus ont été insérés dans un plasmide d'expression le pET-21b (*Novagen*) par des techniques de clonage classique (Sambrook et al., 2001; Ansubel et al., 2002). Le pET-21b est un plasmide de 5442 pb possédant un gène de résistance à l'ampicilline ainsi qu'un promoteur T7lac inductible à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), de même qu'une séquence d'insertion de six résidus histidines dans la portion 3' de l'insert. Des fragments C-terminaux de TRPC6 comportant une des mutations retrouvées chez les patients atteints de FSGS (Reiser et al., 2005) ont aussi été générés. Ces mutations sont la substitution de l'arginine en position 895 par une cystéine pour le fragment R895C et la substitution de l'acide glutamique en position 897 par une lysine pour le deuxième fragment E897K (Figure 16).

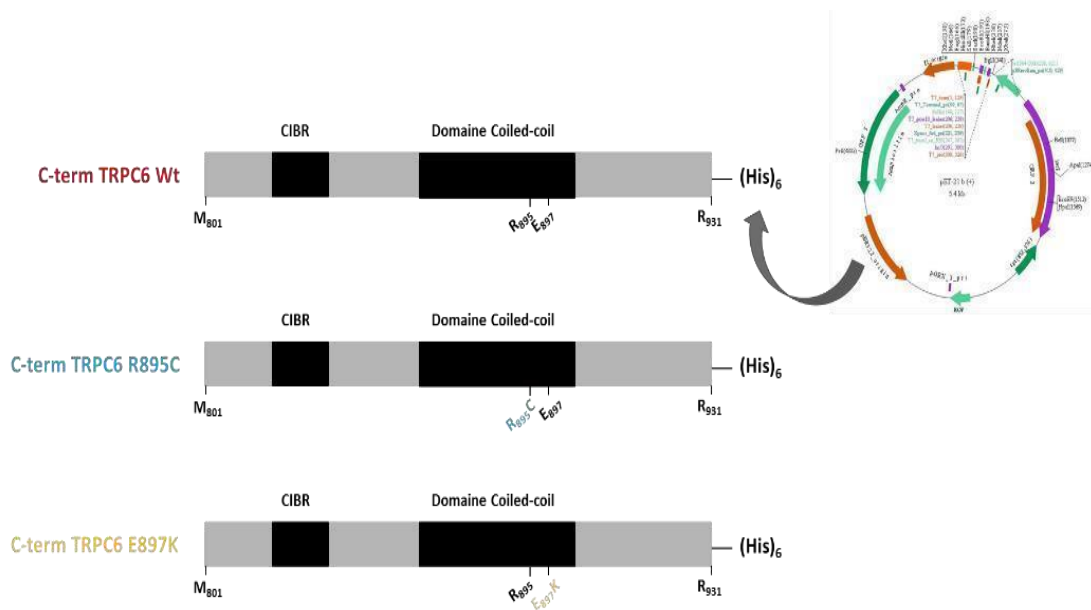


Figure 16: Représentation des constructions d'ADNc codant pour les fragments C-terminal de TRPC6wt, R895C et E897K. Chaque fragment d'ADNc comporte 130 résidus (M₈₀₁ à R₉₃₁) et ils ont été clonés dans le plasmide pet21b afin de rajouter une étiquette hexa histidine en position C-terminal.

Les différents plasmides générés ont été transformés dans des bactéries compétentes *Escherichia coli* BL21 (DE3) (*ThermoFisher Scientific*). Ce type de bactérie compétente contient le lysogène λ DE3 qui véhicule un gène codant pour l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lacUV5*. L'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) est nécessaire pour induire l'expression de l'ARN polymérase T7 afin d'exprimer les gènes des protéines recombinantes en aval du promoteur T7.

Le processus de transformation a été réalisé en mélangeant 10 μ l des bactéries BL21 (DE3) compétentes et 0.50 μ l d'ADN recombinant (contenant entre 0.5 et 1.5 μ g d'ADN/ μ l) suivi d'une incubation sur glace pendant 15 min. Ensuite, le mélange a subi un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes et réincubé sur glace pendant 2 min. Enfin, nous avons resuspendu les bactéries dans un milieu LB pendant 60 min (290 μ l) et ensuite nous avons étalé une aliquote de 100 μ L sur une plaque LB amp⁺ et incubé pendant 16 h à 37°C. Une première vérification des bactéries compétentes transformées a été réalisée en validant l'intégration de l'ADN par une vérification de l'identité des plasmides provenant des souches qui ont poussé sur les plaques LB amp⁺ en utilisant des outils de digestion enzymatique spécifiques au niveau des sites de restrictions utilisés lors de la transformation.

La croissance des différents clones de bactéries *E. coli* BL21 transformées est réalisée dans un milieu de culture de type LB à 37°C sous agitation 220 rpm. Lorsque la culture bactérienne atteint une absorbance de 0.6 à une longueur d'onde de 595 nm, on rajoute 1 mM d'IPTG pour initier l'expression protéique. L'incubation des bactéries est ensuite maintenue à une température de 30°C pendant 10h sous agitation. L'incubation est terminée par la centrifugation de la culture bactérienne à 19 000 G durant 30 min. Le culot bactérien est resuspendu avec une solution de lyse #1 (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 1 mM TritonX-100, 1mM PMSF, 1 mM TCEP à pH 8.1). Le lysat bactérien est centrifugé pendant 30 min à 19000 G à 4°C. Le culot obtenu après centrifugation du lysat bactérien représente les corps d'inclusion

qui seront à leurs tours solubilisés avec une solution de lyse #2 (8 M urée, 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 1 mM Triton-X-100, 1mM PMSF, 1 mM TCEP à pH 8.1). Les protéines obtenues sont séparées et purifiées sur une colonne chromatographique IMAC chargée au nickel. Après plusieurs lavages, dans le but d'éliminer les protéines non spécifiques, la protéine d'intérêt lié à la résine est éluée avec une solution d'éluion (8 M urée, 250 mM d'imidazole, 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 1 mM Triton-X-100, 1mM PMSF, 1 mM TCEP à pH 8.1). La protéine éluée se retrouve dans une solution dénaturante qui représente des conditions non favorables au bon repliement protéique. L'étape finale d'optimisation du repliement de notre protéine purifiée est réalisée par une méthode de dialyse graduelle contre une solution tampon de 10 mM Tris-base avec 10 mM NaCl, pH de 8,1.

La dialyse est une technique qui nous permet d'éliminer d'une façon progressive et à l'équilibre les différents ions (concentration et ou espèces ioniques résiduelles de la purification) qui peuvent interférer avec le signal CD ou défavoriser le repliement optimal de la protéine. Cette technique a surtout été bénéfique pour réduire et éliminer la concentration d'imidazole et de l'urée utilisés pour permettre l'éluion de notre protéine.

2. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

2.1 Principe de la technique de SEC

La chromatographie d'exclusion stérique (*Size Exclusion Chromatography*) est une technique de chromatographie liquide qui permet de séparer les polymères ou complexes protéiques en se basant sur le principe du tamis moléculaire (Porath et al., 1997). Au niveau expérimental, un volume de 0.5 à 1.0 ml de nos protéines purifiées, C-terminal TRPC6 wt, R895C et E897K, est injecté dans le système. Les échantillons protéiques vont ensuite passer à travers une colonne remplie de particules sphériques de gel contenant des pores de sélectivité selon la taille, la forme et le poids moléculaire des protéines du milieu. Dans nos essais expérimentaux, nous avons utilisé 5 unités de colonnes installées en série de type HiTrapTM de 5 ml chacune pour obtenir un volume total de 25 ml de gel. Le principe de séparation du SEC se repose sur la diminution d'entropie d'une protéine repliée lorsqu'elle pénètre dans un pore de diamètre comparable ou plus grand à sa propre dimension. Le nombre de conformations permises pour une protéine flexible diminue fortement à l'approche d'une paroi solide. Pour éviter ces régions, la protéine garde une distance de séparation entre son centre de gravité et l'interface solvant/gel qui est, en moyenne, comparable à l'ordre du rayon hydrodynamique (R_h) adopté par la protéine (Kohn et al., 2004). Le rayon hydrodynamique est défini comme étant le rayon d'une sphère solide ayant des propriétés hydrodynamiques équivalentes à celles de la macromolécule, avec une valeur très proche de celle du rayon de giration (R_g). Partant de ce principe, les protéines multimériques et/ou de grand poids moléculaire vont être éluées plus rapidement, car leur R_h est supérieur à la taille des pores de la colonne, tandis que les protéines monomériques et/ou avec un petit poids moléculaire vont passer à travers toutes les ouvertures des pores de la colonne, ce qui retarde leur élution (Berry et al., 2010).

2.2 Courbe standard pour déterminer le poids moléculaire apparent

Pour déterminer le poids moléculaire de nos segments C-terminaux TRPC6 obtenus, une courbe de calibration avec des standards de protéines de poids moléculaire connus a été établie. Ceci a permis de déterminer le volume d'éluion auquel les standards quittent la colonne en fonction de leurs poids moléculaires. Les standards utilisés sont : l'Héparine (6 kDa), Cytochrome C (12.4 kDa), Myoglobine (17.6 kDa), Albumine (47 kDa), Conalbumine (75 kDa). Ensuite, nous avons présenté sous une forme graphique la relation entre le Log du poids moléculaire des standards utilisés en fonction du volume d'éluion expérimentale obtenu. Cette approche, qui ne tient pas compte de la nature chimique des protéines, est acceptable étant donné le principe décrit plus haut du SEC qui sépare les protéines selon le volume hydrodynamique qui est en fonction du produit de la viscosité du milieu et son poids moléculaire (Harding et al., 1998).

3 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Le DLS permet de déterminer le rayon hydrodynamique et la distribution des tailles des protéines, acides nucléiques et autres particules allant d'une taille de 0.6 nm à 6 μm . Il y a plusieurs revues de littérature décrivant d'une manière détaillée la théorie et les différentes applications du DLS. Ici, nous allons fournir une base théorique simplifiée et une mise à jour des applications du DLS dans l'étude des protéines.

3.1 Principe de la technique DLS

Lorsqu'une source de lumière incidente monochromatique traverse une solution contenant des macromolécules, la diffusion de la lumière résultante dans le milieu est une fonction de la taille et la forme de celles-ci (Berne et al., 1976). Dans le cas de la diffusion statique de la lumière, l'intensité de la diffusion

est analysée en temps moyen d'intensité, ce qui fournit des informations pertinentes sur le poids moléculaire et le rayon de gyration des macromolécules (Harding 1999). L'intensité de la fluctuation, causée par le mouvement Brownien des macromolécules en solution, donc le coefficient de diffusion (D_T) est inversement proportionnel à la taille hydrodynamique des macromolécules (Berne et al., 1976). La diffusion de la lumière dynamique, aussi connue sous le nom de la spectroscopie de la corrélation de photons ou diffusion quasi élastique de la lumière, est une technique qui mesure premièrement le mouvement Brownien des macromolécules en solution qui émerge du mouvement aléatoire des molécules dans un solvant reliant le mouvement à la taille des particules (ou D_T). Ce mouvement des macromolécules est influencé par la taille, la température et la viscosité du solvant (Harding et al., 1998). Donc, le contrôle de la température expérimentale est un paramètre essentiel dans la prise des mesures DLS, surtout que la viscosité du solvant dépend également de la température (Harding 1999). Lorsque le mouvement des particules à travers une période de temps est monitoré, l'information au niveau de la taille des macromolécules peut être obtenue. Sachant que les particules plus larges diffusent plus lentement, résultant en des positions similaires à différents points de temps, comparativement aux particules plus petites (notamment les molécules du solvant) qui se déplacent de façon plus rapide et alors n'adoptent pas une position spécifique.

Au niveau de l'appareil DLS, lorsque la lumière laser heurte des macromolécules en solution, la lumière incidente diffuse dans toutes les directions et l'intensité de diffusion est captée et enregistrée par un détecteur. La lumière incidente monochromatique subit un phénomène appelé effet Doppler lorsque les macromolécules sont dans un mouvement continu en solution (Harding et al., 1998). La diffusion de la lumière va soit mener à une série de phases mutuellement destructives et par le fait même s'annuler mutuellement, ou à une série de phases mutuellement constructives pour produire un signal détectable

(Pusey et al., 1972). L'auto-corrélateur digital va ainsi corrélérer l'intensité de fluctuation de la diffusion de la lumière en prenant en compte le temps (variant de l'ordre de la ns à la μ s) pour déterminer la rapidité à laquelle l'intensité fluctue. Cette intensité de fluctuation est influencée par le comportement de diffusion des macromolécules en solution (Pusey et al., 1972). Dans une expérience de DLS, nous mesurons le $G_{2(T)}$ qui est une fonction de corrélation d'intensité (ou fonction de corrélation de second ordre) décrivant le mouvement des macromolécules à l'étude et mettant en relation l'intensité en temps t ainsi que le délai de temps $(t+T)$ (Berne et al., 1976):

$$G_2(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle$$

où, T est la différence de temps entre les deux points de temps.

Le $G_{2(T)}$ peut être normalisé de la façon suivante;

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

Les deux équations présentent la moyenne des propriétés à travers la durée de l'expérience (temps t). Dans une expérience typique de diffusion de la lumière, il est difficile de connaître précisément la façon dont chaque particule se déplace en solution. Cependant, les mouvements relatifs des particules entre elles sont corrélés par la fonction de corrélation du champ électrique expérimental, $G_{1(T)}$, aussi connu sous la nomination de fonction de corrélation de premier ordre, illustrant la corrélation du mouvement des particules. Elle est définie comme suit;

$$G_1(\tau) = \langle E(t)E(t + \tau) \rangle$$

où, $E(t)$ et $E(t+T)$ représente la diffusion du champ électrique à temps (t) et $(t+T)$

Les instruments DLS emploient soit un détecteur à 90° (DynaPro[®], NanoStar[®] de Wyatt Technology ou Zetasizer Nano S90[®] de *Malvern Instruments*), qui est l'instrument utilisé dans nos travaux, ou un système de détection de type *backscatter* à 173° (DynaPro Plate Reader[®] de Malvern Instruments) (Malvern 2014) proche de la lumière incidente de 180°. À un angle de diffusion plus élevé (173°), la contribution de l'effet de diffusion rotationnel dans le profil d'autocorrélation observé peut être négligée et le D_T peut être obtenu (Harding 1999). Alors que la lumière ne voyage pas à travers l'échantillon entier dans la cuvette, le système de détection *backscatter* peut également permettre de mesurer le D_T pour les échantillons à haute concentration puisque le phénomène de diffusion multiple peut être évité (la diffusion d'un photon par plus d'une particule en contraste à la diffusion d'un photon par une seule particule). De plus, les larges particules de poussières et contaminants diffusent dans une direction unique; leur diffusion devient indépendante de la longueur d'onde comparativement aux particules de plus petites tailles (la diffusion de Rayleigh) qui ont une diffusion quasi équivalente dans les deux directions. La contribution de la diffusion des larges particules pourrait être évitée dans un système de détection de type *backscatter* (Harding 1999).

Le coefficient de diffusion translationelle, D_T , qui est concentration dépendante, est une valeur extrêmement utile pour déterminer des paramètres hydrodynamiques importants (Harding 1999). Par exemple, le rayon hydrodynamique (R_h), ce qui peut être défini comme le rayon d'une sphère hypothétique, diffuse au même ratio que les particules à l'étude ainsi elle peut être obtenue en utilisant l'équation de Stokes-Einstein (Harding 1999) :

$$D_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$$

où k_B est le coefficient de Boltzmann ($1,380 \times 10^{-23} \text{ kg}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$), T est la température en valeur absolue, et η est la viscosité du milieu (Barnett 1942).

Les instruments modernes sont supplémentés avec des outils qui peuvent faire les analyses en utilisant différentes approches afin d'évaluer le poids moléculaire et l'homogénéité des macromolécules. Dans la section suivante, je vais tenter de vous fournir la base des stratégies d'analyse des résultats. La fonction de corrélation contient des informations au niveau du comportement de diffusion des macromolécules à l'étude, ce qui nous donne des informations sur le R_h . Dans le but de récolter plus d'informations sur le coefficient de diffusion, deux approches peuvent être envisageables pour implanter la fonction de corrélation : la distribution monomodale et la distribution non monomodale.

3.2 La distribution de la taille des rayons hydrodynamiques

Les équations décrites dans les sections 3.1 et 3.2 nous permettent d'évaluer le comportement de distribution de diffusion et déterminer le R_h expérimental de l'échantillon. Le coefficient de diffusion moyen ($\langle D_T \rangle$) dans un système donné est exprimé comme suit (Barnett 1942) :

$$\langle D_T \rangle = \frac{\sum_i N_i M_{w,i}^2 P(q, R) D_{\tau i}}{\sum_i N_i M_{w,i}^2 P(q, R)}$$

où M_w est le poids moléculaire et N le nombre de particules, et $P(q, R)$ est l'interface intra-particule. L'équation décrit la dépendance du coefficient de diffusion et M_w^2 , ce qui explique la limite de la technique pour l'analyse des molécules avec un poids moléculaire plus élevé. Il est aussi important de noter que la diffusion de la lumière dépend de l'indice de réfraction des macromolécules, et que le terme $P(q, R)$ peut être ramené à 1 pour les molécules suffisamment petites que la longueur d'onde de la lumière incidente (Barnett 1942). C'est la fluctuation de l'intensité des macromolécules qui est collectée et analysée dans

une expérimentation de DLS. La première information au niveau du R_h est basée sur la distribution de l'intensité du poids moléculaire ou simplement la distribution de l'intensité qui produit la moyenne du R_h . La diffusion de la lumière dépend de l'indice de réfraction des macromolécules et de la viscosité du solvant et par conséquent le R_h moyen nécessite les données de ces deux paramètres (Barnett 1942). En accord avec l'approximation de Rayleigh, la distribution de l'intensité est proportionnelle à la (taille)⁶ pour les petites particules (Malvern 2014). À noter que la moyenne du R_h provenant du DLS doit seulement être comparée avec les R_h obtenus d'autres méthodes. Si les molécules à l'étude sont monodisperses et présentent une distribution monomodale, alors les particules adoptent une forme sphérique.

La distribution de l'intensité du poids peut être convertie en distribution de la masse volumique qui représente la proportion relative de multiples tailles dans un échantillon en se basant sur le volume et la taille, mais pas sur l'intensité selon la théorie de Mie (Harding et al., 1998). Selon l'approximation de Rayleigh, la masse des molécules sphériques est proportionnelle à la (taille)³. Si la densité du système est uniforme, la masse peut être approximativement estimée au volume, impliquant que la distribution de la masse volumique est proportionnelle à la (taille)³, c'est pourquoi le R_h provenant de la distribution volumique est plus petit comparativement à la distribution de l'intensité du poids (Pusey et al., 1972).

$$\%V_a = \frac{a^3 N_a \cdot 100}{N_a a^3 + N_b b^3}$$

Cette équation décrit la distribution du volume pour une solution contenant N_a et N_b molécules avec une taille de a et b respectivement. Le $\% V_a$ présente la distribution de la masse volumique pour les molécules avec une taille a (Pusey et al., 1972). Connaissant les principes de l'indice réfractaire et de la viscosité, la

distribution volumique se base sur le principe que toutes les molécules sont homogènes et ont une forme sphérique et que la distribution de l'intensité n'a aucune erreur. La distribution de l'intensité volumique peut aussi être convertie à la distribution du nombre volumique qui représente le nombre molécules dans chaque colonne d'un histogramme présenté. L'équation suivante présente le nombre de distributions pour un système comprenant deux molécules.

$$\%N_a = \frac{N_a \cdot 100}{N_a + N_b}$$

où, N_a et N_b sont des molécules avec les tailles a et b respectivement. Le $\% N_a$ représente la distribution du nombre volumique pour les molécules avec des tailles a et b basées sur le nombre des molécules avec la taille a (Pusey et al., 1972).

3.3 Analyse des échantillons C-terminaux TRPC6 wt, R895C et E897K

Le spectroscope utilisé est de type Zetasizer Nano S de Malvern Instruments Ltd. qui nous a permis de réaliser les expériences en utilisant une cuvette en quartz ZEN2112 de Hellma Analytics.

La cuvette est lavée avec 5 ml d'une solution de 5% de HellmanexTM de Hellma Analytics (solution de détergent), suivi d'un lavage avec 5 ml d'une solution d'acide acétique 5% et un lavage final avec 10 ml d'eau ultrapure (Qualité de type 1 de Milipore Milli-W systems). La cuvette est rincée avec 5 ml d'une solution éthanol à 70% et séchée pendant 5 min. La présence de poussières peut influencer la diffusion de la lumière lors de la prise des mesures DLS. Une vérification avec un standard est réalisée pour s'assurer de l'efficacité du nettoyage utilisant une solution tampon filtrée dans la cuvette ou l'absence du signal confirme la propreté de la cuvette et l'absence de particule qui pourrait interférer avec la prise des mesures.

Il est important de noter que nos échantillons analysés au DLS ont été préalablement filtrés afin d'atteindre le plus haut niveau de pureté possible. La filtration de nos échantillons a été réalisée à travers un filtre de 0.1 μ m (filtre de marque Ultrafree-MC VV, Merck Millipore) pour éliminer les particules larges de la préparation. Pour minimiser la quantité nécessaire pour les analyses, nous avons utilisé une cuvette qui nécessite seulement \sim 12 μ l de l'échantillon concentré, filtré et dépourvu de bulles d'air. La standardisation de l'appareil a été réalisée en utilisant la BSA comme standard protéique. Le logiciel Zetasizer (Zetasizer Nano S software) fournit plusieurs méthodes d'analyse pour étudier les états d'agrégation par DLS. La distribution de taille par intensité ou par volume sont les méthodes les plus couramment utilisées par ces logiciels. Le logiciel utilise un protocole de standardisation (SOP) pour des échantillons. Un SOP doit être préparé contenant les informations essentielles notamment la composition du tampon et la température expérimentale (ce qui permettrait de calculer la viscosité à une température particulière et l'index de réfraction du tampon, paramètres essentiels pour les mesures DLS). Nous avons collecté les valeurs de distribution R_h avec un n = 10 reproduit sur 3 expériences indépendantes afin d'obtenir un résultat reproductible. Ces mesures ont été réalisées avec un échantillon de 50 μ M des protéines recombinantes C-terminal TRPC6 wt, R895C et E897K. Afin d'étudier l'influence de la concentration sur le R_h apparent, nous avons produit des dilutions en série allant de 5 à 50 μ M pour l'ensemble des protéines étudiées.

4.Spectroscopie de Dichroïsme circulaire (CD)

La dynamique structurale des protéines en solution est sous l'influence de deux facteurs importants : le repliement structural favorisé selon le milieu et le repliement structural adopté en réponse à la variation des paramètres biochimique du milieu: composition du milieu, concentration protéique, présence de ligand, pH, concentration ionique et la température. Une des techniques grandement utilisées pour permettre d'évaluer à la fois le type de repliement et la dynamique structurale des protéines est la spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire (CD). Afin de bien comprendre le potentiel de cette technique spectroscopique, faisons un petit survol sur ces principes et ces applications dans le cadre de l'étude structurale des protéines recombinantes.

4.1 Le signal CD

La technique CD utilise une source de lumière polarisée composée de deux ondes circulaires polarisées de même magnitude. La première onde circulaire est orientée vers la gauche (G), ou sens antihoraire, et la deuxième orientée vers la droite (D), ou sens horaire (Woody et al., 1996). Le dichroïsme circulaire mesure la différence d'absorption de ces deux composantes circulaires par une protéine repliée en solution (Woody et al., 1996). Les lumières polarisées circulaires D et G peuvent être non absorbées ou absorbées de façon égale par la protéine à l'étude, ce qui va générer une radiation polarisée dans le plan original (Woody et al., 1996). Toutefois, si les lumières polarisées D et G sont absorbées de façon différente, ceci résulte à une radiation différentielle appelée polarisation elliptique (Kelly et al., 2005). Un signal CD peut être mesuré en présence d'un chromophore (la liaison peptidique, les noyaux aromatiques et les ponts disulfures) dit chiral (ou optiquement actif) en réponse à une des caractéristiques suivantes :

- Le chromophore est situé dans un environnement asymétrique suivant la structure tridimensionnelle adoptée (pelote statistique, hélice $-\alpha$, feuillet- β et autres structures) par la molécule (Fasman et al., 1996).

- La présence d'un pont disulfure qui est chiral à cause des angles dièdres formés par la chaîne des atomes C-S-S-C;
- L'enfouissement d'un noyau aromatique à l'intérieur de la structure tertiaire.

La différence d'absorbance (ΔA) entre l'absorbance de la lumière polarisée circulaire G (A_{absG}) et D (A_{absD}) mesurée par le CD peut être représenté par la formule suivante (Kelly et al., 2005):

$$\Delta A = A_{absG} - A_{absD}$$

Cette différence d'absorbance est exprimée en termes d'ellipticité (θ) en degrés. La valeur de l'ellipticité est positive dans le cas d'une résultante droite ou négative pour la résultante gauche. L'ellipticité est aussi exprimée mathématiquement sous la formule :

$$\theta = \tan^{-1} (b/a)$$

où b et a sont les axes mineurs et majeurs de l'ellipse résultante obtenue de la différence d'absorption par l'échantillon (Kelly et al., 2005). Il y a également une deuxième équation mettant en relation la valeur de ΔA et l'ellipticité mesurée (en degrés) qui se traduit par (Kelly et al., 2005);

$$\theta = 32.98 \Delta A$$

L'ellipticité peut se traduire par la résultante de la différence du coefficient d'extinction moléculaire ($\Delta \epsilon$) et des composantes G (ϵ_G) et D (ϵ_D) décrites par la formule (Kelly et al., 2005):

$$\Delta \epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D$$

La valeur de cette différence de coefficient d'extinction molaire peut être en relation avec la loi de Beer-Lamber :

$$A = \epsilon Cl$$

où A est l'absorbance de la lumière, ϵ le coefficient d'extinction moléculaire, C la concentration de la protéine et l le trajet optique de la cuvette utilisée (Johnson et al., 1988). De cette relation optique, nous pouvons exprimer le $\Delta\epsilon$ en millidegré d'ellipticité (mdeg) (Johnson et al., 1988) de la façon suivante ;

$$\Delta\epsilon = \Delta A / Cl$$

Un spectre CD met en relation l'ellipticité en millidegrés obtenue du repliement structural de la protéine repliée en fonction de la variation de la longueur d'onde (Johnson et al., 1988). Il y a plusieurs méthodes pour mesurer l'effet dichroïque par un spectropolarimétrie : premièrement par modulation dans laquelle la radiation incidente est continuellement variable entre les composantes D et G; et deuxièmement par soustraction directe où l'absorbance des deux composantes qui est mesurée séparément et soustraite de chacune d'elles (Kelly et al., 2005).

4.2 Spectres CD des structures secondaires en hélices α , feuillets β ou repliement aléatoire

Dans l'étude des structures des protéines, la spectroscopie CD est une technique qui permet d'identifier d'une manière précise le type et l'intensité du repliement de structure secondaire d'une protéine. Cette technique nous permet d'estimer la proportion des trois types de repliement de structure secondaire protéiques : hélices- α , feuillets- β et structure aléatoire. L'avantage du CD dans l'étude des structures des protéines est la possibilité d'étudier le repliement de la structure globale en solution à travers plusieurs longueurs d'onde. Au niveau de la chaîne principale des protéines, la région d'intérêt (≤ 240 nm) nous renseigne sur la conformation dans laquelle se retrouvent les liens peptidiques. Finalement la région de 260 nm nous renseigne sur la présence de ponts disulfures formés entre différents résidus protéiques (Berova et al., 2000). Le signal CD peut être également obtenu à partir des ligands qui ne possèdent pas

de chiralité intrinsèque, mais qui peuvent acquérir une chiralité potentielle lorsqu'ils sont liés à d'autres ligands dans un environnement asymétrique (Kelly et al., 2005).

Au niveau des spectres CD, l'absorption dans la région inférieure à 240 nm est principalement due à des transitions électroniques d'une orbitale à une autre en réponse aux liens peptidiques de type amides. Dans cette région on observe deux transitions, $n \rightarrow \pi^*$, dont une faible transition centrée autour de 220 nm et une forte transition $\pi \rightarrow \pi^*$ autour de 190 nm. Dans certaines conditions, la présence de résidus aromatiques peut contribuer significativement au niveau de l'absorption dans cette région du spectre (Beychok et al., 1966). L'allure et l'intensité du signal dans la région du UV rapproché du spectre vont dépendre selon le nombre de chaque type de résidus aromatique retrouvé au niveau de la protéine, de leurs degrés de mobilités, de la nature de leurs environnements (pont hydrogène, présence de groupe polaire avoisinant ainsi que leur polarité) et également de leurs dispositions dans la structure de la protéine d'intérêt.

Le signal de dichroïsme circulaire caractéristique des hélices- α est la résultante de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ suite à la polarisation des amides et également de la contribution des liens peptidiques de la structure hélicale (Figure 17). Le produit de ces liens va générer deux absorbances positives avec une intensité forte maximale à 190-195 nm. Deux autres absorbances négatives sont observées pour les hélices α notamment une absorbance négative de forte intensité résultante de la même transition qui sera mesurée à 208 nm et une dernière absorbance suite à la transition $n \rightarrow \pi^*$ qui va se traduire par une absorbance négative centrée à 222 nm (Gratzer al., 1969).

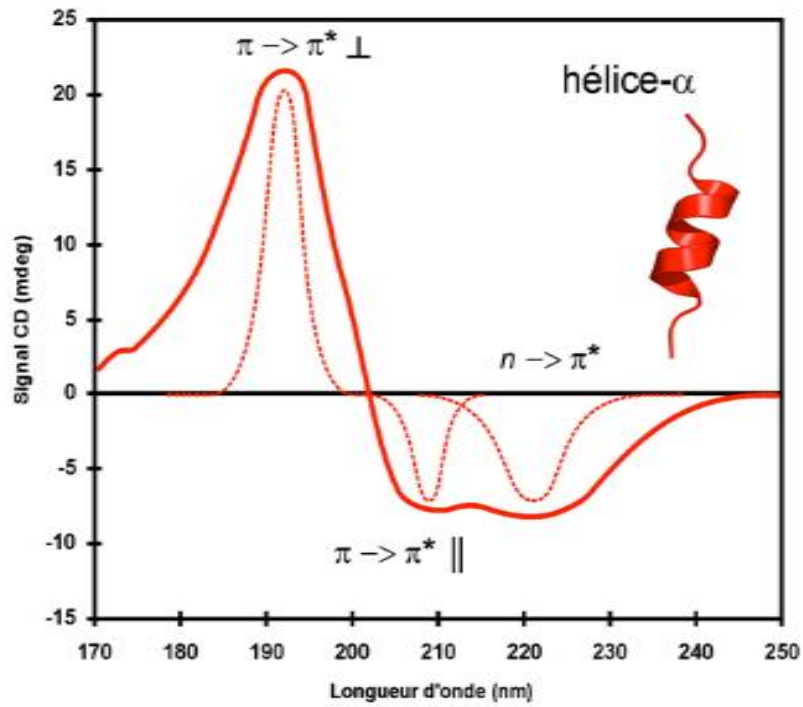


Figure 17: Hélice α et le spectre d'absorption CD de son repliement à travers les longueurs d'onde de 170 à 250 nm. (Figure tirée du mémoire de François-olivier Mc Duff 2008)

Pour les feuillets β , le signal CD caractéristique du repliement structural va être observé avec un maximum positif aux alentours de 195 nm qui est la résultante de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ et aussi un minimum négatif d'absorbance à 215 nm qui est la résultante de la transition de $n \rightarrow \pi^*$ (Gratzer al., 1969) (Figure 18).

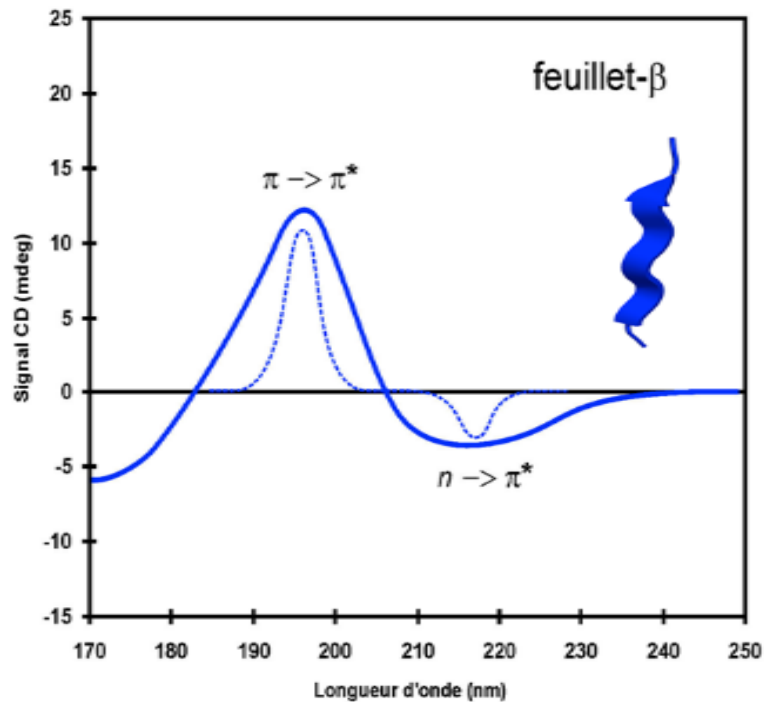


Figure 18: Feuillet β et le spectre d'absorption CD de son repliement à travers les longueurs d'onde de 170 à 250 nm. (Figure tirée du mémoire de François-olivier Mc Duff 2008)

Au niveau de la structure aléatoire ou random coil qui est la structure la moins organisée du repliement protéique, nous allons voir une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ qui va générer une forte intensité négative d'absorption à 195 nm (Gratzer al., 1969) (Figure 19).

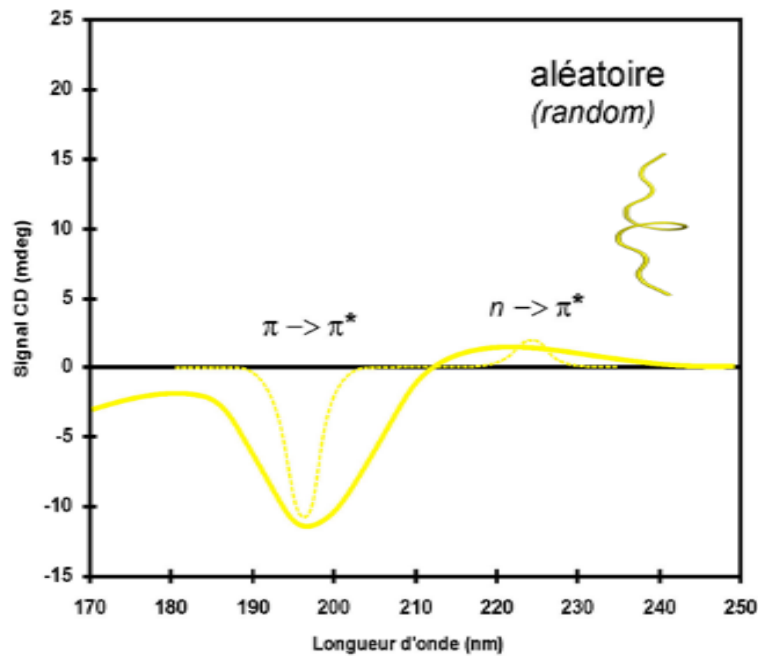


Figure 19: Structure aléatoire et le spectre d'absorption CD de son repliement à travers les longueurs d'onde de 170 à 250 nm. (Figure tirée du mémoire de François-olivier Mc Duff 2008)

L'absorption dans la région du spectre comprise entre 260 à 320 nm est caractéristique de la présence de résidus aromatique (Kelly et al., 2005). Chaque résidu présente un profil d'absorption caractéristique notamment le tryptophane (Trp) présente un pic d'absorption à 290 nm avec une fine absorption entre 290 et 305 nm tandis que la tyrosine (Tyr) présente un pic d'absorption compris entre 275 nm et 282 nm. Un pic classique d'absorption autour entre 255 et 270 nm est caractéristique de la phénylalanine (Phe). Il est important de noter que selon le type de repliement protéique adopté, les chaînes latérales des résidus

aromatiques peuvent influencer significativement le signal CD dans la région des UV lointain (inférieur à 250 nm).

Lors de l'étude des transitions ou le changement du repliement structural des protéines, il est généralement intéressant de balayer l'absorbance du signal CD dans une fenêtre des longueurs d'onde entre 190 et 250 nm afin d'avoir un profil complet de la présence des différents types de repliement hélices α , feuillets β et structures aléatoires (Beychok et al., 1966).

4.3 Déconvolution des spectres CD en utilisant les algorithmes mathématiques

À partir des valeurs mesurées des spectres CD de protéines, plusieurs procédures analytiques utilisant des algorithmes mathématiques peuvent être utilisées pour produire des estimations sur la proportion des compositions de structures secondaires des protéines repliées (hélice- α , feuillet- β et structures aléatoires). La plupart de ces algorithmes utilisent des bases de données de spectres CD de protéines dont la structure a été résolue par des techniques comme la cristallographie par diffractions des Rayons-X ou résonance magnétique nucléaire (RMN). Les algorithmes de déconvolution des spectres CD les plus couramment utilisés sont ceux de SELCON (Screerama et al., 1993), CONTIN (Proovencher et al., 1981), VARSLC (Manavalan et al., 1987), CDSSTR (Johnson et al., 1999) et K2D3 (Loui-Jeune et al., 2012). *Dichroweb* est un serveur comprenant tous les outils mentionnés ci-dessus afin de nous permettre d'analyser les spectres CD obtenus de nos protéines. Pour permettre une bonne estimation du contenu en structures secondaires, il est primordial de mesurer avec précision la concentration de protéines à l'étude ainsi que de s'assurer que l'appareil CD est proprement calibré. Une variation de ces paramètres peut engendrer une sur- ou sous-estimation de la structure secondaire de notre échantillon. Pour l'ensemble de nos essais, nous avons estimé la proportion de repliement des trois types de repliements en utilisant les valeurs d'intensité CD mesurées pour chacune des concentrations protéiques expérimentales et pour

chacun des segments C-terminaux TRPC6. Les valeurs d'estimation obtenues sont rapportées sous forme graphique en mettant en relation le pourcentage de repliement (hélices α , feuillets β ou aléatoire) en fonction de la concentration de la protéine. Nous avons reproduit les mesures d'estimations pour un n égal à 10 afin de vérifier la reproductibilité des valeurs obtenues.

4.4 Étude CD de la stabilité thermodynamique de la structure secondaire des protéines

Le dichroïsme circulaire nous permet d'étudier le comportement thermodynamique de la structure d'une protéine en solution en fonction des conditions expérimentales de son environnement notamment: la température, le pH et la composition ionique. De façon générale, la structure native d'une protéine est en équilibre avec sa forme dénaturée. Ce système thermodynamique est appelé système à deux états ou la répartition de la population totale est décrite par la population native (P_n) et la population dénaturée (P_u) (Pace et al., 1986). De façon classique, l'étude de la stabilité thermodynamique des protéines repose sur la détermination de cette constante d'équilibre. Une fois connue, cette constante d'équilibre décrivant la dénaturation, K_u , nous permet d'accéder à la variation d'énergie libre de Gibbs standard du phénomène de dénaturation par l'équation classique suivante :

$$\Delta G_u(T) = - RT \ln K_u(T)$$

Il est à noter que les populations natives et dénaturées, K_u et ΔG_u sont en fonction de la température.

Pour un système à deux états, la population de la forme dénaturée en fonction de la température est donnée par :

$$P_u(T) = \frac{K_u(T)}{1 + K_u(T)}$$

où $K_u(T) = e^{(-\Delta G_u(T)/RT)}$

$K_u(T)$ et $\Delta G(T)$ peuvent être déterminés à partir des courbes de dénaturation thermique (Pace et al., 1986).

De plus grâce à l'équation de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ + \Delta C_p (T - T^\circ) - T \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T^\circ} \right)$$

D'autres paramètres peuvent être déterminés tel que T° , la température de transition, ΔH° la variation de l'enthalpie de Van't Hoff, ΔS° la variation de l'entropie du système et ΔC_p° , la variation de la capacité calorifique (Tandord et al., 1970). Lors de nos essais de dénaturation thermique, les valeurs T° ont été calculées selon un modèle mathématique tétramérique et intégré dans un programme développé par le professeur Pierre Lavigne basé sur la résolution mathématique d'un modèle en tétramère (Montagne et al., 2005).

La dénaturation thermique comparativement à la dénaturation chimique, influence la stabilité thermodynamique de la structure des protéines sans influencer les conditions environnementales du milieu notamment la force ionique et le pH (Baldwin et al., 1986). Pour la plupart des cas, la réversibilité suite à une dénaturation thermique n'est pas possible et peut être causée par la formation d'agrégats ou de la précipitation de la protéine dénaturée. Ce phénomène est favorisé à de hautes températures en conséquence à la favorisation des interactions hydrophobes au niveau de l'exposition de résidus hydrophobe dans les populations de protéines dénaturées (Baldwin et al., 1986). Outre le phénomène d'agrégation, ce caractère d'irréversibilité est principalement causé par la température, mais également aux effets du solvant de la protéine. L'implication des forces ioniques dues à l'interaction avec le solvant peut être étudiée par la dénaturation utilisant des agents chimiques chaotropes comme l'urée ou le guanidium (Reisker et al., 1977). Des études sur les Leucine Zippers dimériques ont démontré que le guanidium peut être 4 fois plus efficace que l'urée lorsque ces derniers sont stabilisés par des interactions électrostatiques (Dempsey et

al., 2005). Dans nos essais de dénaturations chimiques, nous avons opté pour le guanidium pour sa plus grande efficacité comparativement à l'urée. Dans ce type d'études, la $K_u(T)$ est estimée à chaque concentration de dénaturant à une température fixe. En assumant une relation linéaire de K_u , cette dernière est extrapolée pour estimer le DGu° à la température choisie.

4.5 Méthodologie expérimentale pour l'étude CD

Les mesures CD ont été réalisées avec un spectropolarimètre de type Jasco J-810 équipé avec d'un régulateur de température de type Pelletier. Les mesures ont été réalisées dans des cuvettes en quartz avec un trajet optique de 1.0 mm. La même méthode a été utilisée pour les mesures CD à température pièce de la dénaturation thermique et chimique pour l'ensemble des trois segments C-terminaux TRPC6 wt et les mutants R895C et E897K. Les protéines à l'étude ont été resuspendues dans 10 mM Tris-base, 10 mM NaCl à pH 8.1 pour atteindre des concentrations finales allant de 2.5 μ M à 50 μ M. La concentration a été déterminée par une méthode spectroscopique à 280 nm en utilisant le coefficient d'extinction de la protéine de 4470 $M^{-1} cm^{-1}$. Les spectres CD présentés sont le résultat d'une accumulation de 10 scans sur un intervalle de 0.1 nm. La vitesse d'acquisition a été optimisée pour avoir un bon ratio signal/bruit. Les courbes de dénaturation thermique ont été réalisées dans une fourchette de température allant de 10 à 100°C avec une progression graduelle de la température à une vitesse de 1°C/min. Les valeurs mesurées brutes d'ellipticité (en mdeg) sont transformées en ellipticité molaire par résidu « *mean residue molar ellipticity* » exprimé en $deg \cdot cm^2 \cdot dmol^{-1}$ en utilisant la formule suivante :

$$[\theta]_{222} = \frac{\text{CD signal (deg)} \cdot \text{MRW}}{\text{concentration} \left(\frac{g}{L} \right) \cdot l \cdot 10}$$

où MRW est la moyenne du poids par résidu et l est la longueur du trajet optique de la cellule de lecture CD en cm (Roostae et al., 2008). Au niveau des dénaturations chimiques, chaque mélange a été réalisé dans la cuvette CD de lecture ensuite un temps de 15 min a été alloué afin de permettre d'atteindre l'équilibre thermodynamique. Par la suite, la lecture a été réalisée selon la progression de la concentration du guanidinium (de 0 à 6 M suivant 40 dilutions successives) dans le milieu protéique à température pièce. Chaque point est le résultat d'une série de 10 lectures du spectre CD de la protéine et l'expérience a été répétée pour permettre de voir une reproductibilité des résultats ($n = 3$) pour les trois segments du C-terminal TRPC6. Le pH a été vérifié avant et suite à l'ajout du GuHCl afin de s'assurer de ne pas modifier ce paramètre.

5. Culture cellulaire et signalisation calcique

5.1 Matériel pour les essais cellulaires

Le milieu de culture cellulaire, le sérum, l'Hepes, la trypsine, l'Opti-MEM I et Lipofectamine 2000 proviennent d'*Invitrogen* (Burlington, Canada). Le carbachol (CCh) et le fura-2 proviennent de *Calbicochem* (San Diego, CA). Les enzymes de restriction et le *Phusion DNA polymerase* de *New England Biolab* (Pickering, Canada). Tous les autres produits mentionnés proviennent de *Sigma* (Oakville, Canada).

5.2 Fura-2

Au niveau expérimental, l'imagerie calcique est une technique courante pour mesurer les variations de concentration du Ca^{2+} intracellulaire. Les techniques d'imagerie au calcium se reposent sur des sondes qui changent leurs propriétés spectrales en réponse à la liaison des ions Ca^{2+} . La sonde utilisée dans notre

étude de signalisation calcique est le Fura-2. La molécule Fura-2 seule est sensible au Ca^{2+} , mais imperméable à la membrane cellulaire. En conséquence, le composé non polaire fura-2 pentaacétoxyméthyl (Fura2-AM) est utilisé pour permettre de à la molécule d'acquérir une solubilité à travers la membrane cellulaire. Une fois à l'intérieur de la cellule, les enzymes de type estérase clivent le groupement AM pour laisser le Fura-2 polaire et libre afin de lier le calcium intracellulaire (Hirst et al., 2005). Fura-2 présente deux variations au niveau de son spectre d'excitation notamment la forme non liée au Ca^{2+} est excitée à un maximum de 380 nm tandis que la forme liée au Ca^{2+} est excitée à un maximum de 340 nm. Lors d'une réaction cellulaire provoquant une augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire, la proportion de fura-2 liée au calcium augmente à travers le temps au détriment de celle du fura-2 non lié. Les deux formes émettent de la fluorescence avec un pic maximal commun à 510 nm (Hirst et al., 2005). Par conséquent, la concentration du Ca^{2+} libre intracellulaire est proportionnelle au rapport de fluorescence à 340/380. Les avantages de l'utilisation du fura-2 sont que le rapport de fluorescence de 340/380 est indépendant de la concentration ainsi que la distribution du Fura-2 intracellulaire, de l'intensité d'éclairage et de la longueur du trajet optique (épaisseur de la membrane), ce qui permet de déterminer la concentration de calcium intracellulaire indépendamment de ces artefacts (Kopp et al., 2013).

5.3 Biologie moléculaire

Des techniques de biologie moléculaire classiques ont été utilisées pour réaliser le clonage, l'analyse et l'isolation des différents fragments d'ADN (Ausubel et al., 2002). Brièvement, l'ADN complémentaire (cDNA) a été cloné dans le vecteur d'expression pCDNA3.1 (*Invitrogen*) pour réaliser les essais d'imagerie calcique *in vitro*. Les constructions cDNA codant pour TRPC6 wt, R895C et E897K ont été faits selon les méthodes de mutagenèse dirigée par oligonucléotides. Également nous avons utilisé une

chimère du canal TRPC6 développée par notre laboratoire, produit par l'insertion d'un site de restriction SpeI au niveau du sixième segment transmembranaire pour générer [CT4] TRPC6 (TRPC6^{M1-M714}/TRPC4^{L609-L974}). Cette chimère permet l'expression d'un canal fonctionnel tétramérique fonctionnel exprimé à la membrane ayant un segment C-terminal appartenant à la famille des TRPC4 (Lepage et al., 2006).

5.4 Culture cellulaire et transfection des ADNc

Les cellules embryonnaires de reins humains (HEK239T) ont été cultivées dans des conditions de sous-confluence dans le milieu de culture « Dulbecco's modified Eagle's medium » (DMEM) enrichi d'une solution de sérum fœtal bovin 10% (FBS), de pénicilline (50 unités/ml) et de streptomycine (50 µg/ml). Ces cellules ont par la suite été conservées dans un incubateur à 37°C contenant 5% CO₂. Les cellules ont été transfectées avec une solution de Lipofectamine 2000. Des plaques de 6 puits ont été prétraitées avec de la poly-L-lysine 0.1mg/ml pendant 30 minutes et ensuite rincées avec une solution PBS (Phosphate-buffered saline) (137mM NaCl, 3.5mM KCl, 10mM tampon sodium-phosphate, pH 7.4) avant d'être séchées à l'air libre sous la hotte. Une quantité de 0.5µg d'ADN plasmidique (cDNA) contenant les différentes constructions a été diluée dans 250 µl d'Opti-MEM I et ajoutée dans les puits séchés. Un volume de 2.0 µl de Lipofectamine 2000 a été dilué dans 250 µl d'Opti-MEM I avant d'être ajouté dans les solutions d'ADN plasmidiques diluées. Les différentes solutions ont été mélangées vigoureusement et incubées pendant 20 minutes à température pièce. Pour chaque condition expérimentale, 8.5×10⁵ cellules HEK 293T, en suspension dans 1.5 ml de milieu de culture sans antibiotique, sontensemencées dans chaque puits pour une période de 16 heures à 37°C en présence de 5% de CO₂. Une incubation supplémentaire de 24 heures a été effectuée.

Pour les essais d'imagerie calcique, les cellules ont été traitées à la trypsine et le contenu d'un seul puits a étéensemencé sur trois lamelles à microscope prétraitées à la poly-L-lysine. Les cellules ont également été transfectées avec 0.5µg d'ADN plasmidique codant pour le récepteur muscarinique M5 (M5R). Le niveau de transfection a été évalué par la proportion des cellules répondantes à une stimulation au Cch 10µM par l'entremise d'une mobilisation du calcium pendant 48 heures après les transfections. Le taux de transfection est évalué entre 50 et 60%.

5.5 Les essais d'imagerie calcique

48 heures après la transfection, les puits contenant les cellules sont lavés deux fois avec 2.0 ml de « Hank's Balanced Salt Solution » (HBSS) (120mM NaCl, 5.3mM KCl, 0.8mM MgSO₄, 1.8mM CaCl₂, 10 mM Glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4). Les cellules sont ensuite incubées à température pièce à l'abri de la lumière avec 1.5 ml de HBSS contenant 1µM de Fura-2 pendant 20 minutes. Les cellules sont lavées deux fois avec du HBSS et incubées avec 2.0 ml de HBSS pendant 25 minutes.

Une lamelle, sur laquelle les cellules ont été ensemencées, est montée sur un support à microscope. La mise au point du microscope a été faite au niveau de l'oculaire et via l'ordinateur à l'aide du logiciel Metafluor for Olympus version 7.5.6. Pour chaque lamelle, entre 30 et 70 cellules ont été sélectionnées manuellement pour effectuer l'essai qui dure 345 secondes. Les changements du milieu se font par une perfusion manuelle selon l'ordre suivant : 30 secondes avec HBSS (0mM CaCl₂, 0.5mM EGTA); à 60 secondes avec HBSS (0mM CaCl₂, 0.5mM EGTA) contenant 10µM CCh; à 210 secondes avec HBSS (1.8mM CaCl₂) contenant 10µM Cch et l'enregistrement continu pour une période d'au moins 135 secondes. Chaque condition expérimentale a été répétée en triplicata à travers trois expériences indépendantes (n = 3).

Les données obtenues ont été traitées afin d'obtenir les courbes de variation du niveau de calcium intracellulaire en fonction du temps. Chaque résultat, d'une série de trois essais, a été traité individuellement pour être ensuite regroupé avec les deux autres duplicatas. Les moyennes des différents essais ont également été regroupées avec le même programme. Pour les analyses statistiques, le programme *GraphPad Prism 6* a été employé. Pour chaque condition, la valeur de la variation de concentration calcique a été prise après l'ajout de la dernière solution de HBSS (1.8mM CaCl₂, 1μM Cch), ce qui représente 210 secondes après le début de l'essai. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la condition normale (HBSS non enrichi de Mg²⁺). Un test T de Student pour des données non appariées et corrigées selon la méthode de Welch a été réalisé pour comparer l'effet du magnésium par rapport aux conditions normales. Il y avait une différence statistiquement significative quand le p<0.05.

Résultats

1. Purification et détermination des états d'oligomérisation des segments C-terminaux de TRPC6

La purification des protéines recombinantes est une étape importante pour permettre de mener des analyses biophysiques et structurales. Le fragment C-terminal TRPC6 a été exprimé de façon importante au niveau des corps d'inclusion des bactéries DE3 transformées. Nous avons resolubilisé les corps d'inclusion avec notre protéine d'intérêt en utilisant l'urée à une concentration de 8 M et par la suite nous avons poursuivi le processus vers l'étape de purification sur colonne de chromatographie de type NTA chargée au Nickel. Cette méthode schématisée à la figure 20, nous a permis de resolubiliser et purifier notre protéine, mais dans un état de repliement complètement dénaturé. Suite à l'élution, nous avons voulu valider à la fois le poids moléculaire apparent sur gel SDS-PAGE ainsi que la concentration de la protéine purifiée dans nos conditions expérimentales d'élution.

Comme on peut le remarquer à la figure 21, le segment C-terminal TRPC6 wt est exprimé en forte majorité au niveau des corps d'inclusion avec une bande apparente de forte intensité à un poids moléculaire de 15 kDa ce qui représente le poids moléculaire estimé théorique du segment. De plus, nous pouvons remarquer que les lavages répétitifs à l'imidazole ont mené à des pertes au niveau de la purification de la protéine. Cette perte est causée par le niveau maximal de liaison saturable de la colonne utilisée en fonction de la concentration de protéines recombinantes purifiées. À l'étape de l'élution, nous étions en mesure de récupérer une concentration de 0.47 mg.ml^{-1} du segment C-terminal de TRPC6 ainsi qu'une concentration équivalente pour les deux segments avec les mutations R895C et E897K. L'échantillon est ensuite concentré avec un amicon de $0.1 \mu\text{m}$ qui nous a permis d'atteindre une concentration maximale de 0.81 mg.ml^{-1} . L'échantillon élué et concentré se retrouve dans un environnement chaotrope dû à la présence d'une forte concentration d'urée ce qui ne favorise pas le repliement optimal de la protéine. Afin

d'éliminer l'urée, nous avons utilisé la dialyse graduelle, ce qui permet un repliement efficace et progressif de nos protéines. À travers le processus de dialyse, nous avons également remplacé la solution de tampon phosphate initial par la solution de tampon 10 mM Tris-HCl contenant 10 mM NaCl à un pH de 8.0. Le choix de ce type de tampon a été basé sur la stabilité de la protéine en solution après l'analyse primaire de son repliement CD comparativement à plusieurs autres types de solutions tampons testés. Pour étudier l'état d'oligomérisation apparent des protéines C-terminaux TRPC6 wt, R895C et E897K, nous avons utilisé deux méthodes expérimentales: la méthode de séparation chromatographique d'exclusion et la méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS) (voir section méthode pour plus d'information sur les détails de chacune de ces deux méthodes).

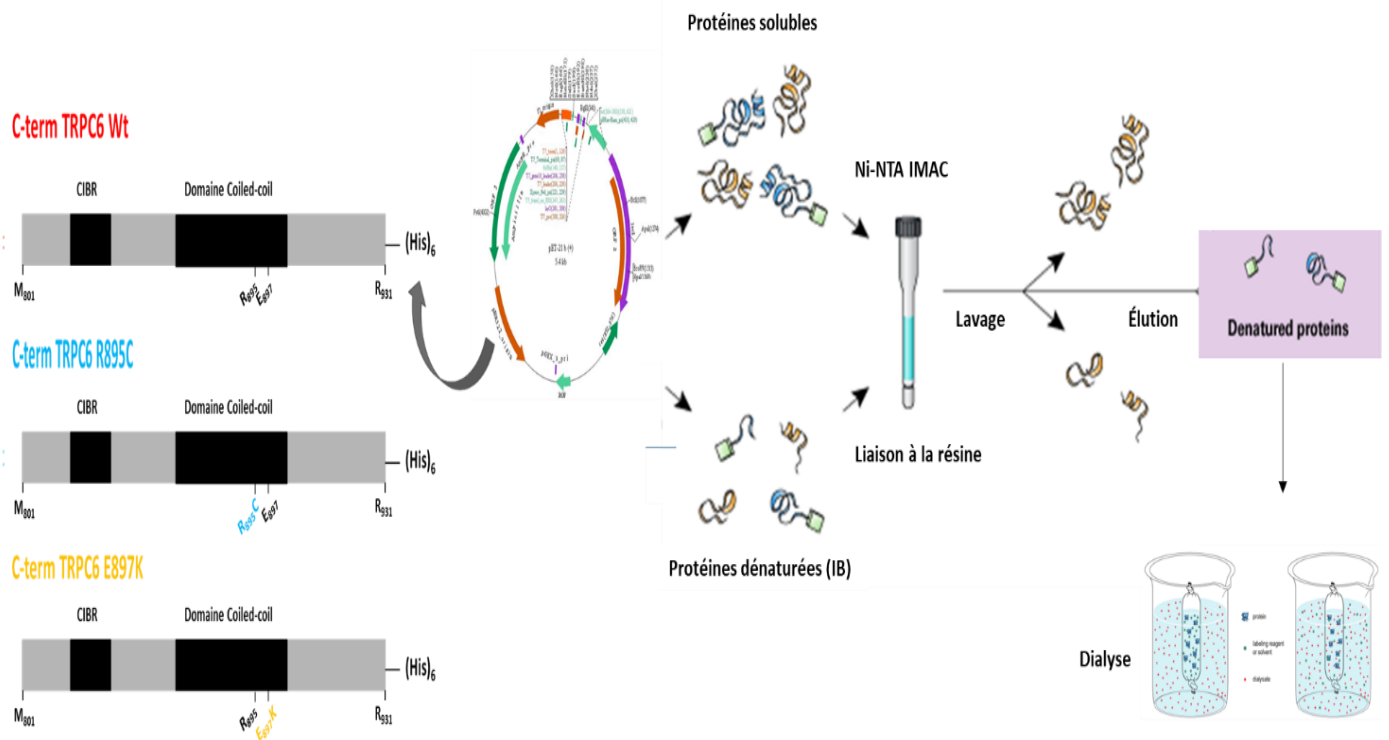


Figure 20: Schéma simplifié de la méthode d'expression et de purification des segments C-terminal TRPC6 wt et les mutants R895C et E897K. Trois fragments C-terminaux TRPC6 type sauvage (wt), segment ayant la mutation R895C ou la mutation E897K ont été transformés dans le plasmide pet-21b. Suite à la transformation et l'expression de ces différentes protéines dans des bactéries E.Coli BL21, les protéines recombinantes ont été purifiées via une colonne de type NTA IMAC chargée au nickel. Les protéines ont par la suite été éluées et subis une dialyse afin de les resolubiliser dans une solution tampon adéquate pour favoriser le repliement et l'analyse structurale.

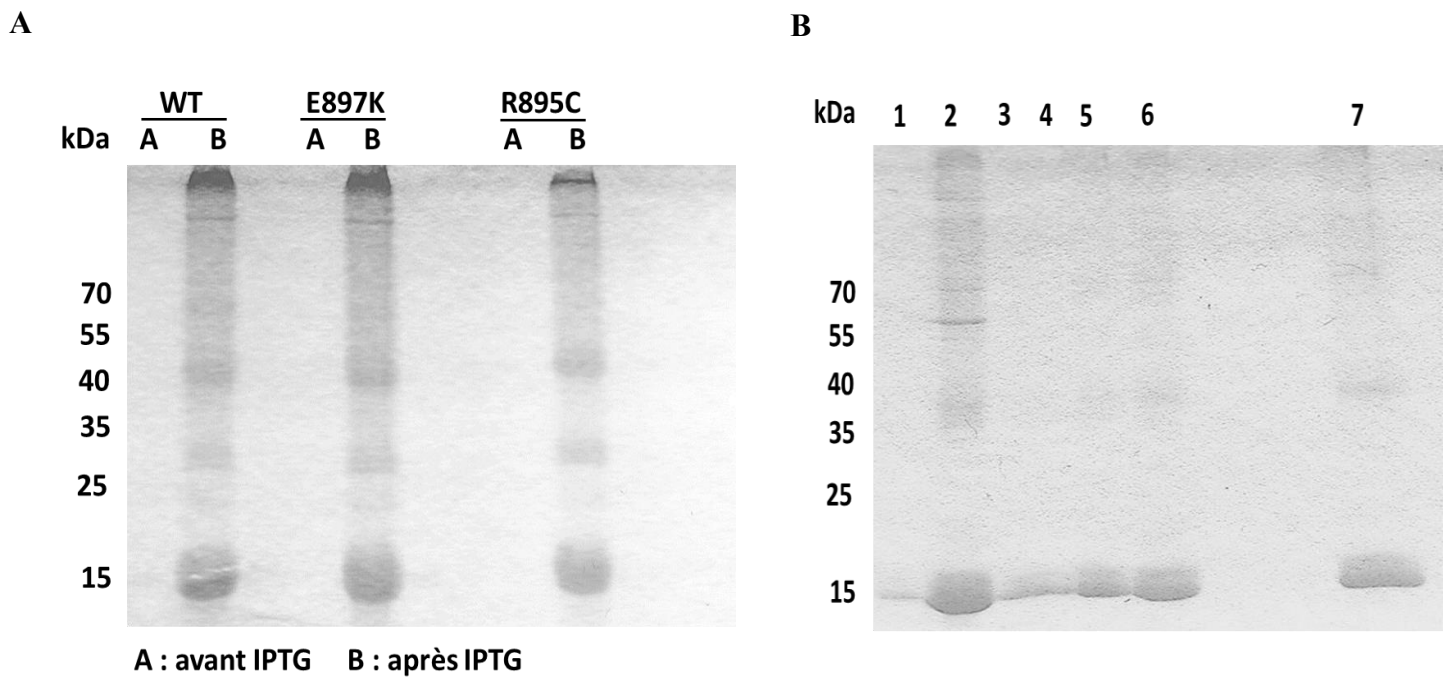


Figure 21: Expression et purification du segment C-terminal TRPC6. (A) Gel SDS-PAGE représentant l'induction d'expression des différents segments C-terminal TRPC6 wt, le mutant E897K et le mutant R895C suite à l'ajout d'IPTG. Les puits A et B représentent les lysats protéiques avant et après l'induction à l'IPTG respectivement. (B) Gel SDS-PAGE représentant les différentes étapes de la purification du segment C-terminal TRPC6wt. Puit 1 : Matériel soluble/ Puit 2: IB solubilisé induit dans la colonne de résine/ Puit 3: matériel non lié à la résine/Puit 4: Premier lavage avec 25 mM imidazole (série de 3 lavages) / Puit 5: Première élution avec 250 mM imidazole/ Puit 6: Deuxième élution avec 350 mM imidazole / Puit 7: Protéine après dialyse dans une solution tampon finale (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl ph 8.1)

La méthode de séparation par chromatographie d'exclusion (SEC), nous a permis d'identifier les états oligomériques présents au niveau de notre échantillon de protéines purifiées. Dans nos conditions expérimentales, le fragment C-terminal TRPC6 wt présente un profil avec deux états d'oligomérisation à différentes proportions comme présenté à la figure 22. Au niveau du spectre de distribution obtenu de SEC nous pouvons observer que le fragment C-terminal TRPC6 wt en solution a une forte intensité d'absorbance à un volume de 9.7 ml, qui correspond, selon notre courbe de standards, à un poids moléculaire apparent de 59.7 kDa. Ceci pourrait correspondre à une forte population en forme tétramérique à la fois pour le segment C-terminal TRPC6 wt, mais aussi pour les deux segments ayant les mutations R895C ou E897K indiqué par la flèche à la figure 22A. Cette conformation tétramérique représente une population majoritaire dans nos échantillons et ce type d'organisation tétramérique semble être ordonné et favorable ce qui explique son abondance dans l'échantillon. Le pic de faible intensité située à 7.2 ml pour le segment C-terminal TRPC6 wt pourrait être dû à de fortes interactions électrostatiques et hydrophobes causant la formation d'un état d'oligomérisation aléatoire ou la combinaison de plusieurs monomères ou dimères.

L'oligomérisation favorisée en tétramère des segments C-terminaux TRPC6 wt, R895C et E897K a été également observée dans nos essais DLS. Comme présenté à la figure 22B, nous pouvons remarquer que le C-terminal TRPC6 wt et les mutations R895C ou E897K présentent une distribution monodisperse monomodale (figure 22B) des populations majoritaires avec des valeurs de rayons hydrodynamiques de 9.2, 9.1 et 9.2 nm respectivement. À partir des valeurs des rayons hydrodynamiques expérimentaux obtenus, nous avons calculé les poids moléculaires apparents de 62.7, 62.4 et 66.1 kDa pour les trois segments C-terminaux TRPC6 wt, E897K et R895C respectivement (figure 22B). Ces poids moléculaires obtenus représentent l'équivalent d'un poids total de quatre unités monomériques de chacun des segments

qui, dans nos conditions expérimentales, favorisent une structure tétramérique. Il faut noter que la différence dans les valeurs obtenues entre les techniques de séparation chromatographique d'exclusion et DLS peut être expliquée par des facteurs notamment la viscosité du milieu, le caractère vibrationnel des protéines dépendant de l'état oligomérique, la forme globulaire ou linéaire favorisée par la protéine et la sensibilité de détection de chacune des deux techniques. À la lumière de ces résultats, nous pouvons confirmer que le segment C-terminal du canal TRPC6 forme un oligomère tétramérique en solution et les mutations ponctuelles, R895C et E897K, n'influencent pas la formation du tétramère dans nos conditions expérimentales.

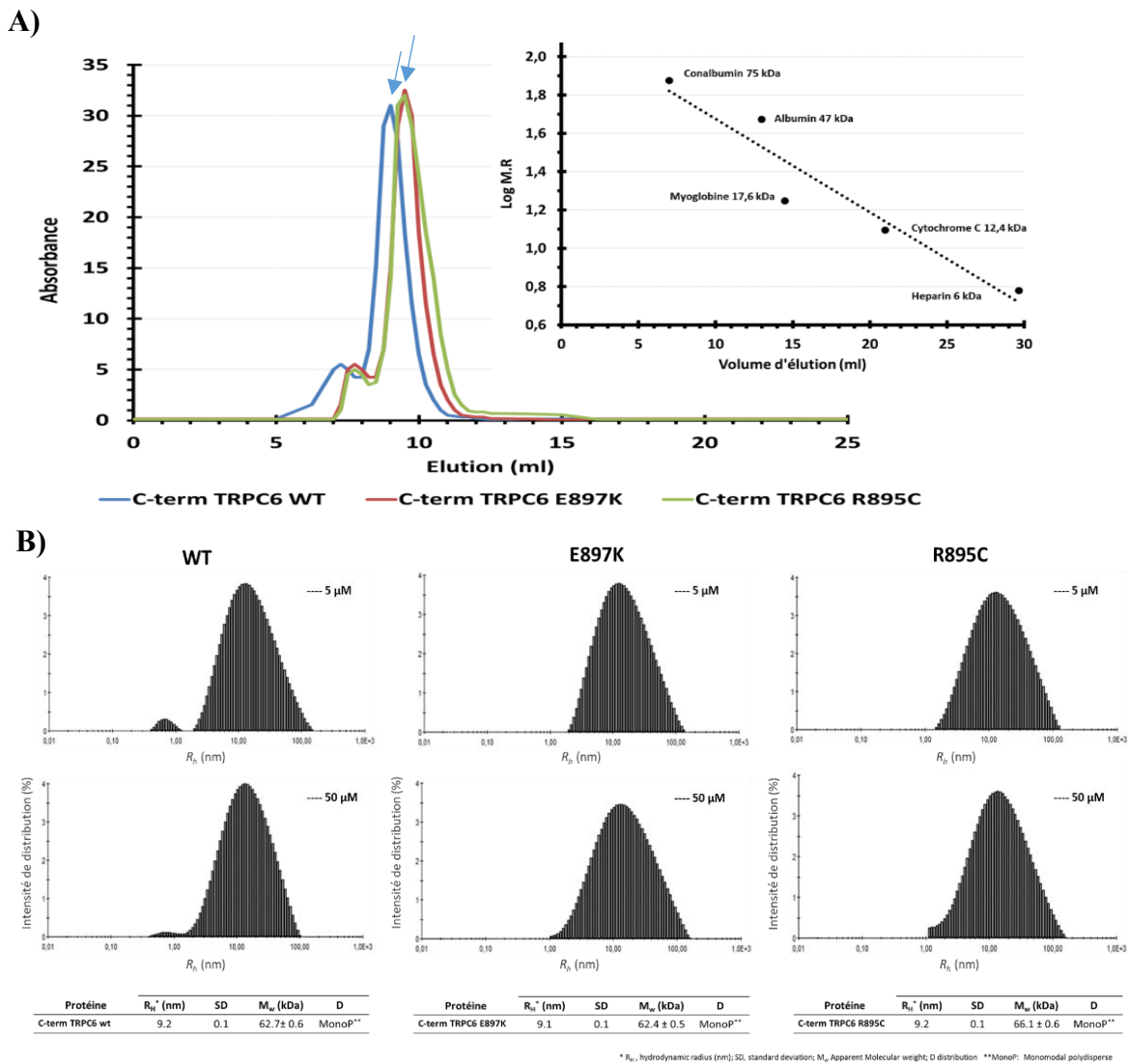


Figure 22 : Tétramérisation du segment C-terminal TRPC6 wt et les mutants R895C et E897K.

(A) Spectres d'éluions obtenus par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) pour les protéines des segments C-terminal TRPC6 wt, le mutant E897K et le mutant R895C. Les pics majoritaires d'éluions obtenus pour les trois protéines recombinantes sont présentés par les deux flèches. Une courbe d'étalons avec des protéines de poids moléculaires connus (Conalbumine, Albumine, Myoglobine, Cytochrome C et Héparine) a été utilisée afin de déterminer le volume d'éluion correspondant au poids moléculaire des protéines d'intérêt. (B) Spectres de distribution obtenus par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour les protéines des segments C-terminal TRPC6 wt, le mutant E897K et le mutant R895C. Les rayons hydrodynamiques des différents segments mesurés sont représentés dans le tableau du bas. Les protéines sont dans une solution tampon 10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl pH 8.1.

2. Analyse CD du spectre C-terminal TRPC6 wt et estimation des proportions des repliements en hélices α , feuillet β et aléatoire

Afin d'étudier le repliement de la structure secondaire du fragment C-terminal TRPC6, nous avons utilisé la technique de spectroscopie CD. Dans nos conditions expérimentales, le spectre CD du segment C-terminal TRPC6 wt expose la présence de deux pics minimums négatifs, un observé à 208 et un deuxième à 222 nm, ainsi qu'un pic maximum positif à 195 nm (figure 23). Ce spectre présente un profil caractéristique d'une structure secondaire majoritairement organisée en hélices α . Afin de vérifier si le repliement en hélices α est dépendant de la concentration du segment C-terminal TRPC6, nous avons varié la concentration de l'échantillon de 2.5 μ M à 50 μ M. Ces concentrations de protéines nous ont permis d'obtenir un bon ratio signal CD sur bruit. Tel que présenté à la figure 23, l'intensité du signal CD du segment C-terminal TRPC6 wt augmente en fonction de l'augmentation de la concentration de la protéine, mais en conservant le même profil de sa structure secondaire majoritairement organisée en hélices α . Également nous pouvons remarquer une variation de l'intensité du signal CD au niveau des concentrations de 20 à 30 et de 30 à 50 μ M. Le croisement de tous les spectres CD des différentes concentrations du segment C-terminal TRPC6 wt à $\lambda = 200$ nm porte le nom de point isodichroïque. La signification de ce point isodichroïque est qu'à 200 nm, l'intensité du signal mesurée est indépendante de la concentration du segment C-terminal TRPC6. La présence d'un point isodichroïque nous permet également de considérer le système comme un modèle à deux états de population présente dans notre échantillon.

La déconvolution des spectres CD obtenus du segment C-terminal TRPC6 wt (figure 23B) nous permet d'estimer la proportion des différentes structures secondaires qui compose le spectre de repliement total observé en CD. Plusieurs informations pertinentes ont été obtenues de cette analyse. Premièrement, nous pouvons remarquer que la proportion du repliement en hélices α augmente avec l'augmentation de la

concentration du segment C-terminal TRPC6 wt. À faible concentration (2.5 μM), le segment C-terminal TRPC6 wt adopte un repliement en hélices α à un niveau faible de 2.5% de la structure globale du segment. La proportion du repliement en hélices α du C-terminal TRPC6 wt augmente de façon concentration dépendante jusqu'à atteindre un repliement en hélices α maximal de 61% à une concentration de 50 μM . Le niveau de repliement en hélices α maximal est maintenu jusqu'à une concentration de 80 μM du segment C-terminal TRPC6 wt. Au niveau du repliement en feuillets β , le repliement global du segment C-terminal TRPC6 wt à faible concentration est composé d'un repliement en feuillets β estimé à 31%. Le repliement en feuillets β diminue avec l'augmentation de la concentration du C-terminal TRPC6 wt pour atteindre un niveau de 0.55% à partir d'une concentration de 50 μM et ce niveau est maintenu jusqu'à 80 μM . Outre ces deux repliements, le segment C-terminal TRPC6 wt est composé d'une portion de sa structure globale organisée en un repliement de type aléatoire. Ce repliement est maximal, à un niveau de 60%, à faible concentration protéique et il diminue pour atteindre un niveau minimal de 35% à la plus haute concentration expérimentale du C-terminal TRPC6 wt. Ces résultats nous indiquent qu'à faible concentration, le segment C-terminal TRPC6 wt adopte une structure globale peu repliée avec une organisation majoritairement de type aléatoire et une portion organisée en feuillets β . L'augmentation de la concentration du segment C-terminal TRPC6 wt favorise une structure globale majoritairement organisée en hélices α avec une portion en structure aléatoire.

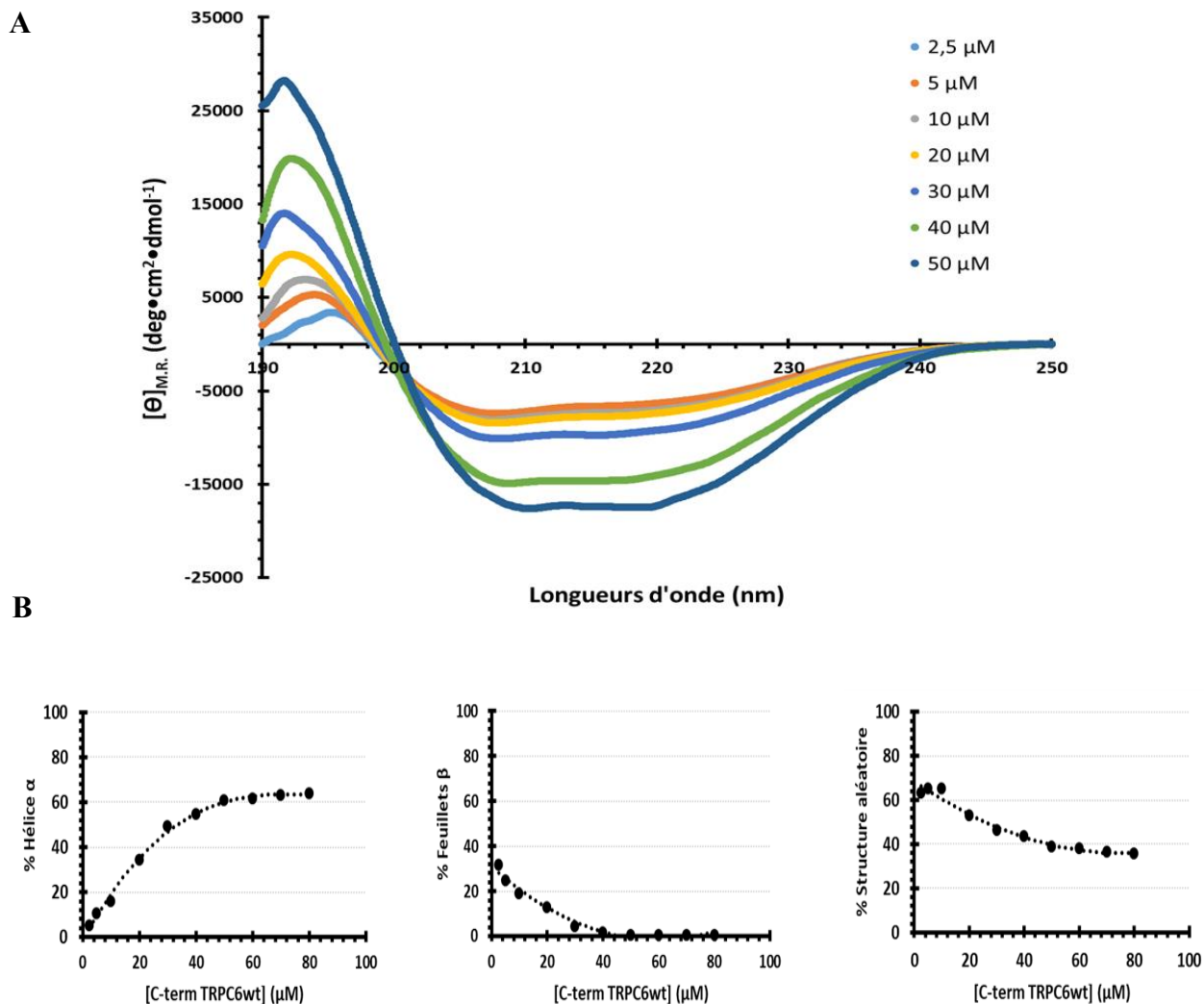


Figure 23 : Spectres CD du segment C-terminal TRPC6wt. (A) Les spectres CD selon la concentration du segment C-terminal TRPC6wt exprimé en ellipticité molaire sur un intervalle de longueur d'onde de 195 à 250 nm. (B) la déconvolution des spectres CD obtenus pour chaque concentration du segment C-terminal TRPC6 wt en présentant l'estimation du repliement en hélices α , feuilletés β et structure aléatoire en % en fonction de la concentration de l'échantillon. Chaque courbe est une accumulation de 10 spectres à température pièce (25°C) dans une cuvette en quartz de 1 mm.

3. Expression et purification du segment C-terminal TRPC6 avec la mutation E897K

Pour exprimer le mutant C-terminal TRPC6 E897K, nous avons opté pour le même protocole que celui utilisé pour l'expression et la purification du segment de type sauvage. La mutation E897K n'a pas influencé le niveau d'expression de la protéine recombinante au niveau des corps d'inclusions comme présentés à la figure 21. Nous étions en mesure de purifié le segment C-terminal TRPC6 E897K à une concentration de 0.78 mg.ml⁻¹. La mutation au niveau de l'acide glutamique à la position 897 n'a pas modifié le caractère d'oligomérisation du segment C-terminal en comparaison avec le segment de type sauvage (figure 22 A et B).

4. Analyse CD de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6 E897K

Afin d'approfondir la compréhension de la conséquence de la mutation E897K sur la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6, nous avons vérifié en premier lieu si cette mutation influence le type de repliement de la structure globale du segment C-terminal et si la mutation influence la composition ainsi que la proportion des différents types de repliements de structure secondaire. Dans les mêmes conditions expérimentales que celles du segment de type sauvage, nous avons analysé le spectre CD du segment C-terminal TRPC6 E897K en fonction de la variation de la concentration du segment comme présenté à la figure 24A. Nous pouvons remarquer que la mutation E897K n'influence pas le repliement global de la structure secondaire comparativement à celui observé du segment C-terminal TRPC6 wt. La figure 24B montre que l'augmentation de la concentration du segment C-terminal TRPC6 E897K favorise un repliement de structure globale organisée majoritairement en hélices α avec deux minimum observé à 208 et à 222 nm ainsi qu'un maximum à 195 nm. On peut remarquer également que l'augmentation de l'intensité du signal CD est plus élevée entre les concentrations de 10 à 30 μ M comparativement à celle observée entre les concentrations de 30 et 50 μ M. Le point isodichroïque n'est pas aussi clairement

identifiable pour le mutant C-terminal TRPC6 E897K comparativement à celui observé au niveau du segment de type sauvage. Par contre on peut remarquer un croisement des spectres CD des différentes concentrations du mutant E897K à une longueur d'onde de 200 nm. La déconvolution des spectres CD du segment C-terminal TRPC6 E897K, figure 24B, présente une augmentation graduelle de la proportion du repliement en hélices α passant de 6% à une concentration de 2.5 μ M vers un repliement maximal en hélices α de 61% aux concentrations maximales de l'échantillon. Cette augmentation du repliement en hélices α avec l'augmentation de la concentration de l'échantillon est semblable à celle observée au niveau du segment C-terminal TRPC6 de type sauvage. Au niveau du repliement en feuillets β , le segment C-terminal TRPC6 E897K présente une proportion de repliement en feuillets β de 20 % du repliement global à de faibles concentrations. La proportion du repliement en feuillets β du repliement global du C-terminal TRPC6 E897K diminue pour atteindre un niveau minimal maintenu à 0.5%. À faible concentration, le mutant C-terminal TRPC6 E897K présente une structure avec un repliement majoritairement organisé en structure aléatoire estimé à 73 %. Tout comme le segment de type sauvage, la proportion du repliement de type aléatoire du segment C-terminal TRPC6 E897K diminue avec l'augmentation de la concentration de la protéine. Semblables au comportement structural du segment de type sauvage, ces résultats démontrent un changement dans la proportion des différents repliements pour favoriser une structure avec un repliement majoritairement organisé en hélices α qui est concentration dépendante. Tout comme le C-terminal TRPC6 wt, ceci est probablement dû à une interaction entre les protéines pour former un tétramère stable.

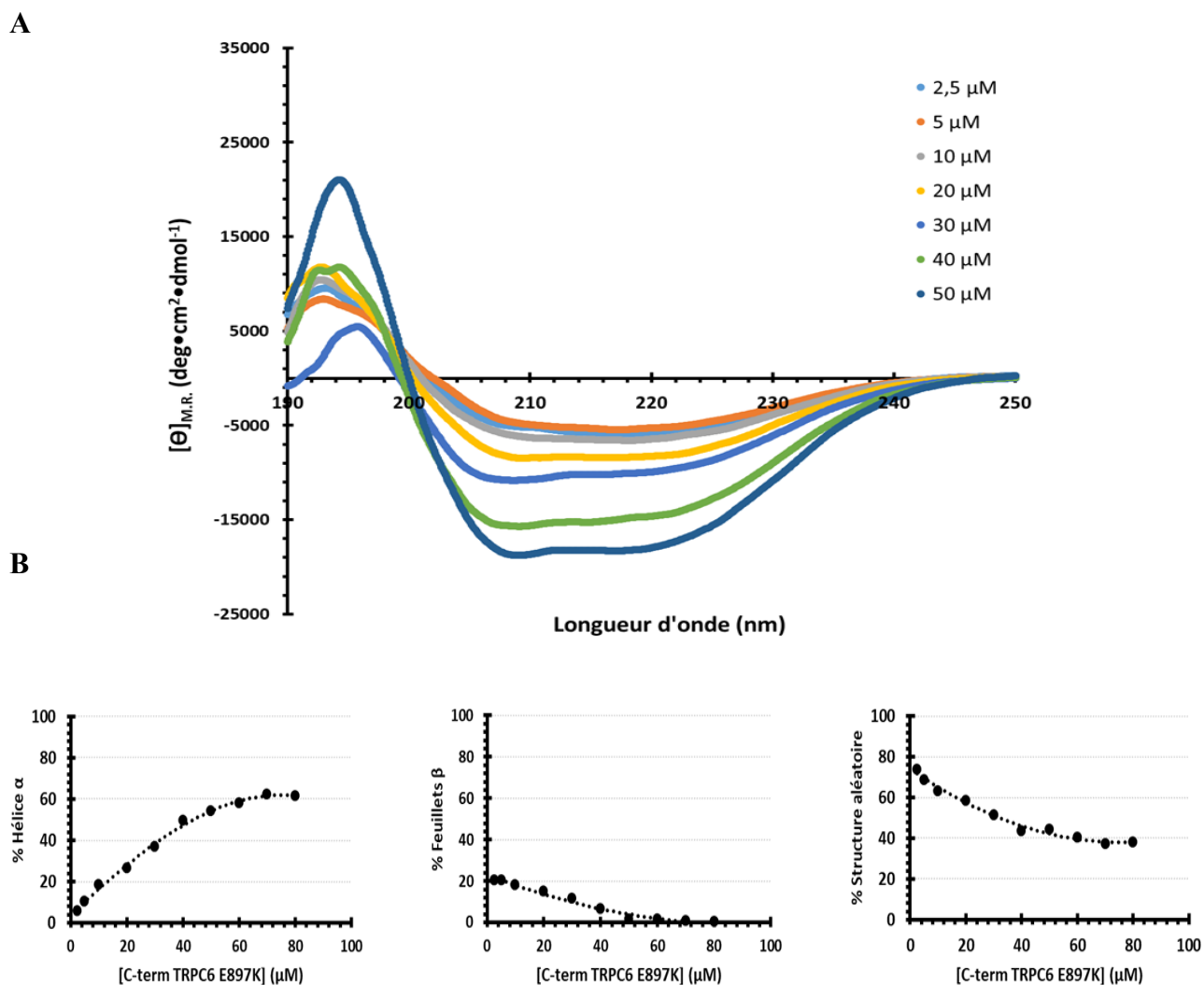


Figure 24: Spectres CD du segment C-terminal TRPC6 E897K. (A) Les spectres CD selon la concentration du segment C-terminal TRPC6 E897K exprimé en ellipticité molaire sur un intervalle de longueur d'onde de 195 à 250 nm. (B) la déconvolution des spectres CD obtenus pour chaque concentration du segment C-terminal TRPC6 E897K en présentant l'estimation du repliement en hélices α , feuilletés β et structure aléatoire en % en fonction de la concentration de l'échantillon. Chaque courbe est une accumulation de 10 spectres à température pièce (25°C) dans une cuvette en quartz de 1 mm.

5. Analyse CD de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6 R895C

Tout comme les deux autres protéines recombinantes, le fragment C-terminal TRPC6 R895C a été majoritairement exprimé au niveau des corps d'inclusion des bactéries DE3. En utilisant le même protocole de purification expliqué au niveau de la section méthodologie, nous avons purifié le segment C-terminal TRPC6 R895C à une concentration de 0.82 mg.ml^{-1} . Comme montré à la figure 25A, la mutation R895C n'influence pas le profil CD du repliement global de la structure secondaire en hélices α . L'augmentation de la concentration, allant de 2.5 à 50 μM , du segment C-terminal TRPC6 R895C augmente l'intensité de signal CD au niveau des longueurs d'onde à 208 et 222 nm. Comparativement au segment de type sauvage, le mutant R895C induit une augmentation graduelle de l'intensité du signal CD en fonction de la concentration de l'échantillon par contre au niveau du segment wt on a vu une augmentation variable selon le ratio de concentration de l'échantillon. De plus, on remarque que la mutation R895C à des concentrations de 2.5 à 20 μM , présente des intensités de signal plus faibles que celles observées pour les mêmes concentrations pour le segment du type sauvage. On peut remarquer un point isodichroïque identifiable à 200 nm, ce qui implique que le mutant R895C possède la même intensité de signal dichroïque à cette longueur d'onde peu importe la concentration de l'échantillon.

Selon les calculs de déconvolution des spectres CD présentés à la figure 25B, le mutant R895C présente une structure globale composée d'une portion organisée en hélices α à un niveau de 5%, en feuillets β à 31% et 64 % en structure aléatoire à une faible concentration de 2.5 μM . À forte concentration, 50 μM , le mutant C-terminal TRPC6 R895C atteint une proportion de 56% de son repliement global organisé en hélices α , 3.8% en feuillets β et une proportion de 40% en structure aléatoire. L'augmentation de la proportion du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 R895C est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de l'échantillon pour atteindre un niveau maximal maintenu d'environ

60% à une concentration de 50 μM . Le repliement en feuillets β du mutant R895C diminue d'une façon proportionnelle à l'augmentation de la concentration de l'échantillon pour atteindre des niveaux faibles à partir de 50 μM .

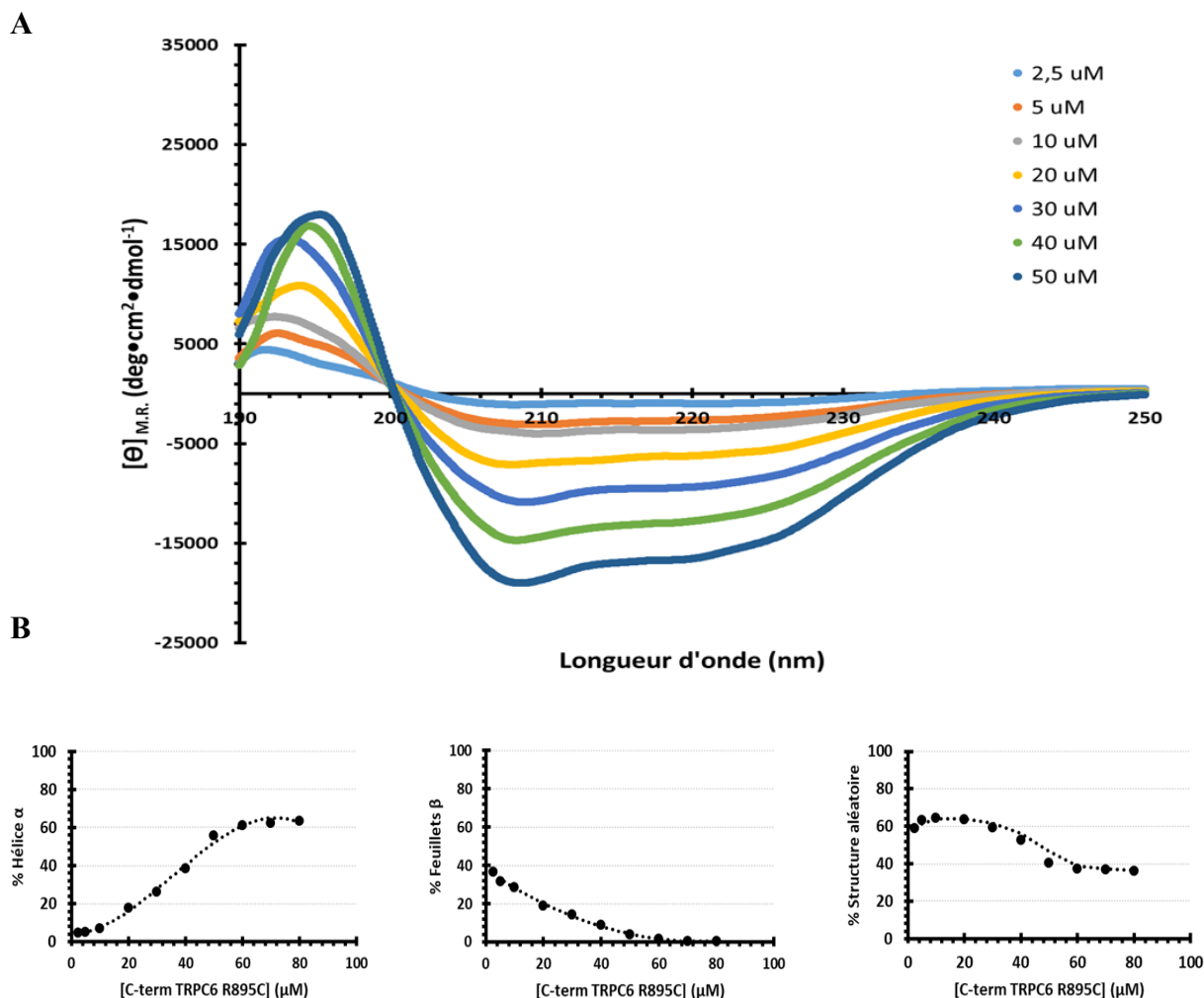


Figure 25: Spectres CD du segment C-terminal TRPC6 R895C. (A) Les spectres CD selon la concentration du segment C-terminal TRPC6 R895C exprimé en ellipticité molaire sur un intervalle de longueur d'onde de 195 à 250 nm. (B) R895C la déconvolution des spectres CD obtenus pour chaque concentration du segment C-terminal TRPC6 en présentant l'estimation du repliement en hélices α , feuilletés β et structure aléatoire en % en fonction de la concentration de l'échantillon. Chaque courbe est une accumulation de 10 spectres à température pièce (25°C) dans une cuvette en quartz de 1 mm.

La figure 26 présente une compilation des résultats obtenus pour les trois segments C-terminaux TRPC6 type sauvage, mutant E897K et mutant R895C. On remarque que les trois segments C-terminaux TRPC6 favorisent un repliement en hélices α qui atteint un niveau maximal de repliement de 60% à partir d'une concentration de 50 μM . À cette concentration, le repliement global des trois segments présente une proportion très faible de repliement en feuillets β . Cette concentration de 50 μM sera la concentration expérimentale utilisée pour les prochaines expériences pour son niveau de repliement en hélices α qui est le repliement majoritaire et favorable pour nos trois segments C-terminaux TRPC6.

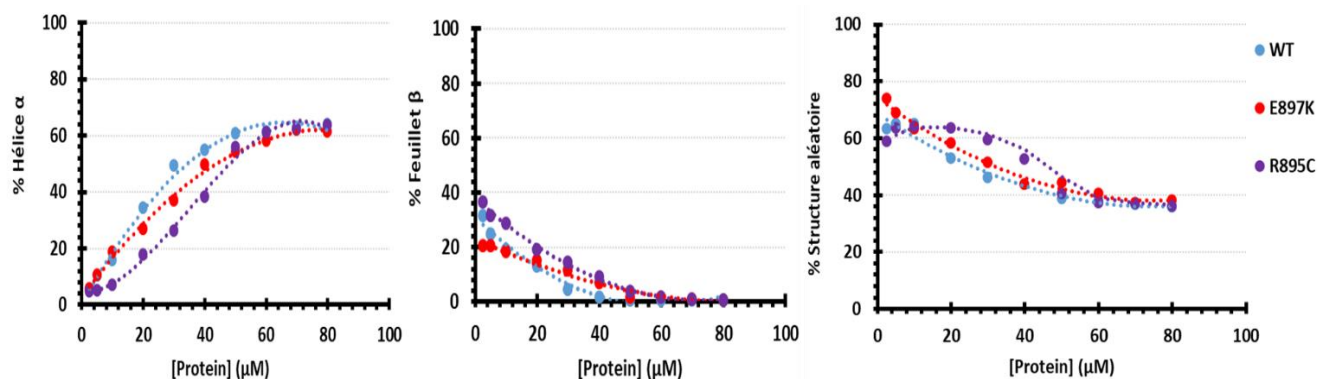


Figure 26 : Compilation des courbes du contenu estimé en hélices α , feuillets β et structures aléatoires pour les segments C-terminal TRPC6 wt (●) le mutant E897K (●) et le mutant R895C (●) en fonction de leurs concentrations.

6. Impact de la dénaturation thermique et chimique sur les segments C-terminaux TRPC6 wt, R895C et E897K

La stabilité thermodynamique du repliement de la structure secondaire peut être étudiée par CD afin de comprendre la dynamique réactionnelle de la structure face à la variation de son environnement. En effet, la variation de la stabilité thermodynamique de la structure d'un complexe protéique est en réponse à la variation des facteurs comme le pH, la température ainsi que la composition et la concentration ionique du milieu. La variation de la température sur la stabilité thermodynamique du repliement d'une structure d'une protéine nous permet d'étudier plusieurs caractéristiques de sa dynamique structurale. Premièrement, nous pouvons étudier le comportement de stabilité du repliement structural de la protéine face à la variation de température. Deuxièmement, dans le cas où la structure de la protéine est sensible à la température, le repliement structural va subir une dénaturation thermique de son organisation avec soit un profil à deux états; un état natif replié vers un état dénaturé non replié sans intermédiaire ou un profil de dénaturation à deux états avec un ou plusieurs intermédiaires. Dans le cas d'une dénaturation thermique à deux états sans intermédiaire, nous pouvons établir la valeur d'un T_m apparent. Le T_m représente la température à laquelle l'échantillon présente une population repliée en équilibre avec une population égale sous forme dénaturée. Le T_m est aussi un paramètre qui représente une indication sur l'énergie nécessaire à fournir pour réduire la stabilité de la structure secondaire de la protéine de 50%. Comme mentionné précédemment, les trois segments du C-terminaux TRPC6 wt, E897K et R895C favorisent tous une structure globale majoritairement organisée en hélices α à 50 μ M. Nous avons alors établi l'analyse de la stabilité thermodynamique à une longueur de 222 nm pour valider la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α de la structure des trois protéines. Également, nous avons analysé l'impact des mutations R895C et E897K sur la réponse de la stabilité du repliement du segment C-terminal TRPC6 face à la variation de température. Les spectres de dénaturation thermique ont été réalisés sur une fenêtre

de température allant de 10°C à 100 °C (1°C/min) en mesurant l'intensité du signal à 222 nm. Les spectres de dénaturation thermique pour les segments C-terminaux TRPC6 wt, R895C et E897K sont présentés à la figure 27. Nous pouvons remarquer que le segment C-terminal TRPC6 wt présente une stabilité thermodynamique marquante à travers la fenêtre de température expérimentale sans passage vers un état dénaturé ou déplié. Par l'effet même l'absence de transition vers un état totalement déplié ne nous permet pas de déterminer la valeur du T_m apparent dans nos conditions expérimentales. Il faut noter que l'absence de dénaturation thermique complète et l'absence de T_m apparent sont en fonction de la fenêtre de température expérimentale de cet essai; ceci n'empêche pas que le segment C-terminal TRPC6 wt puisse être dénaturé avec un T_m apparent observé à des températures supérieures à 100°C. À une température de 100°C, on peut noter que le repliement de la structure du segment C-terminal TRPC6 wt a perdu 32 % de son repliement initial en hélices α (figure 27B). Le segment muté C-terminal TRPC6 E897K présente un profil de dénaturation thermique stable sans une présence de transition vers un état complètement dénaturé avec un profil comparable à celui du segment de type sauvage (figure 27A). À la température maximale de 100°C, le repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 E897K est dénaturé à un niveau de 28% de son repliement initial ce qui est légèrement plus stable que le segment de type sauvage (figure 27B). Le segment C-terminal TRPC6 R895C présente également une stabilité thermodynamique sans un passage vers un état dénaturé à travers la fenêtre de température expérimentale utilisée. À la température maximale de 100°C, le repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 R895C perd seulement 22% de son repliement initial (figure 27B). La stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 R895C est plus stable que celle du mutant E897K et celle du segment de type sauvage dans nos conditions expérimentales. Comme présenté à la figure 27, à température maximale, la mutation E897K diminue la stabilité du repliement en hélices α de 4% tandis ce que la mutation R895C diminue la stabilité du repliement de 10% comparativement au segment de type sauvage.

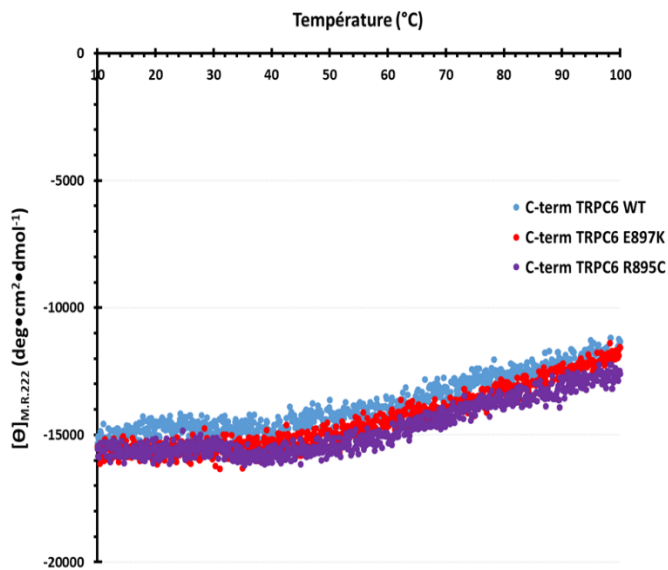
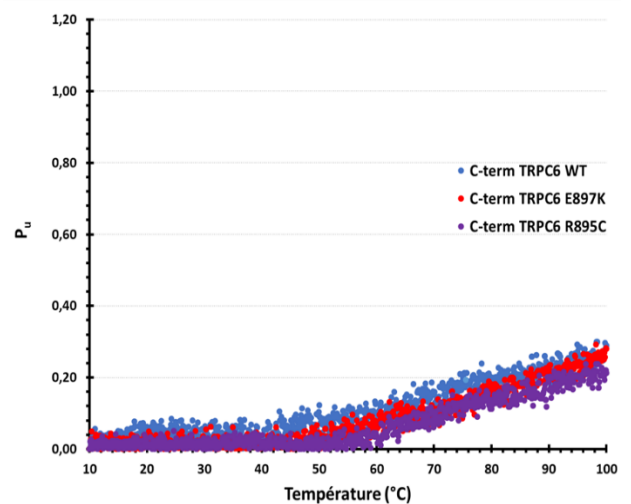
A**B**

Figure 27: Courbes de dénaturation thermique des segments C-terminal TRPC6 wt (●) le mutant E897K (●) et le mutant R895C (●). **A** Spectres de dénaturation thermique mesurée à 222 nm suivant l'intensité du signal exprimé en ellipticité molaire ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) en fonction la variation de la température ($^{\circ}\text{C}$). **B** Spectres de dénaturation thermique normalisés (P_u) entre 1 et 0, 1 étant le signal de l'état de repliement complètement dénaturé et 0 le signal mesuré du repliement 100% replié en fonction de la variation de la température ($^{\circ}\text{C}$).

7. Stabilité chimique du repliement structural des segments C-terminaux TRPC6 wt, E897K et R895C

L'ellipticité molaire à 222 nm en fonction de la concentration du GuHCl a été mesurée pour vérifier l'effet de l'environnement chaotrope sur le repliement de la structure secondaire des segments C-terminaux TRPC6 wt et les mutants E897K et R895C. Comme présenté à la figure 28, le GuHCl induit une dénaturation chimique du repliement en hélices α pour les structures des segments C-terminaux TRPC6 wt et les mutants E897K et R895C. Les spectres de dénaturation chimiques obtenus présentent un profil sinusoïdal, ce qui est traduit par une relation de transition de type coopératif à deux états (natif et dénaturé) (figure 28A). À de fortes concentrations de GuHCl, le repliement en hélices α des trois segments C-terminaux présentent une intensité de signal d'ellipticité proche de zéro. Cette observation indique que le repliement en hélices α de la structure secondaire est complètement déplié et dénaturé. Pour les trois segments protéiques, la dénaturation chimique de leurs repliements est réversible par des dialyses comparables à celle utilisée lors de la purification. L'élimination graduelle du GuHCl permet de favoriser le passage de l'état de repliement dénaturé non structuré vers un état replié majoritairement organisé en hélices α pour les trois segments protéiques. La concentration de GuHCl qui induit une dénaturation à 50% du repliement en hélices α de la structure, $[\text{GuHCl}]_{1/2}$, est de 1.8 M pour le segment C-terminal TRPC6 wt, 2.6 M pour le mutant E897K et 3.0 M le mutant R895C (figure 28B). On peut remarquer que les mutations E897K et R895C augmentent la stabilité du repliement en hélices α de la structure du segment C-terminal TRPC6 face à l'augmentation de la concentration de l'agent chaotrope GuHCl comparativement à la stabilité observée du segment de type sauvage. Également, on peut remarquer que le repliement de la structure secondaire du segment C-terminal TRC6 R895C possède un repliement plus stable face à la variation de la concentration de GuHCl que ceux observés pour les deux segments wt et E897K.

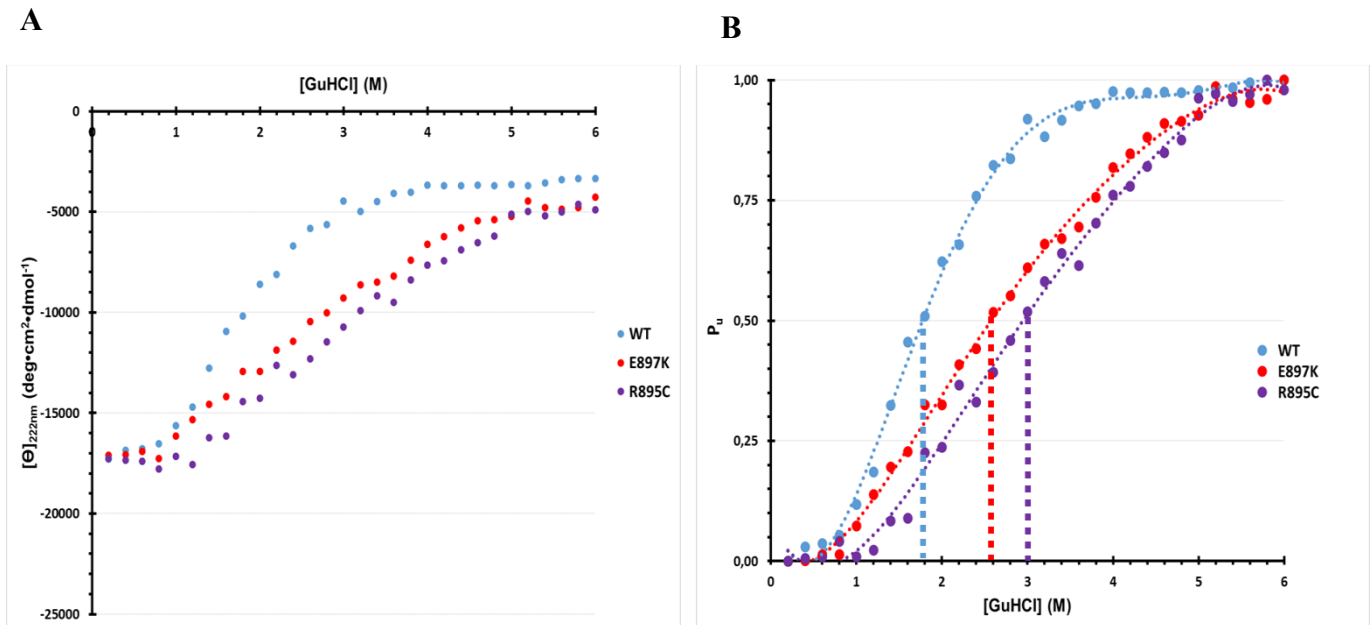


Figure 28: Courbes de dénaturation chimique au GuHCl des segments C-terminal TRPC6 wt (●) le mutant E897K (●) et le mutant R895C (●). (A) Spectres représentés en ellipticité molaire (deg.cm².dmol⁻¹) en fonction la variation de la longueur d'onde (nm) pour chaque concentration de GuHCl étudié. (B) les résultats normalisés entre des valeurs de 0 (état natif replié) et 1 (état dénaturé) en fonction de la variation de concentration de GuHCl en M. Les lignes pointillés représentent $[\text{GuHCl}]_{1/2}$

8. Effet des ions Na⁺ sur la stabilité thermodynamique de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6

Nous avons démontré que le repliement de la structure secondaire des segments C-terminaux TRPC6 type sauvage, E897K et R895C sont stables thermiquement et il n'existe pas de transition vers un état dénaturé visible dans la fenêtre de température expérimentale utilisée. Contrairement à l'urée, l'agent dénaturant GuHCl en solution se dissocie en ions positifs afin de générer un environnement hautement chaotrope qui diminue la stabilité de la structure secondaire des protéines. Ce phénomène a été observé par la sensibilité du repliement structural des trois segments C-terminaux TRPC6 wt, E897K et R895C face à la variation de la concentration du GuHCl. À la lumière de ces résultats, nous avons poussé l'analyse plus loin pour vérifier l'effet des ions positifs en solution sur la structure secondaire des trois segments et sur la stabilité thermodynamique de leurs repliements. Nous avons exploré l'effet des ions Na⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ sur le repliement et la stabilité thermodynamique des segments C-terminaux TRPC6 wt, R895C et E897K. Nous avons commencé par l'évaluation de l'impact de la force ionique des ions monovalents Na⁺ en solution sur le profil du spectre CD de la structure secondaire des segments C-terminaux TRPC6 wt, du mutant E897K et du mutant R895C. Comme présenté à la figure 29, dans nos conditions expérimentales, l'addition des ions Na⁺ n'a pas induit de changements au niveau du type de repliement structural en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt. Nous avons observé le même comportement dichroïque avec les mutations R895C et E897K (résultats non présentés dans cet ouvrage). Au niveau de la stabilité thermodynamique de la structure en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt, les ions Na⁺ n'influencent pas l'intensité du signal à 222 nm du repliement, et ce à travers la variation de température allant de 10 à 100°C. Ceci implique que dans nos conditions expérimentales, les ions Na⁺ n'exercent pas d'effet notable sur la stabilité thermodynamique de la structure du C-terminal TRPC6 wt dans le fenêtre de température mesurée. L'action neutre des ions Na⁺ a été également observée sur la stabilité

thermodynamique des deux segments mutés C-terminaux TRPC6 E897K et R895C (résultats non présentés dans cet ouvrage).

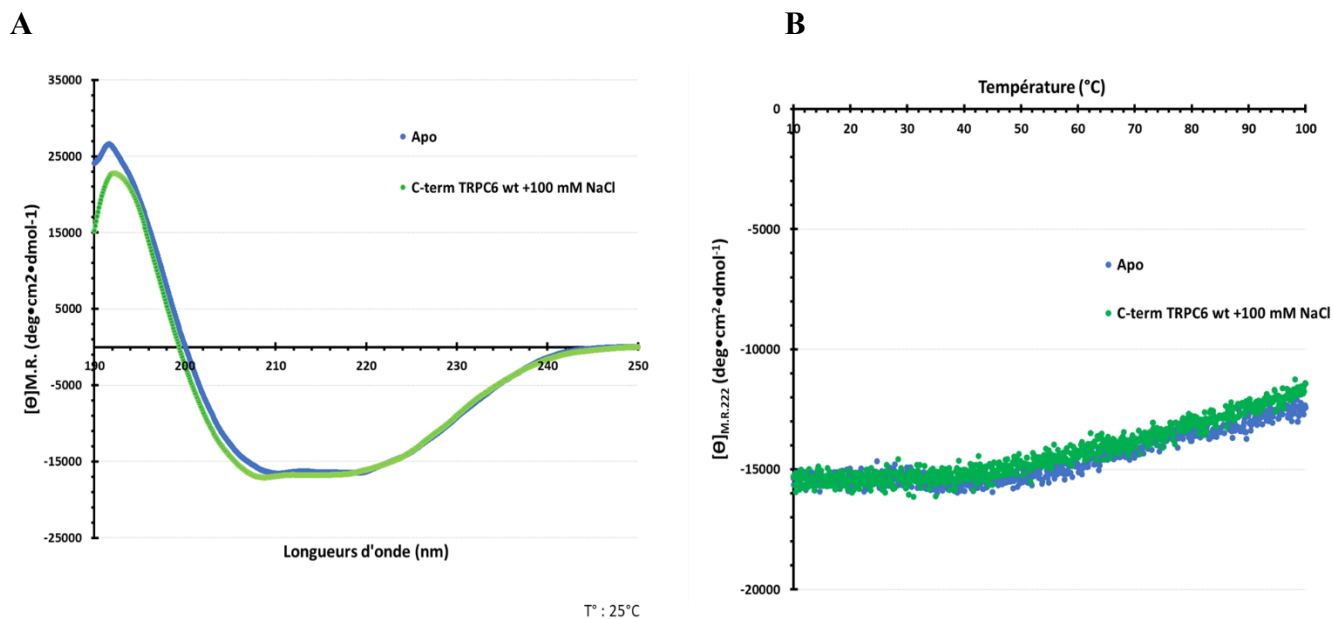


Figure 29: Spectres CD du segment C-terminal TRPC6wt en présence d'ions Na⁺. (A) Spectre CD à température pièce du segment C-terminal TRPC6wt en présence de 100 mM NaCl en mesurant l'intensité dichroïque exprimée en ellipticité molaire (deg.cm².dmol⁻¹) en fonction de la variation de la longueur d'onde de 190 à 250 nm. (B) Figure présentant les spectres de dénaturation thermique mesurés à 222 nm suivant l'intensité du signal exprimée en ellipticité molaire (deg.cm².dmol⁻¹) en fonction la variation de la température (°C).

9. Effet des ions divalents sur la stabilité thermodynamique de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6

Nous avons également investigué l'effet des ions métalliques (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+}) sur le repliement de la structure secondaire et la stabilité thermodynamique des segments C-terminaux TRPC6 wt, E897K et R895C. Nous avons commencé par valider l'effet des différents ions métalliques sur le spectre CD du segment C-terminal TRPC6 de type sauvage à température pièce. Comme on peut l'observer à la figure 30A, les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} ont augmenté l'intensité du signal d'ellipticité molaire comparativement à celle en forme apo au niveau de la longueur d'onde à 208 nm et une diminution du signal à 195 nm. En présence des ions Zn^{2+} , on remarque qu'il y a un décalage du signal mesuré d'ellipticité allant de 195 nm vers 198 nm avec une intensité du signal semblable. Au niveau du signal à 208 nm, on peut remarquer que les ions divalents cationiques ont modifié l'intensité du signal comparativement à la forme apo et ce à la baisse pour les ions Zn^{2+} et Mn^{2+} . L'ensemble des ions divalents testés n'ont pas influencé l'intensité du signal CD mesuré du segment C-terminal TRPC6 wt et ce à partir de la longueur d'onde 220 nm. À 222 nm, l'intensité du signal mesurée est la même pour la forme apo que celles mesurées en présence de l'ensemble des différents ions testés. Nous avons également observé le même comportement des ions divalents avec les segments mutés C-terminaux TRPC6 E897K et R895C dont les spectres CD en présence des ions testés (résultats non présentés dans cet ouvrage). Suite à cette observation, nous avons exploré si les ions divalents cationiques peuvent influencer la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 à 222 nm, longueur d'onde à laquelle on a observé une intensité commune pour l'ensemble des ions. Nous avons maintenu la concentration des différents ions divalents cationiques Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} et Ca^{2+} à une concentration fixe de 1600 μM et étudié leurs effets sur la stabilité du repliement en hélices α de la structure des segments C-terminaux TRPC6 wt, E897K et R895C. Comme présenté à la figure 30B, les ions Zn^{2+} et le Mn^{2+} n'influencent pas la stabilité thermodynamique

du repliement en hélices α de la structure du segment C-terminal TRPC6 wt comparativement à la stabilité de sa forme apo dans la même fenêtre de température expérimentale. On peut remarquer à la figure 30B, que l'introduction des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} dans le milieu du segment C-terminal TRPC6 wt, cause une réduction de la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α de sa structure secondaire. Dans ces deux situations, on peut observer une dénaturation thermodynamique à deux états traduits par une courbe de forme sinusoïdale avec un état natif qui, avec l'augmentation de la température, passe par une transition vers un état dénaturé sans intermédiaire structural détectable. La présence d'une concentration de 1600 μM d'ions Ca^{2+} à température pièce n'influence pas d'une façon significative l'intensité du signal CD du repliement en hélices α de la structure du C-terminal TRPC6 wt. Cependant, à partir de 37°C, l'intensité du signal CD en ellipticité molaire passe de -15000 $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ vers une intensité de -5576 $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ à une température de 70°C. Cette intensité d'absorption de -5576 $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ de la structure secondaire est maintenue jusqu'à 100°C se qui représente l'intensité du repliement en hélices α résiduel après la dénaturation. La figure 30C présente les courbes normalisées du signal CD de la dénaturation thermique. La valeur de 0 représente l'état natif et la valeur 1 représente l'état dénaturé maximal du repliement en hélices α de la structure secondaire du C-terminal TRPC6 wt. Dans nos conditions expérimentales, la présence d'ions Ca^{2+} à une concentration de 1600 μM dans le milieu a permis d'induire une dénaturation thermique complète du repliement en hélices α de la structure secondaire du C-terminal TRPC6 wt avec un T_m apparent de 47.14°C. À une même concentration, la présence d'ions Mg^{2+} a permis d'établir un profil de dénaturation thermique comparable à celui induit par les ions Ca^{2+} avec le passage d'un état natif replié vers un état complètement dénaturé sans état intermédiaire observable. À la figure 30C, nous pouvons observer que les ions Mg^{2+} , à une concentration de 1600 μM , causent une diminution de la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPPC6 wt à partir de 40°C pour atteindre un état complètement déplié à partir d'une

température de 78°C avec un T_m apparent de 59.77 °C. La courbe de dénaturation thermique en présence d'ions Mg^{2+} est située à la droite de la courbe en présence d'ions Ca^{2+} . Cette observation nous indique que l'interaction des ions Mg^{2+} avec le repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt influence plus faiblement la stabilité thermodynamique que celle observée des ions Ca^{2+} .

Comme nous pouvons remarquer dans la figure 30B et C, seulement la présence des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} ont favorisé un repliement en hélices α avec un même signal CD à température pièce, mais qui est moins stable face à l'augmentation de la température comparativement à la forme apo du segment C-terminal TRPC6. Cette découverte est d'une importance capitale étant donné que le segment C-terminal des canaux TRPC6 est intracellulaire et ces deux ions sont présents avec des concentrations variables en réponse aux différentes fonctions cellulaires. Il faut noter que la concentration du Mg^{2+} intracellulaire est de l'ordre de 2 mM ce qui amène un point important de la proximité des concentrations utilisées expérimentales aux concentrations physiologiques. Pour les ions Ca^{2+} , il faut se rappeler que le segment C-terminal du canal TRPC6 est à proximité de l'ouverture du pore du canal et également à proximité des récepteurs-canaux IP_3R . Selon ce positionnement, nous pouvons imaginer que le segment C-terminal TRPC6 est sans cesse confronté à des concentrations élevées, mais temporaires d'ions Ca^{2+} lors de la relâche du Ca^{2+} du RE ainsi que suite à l'ouverture du canal TRPC6 et ce avant le retour de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire à un niveau basal dans l'ordre du nM. La compréhension de l'effet de ces deux ions physiologiques sur le repliement et la stabilité thermodynamique de la structure du segment C-terminal TRPC6 est donc très importante pour comprendre l'impact de la variation ionique sur la dynamique de la structure et également comprendre si les mutations E897K et R895C peuvent influencer l'interaction de la structure avec ces ions.

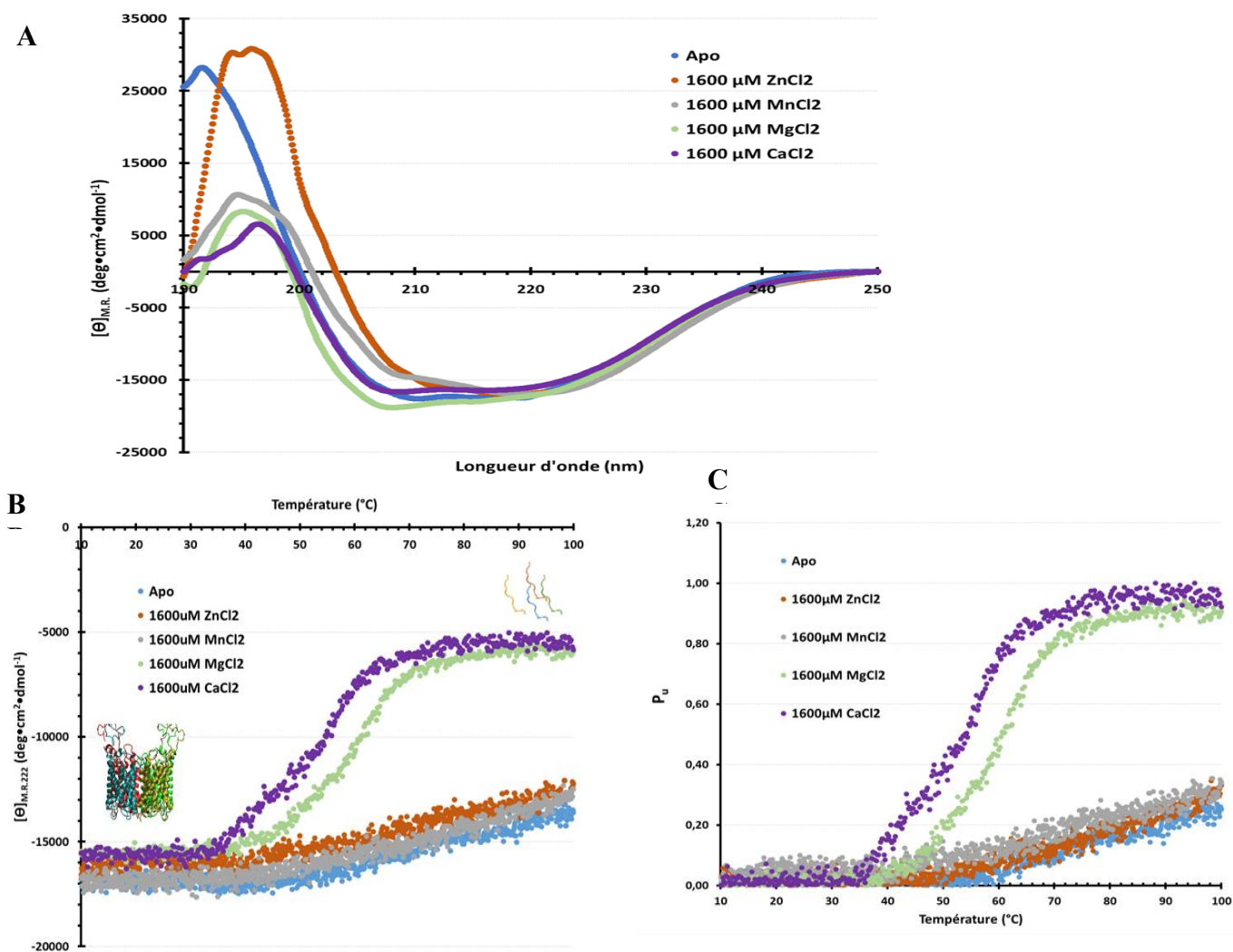


Figure 30: Spectres CD du segment C-terminal TRPC6wt en présence d'ions métalliques Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} et Ca^{2+} . (A) Spectre CD à température pièce du segment C-terminal TRPC6wt en présence de 1600 μM de ZnCl_2 ou MnCl_2 ou MgCl_2 ou CaCl_2 en mesurant l'intensité dichroïque exprimée en ellipticité molaire ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) en fonction de la variation de la longueur d'onde de 190 à 250 nm. (B) Figure présentant les spectres de dénaturation thermique mesurés à 222 nm suivant l'intensité du signal exprimé en ellipticité molaire ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) en fonction la variation de la température ($^{\circ}\text{C}$) selon la présence des différents ions. (C) les résultats normalisés entre des valeurs de 0 (état natif replié) et 1 (état dénaturé) en fonction de la variation de de température ($^{\circ}\text{C}$)

10. L'influence de la variation de concentration de Ca^{2+} sur la structure et la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 wt

La présence d'une forte concentration de Ca^{2+} (1600 μM) diminue d'une façon ion spécifique la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6 wt. Nous avons alors voulu comprendre si cette stabilité thermodynamique était dépendante de la variation de concentration ionique de Ca^{2+} . Pour cela, nous avons mesuré la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 à une concentration de 50 μM à une longueur d'onde de 222 nm en présence d'une variation de concentration d'ions Ca^{2+} allant de 50 à 2000 μM . À température pièce, la variation de concentration des ions Ca^{2+} dans le milieu n'influence pas l'intensité du signal CD mesuré à 222 nm du repliement de la structure du segment C-terminal TRPC6 wt (figure 31A). L'augmentation de la concentration des ions Ca^{2+} dans le milieu diminue l'intensité du signal CD mesuré à 195 nm comparativement à celle observée pour la forme apo du segment C-terminal TRPC6 wt (figure 31A). Également, nous pouvons observer une augmentation de l'intensité du signal CD mesuré à 208 nm de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6 wt en présence de 2 mM de Ca^{2+} . La variation de la concentration des ions Ca^{2+} n'a pas influencé l'intensité du signal mesuré à 222 nm à température pièce, par contre nous avons voulu vérifier si la variation de la concentration d'ions Ca^{2+} influence la stabilité thermodynamique de la structure secondaire en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt (figure 31B). L'augmentation de la concentration d'ions Ca^{2+} induit une diminution de la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6 wt. Comme présenté à la figure 31B, on peut remarquer que les concentrations allant de 50 et 100 μM de Ca^{2+} induisent une dénaturation thermique à 222 nm incomplète sans atteindre un plateau totalement dénaturé dans la fenêtre de température expérimentale de l'étude. À partir de 200 μM de Ca^{2+} , la présence de Ca^{2+} induit une dénaturation thermique complète du repliement en hélices α de la structure du C-

terminal TRPC6 wt traduite par un spectre de dénaturation de type coopératif allant d'un état natif vers un état complètement dénaturé. À noter qu'il n'y a aucun état intermédiaire observable dans la fenêtre de température de 10 à 100°C pour l'ensemble des spectres de dénaturations thermiques en présence d'ions Ca^{2+} . Ainsi, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} diminue la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt en migrant le spectre CD de dénaturation thermique vers de plus basses températures. Afin de comparer les courbes de dénaturations thermiques obtenues entre elles, nous avons normalisé les spectres entre 0 et 1, sachant que 1 étant l'intensité de signal mesuré à 222 nm de l'état dénaturé maximal et 0 celui de l'état natif replié de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6 wt (figure 31C). Les concentrations de 400 μM à 2 mM de Ca^{2+} induisent une dénaturation thermique complète, à deux états, du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt. Ceci nous permet de déterminer les valeurs du T_m apparent en fonction de la variation de la concentration d'ions Ca^{2+} dans le milieu. Comme présenté à la figure 31D, le T_m apparent du segment C-terminal TRPC6 wt en présence de 400 μM de Ca^{2+} est de 74.3°C et diminue d'une façon concentration Ca^{2+} dépendante pour atteindre un T_m minimal expérimental d'une valeur de 42.7°C en présence de 2 mM de Ca^{2+} .

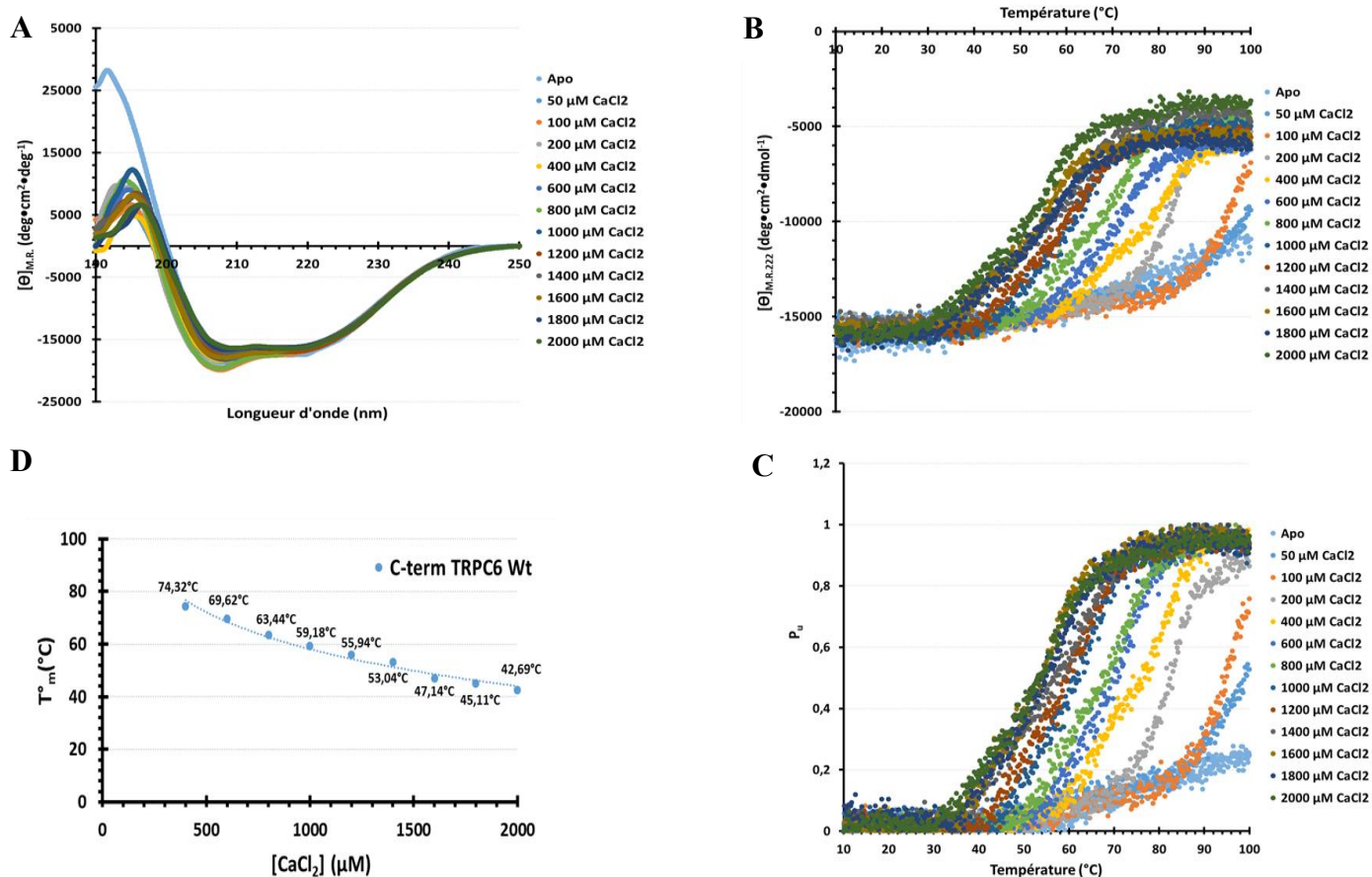


Figure 31: L'effet de la variation d'ions Ca²⁺ sur le repliement et la stabilité thermodynamique structurale du segment C-terminal TRPC6 wt. (A) Spectres CD à température pièce mettant en relation l'intensité dichroïque mesurée du segment C-terminal TRPC6wt exprimé en ellipticité molaire (deg.cm².dmol⁻¹) en présence d'une variation de concentration d'ions Ca²⁺ (de 50 à 2000μM) en fonction de la variation de la longueur d'onde de 190 à 250 nm. (B) Figure présentant les spectres de dénaturation thermique mesurés à 222 nm du repliement du C-terminal TRPC6 wt en présence d'une variation de [Ca²⁺] allant de (50 à 2000μM) en fonction la variation de la température (°C). (C) les résultats des spectres de dénaturations thermiques normalisés entre des valeurs de 0 (état natif replié) et 1 (état dénaturé) en fonction de la variation de de température (°C). (D) Les valeurs des Tm° calculés (°C) pour le segment C-terminal TRPC6 en fonction de la variation de concentration des ions Ca²⁺

11. L'influence de la variation de concentration de Ca^{2+} sur la structure et la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 E897K

Nous avons démontré que la variation de la concentration du Ca^{2+} dans le milieu influence la stabilité thermodynamique de la structure du segment C-terminal TRPC6 de type sauvage. Suite à ce résultat, nous avons voulu étudier l'effet de la mutation E897K sur la stabilité thermodynamique du repliement du segment C-terminal TRPC6 face à la variation de la concentration des ions Ca^{2+} . La variation de concentration des ions Ca^{2+} dans le milieu n'a pas modifié l'intensité du signal mesuré du spectre CD du segment C-terminal TRPC6 E897K entre les longueurs d'onde de 220 et 250 nm (figure 32A). Nous avons également remarqué que l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} diminue d'une façon significative l'intensité du signal CD du segment C-terminal TRPC6 E897K à la longueur d'onde de 208 nm. La variation de la concentration de Ca^{2+} a également modifié d'une façon aléatoire l'intensité du signal enregistré à 195 nm du segment C-terminal TRPC6 E897K. Nous avons complété l'étude de l'effet de la variation d'ions Ca^{2+} sur la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 E897K. La figure 32B présente la stabilité thermodynamique à 222 nm du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 E897K en fonction de la variation de concentration des ions Ca^{2+} allant de 50 μM jusqu'à 2 mM sur une fenêtre de température allant de 10 à 100°C. À de faibles concentrations de 50 à 200 μM , les ions Ca^{2+} n'induisent pas une dénaturation thermique complète du repliement en hélices α du C-terminal TRPC6 E897K dans le cadre de température expérimentale utilisée. À partir d'une concentration de 400 μM , la présence des ions Ca^{2+} dans le milieu diminue la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 E897K avec des profils spectraux de dénaturation thermique complète à deux états sans intermédiaire observable (figure 32B). À la figure 32C, nous avons normalisé les courbes de dénaturation thermique obtenues entre des valeurs de 1 et 0, 1 étant le signal le plus faible observé pour un état dénaturé et 0 étant le niveau natif observé à 222 nm du segment

C-terminal TRPC6 E897K. À la température maximale de 100°C, nous pouvons observer que les concentrations de 100 et 200 μM de Ca^{2+} induisent une dénaturation incomplète avec un niveau de repliement en hélices α résiduel de 45% comparativement au repliement initial du mutant E897K enregistré à 222 nm. De plus, à partir d'une concentration de 400 μM jusqu'à une concentration de 1 mM de Ca^{2+} , on peut observer que l'intensité du signal CD du repliement en hélices α du mutant E897K commence à diminuer à partir d'une température de 40°C. Pour les concentrations de 1200 à 2000 μM , le signal enregistré à 222 nm du repliement hélical du mutant E897K commence à diminuer à partir des températures de 34 et 27°C respectivement (figure 32C). À une concentration de 400 μM de Ca^{2+} , nous avons calculé un T_m apparent de 85.61°C (figure 32D). L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} de 400 à 1600 μM diminue T_m apparent du repliement en hélices α de la structure C-terminal TRPC6 E897K d'une valeur de 33.00°C jusqu'à 53.82°C. Les valeurs du T_m apparent sont faiblement modifiées dans les conditions de 1600 à 2000 μM de Ca^{2+} avec des variations de $\pm 0.4^\circ\text{C}$.

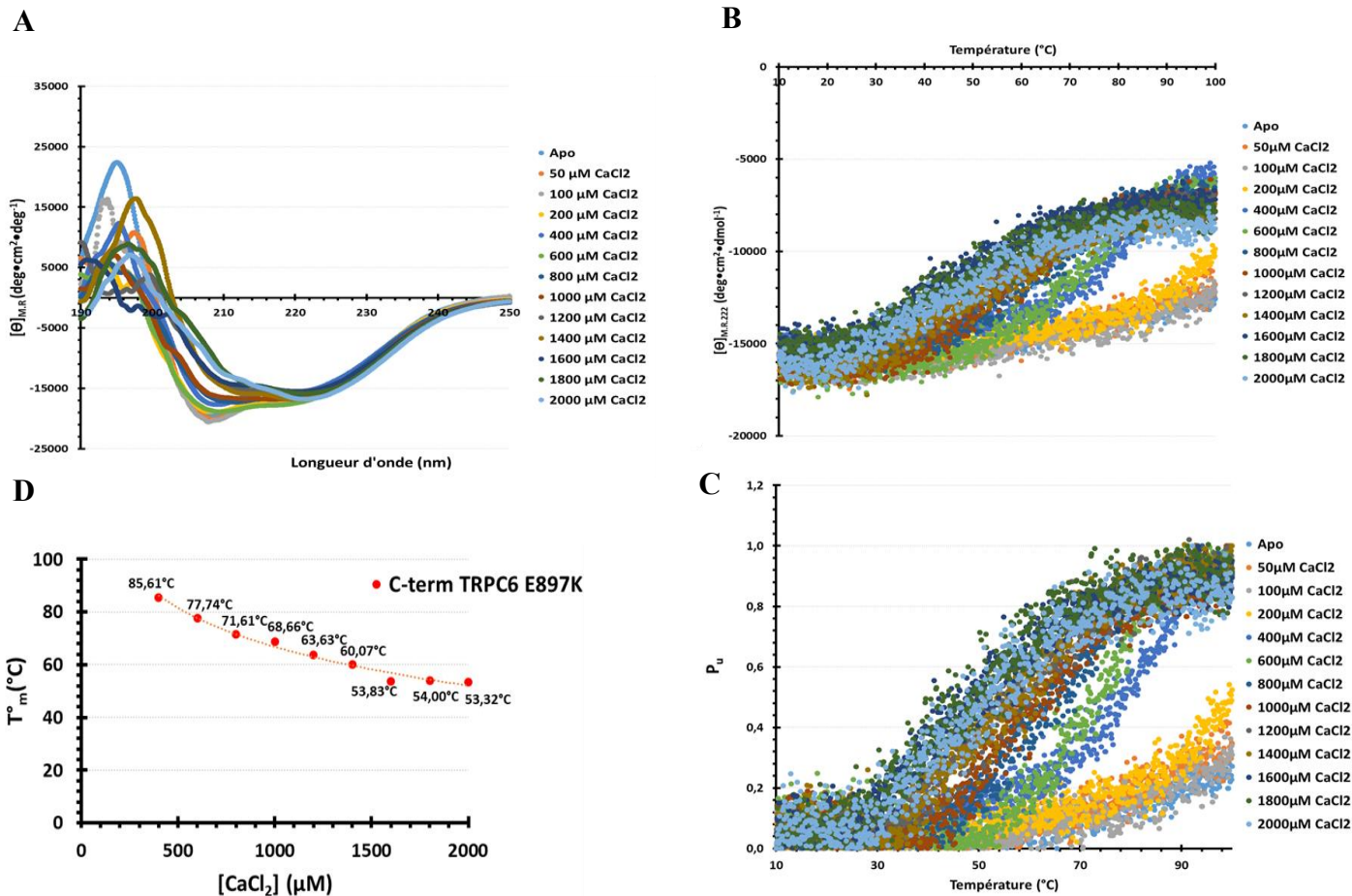


Figure 32: L'effet de la variation d'ions Ca²⁺ sur le repliement et la stabilité thermodynamique structurale du segment C-terminal TRPC6 E897K (A) Spectres CD à température pièce mettant en relation l'intensité dichroïque mesurée du segment C-terminal TRPC6 E897K exprimé en ellipticité molaire (deg.cm².dmol⁻¹) en présence d'une variation de concentration d'ions Ca²⁺ (de 50 à 2000μM) en fonction de la variation de la longueur d'onde de 190 à 250 nm. (B) Figure présentant les spectres de dénaturation thermique mesurés à 222 nm du repliement du C-terminal TRPC6 E897K en présence d'une variation de [Ca²⁺] allant de (50 à 2000μM) en fonction la variation de la température (°C). (C) les résultats des spectres de dénaturations thermiques normalisés entre des valeurs de 0 (état natif replié) et 1 (état dénaturé) en fonction de de température (°C) (D) Les valeurs des T_m^o calculés (°C) pour le segment C-terminal TRPC6 en fonction de la variation de concentration des ions Ca²⁺

12. L'influence de la variation de concentration de Ca^{2+} sur la structure et la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 R895C

Nous avons aussi vérifié l'effet de la variation de concentration d'ions Ca^{2+} sur le repliement et la stabilité thermodynamique de la structure secondaire du mutant R895C. Comme présenté à la figure 33A, nous pouvons observer que la présence de Ca^{2+} induit une diminution de la stabilité thermodynamique seulement à une forte concentration, contrairement aux deux autres segments C-terminaux TRPC6. Dans nos conditions expérimentales, la variation de la concentration Ca^{2+} ne modifie pas l'intensité du signal CD de la structure secondaire du C-terminal TRPC6 R895C entre les longueurs d'onde de 210 nm jusqu'à 250 nm à température pièce (figure 33A). À 208 nm, le Ca^{2+} influence l'intensité du signal CD de la structure secondaire d'une manière aléatoire. À des concentrations de 1200 et 1400 μM , le Ca^{2+} n'influence pas l'intensité du signal à 208 nm. Par contre l'ajout des concentrations de 1000, 1600 et 2000 μM augmente l'intensité du signal de 23% comparativement à la forme apo. La présence de 1800 μM de Ca^{2+} a enregistré une augmentation de 39% de l'intensité du signal CD mesuré à 208 nm de la structure secondaire du mutant R895C du segment C-terminal TRPC6. Au niveau de la longueur d'onde de 195 nm, les différentes concentrations de Ca^{2+} ont induit une diminution de l'intensité du signal CD de la structure secondaire du mutant R895C comparativement à la forme apo. Compte tenu du fait que le repliement en hélices α est majoritaire au niveau de la structure secondaire du C-terminal TRPC6 R895C, nous avons étudié sa stabilité thermodynamique à 222 nm en présence de la variation de concentration des ions Ca^{2+} à des concentrations allant de 1000 jusqu'à 2000 μM (figure 33B). Nous pouvons remarquer que le Ca^{2+} à des concentrations de 1000 et 1200 μM n'induit pas une dénaturation thermique complète à deux états du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 R895C. À partir d'une concentration de 1400 μM de Ca^{2+} , on observe une diminution de la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 R895C pour atteindre un état complètement dénaturé (figure 33B).

L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} , de 1400 jusqu'à 2000 μM , augmente la sensibilité thermique du repliement en hélices α du mutant R895C. Ceci se traduit par la migration des spectres CD de dénaturation thermique vers des températures plus faibles (figure 33B). À la figure 33C, la présence de Ca^{2+} à une concentration de 1200 μM a pu diminuer l'intensité du signal du repliement en hélices α de 27 % à 100°C comparativement à celle mesurée en présence de 1000 μM de Ca^{2+} ainsi qu'à la forme apo du mutant R895C. Nous remarquons également que la transition vers un état dénaturé de la structure du segment C-terminal TRPC6 R895C débute à des températures de 46°C pour les concentrations de 1200 et 1400 μM de Ca^{2+} et à 40°C pour les concentrations de 1600 jusqu'à 2000 μM . La dénaturation thermique complète en deux états du repliement en hélices α du mutant R895C nous permet de calculer la valeur du T_m apparent pour les concentrations allant de 1400 jusqu'à 2000 μM . Comme présenté à la figure 33D, la présence de Ca^{2+} à 1400 μM a permis de générer une dénaturation thermique complète avec un T_m apparent de 92.42°C du repliement en hélices α de la structure du mutant R895C. L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} a diminué la valeur du T_m apparent du mutant R895C d'une façon significative pour atteindre une valeur minimale de 72.26°C suite à l'ajout de 2000 μM de Ca^{2+} .

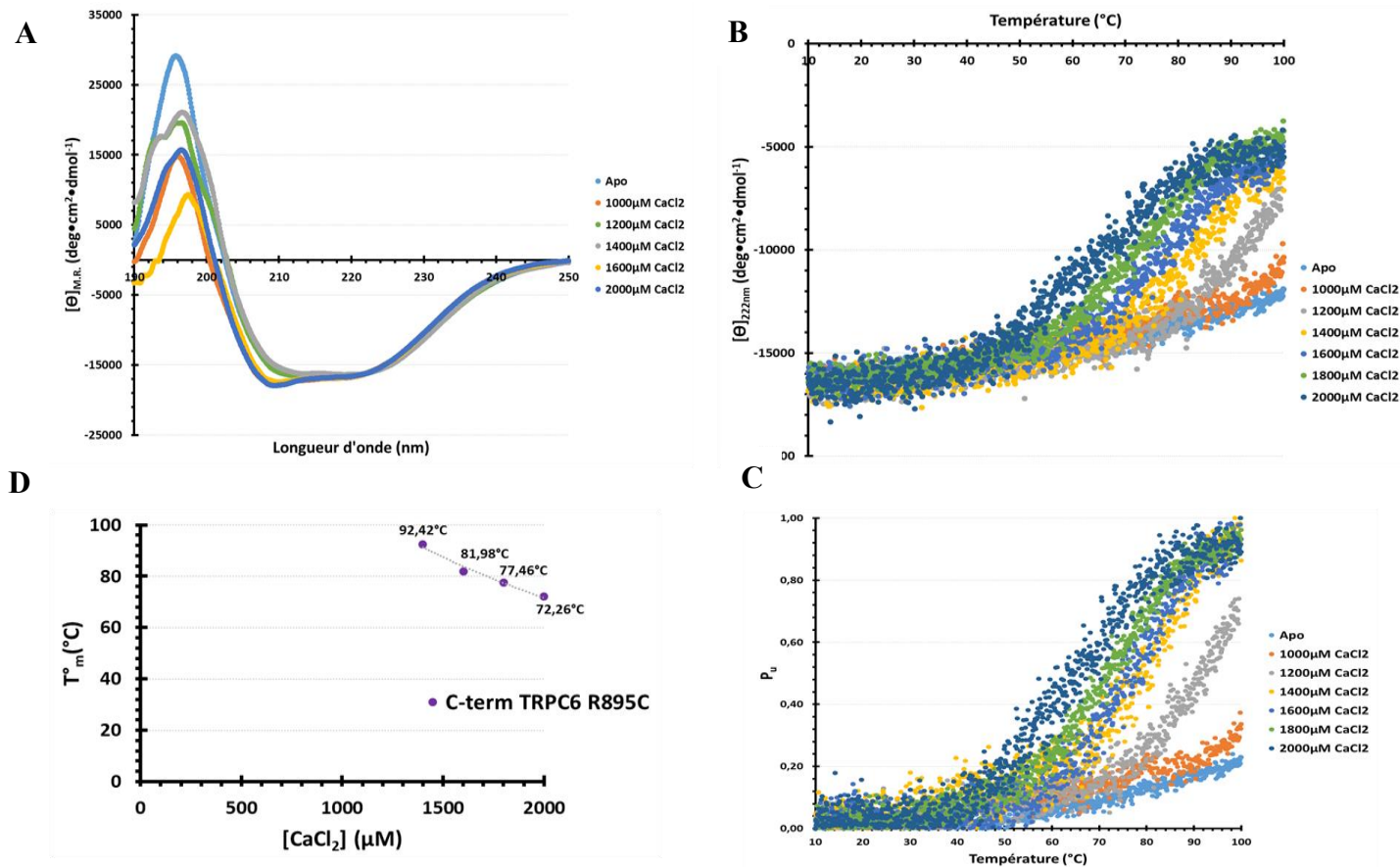


Figure 33: L'effet de la variation d'ions Ca^{2+} sur le repliement et la stabilité thermodynamique structurale du segment C-terminal TRPC6 R895C (A) Spectres CD à température pièce mettant en relation l'intensité dichroïque mesurée du segment C-terminal TRPC6 E897K exprimé en ellipticité molaire ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) en présence d'une variation de concentration d'ions Ca^{2+} (de 1000 à 2000 μM) en fonction de la variation de la longueur d'onde de 190 à 250 nm. (B) Figure présentant les spectres de dénaturation thermique mesurés à 222 nm du repliement du C-terminal TRPC6 R895C en présence d'une variation de $[\text{Ca}^{2+}]$ allant de (1000 à 2000 μM) en fonction la variation de la température ($^{\circ}\text{C}$). (C) les résultats des spectres de dénaturations thermiques normalisés entre des valeurs de 0 (état natif replié) et 1 (état dénaturé) en fonction de la variation de de température ($^{\circ}\text{C}$) (D) Les valeurs des T_m° calculés ($^{\circ}\text{C}$) pour le segment C-terminal TRPC6 en fonction de la variation de concentration des ions Ca^{2+}

13. L'impact de la variation de concentration de Mg^{2+} sur la structure et la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 wt

Tout comme le Ca^{2+} , le Mg^{2+} est le deuxième ion spécifique à pouvoir diminuer la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α de la structure du segment C-terminal TRPC6 wt (figure 30). Cette observation nous a amenés à explorer l'effet de la variation ionique des ions Mg^{2+} , allant de $50\mu M$ à $2000\mu M$, sur la structure et stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6. À température pièce, la variation de la concentration de Mg^{2+} n'influence pas l'intensité du signal CD de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6 wt entre les longueurs d'onde de 214 nm jusqu'à 250 nm (figure 34A). À la longueur d'onde de 208 nm, l'ensemble des concentrations de Mg^{2+} ont augmenté d'une façon similaire l'intensité du signal CD de 13 % comparativement au signal enregistré pour la forme apo du même segment. L'intensité du signal enregistré à 195 nm a été diminuée de 52% suite à l'ajout de $50\mu M$ de Mg^{2+} jusqu'à atteindre une diminution de 80% à une concentration de $2000\mu M$ de Mg^{2+} comparativement au signal CD de la forme apo du segment C-terminal TRPC6 wt. Le Mg^{2+} favorise le repliement en hélices α sur l'ensemble des concentrations utilisées dans l'essai. La stabilité thermodynamique du repliement en hélices α de la structure du segment C-terminal TRPC6 wt en présence d'une variation de la concentration de Mg^{2+} a été étudiée à la longueur d'onde de 222 nm sur une fenêtre de température expérimentale allant de 10 à $100^{\circ}C$ (figure 34B). Dans nos conditions expérimentales, la présence de Mg^{2+} à des concentrations inférieures à $400\mu M$ dans le milieu n'induit pas une dénaturation thermique complète à deux états du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt. À la température maximale de $100^{\circ}C$, les concentrations de 50, 100 et $200\mu M$ d'ions Mg^{2+} ont pu réduire l'intensité CD enregistrée à 222 nm du repliement en hélices α de 45, 58 et 72% respectivement (figure 34B et C). Pour les concentrations supérieures à $400\mu M$, la présence d'ions Mg^{2+} dans le milieu permet d'obtenir une dénaturation thermique complète en deux états et un déplacement des courbes vers des

températures plus basses (figure 34B et C). Comme présenté à la figure 34D, nous avons pu calculer les valeurs du T_m apparent pour l'ensemble des essais en présence de Mg^{2+} et ce allant d'un T_m de $87.32^\circ C$ en présence de $400\mu M$ de Mg^{2+} jusqu'à un T_m minimal enregistré de $58.23^\circ C$ en présence de $2000\mu M$ de Mg^{2+} . Également, la variation du T_m (ΔT_m) entre les concentrations de 400 à $1000\mu M$ est de $22.88^\circ C$, tandis que la variation du T_m entre les concentrations de 1200 à $2000\mu M$ d'ions Mg^{2+} est de $3.93^\circ C$. Ceci démontre que le Mg^{2+} à faible concentration a un effet plus important sur la variation de la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt comparativement à l'effet observé à de fortes concentrations de Mg^{2+} .

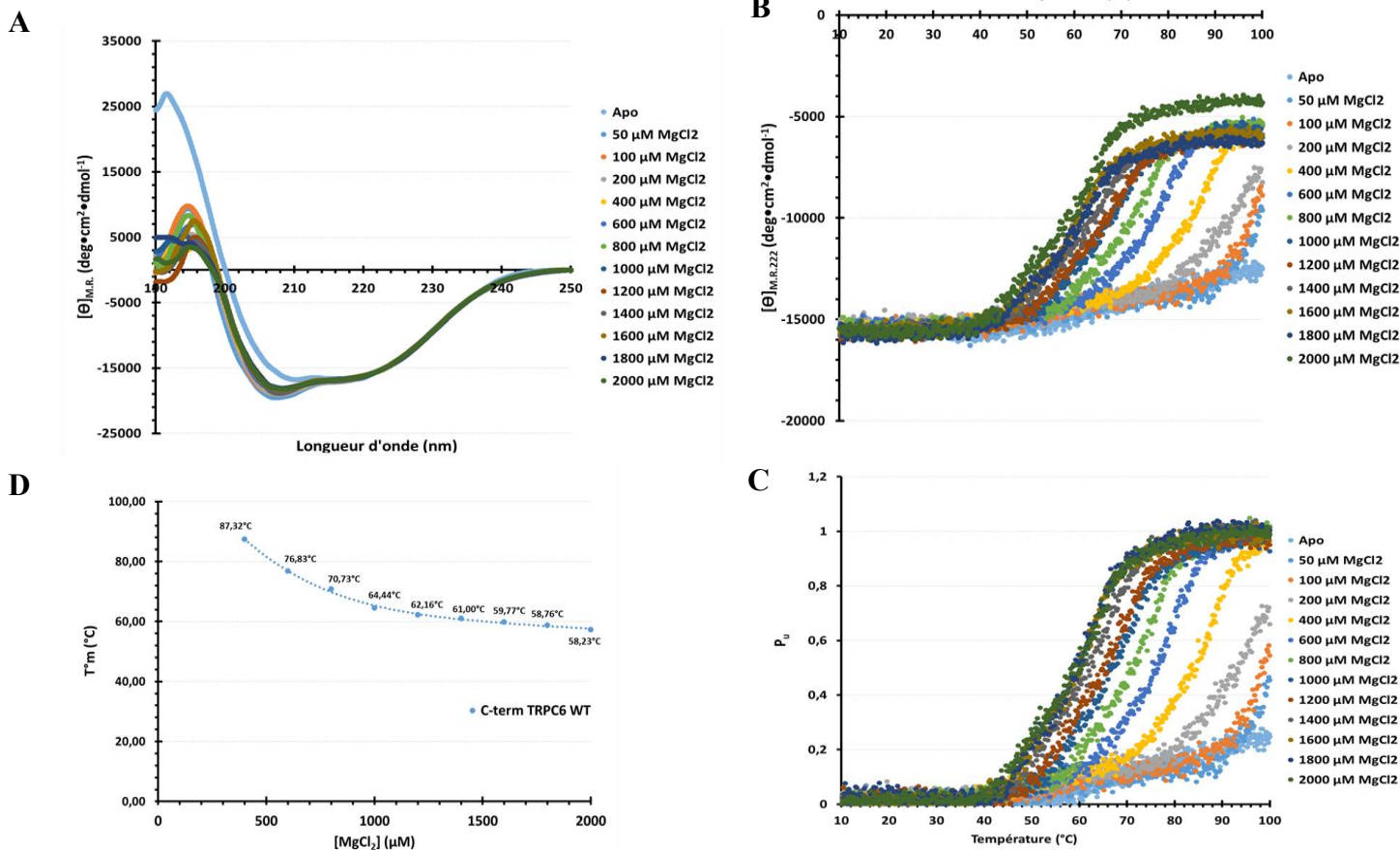


Figure 34: L'effet de la variation d'ions Mg²⁺ sur le repliement et la stabilité thermodynamique structurale du segment C-terminal TRPC6 wt. (A) Spectres CD à température pièce mettant en relation l'intensité dichroïque mesurée du segment C-terminal TRPC6 wt exprimé en ellipticité molaire (deg·cm²·dmol⁻¹) en présence d'une variation de concentration d'ions Mg²⁺ (de 50 à 2000μM) en fonction de la variation de la longueur d'onde de 190 à 250 nm. (B) Figure présentant les spectres de dénaturation thermique mesurés à 222 nm du repliement du C-terminal TRPC6 wt en présence d'une variation de [Mg²⁺] allant de (1000 à 2000μM) en fonction la variation de la température (°C). (C) les résultats des spectres de dénaturations thermiques normalisés entre des valeurs de 0 (état natif replié) et 1 (état dénaturé) en fonction de la variation de de température (°C) (D) Les valeurs des T_m^o calculés (°C) pour le segment C-terminal TRPC6 en fonction de la variation de concentration des ions Mg²⁺

14. L'influence de la variation de concentration de Mg^{2+} sur la structure et stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 E897K

Dans une même démarche expérimentale, l'effet de la variation de concentration de Mg^{2+} sur le repliement et la stabilité thermodynamique de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6 E897K a été investigué. Nous avons évalué l'effet de la variation de la concentration des ions Mg^{2+} , de 50 à 2000 μM , sur le spectre CD de la structure du segment C-terminal E897K. À température pièce, la variation de la concentration de Mg^{2+} n'influence pas l'intensité du signal CD de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6 E897K entre les longueurs d'onde de 214 nm jusqu'à 250 nm (résultats non présentés dans cet ouvrage). Au niveau des essais de dénaturation thermique, aucune concentration, entre 50 μM et 1800 μM d'ions Mg^{2+} , n'a pu induire une dénaturation thermique complète à deux états du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 E897K. Afin d'alléger le spectre, la figure 35A présente la relation de l'effet de l'ajout de 2000 μM d'ions Mg^{2+} sur la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 E897K. Comme on peut le remarquer, la présence d'ion Mg^{2+} n'a pas induit une dénaturation thermique complète du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 E897K. À 100°C, j'ai enregistré une diminution de l'intensité du signal d'hélices α de 48% en présence de 2000 μM de Mg^{2+} . Ceci implique que la température de 100°C est très proche de la valeur du T_m du segment C-terminal TRPC6 E897K puisque nous sommes proches à réduire la structure de 50% de son état initial.

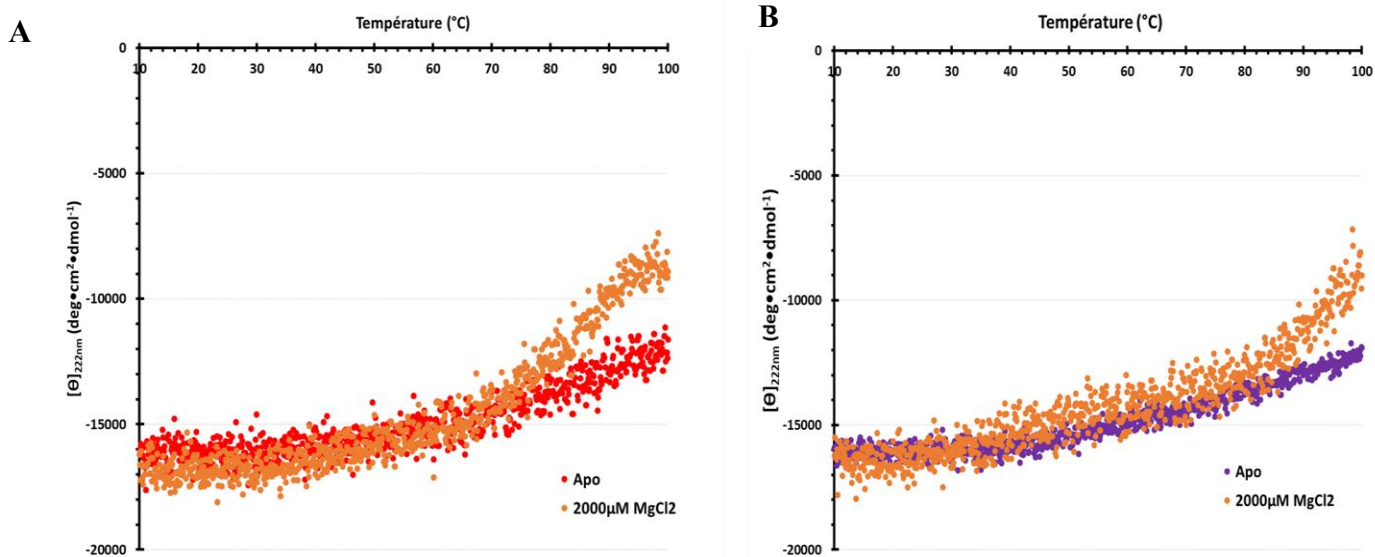


Figure 35: L'effet des ions Mg^{2+} sur la stabilité thermodynamique des segments C-terminal TRPC6 E897K et R895C. (A) Figure présentant les spectres de dénaturation thermique mesurés à 222 nm du repliement du C-terminal TRPC6 E897K en présence d'une concentration de Mg^{2+} 2000 μ M en fonction la variation de la température ($^{\circ}C$). (B) Figure présentant les spectres de dénaturation thermique mesurés à 222 nm du repliement du C-terminal TRPC6 R895C en présence d'une concentration de Mg^{2+} 2000 μ M en fonction la variation de la température ($^{\circ}C$).

15. L'influence de la variation de concentration de Mg^{2+} sur la structure et la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 R895C

Nous avons démontré que les ions Mg^{2+} exercent un faible effet sur la stabilité thermique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 E897K. Également nous avons démontré que la stabilité thermodynamique de la structure du segment C-terminal R895C est plus stable que celle du segment E897K face à la variation d'ions Ca^{2+} . Nous avons alors exploré l'effet des ions Mg^{2+} à une concentration maximale de 2000 μM sur la structure et la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 R895C. À température pièce, la présence de 2000 μM de Mg^{2+} n'exerce aucune modification au niveau du profil et l'intensité du signal CD enregistré du segment C-terminal TRPC6 R895C entre les longueurs d'onde de 214 nm jusqu'à 250 nm (résultats non présentés dans cet ouvrage). Pour les essais de dénaturations thermiques, une concentration de 2000 μM de Mg^{2+} influence très faiblement la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 R895C sans atteindre une dénaturation thermique complète à deux états. Comme on peut remarquer à la figure 35B, la présence de 2000 μM Mg^{2+} diminue de 47% le repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 R895C comparativement au niveau de repliement initial à une température de 100°C.

16. L'influence de la variation de concentration des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sur la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 wt

Nous avons démontré que les ions Mg^{2+} , tout comme les ions Ca^{2+} , diminuent d'une façon concentration dépendante la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt. Comme présenté à la figure 36, les valeurs des T_m apparents en présence de Mg^{2+} sont plus élevées que celles obtenues en présence de Ca^{2+} pour les mêmes concentrations ioniques. Ceci indique que l'interaction des ions Ca^{2+} avec le repliement du segment C-terminal TRPC6 wt diminue plus fortement la stabilité thermodynamique de son repliement en hélices α comparativement à l'interaction avec les ions Mg^{2+} . Il est à noter que les concentrations expérimentales de Mg^{2+} qui ont eu un effet sur la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du C-terminal TRPC6 wt sont dans un ordre de concentration retrouvées au niveau physiologique ($[\text{Mg}^{2+}]_i \sim 1$ à 1.5 mM).

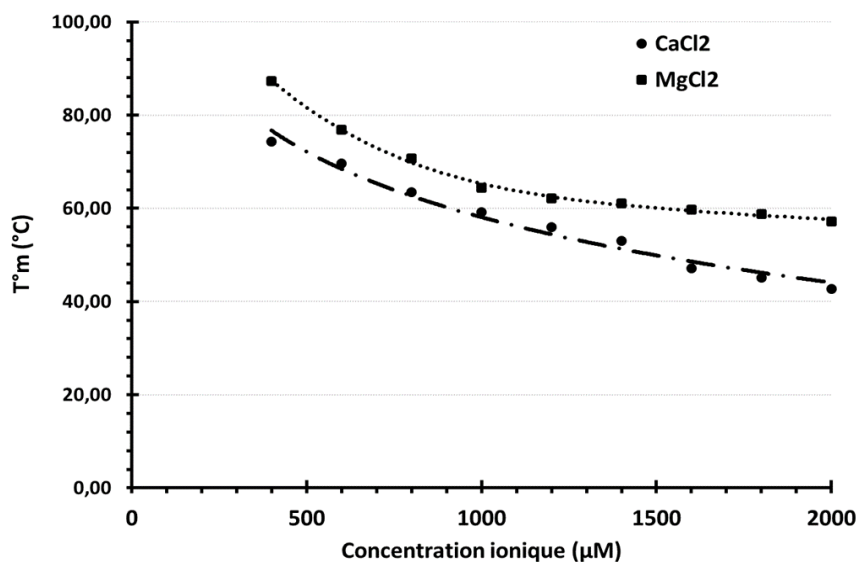
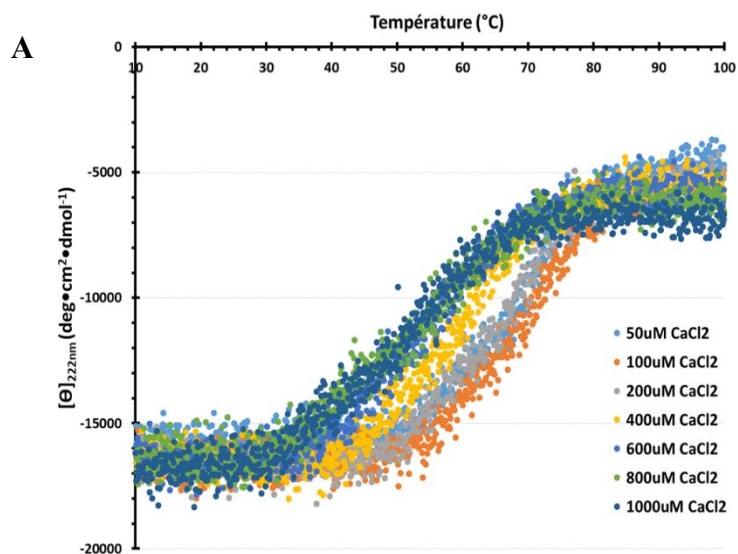


Figure 36: Effet des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sur la variation du T_m° obtenus le segment C-terminal TRPC6 wt. Compilation des valeurs des T_m° calculés (°C) pour le segment C-terminal TRPC6 wt en fonction de la variation de concentration des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} .

Compte tenu du fait que le milieu intracellulaire contient une concentration dynamique des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} qui varie en fonction des réactions cellulaires et que le C-terminal du canal TRPC6 est situé dans ce milieu ionique, nous avons voulu vérifier si les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} pourraient avoir des interactions synergiques avec la structure secondaire du C-terminal TRPC6. Pour ce faire, la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt a été étudiée en présence d'une concentration constante de Mg^{2+} fixée à 1mM avec une variation de la concentration d'ions Ca^{2+} allant de 50 à 1000 μ M (figure 37). Comme présenté à la figure 37A, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} diminue la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 wt en présence de 1 mM Mg^{2+} . Nous avons pu remarquer que comparativement aux conditions en présence de Ca^{2+} seulement, les faibles concentrations en Ca^{2+} avec 1 mM de Mg^{2+} réduisent la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt. Comme présenté à la figure 37B, en présence de 50, 100, 200 μ M Ca^{2+} nous n'avons pas pu observer un T_m apparent dû à l'absence d'une dénaturation thermique complète du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt. Pour les mêmes concentrations d'ions de Ca^{2+} 50, 100 et 200 μ M avec l'ajout de 1000 μ M de Mg^{2+} nous avons pu obtenir des spectres de dénaturation thermique complets à deux états et par l'effet même, déterminer les valeurs de T_m apparent de 64.4, 62.1 et 60.1 °C respectivement. L'ajout du Mg^{2+} aux ions Ca^{2+} , pour les concentrations entre 50 et 200 μ M, provoque une diminution marquante de la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt avec une variation de T_m entre 35 et 39 °C (figure 37B).



B

[CaCl ₂] (μM)	T _m _{CaCl₂}	T _m _{CaCl₂+MgCl₂} *	ΔT _m
50	---	64,4 °C	> 35,6 °C
100	---	62,1 °C	> 37,9 °C
200	---	60,1 °C	> 39,9 °C
400	74,3 °C	57,5 °C	16,8 °C
600	69,6 °C	53,8 °C	15,8 °C
800	63,4 °C	52,2 °C	10,9 °C
1000	59,2 °C	51,4 °C	7,8 °C

* Rajout de 1 mM MgCl₂

Figure 37: L'effet complémentaire des ions Mg²⁺ et Ca²⁺ sur la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 wt. (A) Figure présentant les spectres de dénaturation thermique mesurés à 222 nm du repliement du C-terminal TRPC6 wt en présence d'une concentration fixe de Mg²⁺ à 1000μM avec une variation de la concentration des ions Ca²⁺ allant de (50 à 1000μM) en fonction la variation de la température (°C). (B) Valeurs des T° calculés pour le segment C-terminal TRPC6 wt dans les conditions calcium seulement, ou calcium avec magnésium et la variation des deux T°_m pour chacune des conditions (ΔT_m) et ce selon la variation de la concentration des ions Ca²⁺.

À la figure 38, nous avons vérifié la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α des segments C-terminaux TRPC6 wt, R895C et E897K selon quatre conditions expérimentales : en présence de 1 mM de Ca^{2+} , 1 mM de Mg^{2+} , une solution de 1mM de Ca^{2+} et 1mM de Mg^{2+} et une solution de 2 mM d'ions Ca^{2+} seulement. Cette étape expérimentale était réalisée afin de vérifier si l'impact sur la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 est de type additif entre les deux ions ou complémentaire. En d'autres termes, est-ce que l'addition des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} provoquent un effet plus important ou égal à la somme de leurs impacts individuels sur la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6. Comme décrit précédemment, 1mM Ca^{2+} de même que 1 mM Mg^{2+} induit une dénaturation thermodynamique complète du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 wt (figure 38A). Le spectre CD de la dénaturation thermodynamique en présence de 1mM de Ca^{2+} et de 1 mM Mg^{2+} est quasi superposable sur celle avec 2 mM Ca^{2+} . Cette observation nous démontre que les deux ions jouent un rôle complémentaire sur le repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6. Pour le segment C-terminal TRPC6 E897K, la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment en présence de 1 mM de Ca^{2+} et 1 mM Mg^{2+} présente une courbe superposable à celle obtenue lors de l'ajout de 1 mM Ca^{2+} uniquement. Cette observation est en lien avec le faible effet des ions Mg^{2+} sur la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 E897K (figure 38 B). Des résultats similaires ont été obtenus pour le segment C-terminal TRPC6 R895C (figure 38 C).

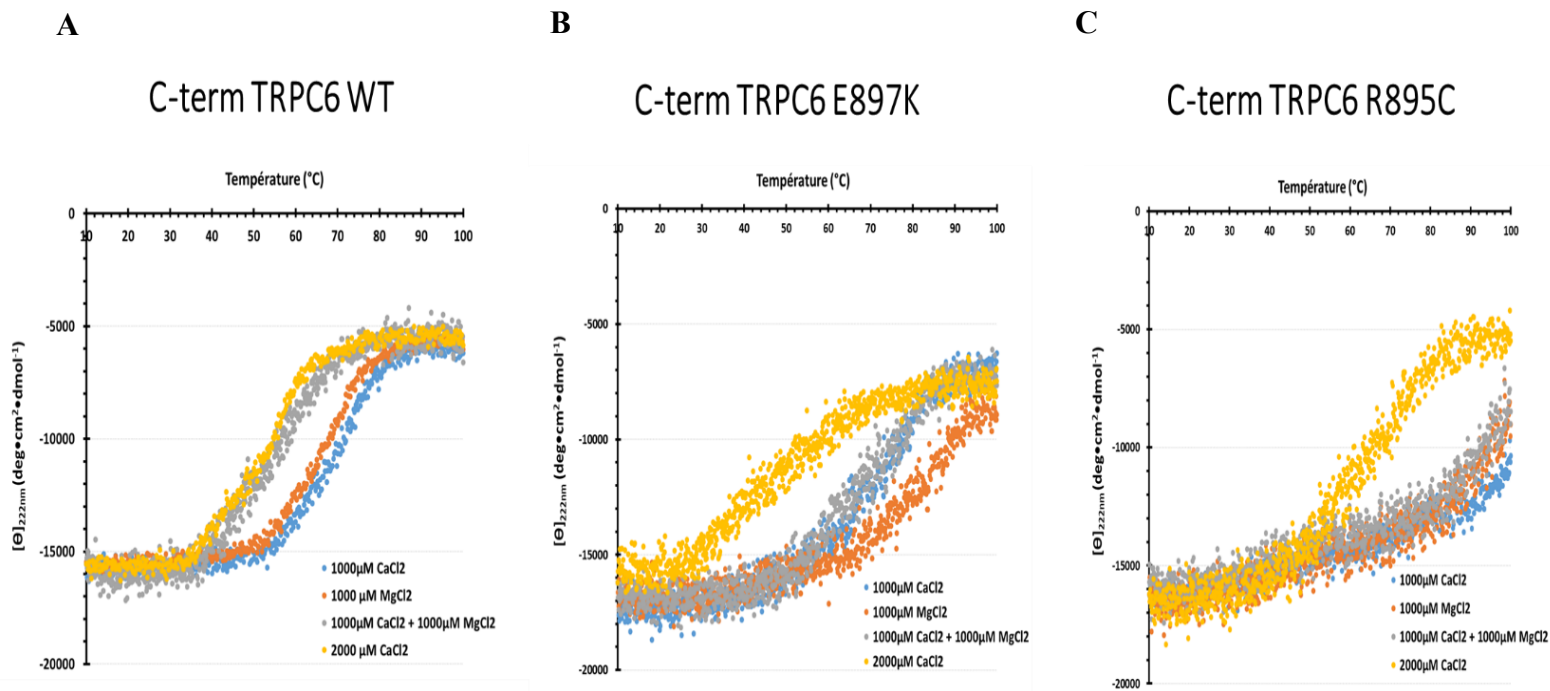


Figure 38: L'effet complémentaire des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} sur la stabilité thermodynamique des segments C-terminal TRPC6 wt, E897K et R895C. Figure qui présente les spectres de dénaturation thermique mesurés à 222 nm du repliement des segments C-terminaux TRPC6 wt (A), E897K (B) et R895C (C) selon 4 conditions : en présence de 1000 μ M de $CaCl_2$, 1000 μ M de $MgCl_2$, 1000 μ M de $CaCl_2$ +1000 μ M de $CaCl_2$ et en présence de 1000 μ M de $CaCl_2$ en fonction la variation de la température ($^{\circ}C$).

17. Influence des mutations E897K et R895C sur l'activité des canaux TRPC6 dans les cellules HEK-293

Au niveau de nos essais en dichroïsme circulaire, nous avons observé que les mutations E897K et R895C adoptent un repliement majoritaire organisé en hélices α de la structure secondaire du segment C-terminal TRPC6. Le repliement des différents segments C-terminaux TRPC6 interagit de façon différente, mais spécifique et concentration dépendante avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Ces observations *in vitro* nous ont amenés à vérifier l'effet de ces mutations sur l'entrée calcique des canaux TRPC6 dans un modèle cellulaire, les cellules HEK-293, et cela en mesurant la variation du niveau d'entrée des ions Ca^{2+} à travers les canaux TRPC6 ayant les mutations E897K ou R895C. Les cellules HEK-293 ont été co-transfectées d'une façon transitoire avec l'ADNc de pleine longueur codant pour le récepteur muscarinique M5 et celle codant pour le canal TRPC6 ou les canaux TRPC6 ayant la mutation E897K ou R895C. Le récepteur M5, un récepteur couplé à la protéine G_q qui active la phospholipase C^{262} , est utilisé pour cibler les cellules qui ont intégré l'ADNc comme contrôle de l'efficacité de transfection. Également, puisque les récepteurs M5 ciblent la production d' IP_3 et la relâche de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique, son activation est utilisée pour étudier l'activité du canal TRPC6 suite à la stimulation au carbachol (CCh). Nous avons utilisé le protocole expérimental standardisé du Ca^{2+} déplétion/restauration afin de discriminer l'entrée des ions Ca^{2+} via les canaux TRPC6 (wt ou mutés) induits par la stimulation par le CCh comparativement à celle induite par l'expression des canaux calciques de type TRPC6 ou autre exprimés au niveau basal dans les cellules HEK-293 (cellules transfectées avec PCDNA3). Les cellules ont été incubées durant 1 min dans un milieu dépourvu de Ca^{2+} et contenant 0.5 mM EGTA avant la déplétion des réserves de Ca^{2+} intracellulaires avec 20 μM CCh. Une fois que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est revenu à un niveau basal (3 min après l'ajout du CCh) on a rajouté 1.8 mM CaCl_2 au niveau du milieu extracellulaire. Comme présenté à la figure 39A, en absence de Ca^{2+} extracellulaire, la relâche du Ca^{2+} induite par l'action du CCh atteint un niveau similaire

pour l'ensemble des cellules transfectées PCDNA3, TRPC6 wt et TRPC6 E897K. Suite à l'addition de 1.8mM de CaCl₂, les cellules contrôles transfectées avec PCDNA3 présentent une deuxième augmentation du niveau du [Ca²⁺]_i qui atteint un niveau maximal mesuré de 175 nM qui résulte de la réponse suite à l'ouverture des canaux TRPC3 ou TRPC6 exprimés au niveau basal. Pour les cellules transfectées mTRPC6, donc en surexpression, l'addition de 1.8 mM de CaCl₂ génère une deuxième élévation du [Ca²⁺]_i pour atteindre un niveau mesuré de 200 nM. Enfin les cellules surexprimant le canal TRPC6 ayant la mutation E897K, l'addition de la même concentration de CCh produit une élévation du [Ca²⁺]_i pour atteindre un niveau maximal enregistré de 225 nM. Nous avons reproduit la même démarche expérimentale pour vérifier l'effet de la mutation R895C sur l'entrée du Ca²⁺ via les canaux TRPC6 toujours en comparaison aux cellules contrôles (PCDNA3) et les cellules surexprimant TRPC6 wt (figure 39B). Dans cet essai, en absence d'ions Ca²⁺, la relâche du Ca²⁺ induite suite à l'action du CCh atteint des niveaux de 235 et 200 nM pour les cellules surexprimant les canaux TRPC6 wt ou TRPC6 R895C respectivement. L'addition de 1.8 mM de CaCl₂ génère une deuxième élévation du [Ca²⁺]_i pour atteindre des niveaux enregistrés de 165, 200 et 250 nM pour les cellules transfectées avec PCDNA3, surexprimant TRPC6 wt et TRPC6 R895C respectivement.

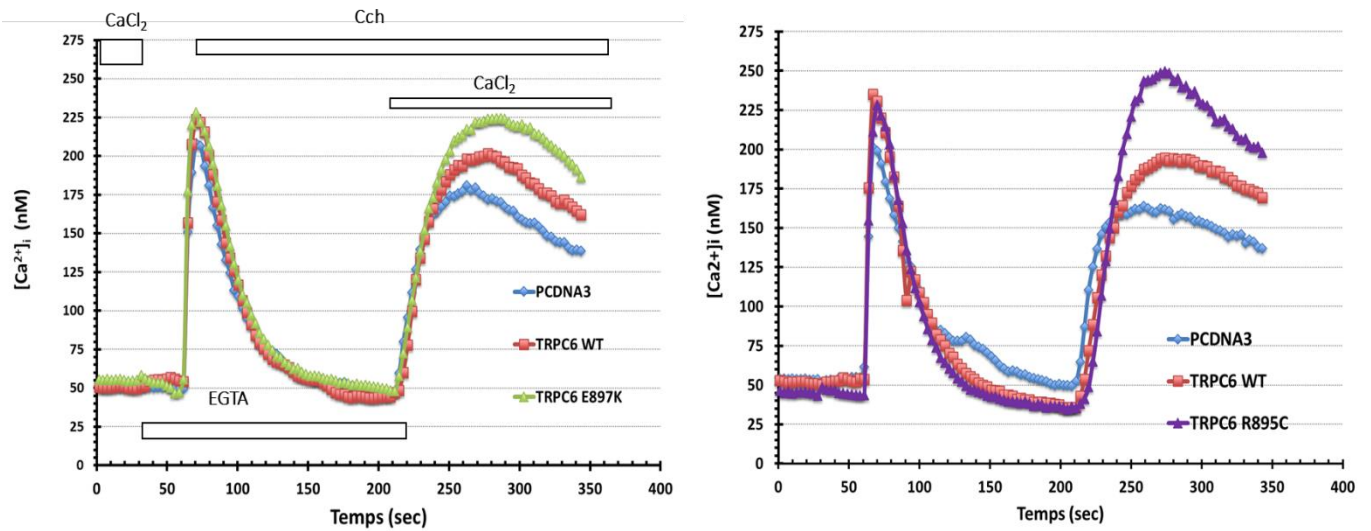


Figure 39: L'impact de la surexpression des canaux TRPC6 de type sauvage et des canaux TRPC6 ayant la mutation E897K et R895C sur l'élévation du calcium intracellulaire. Des cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement avec le vecteur PCDNA3 (■), TRPC6 wt (■) ou TRPC6 E897K (■) ou R895C (■) et suite à la stimulation au CCh la variation du calcium intracellulaire (nM) est mesurée par imagerie calcique par fluorescence pendant le temps de stimulation de 350 sec.

18. L'effet des ions Mg^{2+} sur l'activité des canaux TRPC6 de type sauvage dans les cellules HEK-293T

Nous avons observé en CD que les ions Mg^{2+} , à des concentrations physiologiques, affectent la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 wt et que cet effet est réduit considérablement en présence de la mutation E897K et complètement absent en présence de la mutation R895C. Nous savons aussi que suite à la liaison du segment C-terminal des canaux TRPC6 à la CaM, l'activité du canal est diminuée ce qui implique une diminution de l'entrée calcique. Le domaine de liaison à la CaM du segment C-terminal TRPC6 est un domaine qui interagit également d'une façon compétitive avec la portion cytoplasmique du récepteur IP_3R situé au niveau du RE. À la lumière de ces connaissances et des résultats observés au niveau de nos essais CD, nous pouvons émettre l'hypothèse que la fluctuation de la concentration des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} , au niveau intracellulaire, peuvent influencer le repliement du segment C-terminal TRPC6 qui par l'effet même peut favoriser ou pas son interaction avec des protéines régulatrices de l'activité du canal TRPC6. Sachant que la $[Ca^{2+}]_i$ fluctue continuellement en réponse à plusieurs stimuli cellulaires, nous avons vérifié si la variation des ions Mg^{2+} intracellulaires influence l'activité du canal TRPC6 et par conséquent l'entrée calcique. Pour se faire, nous avons évalué par la technique d'imagerie calcique la variation du niveau d'élévation des ions Ca^{2+} intracellulaires en réponse à l'ouverture des canaux TRPC6 en réponse à une augmentation de concentration de Mg^{2+} intracellulaire. Pour augmenter la concentration d'ions Mg^{2+} intracellulaire, nous avons supplémenté le milieu extracellulaire avec des ions Mg^{2+} , cette technique se repose sur le principe que l'augmentation du milieu extracellulaire en ions Mg^{2+} augmente la concentration intracellulaire de ce même ion par des mécanismes de diffusion membranaire et l'implication des canaux / pompes à Mg^{2+} (Maguire et al., 2006). Nous avons premièrement vérifié l'effet de l'augmentation des ions Mg^{2+} sur la signalisation calcique dans les cellules transfectées avec PCDNA3 à travers trois conditions : en absence de Mg^{2+} extracellulaire (condition

contrôle CTRL), en présence de 5 mM MgCl₂ et en présence de 25 mM MgCl₂. À la figure 40, la relâche du Ca²⁺ induite suite à l'action du CCh en absence de Ca²⁺ extracellulaire génère une élévation du [Ca²⁺]_i de l'ordre de 200 nM pour la condition contrôle et des niveaux de 200 et 225 nM pour les conditions en présence de 5 et 25 mM de MgCl₂ extracellulaires respectivement. L'addition du CaCl₂ génère une deuxième élévation du [Ca²⁺]_i pour atteindre des niveaux d'entrée de 140 nM pour l'ensemble des trois conditions (en présence de 0, 5 ou 25 mM [Mg²⁺]_{ex}). L'absence d'effet des ions Mg²⁺ sur l'entrée d'ions Ca²⁺ via les canaux TRPC6 exprimés au niveau basal indique que les ions Mg²⁺ n'influencent pas la signalisation calcique dans les conditions de transfection et d'expression des récepteurs M5. Ces résultats permettent de valider notre méthode expérimentale afin de vérifier l'effet des ions Mg²⁺ sur l'activité et l'entrée calcique dans les cellules surexprimant TRPC6 ainsi que dans les conditions de surexpression des canaux TRPC6 ayant la mutation R895C ou E897K. De plus, puisque la variation de magnésium n'influence pas l'entrée calcique extracellulaire des cellules HEK293T transfectées transitoirement avec le vecteur PCDNA3, cette transfection servira de témoin qui caractérise une situation physiologique basale.

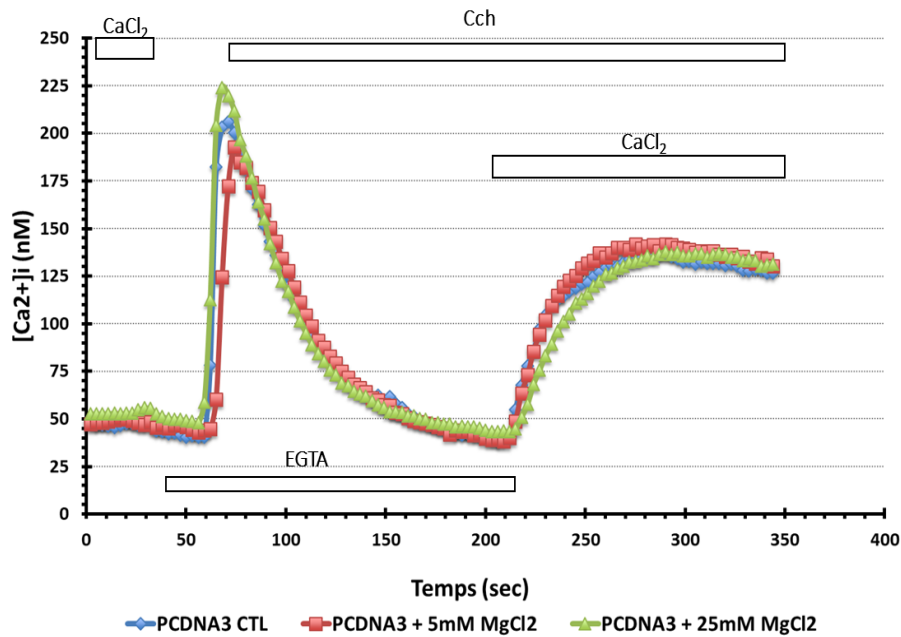


Figure 40: L'impact de l'élévation du magnésium extracellulaire sur l'entrée calcique basale des cellules HEK293. Représentation graphique du niveau du calcium intracellulaire (nM) mesurée par imagerie calcique par fluorescence. Des cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement avec le vecteur PCDNA3. Des solutions HBSS standard (■), contenant 5 mM Mg²⁺ (■) ou 25 mM Mg²⁺ (■) ont été employées durant l'essai de 350 sec. Un minimum de trois essais expérimentaux indépendants ont été effectués pour chaque condition (n = 3)

Nous avons évalué premièrement l'effet de l'élévation du $[Mg^{2+}]_{ext}$ sur le niveau d'entrée calcique dans les cellules HEK-293T surexprimant les canaux TRPC6 de type sauvage. Comme présenté à la figure 41A, suite à l'ajout de $CaCl_2$ dans le milieu extracellulaire, nous pouvons observer que l'élévation de la $[Mg^{2+}]_{ext}$ influence de façon concentration-dépendante la vitesse initiale de l'entrée calcique modulée par l'ouverture des canaux TRPC6 de type sauvage surexprimés dans les cellules HEK-293. À la figure 41B, on peut observer une baisse statistiquement significative des niveaux de calcium intracellulaire 30 secondes après le dernier changement de milieu et ce de 32.6 et 57.6% dans les conditions d'excès en magnésium extracellulaire de 5 et 25 mM respectivement. Il faut noter que la sonde qui est utilisée pour nos essais d'imagerie (Fura-2) est optimisée pour la détection des variations de calcium intracellulaire ce qui ne nous permet pas de déterminer si les ions Mg^{2+} entrent dans les cellules au détriment des ions Ca^{2+} . Cette limite expérimentale peut expliquer en partie la diminution de l'entrée calcique avec l'augmentation du gradient extracellulaire en magnésium.

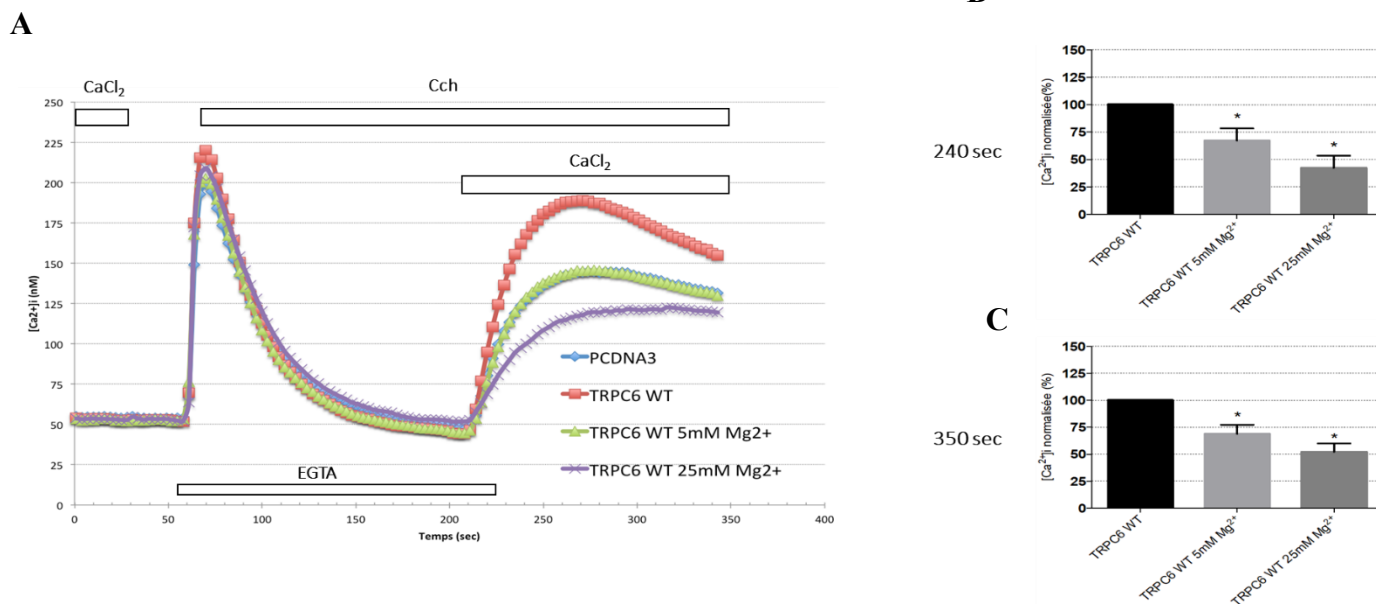


Figure 41: L'impact de l'élévation du magnésium extracellulaire sur l'entrée calcique des canaux TRPC6 wt surexprimés dans les cellules HEK293. **A)** Représentation graphique du niveau du calcium intracellulaire (nM) mesurée par imagerie calcique par fluorescence. Des cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement avec l'ADNc de TRPC6 wt. Des solutions HBSS standard pour PCDNA3(■) ou pour TRPC6 wt (■), contenant 5 mM Mg²⁺ (■) ou 25 mM Mg²⁺ (■) ont été employées durant l'essai de 350 sec. **B)** Les valeurs normalisées de la variation du calcium intracellulaire à un temps de 240 sec (30 secondes après la deuxième stimulation avec 10μM CCh) sur les essais d'imagerie effectués avec les conditions physiologiques normales (HBSS standard). **C)** Les valeurs normalisées de la variation du calcium intracellulaire à un temps de 350 sec (30 secondes après la deuxième stimulation avec 10μM CCh) sur les essais d'imagerie effectués avec les conditions physiologiques normales (HBSS standard). Un minimum de onze essais expérimentaux indépendants a été effectué pour chaque condition (n = 11). *p<0.05

Nous avons reproduit la même méthode expérimentale sur les cellules HEK-293 surexprimant les canaux TRPC6 ayant la mutation R895C. Comme présenté à la figure 42A, on remarque que dans nos essais l'expression des canaux TRPC6 ayant la mutation R895C induit une entrée calcique plus grande que celle mesurée dans les conditions en présence d'ions Mg^{2+} extra-cellulaires. En présence d'excès d'ions Mg^{2+} extracellulaire, à partir de 30 secondes après le dernier changement de milieu (à temps expérimental de 240 secondes), nous avons observé deux phénomènes. Dans la condition en présence de 5mM de Mg^{2+} extracellulaire, on a observé une diminution de 50 nM de l'entrée calcique passant d'un niveau de 200 nM d'entrée Ca^{2+} à un niveau de 150 nM qui représente une diminution de 27% comparativement aux conditions en absence de Mg^{2+} extracellulaire. On a observé également une diminution significative de l'entrée calcique suite à l'addition de 25 mM Mg^{2+} passant d'un niveau de 200 nM de Ca^{2+} à un niveau de 125 nM à 30 sec après l'addition du $CaCl_2$ ce qui représente une diminution significative de 49.7%. À 345 secondes depuis le début de l'essai, temps représentant l'entrée maximale observée par les canaux TRPC6, on observe des diminutions de 80 nM et 110 nM de l'entrée calcique comparativement à la condition en absence d'ions Mg^{2+} extracellulaire ces diminutions représentent 37.7% et 55% respectivement comparables à celle du niveau basal (condition TRPC6 R895C en présence de 5 mM Mg^{2+} vs PCDNA3).

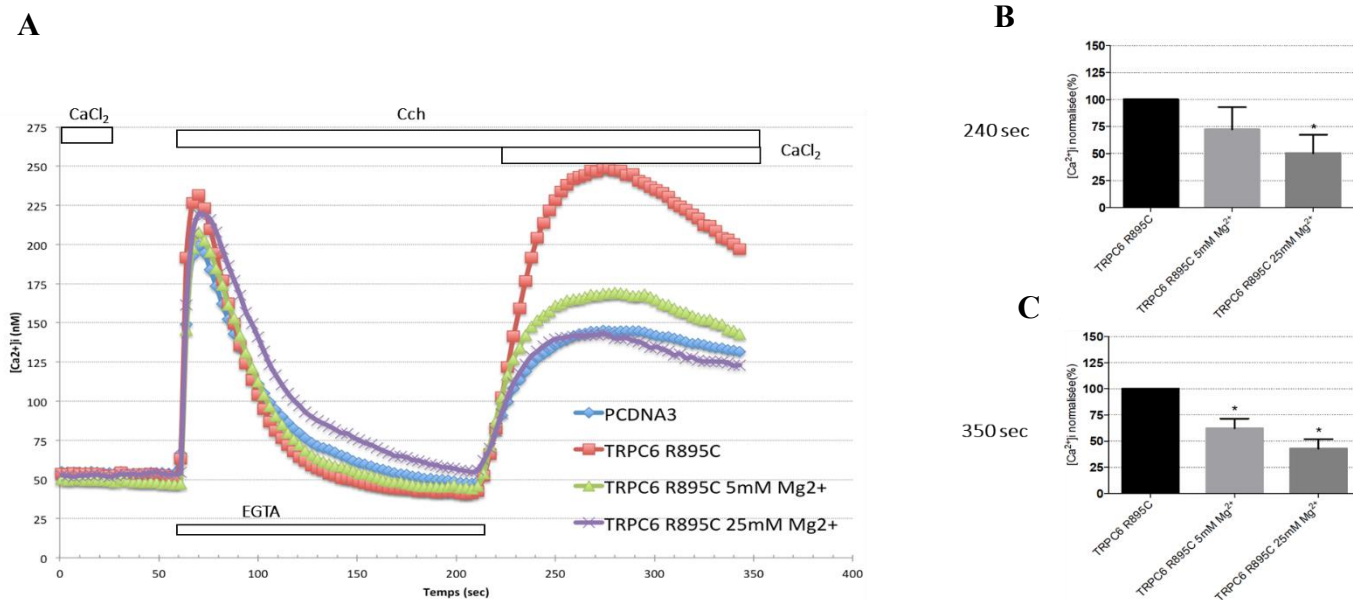


Figure 42: L'impact de l'élévation du magnésium extracellulaire sur l'entrée calcique des canaux TRPC6 R895C surexprimés dans les cellules HEK293. (A) Représentation graphique du niveau du calcium intracellulaire (nM) mesurée par imagerie calcique par fluorescence. Des cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement avec l'ADNc de TRPC6 R895C. Des solutions HBSS standard pour PCDNA3 (■) ou pour TRPC6 R895C (■), contenant 5 mM Mg²⁺ (■) ou 25 mM Mg²⁺ (■) ont été employées durant l'essai de 350 sec. (B) Les valeurs normalisées de la variation du calcium intracellulaire à un temps de 240 sec (30 secondes après la deuxième stimulation avec 10µM CCh) sur les essais d'imagerie effectués avec les conditions physiologiques normales (HBSS standard). (C) Les valeurs normalisées de la variation du calcium intracellulaire à un temps de 350 sec (30 secondes après la deuxième stimulation avec 10µM CCh) sur les essais d'imagerie effectués avec les conditions physiologiques normales (HBSS standard). Un minimum de trois essais expérimentaux indépendants a été effectué pour chaque condition (n = 3). *p<0.05

L'entrée calcique suite à l'ouverture initiale des canaux TRPC6 E897K n'est pas affectée en présence de 5 mM Mg^{2+} extracellulaires (figure 43). Nous avons remarqué également que le niveau calcique pour la même période diminue de manière significative de 43.4% pour atteindre un niveau de 120 nM comparativement à un niveau de 175 nM dans la condition en absence de Mg^{2+} extracellulaire. Au niveau de l'amplitude maximale de l'entrée de calcium à 345 secondes depuis le début de l'essai, on observe une diminution significative de 13.9% suite à l'ajout 5 mM de Mg^{2+} extracellulaires et une diminution significative de 50% suite à l'ajout de 25 mM de Mg^{2+} extracellulaires (figure 43B).

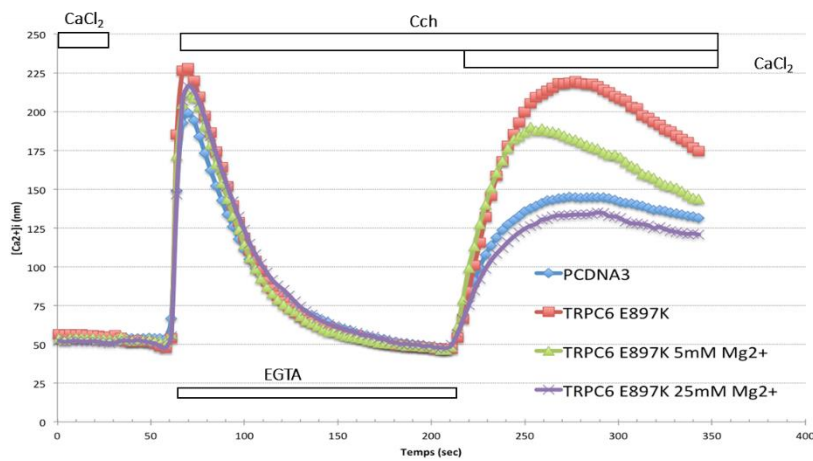
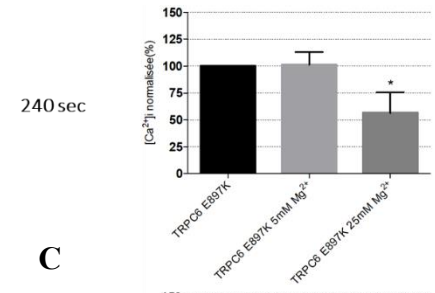
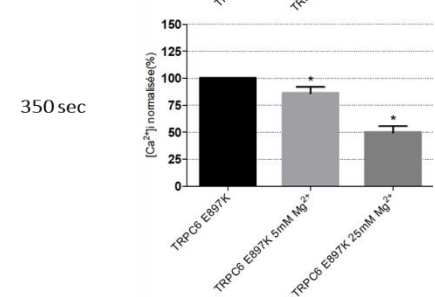
A**B****C**

Figure 43: L'impact de l'élévation du magnésium extracellulaire sur l'entrée calcique des canaux TRPC6 E897K surexprimés dans les cellules HEK293. (A) Représentation graphique du niveau du calcium intracellulaire (nM) mesurée par imagerie calcique par fluorescence. Des cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement avec l'ADNc de TRPC6 E897K. Des solutions HBSS standard pour PCDNA3(■) ou pour TRPC6 E897K (■), contenant 5 mM Mg²⁺ (■) ou 25 mM Mg²⁺ (■) ont été employées durant l'essai de 350 sec. (B) Les valeurs normalisées de la variation du calcium intracellulaire à un temps de 240 sec (30 secondes après la deuxième stimulation avec 10μM CCh) sur les essais d'imagerie effectués avec les conditions physiologiques normales (HBSS standard). (C) Les valeurs normalisées de la variation du calcium intracellulaire à un temps de 350 sec (30 secondes après la deuxième stimulation avec 10μM CCh) sur les essais d'imagerie effectués avec les conditions physiologiques normales (HBSS standard). Un minimum de trois essais expérimentaux indépendants a été effectué pour chaque condition (n = 3). *p<0.05

L'influence des ions Mg^{2+} sur l'entrée calcique des canaux TRPC6 observée dans nos essais de signalisation calcique peut être en conséquence de plusieurs phénomènes. Au niveau cellulaire, on pourrait croire que l'élévation des ions Mg^{2+} intracellulaires interagissent avec les segments N- ou C-terminaux du canal TRPC6 et ainsi influencer la régulation et la perméabilité du canal aux ions Ca^{2+} . Afin de valider l'implication du segment C-terminal dans les résultats obtenus au niveau des essais avec le magnésium, des essais d'imagerie calcique ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales, mais avec un canal chimère tétramérique [CT4] TRPC6 (figure 44A). Cette chimère est un canal TRPC6 formé de 4 unités monomériques, dont le segment, C-terminal a été substitué par le segment C-terminal correspondant du canal TRPC4 de la même famille. Ce canal forme un canal tétramérique fonctionnel exprimé au niveau de la membrane cellulaire. Dans les cellules HEK-293, la surexpression de ce type de canaux TRPC6 chimériques présente un niveau d'entrée calcique plus élevé comparativement au niveau d'entrée calcique en réponse à l'ouverture des canaux calciques exprimés au niveau basal (figure 44B)²⁶¹.

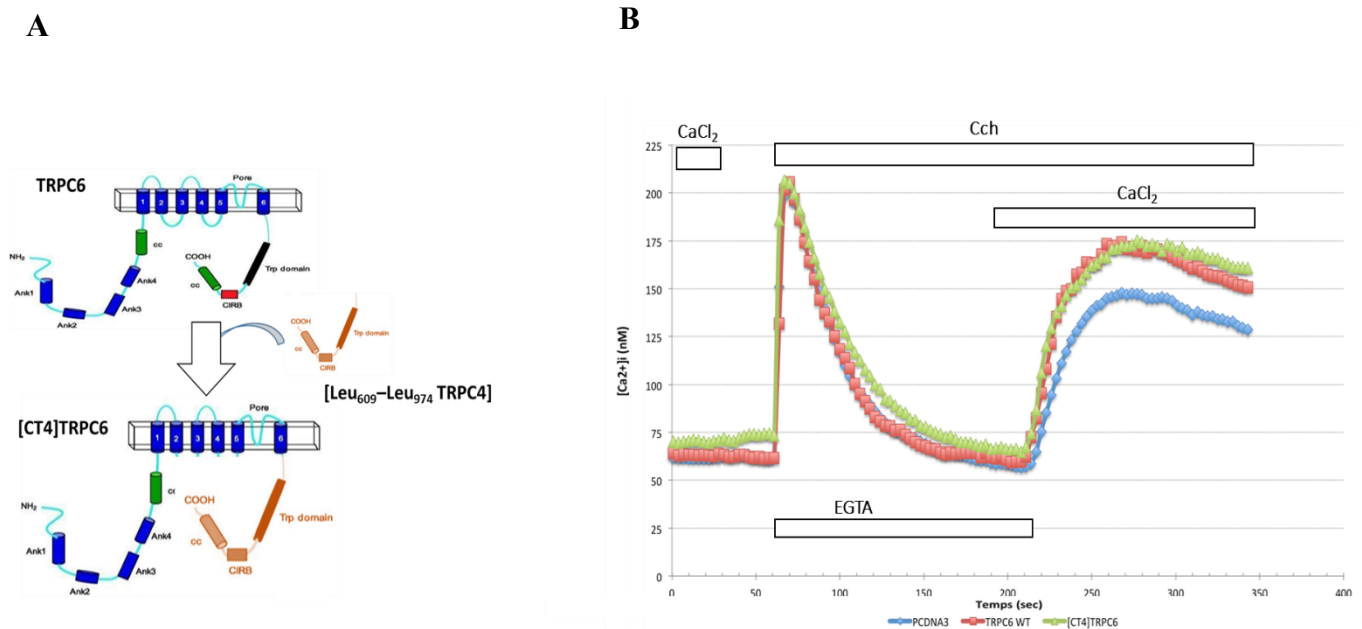


Figure 44: L'entrée calcique via la chimère [CT4] TRPC6 comparativement aux canaux TRPC6 surexprimés dans les cellules HEK293. **A)** Représentation graphique du niveau du calcium intracellulaire (nM) mesurée par imagerie calcique par fluorescence. **B)** Des cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement le plasmide PCDNA3 (■) avec l'ADNc de TRPC6 de type sauvage (■) ou [CT4] TRPC6(■). Un minimum de trois essais expérimentaux indépendants a été effectué pour chaque condition (n = 3).

Comme présenté à la figure 45A, en absence de Mg^{2+} extracellulaire, le niveau d'entrée calcique avec la chimère est plus élevé que celui observé dans la condition basale dans les cellules HEK-293 transfectées avec PCDNA3. Cette observation valide la caractéristique fonctionnelle et le niveau d'entrée calcique observé dans la littérature²⁶¹. Également, on peut observer que l'augmentation des ions Mg^{2+} extracellulaire à des concentrations de 5 et 25 mM n'exerce aucune influence sur le niveau d'entrée calcique enregistré dans les cellules HEK-293 exprimant le canal [CT4] TRPC6 et ce, ni au niveau de l'entrée initiale ni au niveau maximal d'entrée calcique (figure 45 A et B). Ces résultats complémentaires présentent l'implication du segment C-terminal dans la régulation d'entrée du Ca^{2+} via les canaux TRPC6 dans les conditions d'élévation des concentrations de Mg^{2+} intracellulaires dans les cellules HEK-293

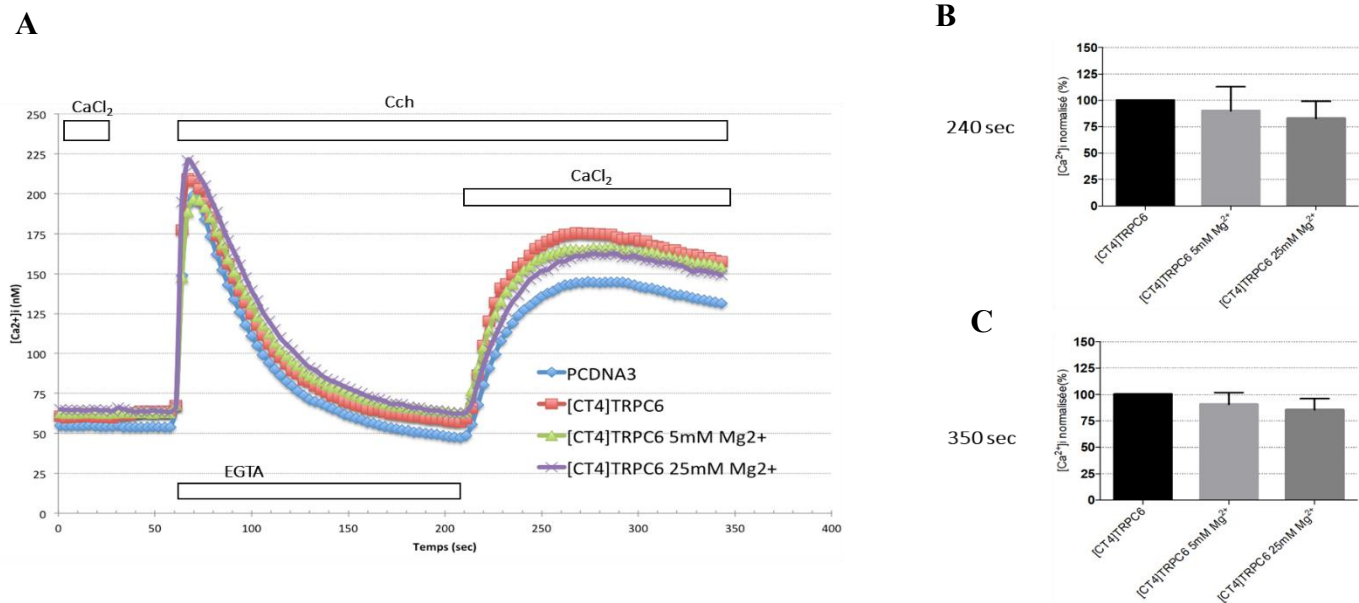


Figure 45: L'impact de l'élévation du magnésium extracellulaire sur l'entrée calcique des canaux chimériques [CT4] TRPC6 dans les cellules HEK293. (A) Représentation graphique du niveau du calcium intracellulaire (nM) mesurée par imagerie calcique par fluorescence. Des cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement avec l'ADNc de [CT4] TRPC6. Des solutions HBSS standard pour PCDNA3 (■) ou pour [CT4] TRPC6 (■), contenant 5 mM Mg^{2+} (■) ou 25 mM Mg^{2+} (■) ont été employées durant l'essai de 350 sec. (B) Les valeurs normalisées de la variation du calcium intracellulaire à un temps de 240 sec (30 secondes après la deuxième stimulation avec $10\mu M$ CCh) sur les essais d'imagerie effectués avec les conditions physiologiques normales (HBSS standard). (C) Les valeurs normalisées de la variation du calcium intracellulaire à un temps de 350 sec (30 secondes après la deuxième stimulation avec $10\mu M$ CCh) sur les essais d'imagerie effectués avec les conditions physiologiques normales (HBSS standard). Un minimum de trois essais expérimentaux indépendants a été effectué pour chaque condition (n = 3). * $p < 0.05$

Discussion

La régulation de l'activité des canaux TRPC6 est essentielle dans l'homéostasie calcique de plusieurs types cellulaires et plus particulièrement au niveau des podocytes. Les podocytes sont des cellules spécialisées qui entourent les capillaires sanguins via leurs pédicelles dans le but de permettre la première filtration au niveau glomérulaire (Pavenstadt et al., 2003). La régulation de ce mécanisme cellulaire est assurée par la coordination d'un réseau complexe de protéines du cytosquelette notamment la néphrine, podocine, CD2AP, alpha-actinine 4 et les canaux TRPC6 (Huber et al., 2006). Dans des situations de néphropathie qui affectent l'intégrité des podocytes, on observe un processus physiologique d'effacement des pédicelles qui cause une lésion progressive du glomérule rénal (Heeriga et al., 2009). L'élévation de la concentration du calcium intracellulaire est un facteur majeur dans la dérégulation des protéines du cytosquelette du podocytes qui est des causes de l'effacement des pédicelles au niveau du glomérule. Au niveau des podocytes, un premier mécanisme qui provoque l'élévation de la concentration du calcium intracellulaire est suite à l'augmentation du niveau d'expression du canal TRPC6 à la membrane cytoplasmique des podocytes via l'action du NFAT (Nijenhuis et al., 2011). Ce mécanisme provoque une cascade réactionnelle qui mène à la déphosphorylation de la synaptopodyne et une dérégulation du cytosquelette des pédicelles. Un deuxième mécanisme qui provoque l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire est en réponse à une suractivation de la podocine qui, de par son interaction, provoque une augmentation du temps d'ouverture du canal TRPC6 (Kim et al 2013 et Anderson et al., 2013). Cette augmentation de la concentration du calcium intracellulaire provoque la dérégulation de la néphrine influençant directement la fente de filtration glomérulaire (Anderson et al., 2013). Depuis la dernière décennie, TRPC6 a été aussi associé à une forme de néphropathie héréditaire, la FSGS. Cette lésion provoque également un effacement des pédicelles dû à une dérégulation de la concentration du

calcium intracellulaire. Plusieurs mutations ont été identifiées et associées à cette pathologie principalement au niveau des segments N- et C-terminaux cytoplasmiques du canal TRPC6 qui entraînent des mutations de type non-sens, gain de fonction ou délétion (Reiser et al., 2005). Parmi ces mutants TRPC6, trois d'entre eux (P112Q, R895C, E897K) sont des mutations de type gain de fonction, qui entraînent une augmentation de l'amplitude du courant enregistré au niveau cellulaire. P112Q est une mutation située au niveau du segment N-terminal TRPC6 qui provoque une augmentation de l'expression du canal à la membrane cytoplasmique qui se traduit par une élévation de la concentration du calcium intracellulaire (Reiser et al., 2005). Les mutations R895C et E897K situées au niveau du segment C-terminal augmentent l'activité du canal muté TRPC6 sans influencer son niveau d'expression au niveau de la membrane cytoplasmique (Reiser et al., 2005). Ces observations suggèrent que le segment C-terminal TRPC6 joue un rôle au niveau de la régulation de l'activité du canal soit via une plus grande ouverture du canal ou par la diminution d'interaction avec des protéines qui diminuent son activité comme la CaM. Il est clair que la dérégulation du niveau du calcium intracellulaire perturbe plusieurs protéines au niveau du podocyte qui est en étroite interaction directe ou indirecte avec les canaux TRPC6. À ce jour, il y a encore peu de connaissances entourant la fonction, la structure et la dynamique structurale du segment C-terminal TRPC6. En 2011, je me suis penché sur la compréhension et la caractérisation de la structure du segment C-terminal TRPC6 de l'impact structural des mutations R895C et E897K. Cette étude est dans l'objectif d'acquérir une meilleure compréhension de la fonction du segment C-terminal TRPC6 et de son implication dans la pathogenèse de la FSGS. Les travaux présentés dans cette thèse fournissent une première caractérisation CD du segment C-terminal (M₈₀₁-R₉₃₁) du canal TRPC6 humain. Nos résultats ont démontré que le segment C-terminal TRPC6 adopte une structure secondaire majoritairement organisée en hélices α . L'augmentation de la concentration du segment C-terminal TRPC6 favorise ce repliement en hélices α pour atteindre un niveau maximal de 60 %. Cette organisation

en hélices α a été prédite dans la littérature par l'organisation coiled-coil like du C-terminal TRPC6. L'organisation en hélices α du segment C-terminal TRPC6 a été aussi observée dans la récente publication de la structure du canal TRPC6h par le groupe de Tang (Tang et al., 2018). En effet, la structure du C-terminal TRPC6 résolue par Cryo-EM est organisée en deux longues hélices dont une première s'étend horizontalement à partir de la périphérie vers le centre du canal et se connecte à la deuxième hélice en position verticale en formant un angle de 90° (Tang et al., 2018). La structure du C-terminal TRPC6 de souris a été également décrite dans les travaux d'Azumaya comme une structure organisée en hélices α qui adopte une forme de L renversé avec une hélice horizontale connecté à une hélice verticale en direction du cytoplasme (Tang et al., 2018; Azumaya et al., 2018). Nous avons également observé un pourcentage important de la structure secondaire globale du C-terminal TRPC6 de type random ou aléatoire. Cette organisation est élevée ($\sim 60\%$) à de faibles concentrations, mais plus qu'on augmente la concentration du segment C-terminal TRPC6 et plus on favorise un repliement en hélices α et une diminution du repliement de type aléatoire à un niveau d'environ 40% . Ceci indique que dans nos conditions expérimentales, il existe une portion du segment C-terminal qui demeure dans une organisation structurale de type aléatoire. Cette observation a été également notée par le groupe de Tang lors de la résolution de la structure du segment C-terminal TRPC6. Il a décrit que le segment allant de N₇₆₆ à P₈₅₂ favorise une structure désordonnée ce qui a été la raison pour laquelle le groupe Tang a éliminé cette portion afin d'avoir une structure analysable par Cryo-EM. Il faut se rappeler que notre segment C-terminal TRPC6 analysé comprend les résidus de M₈₀₁ à la R₉₃₁ ce qui inclut le domaine CIBR (D₈₄₂ à D₈₇₃). Ces observations nous permettent de croire que le domaine CIBR en partie ou en entier est organisé en une structure aléatoire ce qui peut être attribuable au pourcentage du repliement aléatoire observé dans nos résultats CD du segment C-terminal TRPC6. Une expression et une analyse CD du domaine CIBR peuvent être une avenue intéressante afin de confirmer le repliement aléatoire de la structure secondaire de ce segment. Également

cette analyse peut nous permettre de déterminer si le repliement du domaine CIBR est influencé par le repliement du reste du segment C-terminal TRPC6. À travers nos essais de DLS et SEC, nous avons observé que dans nos conditions expérimentales, le segment C-terminal TRPC6 favorise une organisation tétramérique. Ce caractère d'oligomérisation a également été observé par le groupe de Tang au niveau de la structure du C-terminal TRPC6 humain (Tang et al., 2018). En effet, le C-terminal TRPC6 forme un tétramère composé de quatre segments C-terminaux qui adoptent une structure en forme d'entonnoir. Cette structure en forme d'entonnoir est composée de quatre hélices horizontales (HH) du segment C-terminal TRPC6 qui s'entrecroisent pour former la base de la structure et quatre hélices verticales (HV) parallèles qui forment un tunnel ionique vers le cytoplasme (Tang et al., 2018; Azumaya et al., 2018). Au niveau du segment C-terminal TRPC6 de souris, les travaux d'Azumaya ont décrit la même organisation avec une observation supplémentaire que la tétramérisation du segment C-terminal qui présente une organisation composée de quatre connexions comprises entre les hélices HH et HV de chaque monomère qui s'entrecroisent d'une manière étroite pour former une structure en forme de nœud sur la face membranaire de l'hélice verticale (Azumaya et al., 2018). Il a été également décrit que ce croisement entre les monomères C-terminaux TRPC6 est semblable à celui observé dans les canaux TRPM4, TRPM8 et TRPA1, mais un niveau plus serré dans le cas des canaux TRPC6. L'organisation tétramérique du C-terminal TRPC6 est alors nécessaire pour former la continuité du pore du canal TRPC6 et participer, selon la structure, dans le processus de véhiculer les ions Ca^{2+} vers le milieu cytoplasmique. Nos résultats, non seulement confirment les observations structurales menées par Tang et Azumaya, mais également démontre que le profil de tétramérisation est aussi observé avec le segment C-terminal TRPC6 de pleine longueur incluant le domaine CIBR. Le caractère de tétramérisation du segment C-terminal du canal TRPC6 a été aussi rapporté dans la littérature lors de son implication dans l'assemble avec des sous-unités d'autres segments N- ou C-terminaux des canaux TRPC3 dans le processus de formation des canaux

hétérotétramériques. Un point intéressant qui a été rapporté dans les travaux de Tang, c'est que la suppression de la moitié du segment C-terminal (905-931) n'a pas eu d'effet majeur sur l'assemblage et l'ouverture des canaux TRPC6 (Tang et al., 2018). Mais la suppression de l'ensemble de la deuxième hélice α verticale et le linker entre les deux hélices (878-931) affecte de façon importante l'assemblage du canal tétramérique (Tang et al., 2018). Ces observations suggèrent que le segment C-terminal TRPC6 forme une structure tétramérique assurée par la présence de l'hélice horizontale et du lien vers l'hélice verticale jusqu'au résidu N905 (Tang et al., 2018).

Nous avons analysé l'impact des mutations retrouvées chez les patients FSGS, R895C et E897K sur le repliement de la structure secondaire et le potentiel de tétramérisation du segment C-terminal du canal TRPC6. Les mutations R895C et E897K au niveau du segment C-terminal TRPC6 favorisent une structure organisée en tétramère avec un repliement majoritairement organisé en hélices α . Cette observation suggère que ces deux résidus ne jouent pas un rôle dans l'organisation du repliement en hélices α et leurs mutations n'influencent pas non plus l'état d'oligomérisation. Ces observations font un parallèle avec les travaux de Reiser qui a démontré que les mutations R895C et E897K au niveau du C-terminal du canal TRPC6 n'influencent pas la tétramérisation du canal TRPC6 ni le niveau d'expression du canal à la membrane des cellules HEK 293 (Reiser et al., 2005). Il faut noter que dans nos conditions expérimentales, nous travaillons avec le segment C-terminal isolé et non pas en présence d'autres segments mutés. Ceci implique que nos résultats suggèrent que les segments C-terminaux TRPC6 avec la mutation R895C ou E897K forment des structures repliées en hélices α homo-tétramériques. Au niveau cellulaire, les canaux TRPC6 peuvent former des canaux homo ou hétéro-tétramérique avec les canaux TRPC3 et TRPC7. Dans le cas des mutations R895C et E897K du segment C-terminal TRPC6, il y a peu d'informations dans la littérature sur l'influence sur le processus d'hétéro-tétramérisation impliquant des monomères TRPC6 mutés avec des monomères des canaux TRPC 3 et 7. Il faut noter qu'au niveau des

podocytes, l'expression basale des canaux TRPC3 est présente, mais à plus faible proportion que celle observée pour les canaux TRPC6. Il sera intéressant d'évaluer la possibilité que les segments C-terminaux du canal TRPC6 ayant la mutation R895C ou E897K de former une structure tétramérique *in vitro* avec les segments C-terminaux des canaux TRPC3. Ceci nous permettrait d'évaluer l'impact de ces deux mutations sur le potentiel d'hétéro-tétramérisation du segment C-terminal TRPC6.

Nous avons évalué la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α des segments C-terminaux TRPC6 de type sauvage, R895C et E897K. Cette approche nous permet d'évaluer si la stabilité du repliement du tétramère C-terminal TRPC6 est influencée par la température. La variation de température va induire de l'énergie capable d'influencer la stabilité des liaisons de type ponts hydrogènes et des liens électrostatiques qui jouent un rôle au niveau de la stabilité de l'oligomérisation. Dans notre fenêtre de température expérimentale, nos travaux ont démontré que la température ne diminue pas la stabilité thermique de la structure en hélices α du tétramère formé par le segment C-terminal TRPC6 de type sauvage. Les mutations R895C ou E897K n'influencent pas la stabilité du tétramère formé face à la variation de la température. Cette observation implique que les résidus R₈₉₅ et E₈₉₇ ne sont pas impliqués dans la régulation de la tétramérisation du segment C-terminal TRPC6 ni au niveau de sa stabilité thermodynamique. Nous avons évalué la stabilité des tétramères formés par les segments C-terminaux TRPC6 de type sauvage, R895C et E897K par des essais de dénaturation chimique en variant la concentration de l'agent chaotrope, le guanidium. Contrairement à la variation de la température, la variation de la concentration du guanidium en solution influence non seulement la stabilité des liaisons hydrogène et le potentiel de charge entre les protéines, mais également influence le potentiel d'hydratation du repliement de la protéine. La variation du potentiel d'hydratation va introduire une compétitivité de liaison avec les molécules d'eau entre le guanidium et le segment C-terminal TRPC6 ce qui peut exposer des résidus hydrophobes à la surface. Pour l'ensemble des trois segments C-terminaux TRPC6,

l'augmentation de la concentration du guanidium diminue la stabilité du repliement global en hélices α du tétramère formé par les segments C-terminaux TRPC6 wt, R895C ou E897K. Cette dénaturation chimique est de type coopératif à deux états, un état tétramère replié en hélices α vers un état déplié monomérique, sans passer par une structure intermédiaire durant le processus de dénaturation. Les mutations E897K et R895C forment des tétramères avec un repliement en hélices α plus stable face à la variation de concentration de l'agent chaotrope comparativement à la forme de type sauvage. Cette observation nous indique que ces deux mutations diminuent la sensibilité de la structure face à l'ajout du guanidium ce qui signifie que ces mutations jouent un rôle sur la sensibilité du segment C-terminal TRPC6 face au guanidinium et à la variation ionique du milieu autour de la structure du segment C-terminal TRPC6. L'impact de la variation des charges positives sur la stabilité du C-terminal TRPC6 a été observé d'une façon spécifique avec la présence des ions Ca^{2+} et des ions Mg^{2+} comparativement à la présence des ions Zn^{2+} et Mn^{2+} qui n'ont pas eu d'effet sur la stabilité du repliement global en hélices α de l'oligomère C-terminal TRPC6. Cette spécificité est seulement observée pour les ions divalents cationiques Ca^{2+} et Mg^{2+} , mais totalement absente pour les ions cationiques monovalents Na^+ . Ces observations suggèrent que le segment C-terminal TRPC6 forme, à température pièce, un tétramère avec un repliement global organisé en hélices α stable face à la variation thermique. Dans des conditions en présence d'ions divalents cationiques et plus spécifiquement les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , le C-terminal TRPC6 adopte aussi un tétramère avec un repliement global en hélices α à température pièce. L'introduction des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} interagit avec le repliement en hélices α du tétramère du segment C-terminal TRPC6 qui par conséquent modifie la stabilité des ponts hydrogènes et liens électrostatiques face à la variation de température. Cette découverte est d'une pertinence capitale sur plusieurs volets. Premièrement, le repliement global du tétramère C-terminal TRPC6 est sensible à la variation de température seulement en présence d'ions Ca^{2+} et Mg^{2+} ce qui signifie qu'il y a une spécificité du C-terminal TRPC6 à interagir avec ces ions qui se

retrouvent également au niveau cytoplasmique. Au niveau cellulaire il faut se rappeler que le canal TRPC6 est tétramérique au niveau membranaire et que le segment C-terminal de chaque unité monomérique est situé au niveau du cytoplasme de la cellule. Au niveau cellulaire, le tétramère formé des quatre unités C-terminaux TRPC6, dans son environnement cytoplasmique, va adopter un repliement qui interagit avec la variation de $[Ca^{2+}]_i$ qui prend origine de la sortie du Ca^{2+} du RE vers le cytoplasme via les IP₃R et de l'entrée des ions Ca^{2+} via les canaux TRPC6. Également, il est a été démontré que le segment C-terminal TRPC6 interagit avec deux protéines, la CaM et S100A, qui sont des protéines de type EF hand qui coordonnent des ions Ca^{2+} pour permettre d'adopter une forme active et favorable à leurs liaisons (Schafer et al., 1996; Billy et al., 2013). L'importance des ions Ca^{2+} a également été présentée dans les travaux de Friedlova (Friedlova et al., 2010) qui a démontré que l'interaction CaM et C-terminal TRPC6 est calcium dépendant, mais les auteurs ont suggéré que le Ca^{2+} est important pour le repliement de CaM pour se lier au segment C-terminal TRPC6. Nos résultats démontrent que les ions Ca^{2+} sont également importants pour que le segment C-terminal TRPC6 adopte un repliement favorable pour son interaction notamment avec la CaM. Il sera pertinent de vérifier si le segment C-terminal TRPC6 avec la mutation R895C ou E897K, étant les mutants les moins sensibles aux ions Ca^{2+} , possède la même affinité d'interaction avec la CaM comparativement à celle observée avec le segment de type sauvage. Les travaux du groupe de Billy (Billy et al., 2013) ont également démontré que l'interaction entre la protéine S100A et le C-terminal TRPC6 était calcium dépendant, mais encore une fois les ions Ca^{2+} peuvent également exercer un rôle sur le repliement du C-terminal TRPC6 qui va par l'effet même moduler l'interaction avec cette protéine. Deuxième point pertinent de cette découverte est que dans des conditions apo ou en présence d'ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} , le tétramère C-terminal TRPC6 adopte un repliement global en hélices α à température pièce. L'augmentation de la température diminue la stabilité thermodynamique du repliement en hélices α du tétramère C-terminal TRPC6 en présence des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} seulement. Cette observation nous indique

que l'introduction des ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} ne change pas ni le type de repliement ni la structure tétramérique du segment C-terminal TRPC6, mais plutôt la stabilité des interactions ioniques de sa structure suite à l'interaction spécifique avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . En corrélation avec les structures de Tang et Azumaya, les quatre hélices verticales des segments C-terminaux TRPC6 forment un tunnel qui coordonne l'entrée des ions Ca^{2+} en provenance de la lumière du pore. Ceci implique que les chaînes latérales des résidus présents à la lumière de ce tunnel interagissent avec les ions Ca^{2+} ce qui pourrait expliquer le caractère spécifique de l'interaction observé des ions Ca^{2+} et le repliement du segment C-terminal TRPC6 dans nos essais. Également les ions Ca^{2+} peuvent interagir avec les faces cytoplasmiques externes de l'entonnoir formé par le tétramère C-terminal TRPC6. Les faces externes formées par les chaînes latérales des HH et HV du tétramère C-terminal TRPC6 interagissent avec la variation ionique des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} ce qui nous permet de corréler la spécificité des interactions observées dans nos essais CD avec ces deux ions. De plus à la figure 46 nous pouvons remarquer un fort potentiel électrostatique de charge négative à l'intérieur de lumière du tunnel et au niveau des limites du tétramère du C-terminal TRPC6 (Azumaya et al., 2018). L'introduction des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} peuvent interagir sur le potentiel de charge du tétramère C-terminal TRPC6 se qui par l'effet modifie la réactivité ionique de sa structure. Il est bien connu que les canaux TRPC6 sont également perméables aux ions Na^+ par contre dans nos essais CD nous avons observé que les ions Na^+ n'influencent pas la stabilité thermodynamique du tétramère du segment C-terminal TRPC6. Ceci pourrait suggérer que les ions Na^+ , une fois qui traversent le pore, véhiculent librement à travers le tunnel formé par les HH du tétramère C-terminal TRPC6, mais que les ions Ca^{2+} sont probablement coordonnés via la chaîne latérale des résidus situés au niveau de la lumière ce même tunnel.

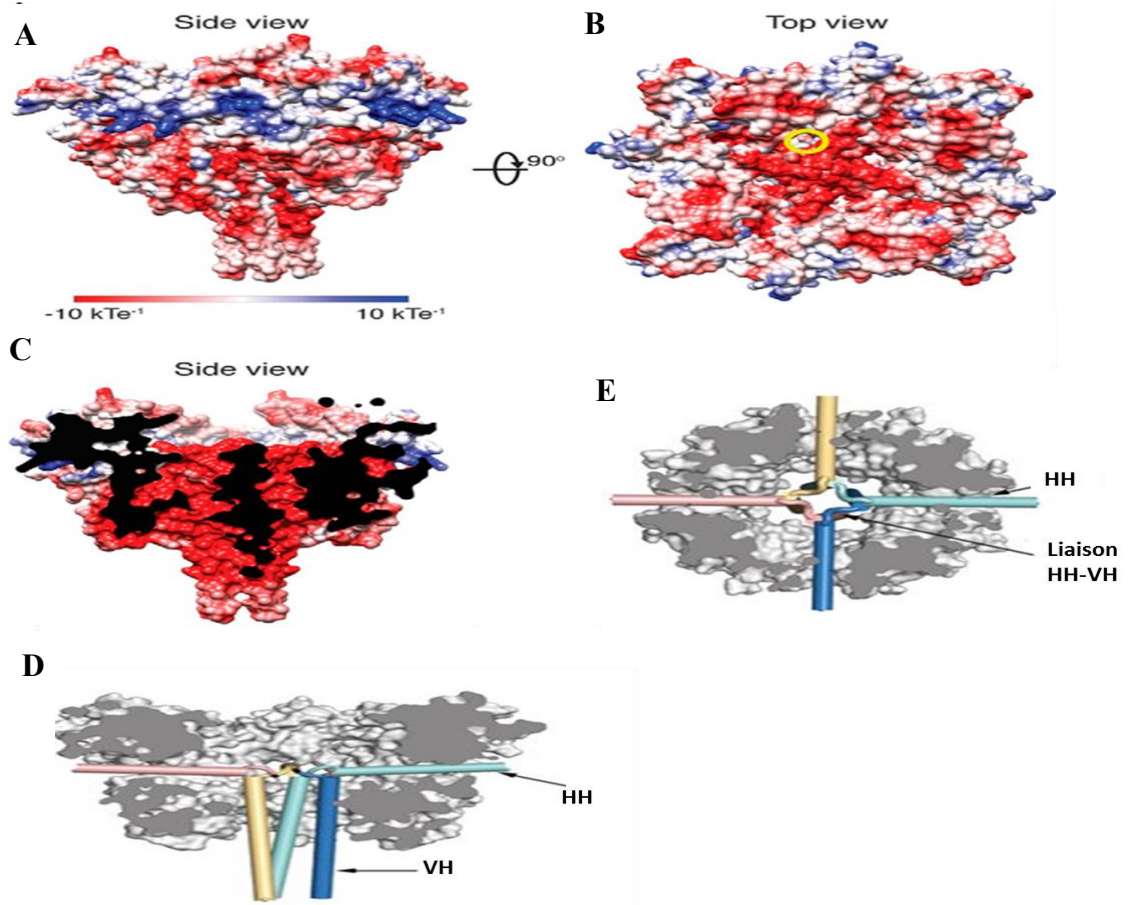


Figure 46: Potentiel électrostatique du domaine cytoplasmique du canal TRPC6. (A). Vue latérale du domaine cytoplasmique avec une forte concentration de charge négative au niveau des hélices longitudinales du segment C-terminal TRPC6. (B) Vue membranaire avec une forte densité de charge négative au milieu du tunnel formé du tétramère de C-terminal TRPC6. (C) coupe transversale du domaine cytoplasmique du canal TRPC6 avec la dispersion des charges. (D et E) modèle structural du domaine C-terminal TRPC6 afin de corrélérer la position selon la dispersion des charges. La couleur rouge représente un potentiel électrostatique négatif et la couleur bleue un potentiel électrostatique positif. HH : hélice horizontale; HV : hélice verticale (D'après Azumaya et al., JBC 2018 et Tang et al., Nature 2018)

À partir de cette découverte de l'interaction spécifique des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , nous avons continué notre investigation sur le rôle de la variation de la concentration de ces deux ions sur le repliement global du tétramère du segment C-terminal TRPC6. Nous avons démontré que l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]$ dans le milieu diminue la stabilité du repliement du segment C-terminal TRPC6 face à la variation de température. À faible concentration, les ions Ca^{2+} interagissent avec la structure du tétramère C-terminal TRPC6 et réduisent sa stabilité thermodynamique sans atteindre une dénaturation complète de la structure dans notre cadre expérimental de température. En effet à une concentration de 50 μM de Ca^{2+} , concentration minimale utilisée, le repliement en hélices α du tétramère du segment C-terminal TRPC6 a perdu 50% de son repliement initial à 100°C ce qui correspond approximativement à la valeur du T_m . L'augmentation de la concentration graduelle des ions Ca^{2+} augmente la sensibilité du repliement en hélices α du tétramère C-terminal TRPC6 face à la variation de la température. Dans ces conditions ioniques, l'augmentation de la température provoque le déplacement de la constante d'équilibre de la population tétramérique repliée vers une population dénaturée non repliée monomérique du segment C-terminal TRPC6. L'augmentation de la concentration ionique en Ca^{2+} a affiché une migration des spectres de dénaturation thermique du repliement du segment C-terminal TRPC6 vers des températures de plus en plus basses. Cette observation démontre que la sensibilité à la température du repliement en hélices α de la structure du C-terminal TRPC6 augmente dans une relation concentration calcium dépendant. Cette relation est également observée par les valeurs de T_m obtenues. À des concentrations entre 400 et 1200 μM de Ca^{2+} nous avons observé une variation de T_m (ΔT_m) de 18.4°C tandis qu'à des concentrations de Ca^{2+} plus élevées (>1200 μM) nous avons observé un ΔT_m de 10.3°C. Ceci implique que suite à leurs interactions, les ions Ca^{2+} à faible concentration exercent un effet plus important sur la variation de la stabilité thermodynamique du segment C-terminal TRPC6 que celui observé à forte concentration. Également on peut imaginer que les

interactions entre les ions Ca^{2+} et la structure du segment C-terminal TRPC6 tendent vers une saturation du potentiel d'interaction avec ces ions ce qui expliquerait cette diminution du ΔT_m . Il faut noter aussi qu'à une température de 37°C , la structure globale organisée en hélices α du C-terminal TRPC6 en présence de l'ensemble des différentes concentrations de Ca^{2+} présente la même intensité de signal mesuré. Ce comportement implique que la variation de concentration des ions Ca^{2+} ne modifie pas le repliement en hélices α du C-terminal TRPC6, mais exerce une modification de son environnement de charge qui par conséquent modifie sa réactivité avec le milieu. Nos résultats peuvent apporter une explication sur le mécanisme d'interaction du C-terminal TRPC6 avec différentes protéines sensibles au calcium. En effet il a été démontré que l'augmentation de l'interaction entre le segment C-terminal TRPC6 et la protéine CaM était favorable avec l'augmentation des ions Ca^{2+} . Cette étude en parallèle à nos résultats nous porte à comprendre que l'augmentation des ions Ca^{2+} favorise l'interaction avec la structure du C-terminal TRPC6 afin de modifier son potentiel de charge et favoriser son interaction avec la forme active de la CaM. Des études semblables ont démontré que l'augmentation des ions Ca^{2+} favorise l'interaction du segment C-terminal TRPC6 à la protéine S100A ce qui suggère un mécanisme semblable du rôle des ions Ca^{2+} . Au niveau des podocytes, une étude a démontré une interaction entre le segment C-terminal du canal TRPC6 (résidus 727 à 930) et celui de la protéine podocine (résidus 126 à 385) (Anderson et al. 2013). Suite à cette interaction, l'action du DAG provoque une amplification de l'entrée du Ca^{2+} via les canaux TRPC6 (Anderson et al. 2013). L'augmentation de l'entrée Ca^{2+} favorise l'interaction podocine au C-terminal TRPC6 et par l'effet même, causer des lésions au niveau de la régulation de la néphrine, composante impliquée dans le maintien de la fente de filtration entre les pédicelles (Anderson et al. 2013). *In vitro* cette interaction a été démontrée en présence d'ions Ca^{2+} et au niveau cellulaire cette interaction augmente l'entrée Ca^{2+} qui favorise par l'effet même l'interaction entre la podocine et le C-terminal TRPC6. Nos résultats CD de l'action des ions Ca^{2+} sur le segment C-terminal peuvent contribuer à la

compréhension de cette interaction à savoir que l'augmentation des ions Ca^{2+} favorise leurs liaisons à la structure tétramérique du C-terminal TRPC6 qui par l'effet même peut participer à la potentialisation de l'interaction avec la podocine et provoquer une dérégulation physiologique du cytosquelette des podocytes. Le C-terminal TRPC6 au niveau cellulaire peut également jouer un rôle de senseur de la fluctuation de la concentration calcique du milieu intracellulaire et par conséquent participer à la régulation de la fermeture du canal TRPC6. Cette hypothèse est à considérer sachant que l'ouverture du canal est en partie suite au relâche du Ca^{2+} du RE vers le milieu cytoplasmique et que la portion du IP_3R interagit avec le segment C-terminal du canal TRPC6 via son CIBR. Ceci suggère que cette relâche du calcium provoque une augmentation locale des ions Ca^{2+} ce qui favorise leurs interactions avec le tétramère formé par les segments C-terminaux TRPC6. Cette interaction ionique va modifier le potentiel de distribution de charge du segment C-terminal TRPC6 ce qui va favoriser un mode actif, mais fermé. Lors du retour de la concentration du Ca^{2+} à un niveau basal et suite à l'action du DAG sur le canal TRPC6, il aura le passage du mode actif fermé vers un mode actif ouvert du canal amenant à une entrée des ions Ca^{2+} à travers le canal TRPC6. Une fois que l'élévation de la concentration du Ca^{2+}_i atteint un seuil maximal, le segment C-terminal TRPC6 lié aux ions Ca^{2+} participe au processus de fermeture en favorisant l'interaction avec des protéines cellulaires comme la CaM ou avec d'autres protéines cellulaires pour moduler la fermeture du canal TRPC6.

Au niveau des mutations qui causent la FSGS, la substitution de l'acide glutamique en position 897 avec une lysine forme également un tétramère majoritairement replié en hélices α *in vitro*. Le repliement de cette structure tétramérique n'est pas sensible à la variation de la température dans des conditions en absence d'ions Ca^{2+} . En présence d'ions Ca^{2+} , le repliement en hélices α du tétramère formé par le segment C-terminal TRPC6 ayant la mutation E897K présente une sensibilité face à la variation de température

qui est traduite par une dénaturation thermodynamique passant d'un état replié vers un état dénaturé. Notre étude a démontré que l'augmentation de la concentration des ions Ca^{2+} augmente leurs interactions avec la structure ce qui augmente la sensibilité du tétramère à la variation de la température. Également nous avons observé un ΔT_m comparable à celui du segment de type sauvage avec des variations de T_m de 22°C en présence de 400 à $1200\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} et de 6.7°C entre 1200 et $2000\ \mu\text{M}$. Ces résultats démontrent que le Ca^{2+} à faible concentration exerce un effet plus grand sur la sensibilité du repliement tétramérique C-terminal TRPC6 E897K que l'effet exercé à des fortes concentrations. Comparativement à l'effet calcique sur le repliement du C-terminal TRPC6 wt, la mutation E897K est moins sensible à la température dans la même fenêtre de concentration d'ions Ca^{2+} . Cette observation a été démontrée lors de la mesure de la variation de T_m en fonction de la variation de concentration de Ca^{2+} où nous avons observé que la mutation E897K augmente les valeurs de T_m d'environ 10°C dans l'ensemble des concentrations de Ca^{2+} expérimentales comparativement aux T_m mesurés pour le segment C-terminal TRPC6 de type sauvage. La mutation de l'arginine en position 895 par une cystéine au niveau du segment C-terminal TRPC6 forme également un tétramère avec un repliement global organisé en hélices α qui, en présence des mêmes variations de concentration d'ions Ca^{2+} , présente une sensibilité moins importante face à la variation de température. En effet, à faible concentration de Ca^{2+} , le repliement en hélices α du mutant R895C n'est pas affecté par la variation de température par contre à des concentrations élevées de Ca^{2+} on observe que la température réduit la stabilité du repliement en hélices α de ce mutant. On remarque également que les ions Ca^{2+} influencent plus faiblement la sensibilité du C-terminal TRPC6 R895C face à la température et cela comparativement au mutant E897K et le segment de type sauvage ce qui est présenté par une variation de T_m , dans les mêmes concentrations de Ca^{2+} , à la hausse de 20°C et de 30°C respectivement. À partir de la structure du segment C-terminal de Tang et Azumaya, j'ai pu isoler la structure du segment C-terminal de la structure globale du canal TRPC6 (pdb 5YX9) et présenter les chaînes latérales des résidus E897 et

R₈₉₅ (figure 47). Comme présenté à la figure 47, on peut observer que les chaînes latérales des résidus E₈₉₇ et R₈₉₅ sont situées sur la face externe (vers le cytoplasme) de l'hélice verticale (HV). Également, les chaînes latérales des résidus E₈₉₇ et R₈₉₅ se situent dans l'interface entre les HV des quatre sous segments C-terminaux TRPC6. Donc la chaîne latérale du résidu E₈₉₇ est à proximité de la chaîne latérale du résidu R₈₉₅ de l'hélice verticale du monomère suivant. De par sa proximité avec la chaîne latérale du résidu R₈₉₅, on peut déduire que sur le plan structural les chaînes latérales des résidus E₈₉₇ et R₈₉₅ peuvent favoriser la formation d'un lien électrostatique ou d'un pont salin qui peuvent participer dans le processus de stabilité d'interaction des quatre HV pour former le tunnel du canal TRPC6. Les mutations R895C ou E897K influencent la stabilité de cette interaction qui par l'effet même modifie sa réactivité ionique avec le milieu notamment avec les ions Ca²⁺. Cette hypothèse est supportée par la diminution de la sensibilité thermodynamique observée dans nos travaux du segment C-terminal TRPC6 suite aux mutations E897K et R895C comparativement au type sauvage. Selon la théorie du mécanisme de fermeture proposé plus haut, les résidus R₈₉₅ et E₈₉₇ sont des résidus situés dans l'hélice verticale du tétramère du C-terminal TRPC6 impliqué dans l'interaction ionique avec le milieu environnement qui lors de leurs mutations, avec la lysine et l'arginine, diminue cette interaction ce qui affecte la fermeture du canal TRPC6. Ce mécanisme va dans le même sens que les résultats obtenus dans les travaux de Reiser en électrophysiologie sur l'activité des canaux TRPC6 mutés E897K et R895C qui a démontré que ces mutations présentent des amplitudes de courant plus élevées comparativement au type sauvage (Reiser et al., 2005).

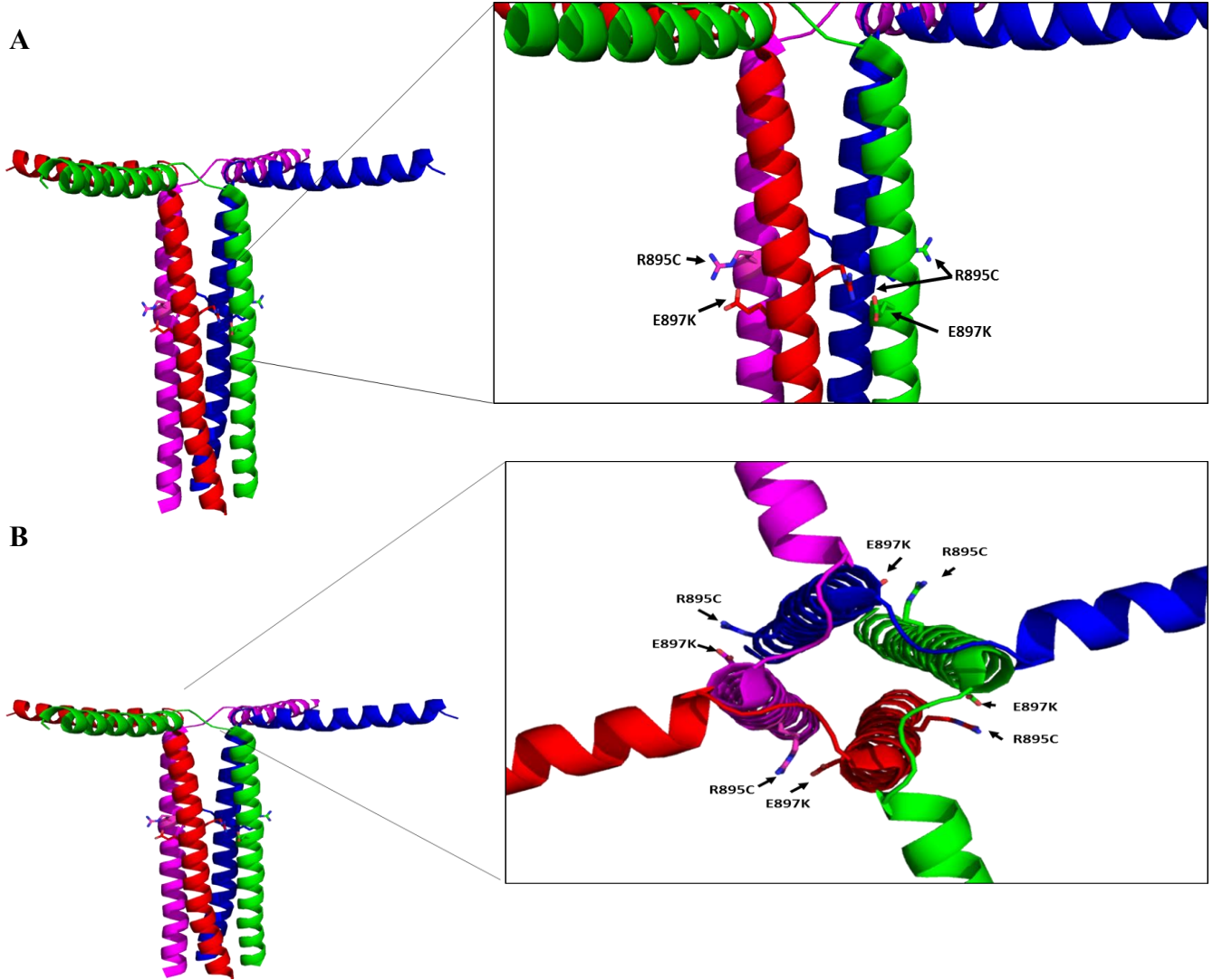


Figure 47: Représentation des chaînes latérales des résidus R895 et E897 au niveau de la structure du tétramère du segment C-terminal TRPC6. (A). Vue latérale du domaine C-terminal TRPC6 avec le positionnement des chaînes latérales des résidus R895C et E897K (Carré). **(B)** Vue du dessus du domaine C-terminal TRPC6 avec le positionnement des chaînes latérales des résidus R895 et E897 (Carré). Représentation basée sur la structure du C-terminal TRPC6 (PDB : 5YX9)

L'ion magnésium est le second ion qui exerce spécifiquement une augmentation de la sensibilité du repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 face à la variation de température. Nous avons investigué si la variation des ions Mg^{2+} peut agir d'une façon semblable ou différente à celle observée avec les ions Ca^{2+} sur le repliement du segment C-terminal TRPC6. Nos résultats démontrent que la variation de la concentration des ions Mg^{2+} influence l'environnement ionique du repliement tétramérique du C-terminal TRPC6 ce qui par conséquent diminue sa stabilité thermodynamique. D'une façon semblable aux ions Ca^{2+} , les ions Mg^{2+} à faible concentration augmentent la sensibilité sans atteindre une dénaturation complète du repliement C-terminal TRPC6 dans le cadre de température expérimentale de l'étude. En présence d'une concentration plus élevée d'ions Mg^{2+} , le repliement en hélices α du segment C-terminal TRPC6 présente une diminution de sa stabilité thermodynamique avec une transition de l'état replié du tétramère vers un état complètement déplié ou dénaturé monomérique. Cette sensibilité augmente d'une façon concentration Mg^{2+} dépendante ce qui est traduit par l'obtention de courbes de dénaturation qui migrent vers de plus basses températures. L'effet du Mg^{2+} est aussi observé au niveau de la diminution des valeurs de T_m qui enregistrent une variation de 23 °C observée entre les T_m mesurés à faible concentration de Mg^{2+} et ceux à de fortes concentrations de Mg^{2+} . Comparativement aux ions Ca^{2+} , les ions Mg^{2+} exercent une interaction avec le tétramère C-terminal TRPC6 qui influence d'une manière moins importante son potentiel de charge traduit par une plus faible sensibilité à la variation de température. Cette stabilité thermodynamique est également observée par des ΔT_m entre les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} qui varient de 13 à 15 °C. Ces résultats impliquent que pour une même concentration ionique, il faut fournir au système plus d'énergie pour déplacer l'équilibre d'une population native repliée du tétramère C-terminal TRPC6 en présence d'ions Mg^{2+} vers une population monomérique dénaturée. Cette

observation peut s'expliquer via le principe que le Mg^{2+} est un ion avec une force ionique moins forte que celle des ions Ca^{2+} (Billy et al., 2013) ce qui pourrait expliquer que l'effet du Mg^{2+} sur le potentiel électrostatique global du segment C-terminal est moins fort que celui exercé par les ions Ca^{2+} . De plus il faut noter que le Mg^{2+} exerce un effet sur la stabilité thermodynamique du repliement à des concentrations physiologiques dans l'ordre du mM tandis que les effets du Ca^{2+} observés ont été au-delà des concentrations physiologiques. Les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sont des ions métalliques de petite taille qui ont une tendance à former favorablement des liens ioniques plutôt que des liens covalents (Martin et al., 1990). Il y a des différences subtiles entre les deux types d'ions qui pourraient expliquer cette différence observée au niveau de la réactivité du C-terminal TRPC6 face à la variation de la température dans nos observations CD. Dans le cas de l'interaction des ions Mg^{2+} avec la structure C-terminal TRPC6, les ions Mg^{2+} favorisent une coordination octaédrale où les ions Ca^{2+} sont communément coordonnés par sept à huit ligands (Martin et al., 1990). La distance pour former une liaison Ca^{2+} -ligand est à une distance type de 2.3 à 2.6 Å, où la liaison entre Mg^{2+} -ligand est d'environ de 2.0 à 2.1 Å (Martin et al., 1990). Finalement selon l'efficacité de sa densité de charge en surface, les ions Mg^{2+} ont 10^3 fois un ratio de désolvatation plus lent que celui du Ca^{2+} (Falke et al., 1994). Ceci implique que dans des conditions hydratées, le rayon ionique des ions Mg^{2+} est plus grand que celui du Ca^{2+} ce qui implique que le Ca^{2+} a un potentiel plus favorable d'interaction avec le C-terminal TRPC6 que celui avec les ions Mg^{2+} . Les concentrations intracellulaires du Ca^{2+} libre fluctuent entre 10^{-7} M à l'état basal vers 10^{-5} M durant le processus d'activation des canaux ioniques membranaires (Berridge et al., 1998; 2000). En contraste, les niveaux du Mg^{2+} libres sont relativement constants et se situent dans des concentrations allant de 0.5 à 1.0 mM dans la plupart des types cellulaires (Romani et al., 1992). Fait intéressant, la stimulation cellulaire peut induire de large influx de Mg^{2+} à travers la membrane cellulaire, ce qui suggère que la concentration cellulaire du Mg^{2+} lié et libre est finement régulée (Romani et al., 1992; 2002). Les ions Mg^{2+} ont un rayon ionique de

~30% plus petit que celui des ions Ca^{2+} . Cependant, dû au caractère ordonné des molécules d'eau, le potentiel d'hydratation des ions Mg^{2+} est approximativement 400 fois plus large en volume que dans sa forme déshydratée (Maguire et al., 2002). Au contraire, l'hydratation des ions Ca^{2+} est seulement 25 fois plus large (Maguire et al., 2002). Cette différence d'hydratation est importante pour le transport des ions (Maguire et al., 2006) et pour la cinétique de liaison aux protéines. Cette différence de taille suite à l'hydratation peut attribuer aux ions Ca^{2+} un potentiel plus favorable à l'interaction avec le C-terminal TRPC6 que celui avec les ions Mg^{2+} ce qui peut expliquer les résultats observés en CD avec les comportements thermodynamiques. Les ions Mg^{2+} exercent un impact sur la stabilité thermodynamique moindre que celui observé par l'action des ions Ca^{2+} qui peut être dû à la différence de cinétique de liaison que ces deux ions ont avec le segment C-terminal. En effet, il est connu que le ratio d'échange avec le solvant des ions Mg^{2+} hydratés est de 3 à 4 fois plus lent que celui des ions Ca^{2+} (Maguire et al., 2002). De plus, le ratio des liaisons des ions Mg^{2+} est limité par le ratio de déshydratation, ce qui implique une faible liaison des Mg^{2+} aux protéines et aux petites molécules (Maguire et al., 2006). Au niveau du type d'interaction, les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} exhibent une préférence de coordination avec la chaîne latérale des groupes carboxyle suivi par une préférence plus faible pour les interactions avec les atomes d'oxygène de la chaîne latérale des groupes amide (Romani et al., 1992). Les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} ont une préférence de liaison avec les résidus aspartate et glutamate. Au niveau de l'interaction avec la chaîne latérale notamment les groupes hydroxyle et oxygène, les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} présentent une préférence complètement différente (Maguire et al., 2002). Alors que les ions Mg^{2+} présentent une préférence d'interaction pour les groupements oxygène et hydroxyle, les ions Ca^{2+} présentent une interaction plus faible avec ces deux groupements. Ceci est expliqué par le fait que les ions Mg^{2+} sont de plus petite taille induisant une déprotonation des groupements hydroxyles, produisant une plus grande liaison à l-O, où l'ion Ca^{2+} est plus large (Maguire et al., 2006). Également les ions Mg^{2+} présentent une préférence

d'interaction avec les atomes d'azote des résidus lysine et histidine alors que les atomes plus larges comme les ions Ca^{2+} n'ont aucune préférence d'interaction avec les atomes d'azote (Zheng et al., 2008).

En présence d'ions Ca^{2+} , les mutations E897K et R895C au niveau du C-terminal TRPC6 ont présenté une structure tétramérique avec une stabilité thermodynamique supérieure à celle observée pour le tétramère de type sauvage. L'introduction des ions Mg^{2+} dans le milieu affecte d'une façon minimale la stabilité thermodynamique du repliement des segments mutés E897K et R895C. Ces résultats suggèrent que les résidus E_{897} et R_{895} sont des résidus impliqués dans la régulation du niveau d'interaction ionique du segment C-terminal TRPC6 avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Les mutations de ces résidus avec une lysine et une arginine respectivement provoquent une diminution de la sensibilité thermodynamique suite à la liaison aux ions Ca^{2+} comparativement au segment de type sauvage. Par contre les mêmes mutations abolissent complètement l'interaction ionique avec les ions Mg^{2+} ce qui par conséquent abolit d'une façon quasi complète la sensibilité du repliement des segments C-terminaux TRPC6 mutés face à la variation de température. Ceci implique que les mutations E897K et R895C provoquent des comportements d'interaction ioniques différents face à la variation des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} démontrés par des réactivités différentes dans nos essais de dénaturation thermique. Comme mentionné précédemment les ions Mg^{2+} nécessitent une distance plus petite pour permettre d'établir un lien ionique avec la chaîne latérale de nos segments C-terminal TRPC6 et les mutations E897K ou R895C modifie cette interaction en diminuant l'exposition des résidus impliqués dans liaison aux ions Mg^{2+} ou tout simplement en développant un potentiel électrostatique qui défavorise l'interaction ionique avec les ions Mg^{2+} . Au niveau cellulaire, les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} interagissent d'une manière différente avec la chaîne latérale du segment C-terminal TRPC6 de type sauvage. Dans le cas des mutants R895C et E897K, ces mutations touchent des résidus clés qui jouent un rôle dans la modulation de cette interaction ionique en la diminuant dans le cas des ions

Ca^{2+} et complètement la défavorisé dans le cas des ions Mg^{2+} . Si on suit notre hypothèse de l'implication potentielle du segment C-terminal dans le processus de fermeture du canal TRPC6, cette sensibilité est importante pour répondre d'une façon optimale et non excessive à un processus cellulaire. Au niveau cellulaire, un mécanisme plausible est que les ions Mg^{2+} interagissent avec le tétramère formé des segments C-terminaux TRPC6 de type sauvage. Lors de l'élévation de la concentration d'ions Ca^{2+} intracellulaire suite à une stimulation, les ions Ca^{2+} vont à leurs tours interagir d'une manière complémentaire avec les ions Mg^{2+} à la portion C-terminal du canal TRPC6 de type sauvage afin de modifier son potentiel d'interaction avec des protéines régulatrices de la fermeture du canal. Dans les cas des mutants R895C et E897K, le tétramère formé des C-terminaux mutés TRPC6 interagit faiblement avec les ions Mg^{2+} selon nos résultats CD. Donc suite à une élévation du niveau du Ca^{2+} intracellulaire, le tétramère muté va nécessiter plus d'ions Ca^{2+} pour combler ses sites d'interactions afin de favoriser l'interaction avec d'autres protéines régulatrices de la fermeture du canal TRPC6. Ce mécanisme pourrait donner une explication aux résultats de Reiser obtenus sur la différence d'amplitude de courant plus élevée obtenue pour les canaux TRPC6 avec les mutations R895C ou E897K comparativement au TRPC6 de type sauvage¹⁵⁹. Cette différence d'amplitude enregistrée pour les mutants R895C et E897K par le groupe de Reiser ne nous permet pas de différencier si le canal reste plus longtemps ouvert (temps d'ouverture) ou permet une entrée plus grande sur une même période d'ouverture (quantité ionique qui passe à travers le canal à un temps t). Afin de répondre à l'hypothèse sur le mécanisme plausible de l'action synergique des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sur le C-terminal TRPC6, nous avons évalué si ces ions ont un rôle complémentaire ou coopératif sur la thermodynamique du repliement du tétramère C-terminal TRPC6. Pour le segment C-terminal TRPC6 de type sauvage, les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} dans un même environnement n'ont pas un comportement de compétitivité ou de coopérativité, mais plutôt ils agissent d'une façon complémentaire. Ce comportement ionique est observé dans nos résultats en présence de Mg^{2+} à des concentrations

physiologiques avec des concentrations faibles en ions Ca^{2+} ou on a pu observer une augmentation de la sensibilité thermodynamique du tétramère C-terminal TRPC6 de type sauvage suite à l'interaction de ces deux ions. Ceci implique qu'en présence de Mg^{2+} , l'interaction des ions Ca^{2+} avec la structure du tétramère formé par le C-terminal TRPC6 est favorisée à de faibles concentrations d'ions Ca^{2+} . Cette conclusion est supportée par les spectres de dénaturation thermique du segment C-terminal TRPC6 à faibles concentrations de Ca^{2+} en présence d'ions Mg^{2+} , phénomène non observé dans les conditions en présence de Ca^{2+} seul aux mêmes concentrations. Ce résultat est remarquable parce que dans des conditions de stimulations, le Mg^{2+} cellulaire est dans l'ordre du mM et de 10^{-5} M pour les Ca^{2+} ce qui suggère que les ions Mg^{2+} et le Ca^{2+} peuvent agir ensemble en même temps sur le tétramère C-terminal TRPC6 en réponse à une élévation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Également les ions Mg^{2+} peuvent être en interaction permanente avec le segment C-terminal et que seulement lors d'une élévation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que le C-terminal peut participer dans la régulation de l'ouverture du canal TRPC6. En complément à la faible interaction des ions Mg^{2+} sur la structure des segments mutés E897K et R895C, l'addition des ions Ca^{2+} aux ions Mg^{2+} n'a provoqué aucun effet de complémentarité ionique sur la sensibilité thermodynamique de la structure des segments mutés E897K et R895C. Donc ces résultats nous permettent de suggérer que le mécanisme d'action des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sur le segment C-terminal TRPC6 proposé plus haut est plausible. En effet, dans des conditions d'expression du canal TRPC6 de type sauvage, les ions Mg^{2+} et l'élévation des ions Ca^{2+} interagissent d'une manière complémentaire avec le tétramère formé par les hélices du segment C-terminal TRPC6. Cette interaction ionique modifie la dispersion de charge et régule l'interaction du C-terminal avec d'autres protéines régulatrices de la fermeture du canal. Ce mécanisme de fermeture est retardé dans le cas des mutations des résidus R895C et E897K. Ces deux mutations réduisent l'interaction du C-terminal TRPC6 aux ions Mg^{2+} ce qui nécessite une plus grande concentration de Ca^{2+} afin de favoriser l'interaction avec des protéines régulatrices de la fermeture du canal. Ce mécanisme est supporté par le

phénotype qu'on observe de ces deux mutations sur l'activité du canal TRPC6 qui résulte à une entrée plus grande de Ca^{2+} ce qui dérégule les protéines du cytosquelette cellulaire et provoque l'effacement des pédicelles dans le cas des lésions FSGS (Heeringa et al., 2009). La découverte de l'action des ions Mg^{2+} sur la stabilité thermodynamique du C-terminal TRPC6 nous amener à investiguer le rôle de ces ions sur l'activité calcique ainsi que sur la régulation des canaux TRPC6 au niveau cellulaire. Nous avons étudié l'impact de la variation d'ions Mg^{2+} sur la signalisation calcique médiée par les canaux TRPC6 dans un modèle cellulaire HEK293 surexprimant TRPC6 type sauvage, le mutant TRPC6 E897K ou le mutant TRPC6 R895C. Notre approche était d'étudier l'effet de l'augmentation de la concentration du Mg^{2+} intracellulaire sur l'activité du canal TRPC6 et l'activité des canaux mutés retrouvés dans les lésions FSGS. Pour augmenter la $[\text{Mg}^{2+}]_i$, nous nous sommes basé sur le principe de diffusion des ions Mg^{2+} via la membrane et l'action des pompes Mg^{2+} qui, lors de l'augmentation du $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{ext}}$, ces mécanismes permettent l'augmentation de la $[\text{Mg}^{2+}]_i$ (Romani et al., 1992). Au niveau basal, l'augmentation de la concentration $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{ext}}$ n'influence pas l'entrée calcique qui est la résultante de l'activité des canaux calciques membranaires notamment les canaux TRPC1 et Orai1 exprimés au niveau basal. Dans des conditions de surexpression des canaux TRPC6 dans les cellules HEK293, l'élévation du Mg^{2+} intracellulaire suite à l'augmentation du Mg^{2+} extracellulaire a diminué l'entrée calcique des canaux TRPC6 exprimés. Cette observation implique que l'élévation du Mg^{2+} intracellulaire augmente la sensibilité du C-terminal au niveau de l'élévation des niveaux Ca^{2+} intracellulaire et par l'effet même diminue l'entrée calcique via le canal TRPC6. La surexpression des canaux TRPC6 ayant la mutation R895C ou E897K en réponse à un stimulus fait augmenter l'entrée calcique à des niveaux supérieurs comparativement à la surexpression des canaux TRPC6 de type sauvage dans le même type cellulaire. Ce résultat suggère que les mutations R895C et E897K laissent passer plus d'ions Ca^{2+} à travers du canal TRPC6 muté sur une même période de temps d'ouverture comparativement au TRPC6 de type sauvage.

L'action de l'élévation des ions Mg^{2+} intracellulaires suite à l'augmentation de $[Mg^{2+}]_{ext}$ sur les canaux TRPC6 ayant les mutations R895C ou E897K voient leurs entrées calcium grandement diminué pour atteindre un niveau comparable à celui des canaux TRPC6 de type sauvage dans les mêmes conditions. Ces résultats nous démontrent que l'élévation du Mg^{2+} intracellulaire diminue l'entrée calcique des canaux TRPC6 de type sauvage. Dans les cas des mutations R895C ou E897K au niveau du C-terminal TRPC6, nos résultats démontrent que l'élévation de la concentration Mg^{2+} intracellulaire amplifie la diminution d'entrée calcique via les canaux TRPC6 mutés. Ceci implique que le segment C-terminal de TRPC6 joue un rôle dans l'inhibition de l'activité du canal TRPC6 et que R₈₉₅ ou E₈₉₇ sont des résidus importants dans la modulation de cette inhibition. Ces résultats sont en concordance avec les résultats observés de l'interaction des ions Mg^{2+} avec la chaîne latérale du repliement en hélices α des segments C-terminal TRPC6 et l'impact des mutations R895C et E897K dans la réduction de cette interaction ionique. Les résultats obtenus au niveau de nos essais cellulaires ne nous permettent pas de dissocier si le processus de régulation du canal TRPC6 est en réponse de l'implication du segment C-terminal ou plutôt du segment N-terminal du canal TRPC6. Pour permettre de confirmer le rôle du segment C-terminal TRPC6, nous avons travaillé avec une chimère du canal TRPC6. Cette chimère est un canal TRPC6 pour lequel nous avons substitué la région C-terminal pour le segment C-terminal homologue du canal TRPC4. Au niveau de nos essais calciques, nous avons observé un niveau d'entrée calcique avec la chimère plus important dans des conditions physiologiques normales comparativement aux canaux TRPC6 de type sauvage ce qui est en accord avec ce qui a déjà été observé dans la littérature (Lepage et al., 2006). L'effet cellulaire du magnésium sur l'activité des canaux TRPC6 a été aboli lorsque la région C-terminal de TRPC6 a été substituée puisqu'aucune variation significative de la vitesse initiale et de l'amplitude maximale est survenue. Au niveau cellulaire, ces résultats suggèrent que le segment C-terminal TRPC6 est responsable de l'action régulatrice des ions Mg^{2+} sur l'entrée calcique via les canaux TRPC6. Depuis le début de mes

études jusqu'à aujourd'hui, plusieurs mutations ont été identifiées au niveau des canaux TRPC6 et associées à des lésions de type FSGS (Tableaux 1 et 2). Les mutations répertoriées dans les tableaux 1 et 2 associées à la FSGS peuvent être catégorisées en trois groupes : des mutations qui augmentent l'activité du canal TRPC6, des mutations qui n'influencent pas l'activité du canal TRPC6 ainsi que les mutations qui diminuent l'activité du canal TRPC6. De par leurs localisations, j'ai également répertorié les mutations selon leurs emplacements structuraux au niveau des différents segments du canal TRPC6. Ce qui ressort de cette classification est que la majorité des mutations qui modifient l'activité du canal TRPC6 se retrouve au niveau des domaines N- et C- terminaux du canal TRPC6 (à l'exception de la mutation L395A qui se retrouve au niveau du domaine transmembranaire). Les mutations au niveau des domaines 1 à 4 de répétitions à l'ankyrine du segment N-terminal notamment G109S, N110H, P112Q, M132T, N143S, R175Q, provoquent une augmentation de l'entrée calcium au niveau des podocytes exprimant ces canaux mutés (Winn et al., 2005; Riehle et al., 2016). La majorité de ces mutations provoque également une augmentation de l'expression de ces canaux TRPC6 mutés au niveau de la membrane cytoplasmique ce qui explique en partie l'augmentation de l'entrée calcique (Winn et al., 2005; Riehle et al., 2016). Il faut se rappeler que les domaines à répétition à l'ankyrine sont des domaines impliqués dans la tétramérisation du canal TRPC6 et que leurs mutations peuvent influencer le processus de dégradation du canal ou son recyclage de la membrane. Au niveau du segment C-terminal on peut remarquer des mutations tout aussi intéressantes, il y a la présence des mutations R895C et E897K qui augmentent l'activité du canal TRPC6 muté sans influencé son niveau d'expression membranaire. Également on retrouve les mutations Q889K qui augmentent l'entrée calcique sans influencer son expression à la membrane. Nous avons tenté d'exprimer et purifier le C-terminal TRPC6 ayant cette mutation pour l'analyser, mais nous n'étions pas en mesure d'avoir les paramètres optimaux pour son expression ou sa purification. Des mutations au niveau de la portion entre le C-terminal et le sixième domaine transmembranaire TRPC6, G757S et L780P

diminuent l'activité du canal sans influencer le niveau d'expression au niveau membranaire. Ce segment du canal pourrait être également impliqué dans la régulation de la fermeture du canal TRPC6 via un mécanisme différent. En utilisant la structure résolue par le groupe de Tang du canal TRPC6 j'ai également isolé les segments N- et C-terminaux afin d'avoir une meilleure visibilité des chaînes latérales impliquées dans les mutations FSGS qui provoquent une augmentation de l'activité du canal TRPC6. Comme on peut l'observer au niveau de la figure 48, la majorité des mutations se retrouve au niveau des chaînes latérales des interfaces délimitées par l'hélice verticale du segment C-terminal TRPC6 et les 3 premiers domaines de répétition à l'ankyrine. Cette observation suggère que cette interface est impliquée dans la régulation de l'activité du canal TRPC6. Avec la dispersion du potentiel électrostatique, cette interface est fortement chargée négativement comme présentée dans les travaux de Azumalay. Ce caractère peut suggérer que l'interaction des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} se fait au niveau de cette interface négative qui, suite à la liaison avec ces deux ions, participe au processus de la fermeture du canal. À la figure 49, j'ai présenté la même localisation des chaînes latérales des résidus impliqués dans les mutations FSGS qui provoquent l'augmentation de l'activité du canal, mais dans un plan d'un tétramère du canal TRPC6. On remarque clairement que ces résidus sont bien positionnés entre les domaines à répétition à l'ankyrine 1 à 3 et le segment C-terminal du canal TRPC6 avec une interaction avec l'environnement ionique cytoplasmique.

Segment du canal TRPC6	Mutation	Activité du canal TRPC6 (entrée Ca ²⁺)	Référence
Avant AR1	P15S	---	Obeidova et al. 2012 (D)
AR1	G109S	Augmentation	Satin et al. 2009 (D) Riehle et al. 2016 (F)
AR1	N110H	Augmentation	Barua et al. 2013 (D) Riehle et al. 2016 (F)
AR1	P112Q	Augmentation	Winn et al. 2005 (D+F) Riehle et al. 2016 (F)
Lien entre AR1 et AR2	N125S	Diminution	Satin et al. 2009 (D) Riehle et al. 2016 (F)
Lien entre AR1 et AR2	M132T	Augmentation	Heeringa et al. 2009 (D+F) Riehle et al. 2016 (F)
AR2	N143S	Augmentation	Reiser et al. 2005 (D+F) Riehle et al. 2016 (F)
AR3	R175Q	Augmentation	Hofstra et al. 2013 (D+F) Riehle et al. 2016 (F)
AR4	H218L	Augmentation	Gigante et al. 2011 Riehle et al. 2016 (F)
Entre LH 3 et LH4	S270T	Semblable au WT	Reiser et al. 2005 (D+F) Riehle et al. 2016 (F)
DTM	R360H	Semblable au WT	Buscher et al. 2012 (D) Riehle et al. 2016 (F)
DTM	L395A	Diminution	Mir et al. 2012 (D) Riehle et al. 2016 (F)
DTM	A404V	Semblable au WT	Mir et al. 2012 (D) Riehle et al. 2016 (F)

Tableau 1: Distribution des mutations associées FSGS au niveau du domaine N-terminaux et domaines transmembranes du canal TRPC6. Tableau présentant la localisation des mutations associées à la FSGS selon le domaine du canal TRPC6 et leurs effets sur l'activité du canal TRPC6. (AR : répétition à l'ankyrine; LH : lien hélicale entre AR et le premier domaine transmembrane; DTM : domaine transmembrane). Au niveau des références (D : découverte de la mutation; F : découverte de la fonction de la mutation).

Segment du canal TRPC6	Mutation	Activité du canal TRPC6 (entrée Ca ²⁺)	Référence
Entre C-terminal + membrane cytoplasmique	G757D	Diminution	Buscher et al. 2010 (D) Riehle et al. 2016 (F)
Entre C-terminal + membrane cytoplasmique	L780P	Diminution	Satin et al. 2009 (D) Riehle et al. 2016 (F)
C-terminal H-H	K874*	Semblable au WT	Reiser et al. 2005 (D+F)
C-terminal H-V	Q889K	Augmentation	Gigante et al. 2012 (D) Riehle et al. 2016 (F)
C-terminal H-V	R895C	Augmentation	Reiser et al. 2005 (D+F) Riehle et al. 2016 (F)
C-terminal H-V	R895L	Diminution	Riehle et al. 2016 (F)
C-terminal H-V	R895L	Augmentation	Gigante et al. 2011 (D+F)
C-terminal H-V	E897K	Augmentation	Reiser et al. 2005 (D+F) Riehle et al. 2016 (F)

Tableau 2: Distribution des mutations associées FSGS au niveau du domaine C-terminal et du canal TRPC6. Tableau présentant la localisation des mutations associées à la FSGS selon le domaine du canal TRPC6 et leurs effets sur l'activité du canal TRPC6. (HH : hélice horizontale du domaine C-terminal; HV : hélice verticale du domaine C-terminal). Au niveau des références (D : découverte de la mutation; F : découverte de la fonction de la mutation).

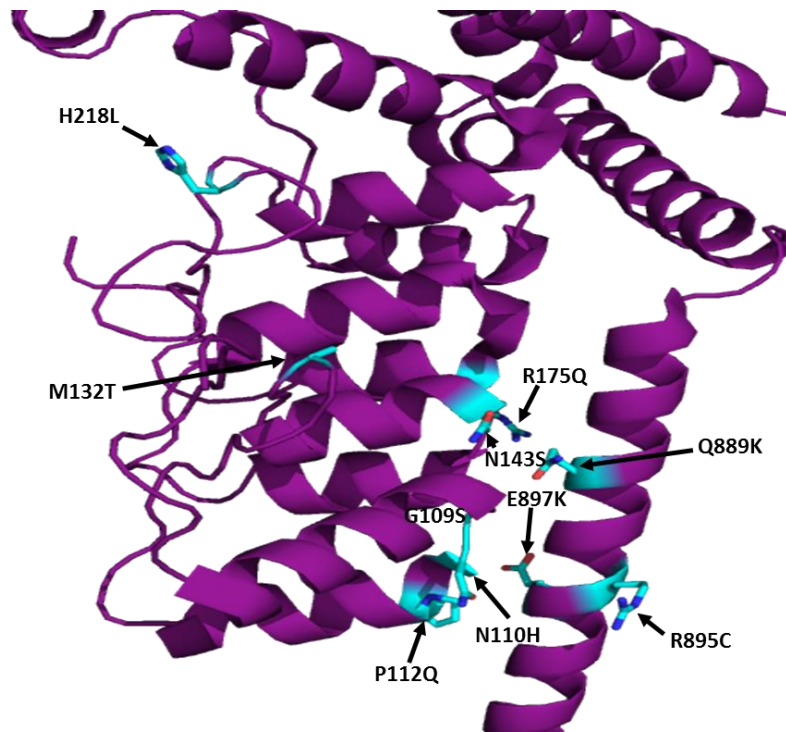


Figure 48: Localisation des différentes mutations FSGS au niveau de la structure des domaines N- et C- terminaux cytoplasmiques de TRPC6. Présentation des mutations FSGS qui sont associées à une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire au niveau des segments N- et C-terminaux du canal TRPC6. La couleur bleue représente les chaînes latérales des résidus mutés. Structure des segments N- et C-terminaux TRPC6 proviennent de la structure du TRPC6h (PDB : 5YX9).

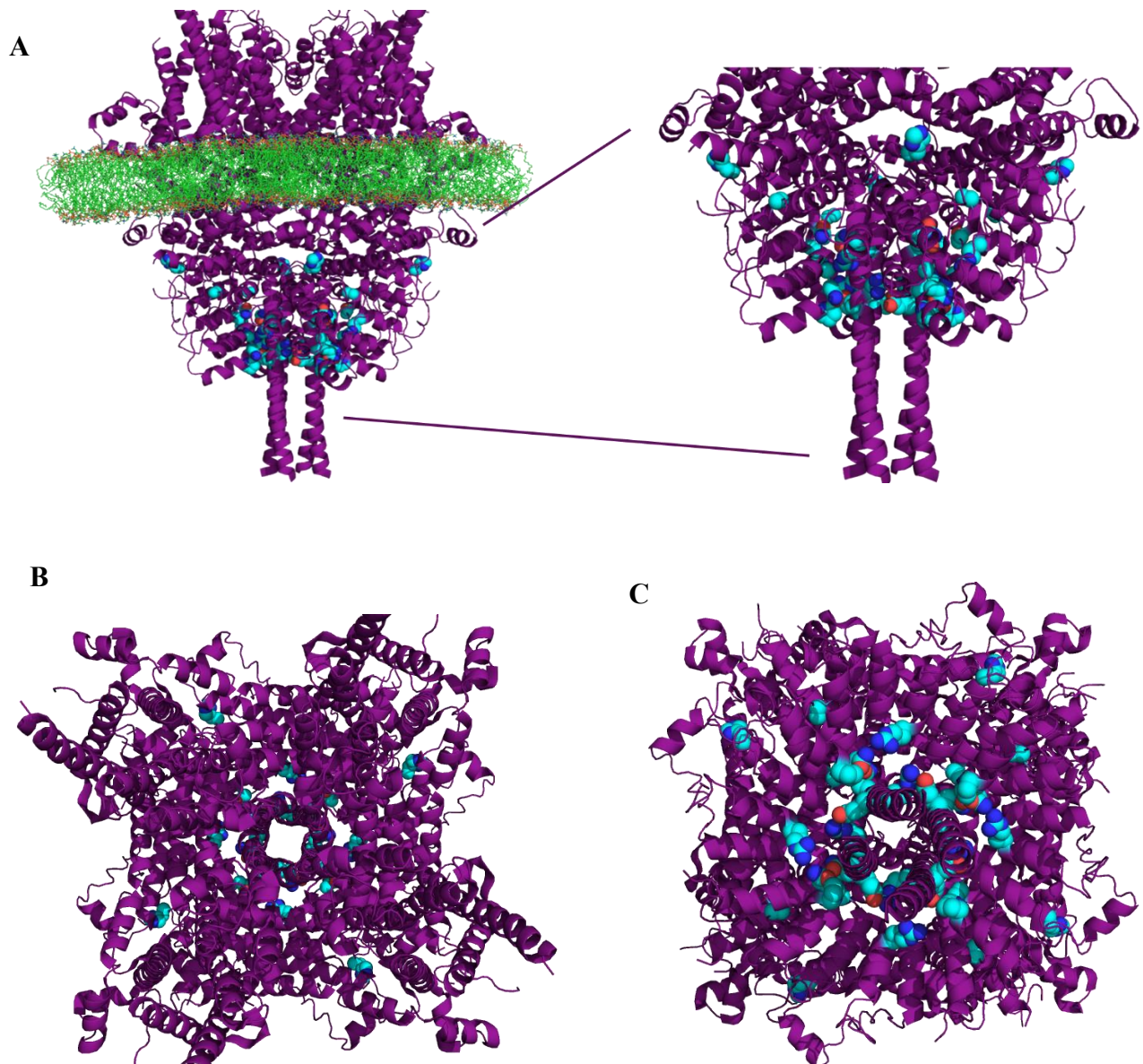


Figure 49: Localisation des différentes mutations FSGS au niveau de la structure du canal TRPC6h.

A) Présentation des mutations FSGS qui sont associées à une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire au niveau de la structure du tétramère du canal TRPC6. B) vue du dessus du tétramère et C) vu du dessous du tétramère du canal TRPC6. La couleur bleue représente les chaînes latérales des résidus mutés. Structure du canal TRPC6 provient de la structure du TRPC6h (PDB : 5YX9).

Conclusion et perspectives

La FSGS est une des lésions néphrotiques la plus commune qui cause la perte de la fonction rénale à un stade final chez les adultes et les enfants. À l'heure actuelle l'absence de traitements efficaces provoque l'évolution de l'état des patients FSGS à des stades avancés de lésion glomérulaire qui sont maintenus par la dialyse en attente de subir une transplantation rénale. Malheureusement, 30 à 40% des patients ayant reçu la transplantation subissent une récurrence (Heeringa et al., 2009). Depuis la dernière décennie, plusieurs groupes de recherche se sont penchés sur la compréhension des causes génétiques de la pathogenèse de la FSGS afin de déterminer une approche thérapeutique efficace. L'implication des canaux TRPC6 dans la régulation du calcium au niveau des podocytes est un facteur important dans le maintien du réseau protéique de leurs cytosquelettes. La dérégulation du niveau du Ca^{2+} intracellulaire est un mécanisme qui provoque la lésion des podocytes observée dans la forme génétique de FSGS. Cette dérégulation peut être causée par une augmentation de l'expression des canaux TRPC6, par l'interaction avec des protéines régulatrices du canal ou par des mutations au niveau des canaux TRPC6 qui influencent son activité. Des mutations au niveau du segment C-terminal TRPC6 notamment R895C et E897K provoquent une augmentation anormale de l'activité du canal qui favorise une plus grande entrée du calcium dans les podocytes. Afin de mieux comprendre les mécanismes structuraux impliqués dans la régulation de ces canaux, cette thèse présente une étude de la dynamique structurale du segment C-terminal TRPC6 et de l'interaction ionique de ce segment avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Nos travaux ont démontré pour la première fois que le segment C-terminal TRPC6 forme un complexe tétramérique avec un repliement global organisé en hélice α qui présente une stabilité thermodynamique modulée par l'interaction ionique spécifique aux ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Cette observation a été réalisée avant la publication des structures des canaux TRPC6 du groupe Tang et Azumaya en 2018. Mon étude amène une

compréhension structurale supplémentaire à ces travaux par le fait que le segment C-terminal TRPC6 étudié est de pleine longueur (comprenant le domaine CIBR) comparativement à celui caractérisé par le groupe de Tang ou le groupe de Azymaya. Les mutations R895C ou E897K du segment C-terminal TRPC6 n'influencent pas l'état de repliement en hélices α du tétramère C-terminal TRPC6. Par contre nos travaux ont démontré que les mutations R895C et E897K réduisent considérablement l'interaction ionique avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} ce qui suggère que ces mutations réduisent la probabilité d'interaction du tétramère C-terminal muté à la variation de la concentration des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} dans milieu cytoplasmique. La découverte du rôle des ions Mg^{2+} sur la thermodynamique structurale du C-terminal TRPC6 nous a conduit à démontrer que l'augmentation du Mg^{2+} intracellulaire diminue l'entrée calcique des canaux TRPC6 exprimés au niveau cellulaire. Les canaux TRPC6 avec les mutations R895C ou E897K perdent totalement cette réactivité à la variation des ions Mg^{2+} . En utilisant une chimère du canal TRPC6, nous avons démontré que le segment C-terminal TRPC6 est impliqué dans la régulation de l'activité du canal TRPC6. Les mutations R895C et E897K n'influencent pas la tétramérisation du segment C-terminal, mais, de par la position de leurs chaînes latérales, ils jouent un rôle sur la régulation d'interaction ionique avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} qui par l'effet même influence le processus de fermeture des canaux TRPC6 mutés. Cette étude rajoute une marche importante dans la compréhension du rôle structural thermodynamique et de l'interaction ionique du segment C-terminal dans la régulation des canaux TRPC6.

Maintenant que nous connaissons la structure du C-terminal TRPC6 et l'influence de la variation ionique des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sur le comportement thermodynamique du repliement de ce segment, il sera pertinent d'explorer l'influence de ces deux ions sur la structure du segment C-terminal, soit par les techniques de microscopie électronique cryogénique, RMN ou cristallographie. Ces études pourraient

nous permettre d'aller plus loin dans la compréhension à la fois de la dynamique de la structure face à la variation ionique du milieu, mais également dans l'identification des chaînes latérales des résidus impliqués dans la coordination des ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Nous savons que la régulation des canaux TRPC6 joue un rôle au niveau de la pathogenèse de la FSGS, mais également au niveau de l'hypoxie induite suite à la vasoconstriction pulmonaire (HPV). Plusieurs molécules ont été développées notamment Larixyl carbamate, GSK255B et GSK503A avec un potentiel inhibiteur spécifique aux canaux TRPC6 portant un potentiel thérapeutique prometteur (Anderson et al., 2013). Avec des analyses de dynamique structurale des canaux TRPC6 et une meilleure compréhension de leurs mécanismes de régulation, nous serons en mesure de développer de meilleures molécules pharmacologiques avec un potentiel thérapeutique efficace. Le développement de ces molécules pharmacologiques est d'une importance capitale vu leurs impacts cliniques dans un objectif de contrôler la propagation des lésions chez les patients FSGS. Ayant la biopsie comme seul outil diagnostique chez les patients atteints de la forme génétique de FSGS, l'importance de l'implication des canaux TRPC6 chez ces patients nous permet de confirmer que le profilage génétique des mutations au niveau du C-terminal TRPC6 est une approche diagnostique importante à considérer dans la prise en main de ces patients. Cette étape diagnostique va nous permettre de cibler l'approche thérapeutique la plus efficace à entreprendre afin de réduire le plus possible le taux de mortalité chez ces patients.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de recherche, le Pr Guylain Boulay et le Pr Pierre Lavigne, pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires, pour leurs confiances, leurs disponibilités, leurs enthousiasmes et tous les précieux conseils qu'ils m'ont prodigués tout au long de ces années. Je tiens également à remercier le Pr Boulay pour m'avoir toujours poussé à approfondir l'interprétation de mes résultats et de toujours trouver le sens à mes expériences au laboratoire. Merci au Pr Lavigne qui m'a immergé dans l'environnement des structures des protéines et qui m'a permis de comprendre l'importance des structures des protéines dans leurs fonctions biologiques.

Je remercie également les membres du jury, Pr Christine Lavoie, Pr Guylain Boissonneault et Pr Rémy Sauvé pour l'évaluation de ma thèse. Vos remarques et commentaires avaient une importance capitale dans l'amélioration de la qualité de ce document.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire du Pr Boulay, présents et passés, qui ont contribué de proche ou de loin à chacune de mes journées au laboratoire durant ces années. Merci pour m'avoir immergé dans le monde des TRPs, de la signalisation calcique et pour votre aide au niveau des expériences et aussi dans le support d'équipe qui se vivait comme une grande famille au laboratoire. Donc un grand merci à toi : Nancy Francoeur, Simon Bousquet, Nathalie Nguyen, Michael Monet, Valérie Chartrand, Francis Phaneuf, Léna le Bras et Julien Maillet.

Un gros merci également aux membres du laboratoire du Pr Lavigne, présents et passés, qui m'ont fourni assez de café pour comprendre le monde des structures des protéines, les heures d'assistance avec l'appareil CD, les débats scientifiques de haut calibre sur mes résultats qui m'ont sans cesse poussé à

améliorer mon travail. Un gros Merci à toi : Martin Montagne, Danny Létourneau, Mikael Bébard, Jérôme Cabana, Loïka Maltais, François-Olivier McDuff

Je tiens également à remercier les membres du département administratifs de la faculté qui durant ces dernières années m'ont assisté sans relâche pour compléter à bien mes études supérieures

Finalement et non le moindre, merci à mes parents, qui m'ont supporté durant toutes ces années tentant toujours à comprendre ce que je fais si le CD n'était toujours qu'un support de musique pour eux. Également je leur remercie de tout cœur pour avoir cru en moi malgré le doute de quelques personnes sur mon potentiel et grâce à leurs convictions dans mon travail acharné. Ils ont tout laissé et quitté un continent pour me permettre de poursuivre mes études et arriver à atteindre mon objectif scientifique et d'améliorer mon savoir. Également merci à Marie-Andrée qui m'a supporté durant ces dernières années difficiles qui ont pesé lourdement sur notre rythme de vie, mais qu'elle a toujours cru en moi et que malgré tout elle a supporté cet étudiant scientifique qui observait durant des heures des graphiques CD tentant de comprendre ce que mes résultats tentaient de me dire.

Je tiens à dédicacer cette thèse à ma sœur Linda, que je ne l'ai pas vu depuis maintenant 5 ans, mais qu'un jour j'espère la revoir et la serrer fort vu que dans mon cœur t'as toujours été là avec moi.

Références

Albert, A.P. et Large W.A. (2003) Synergism between inositol phosphates and diacylglycerol on native TRPC6-like channels in rabbit portal vein myocytes. *J Physiol.* **552**, 789-795.

Alessandri-Haber N, Dina OA, Chen X, Levine JD (2009) TRPC1 and TRPC6 channels cooperate with TRPV4 to mediate mechanical hyperalgesia and nociceptor sensitization, *J Neurosci* 29 :6217-6228

Alexander SP, Mathie A, Peters JA. (2004) Guide to receptors and channels, *1st edition Br. J. Pharmacol.* **141**, 1-126

Anderson M, Kim EY, Hagmann H, Benzing T, Dryer SE. (2013) Opposing effects of podocin on the gating of podocyte TRPC6 channels evoked by membrane stretch or diacylglycerol. *Am J Physiol Cell Physiol.* **305**, C276–289

Anderson M, Roshanravan H, Khine J, Dryer SE. (2014) Angiotensin II activation of TRPC6 channels in rat podocytes requires generation of reactive oxygen species. *J Cell Physiol.* **229**, 434–442

Ansubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et Struhl K. (2002) *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York

Antigny F, Norez C, Dannhoffer L, Bertrand J, Raveau D, Corbi P, Becq F, Vandebrouck C. (2011) TRPC6 Links Ca²⁺ Mishandling to CFTR Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **44(1)**, 83-90

- Apostolidis A, Brady CM, Yangou Y, Davis J, Fowler CJ, Anand P.** (2005) Capsaicin receptor TRPV1 in urothelium of neurogenic human bladders and effect of intravesical resiniferatoxin. *Urology*. **65(2)**, 400-405
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et Struhl K.** (2002) Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York
- Azumaya CM, Sierra-Valdez F, Cordero-Morales JF et Nakagawa T.** (2018) Cryo-EM structure of the cytoplasmic domain of murine transient receptor potential cation channel subfamily C member 6 (TRPC6). *J Biological chemistry*. **293(26)**, 10381–10391
- Bach G.** (2001) Mucopolipidosis type IV. *Mol. Genet. Metab.* **73**, 197-203
- Baldwin RL.** (1986) Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 8069–8072
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A.** (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*. **41**, 849–857
- Barnett CE.** (1942) Some applications of wave-length turbidimetry in the infrared. *J Phys Chem*. **46**, 69–75
- Basora N, Boulay G, Bilodeau L, Rousseau E, Payet MD** (2003) 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *J Biol Chem*. **278** :31709-31716
- Bataille N, Schmitt N, Aumercier-Maes P, Olivier B, Lucas-Heron B, Lestienne P.** (1994) Molecular cloning of human calmitine, a mitochondrial calcium binding protein, reveals identity with calsequestrine. *Biochem Biophys Res Commun*. **203(3)**, 1477-82

- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D.** (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*. **124**, 1269–1282
- Beerhues L** (2006) Hyperforin. *Phytochemistry* **67** :2201-2207
- Berchtold M. W., Celio M. R., Heizmann C. W.** (1984) Parvalbumin in non-muscle tissues of the rat. Quantitation and immunohistochemical localization. *J. Biol. Chem.* **259**, 5189–5196
- Berne BJ, Pecora R.** (1976) Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Berova N, Nakanishi K, Woody RW** (Eds), (2000) Circular Dichroism: Principales and Applications, 2 nd ed., Wiley-VCH, New York. 877pp
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P.** (1998) Calcium-a life and death signal. *Nature*. **395**, 645–648
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD.** (2000) The versatiliy and universality of calcium signalling. *Na Rev Mol Cell Biol.* **1**, 11-21
- Berry GC.** (2010) The hydrodynamic and conformational properties of denatured proteins in dilute solutions. *Protein Sci.***19**, 94–98
- Beskina O., Miller, A., Mazzocco-Spezia, A., Pulina M. V et Golovina V.** (2007) Mechanisms of interleukin-1beta-induced Ca²⁺ signals in mouse cortical astrocytes: roles of store- and receptor-operated Ca²⁺ entry. *Am J Physiol Cell Physiol.* **293**, C1103-11.
- Beychok D.** (1966) Circular dichroism of biological macromoleculs. *Science*. **154(754)** ,1288-1299
- Bezzerides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE.** (2004) Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels *Nat. Cell Biol.*, **6**, pp. 709-720

Billy J, Grycova L, Holendova B, Jirku M, Janouskova H, Bousova K, Teisinger J. (2013) Characterization of the S100A1 Protein Binding Site on TRPC6 C-Terminus. *PlosOne* 2013. Vol. 8 Issue 5. 1-6

Blair NT, Kaczmarek JS, Clapham DE. (2009) Intracellular calcium strongly potentiates agonist-activated TRPC5 channels. *J Gen Physiol.* **133**, 525–546

Blaustein M et Lederrer W. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* **79(3)**, 763-854.

Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L. (1997) Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem.* **272(47)**, 2967280

Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang MS, Dietrich A, Zhu MX, Chen ZG, Birnbaumer M, Mikoshiba K et Birnbaumer L. (1999) Modulation of Ca²⁺ entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor (TRP): Evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca²⁺ entry. *Proc Natl Acad Sci USA* **96(26)**, 14955-14960.

Bousquet SM, Monet M, et Boulay G. (2010) Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. *J Biol Chem.* **285(52)**, 40534-43

Bousquet SM, Monet M, et Boulay G. (2011) The Serine 814 of TRPC6 is Phosphorylated under Unstimulated Conditions. *PLoS One.* **6(3)**, e18121

Brechard S, Melchior C, Plancon S, Schenten V, Tschirhart EJ (2008) Store-operated Ca²⁺ channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai 1 and non-store-operated channels formed by

TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. *Cell Calcium* 44:492-506

Cai S, Fatherazi S, Presland RB, Belton CM, Izutsu KT. (2005) TRPC channel expression during calcium induced differentiation of human gingival keratinocytes. *J Dermatol Sci.* **40(1)**, 21-28

Carrasquillo R, Tian D, Krishna S, Pollak MR, Greka A, Schlöndorff J. (2012) SNF8, a member of the ESCRT-II complex, interacts with TRPC6 and enhances its channel activity. *BMC Cell Biol.* **13**, 33

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997) The capsaicin receptor a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* **389**, 816–824

Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature.* **398**, 436–441

Cayouette S, Lussier MP, Mathieu EL, Bousquet SM, et Boulay, G. (2004) Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein coupled receptor activation. *J Biol Chem.* **279**, 7241-6

Cayouette S, Bousquet SM, Francoeur N, Dupre E, Monet M, Gagnon H, Guedri YB, Lavoie C, Boulay G. (2010) Involvement of Rab9 and Rab11 in the intracellular trafficking of TRPC6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* Vol. 1803, pp. 805-812

Chang MY, Ong AC (2008) Autosomal dominant polycystic kidney disease: Recent advances in pathogenesis and treatment. *Nephron physiol.* **108**, 1-7

Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Muller WE (1998) Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Lide Sci* 63 :499-510

- Chatterjee S, Filippov V, Lishko P, Maximyuk O, Noldner M, Krishtal O** (1999) Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat. *Life Sci* 65 :2395-2405
- Chi X, Hu B, Yu SY, Yin L, Meng Y, Wang B, et al.** (2015) Losartan treating podocyte injury induced by Ang II via downregulation of TRPC6 in podocytes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **16(4)**, 1118-24
- Chin D, Means AR.** (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in cell biology.***10**, 322–328
- Chubanov V, Waldegger S, Mederos y, Schnitzler M, Vitzthum H, Sassen MC, Seyberth HW, Konrad M, Gudermann T.** (2004) Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 2894–2899
- Chyb S, Raghu P, Hardie RC** (1999) Polyunsaturated fatty acids activate the Drosophila light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* 397:255-259
- Clapham DE, Runnels LW, and Strübing C.** (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* **2**, 387–396
- Clapham, D. E.** (2007) Calcium signaling. *Cell.* **131**, 1047-58
- Colletti GA, Kiselyov K.** (2011) TRPML1. *Adv Exp Med Biol.* **704**, 209-219
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Geleoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS.** (2004) TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature.* **432**, 723–730

- Cosens, D. J. & Manning, A.** (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*. **224**, 285-7
- Curthoys NP, Moe OW.** (2014) Proximal tubule function and response to acidosis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology. CJASN*. **9**, 1627–1638
- Davare MA, Fortin DA, Saneyoshi T, Nygaard S, Kaech S, Banker G, Soderling TR, Wayman GA.** (2009) Transient receptor potential canonical 5 channels activate Ca²⁺/calmodulin kinase I gamma to promote axon formation in hippocampal neurons. *J Neurosci*. **29**, 9794–9808
- Delany NS, Hurlle M, Facer P, Alnadaf T, Plumpton C, Kinghorn I, See CG, Costigan M, Anand P, Woolf CJ, Crowther D, Sanseau P, Tate SN.** (2001) Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol Genomics*. **4**, 165–174
- Delmas P, Wanaverbecq N, Abogadie FC, Mistry M, et Brown DA.** (2002) Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP(3) pathways in neurons. *Neuron*. **34**, 209-20
- Delmas P.** (2004) Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell*. **118**, 145–148
- Delmas P, Nauli S, Li X, Coste B, Osorio N, Crest M, Brown D, Zhou J.** (2004) Gating of the polycystin ion channel signaling complex in neurons and kidney cells. *FASEB J*. **18**, 740–742
- Delmas P.** (2005) Polycystins: polymodal receptor/ion-channel cellular sensors. *Pflugers Arch*. **451**, 264–276
- Dempsey CE, Piggot TJ, Mason PE** (2005) Dissecting contributions to the denaturant sensitivities of proteins. *Biochemistry*. **44**, 775–781

- D'Esposito M, Strazzullo M, Cuccurese M, Spalluto C, Rocchi M, D'Urso M, Ciccodicola A.** (1998) Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21—q22. *Cytogenet Cell Genet.* **83 (1-2)**, 46-7
- Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T et Gudermann T.** (2003) N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem.* **278(48)**, 47842-47852.
- Dietrich A, et Gudermann T.** (2007) Trpc6. *Handb Exp Pharmacol.* 125-41
- Diez-Sampedro A, Lenz O, Fornoni A.** (2011) Podocytopathy in diabetes: a metabolic and endocrine disorder. *Am J Kidney Dis.* **58**, 637–646
- Du W, Huang J, Yao H, Zhou K, Duan B, Wang Y.** (2010) Inhibition of TRPC6 degradation suppresses ischemic brain damage in rats. *J Clin Invest.* **120**, 3480-3492
- Durvasula RV, Shankland SJ.** (2008) Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose. *American journal of physiology Renal physiology.* 294, F830–839
- Ebashi S, Endo M.** (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Prog Biophys Mol Biol.* **18**, 123-183.
- Eder P, Poteser M, Romanin C, Groschner K** (2005) Na⁽⁺⁾ entry and modulation of N⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchange as a key mechanism of TRPC signaling. *Pflugers Arch* 451 :99-104
- Endlich N, Endlich K.** (2012) The challenge and response of podocytes to glomerular hypertension. *Seminars in nephrology.* **32**,327–341
- Estacion M, Li S, Sinkins WG, Gosling M, Bahra P, Poll C, Westwick J, Schilling WP.** (2004) Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation. *J Biol Chem.* **279(21)**, 22047-56
- Falke JJ, Drake SK, Hazard AL, et Peersen OB.** (1994) Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins. *Quart. Rev. Biophys.* **27**, 219–290

Fasman GD (Ed.), (1996) Circular Dichroism and The Conformational Analysis of Biomolecules, Plenum Press, New York. 738

Fellner SK, Arendshorst WJ (2008) Angiotensin II-stimulated Ca²⁺ entry mechanisms in afferent arteriols: role of transient receptor potential canonical channels and reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Am J Physiol Renal Physiol* 294:F212-219

Fleming I, Rueben A, Propp R, Fisslthaler B, Schrodt S, Sander A, Haendeler J, Falck JR, Morisseau C, Hammock BD, Busse R (2007) Epoxyeicosatrienoic acids regulate Trp channel dependent Ca²⁺ signaling and hyperpolarization in endothelial cells. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 27 :2612-2618

Finney-Hayward TK, Popa MO, Bahra P, Li S, Poll CT, Gosling M, Nicholson AG, Russell RE, Kon OM, Jarai G, Westwick J, Barnes PJ, Donnelly LE. (2010) Expression of transient receptor potential C6 channels in human lung macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **43(3)**, 296-304

Foster RR, Zadeh MA, Welsh GI, Satchell SC, Ye Y, Mathieson PW, Bates DO, Saleem MA (2009) Flufenamic acid is a tool for investigating TRPC6-mediated calcium signalling in human conditionally immortalised podocytes and HEK293 cells. *Cell Calcium*

Friedlova E, Grycova L, Holakovska B, Silhan J, Janouskova H, Sulc M, Obsilova V, Teisinger J. (2010) The interactions of the C-terminal region of the TRPC6 channel with calmodulin. *Neurochemistry International.* **56(2)**, 363-366

Gilman AG (1987) G proteins: Transducers of receptor -generated signals. *Annu Rev Biochem.* **56**, 615-649.

Goel M, Sinkins W, Keightley A, Kinter M, Schilling WP (2005) Proteomic analysis of TRPC5- and TRPC6- binding partners reveals interaction with the plasmalemmal Na(+)/K(+)-ATPase. *Pflugers Arch* 451 :87-98

Goel M, Sinkins wG, Zuo CD, Estacion M, et Schilling, wP. (2006) Identification and localization of TRPC channels in the rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**, F1241–F1252

van de Graaf SF, Hoenderop JG, Bindels RJ. (2006) Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am J Physiol Renal Physiol.* **290(6)**, 1295–1302

Gratzer WB, et Cowburn DA. (1969) Optical activity of biopolymers. *Nature.* **222 (5192)**, 426-431

Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G et Harteneck C. (2003) Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem.* **278**, 21493-501

Groenestege wM, Hoenderop JG, van den Heuvel L, Knoers N et Bindels rJ. (2006) The epithelial Mg²⁺ channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg²⁺ content and estrogens. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1035–1043

Guderman T. (2005) A new TRP to kidney disease. *Nat Genet.* **37**, 663-664

Guinamard R, Rhmati M, Lefant J, Bois P. (2002) Characterization of a Ca²⁺ activated nonselective cation channel during dedifferentiation of cultured rat ventricular cardiomyocytes. *J Membr Biol.* **188**, 127-135

Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. (2002) The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 183-191

Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piotenk K, Tsiokas L, Sukhatme VP, Guggino WB, and Germino GG. (2000) Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature.* **408**, 990-994

Hardie RC (2007) TRP channels and lipids : from Drosophila to mammalian physiology. *J Physiol* **578** :9-24

Harding SE, Jumel K. Light scattering. In: Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT. (1998) Current protocols in protein science. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Harding SE, Allen G, (1999) Protein: a comprehensive treatise. *Greenwich, CT: JAI Press.* **(2)**, 271–305

Harper MT et Sage SO. (2010) Src family tyrosine kinases activate thrombin-induced non-capacitative cation entry in human platelets. *Platelets.* **21(6)**, 445-50

Hassock SR, Zhu MX, Trost C, Flockerzi V, et Authi KS. (2002) Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store independent calcium entry channel. *Blood.* **100**, 2801-11

Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Caims W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB. (2000) Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain.* **88(2)**, 205–215

Heeringa SF, Moller CC, Du J, Yue L, Hinkes B, Chernin G, Vlangos CN, Hoyer PF, Reiser J, Hildebrandt F. (2009) A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. *Plos One.* **4**, e7771

Henderson R. (1995) The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Rev, Biophys.* **28**, 171–193

Hermosura MC, Cui AM, Go RCV, Davenport B, Shetler CM, Heizer JW, Schmitz C, Mocz G, Garruto RM, Perreaud AL. (2008) Altered functional properties of a TRPM2 variant in Guamanian ALS and PD. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105(46)**,18029–18034

Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C (2001) The complex and intriguing lives of PIP2 with ion channels and transporters. *Sci STKE* 2001 :RE19

Hill AJ, Hinton JM, Cheng H, Gao Z, Bates DO, Hancox JC, Langton PD, James AF (2006) A TRPC-like non-selective cation current activated by alpha 1-adrenoceptors in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Cell Calcium* 40: 29-40

Hisatsune C, Kuroda Y, Nakamura K, Inoue T, Nakamura T, Michikawa T, Mizutani A, Mikoshiba K (2004) Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 279 :18887-18894

Hoenderop JG, Hartog A, Stuiver M, Doucet A, Willems P, Bindels R. (2000) Localization of the epithelial Ca²⁺ channel in rabbit kidney and intestine. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 1171–1178

Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature.* **397 (6716)**, 259-63.

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. (2000) Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J. Mol. Med.* **78**, 14-25

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 7461-7466.

Hong C, Seo H, Kwak M, Jeon J, Jang J, Jeong EM, Myeong J, Hwang K. Ha, Kang MJ, Hirst RA, Harrison C, Hirota K, Lambert DG (2005) Measurement of [Ca²⁺]_i in whole cell suspensions using fura-2. *Methods Mol Biol* 312 : 37-45

- Hisatsune C, Kuroda Y, Nakamura K, Inoue T, Nakamura T, Michikawa T, Mizutani A, Mikoshiba K.** (2004) Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* **279(18)**, 18887-94
- Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T.** (2001) Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *The Journal of biological chemistry.* **276**, 41543–41546
- Huber TB, Schermer B, Muller RU, Hohne M, Bartram M, Calixto A, et al.** (2006) Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **103**, 17079–17086
- Huber TB, Schermer B, Benzing T.** (2007) Podocin organizes ion channel-lipid super complexes: Implications for mechanosensation at the slit diaphragm. *Nephron Exp Nephrol.* **106**, e27-e31
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U.** (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97(11)**, 6155–6160
- Ilatovskaya DV, Palygin O, Chubinskiy-Nadezhdin V, Negulyaev YA, Ma R, Birnbaumer L, et al.** (2014) Angiotensin II has acute effects on TRPC6 channels in podocytes of freshly isolated glomeruli. *Kidney international.* **86**, 506–514
- Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y.** (2001) The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha (1)-adrenoceptor-activated Ca²⁺-permeable cation channel. *Circ Res.* **88(3)**, 325-32
- Inoue R, Jensen LJ, Jian Z, Shi J, Hai L, Laurie AI, Henriksen FH, Salmonsson M, Morita H, Kawarabayashi Y, Mori M, Mori Y, Ito Y** (2009) Synergistic Activation of Vascular TRPC6

Channel by Receptor and Mechanical Stimulation via Phospholipase C/ Diacylglycerol and Phospholipase A2/ Hydroxylase/ 20-HETE Pathways. *Circ Res*

Jardin I, Gomez LJ, Salido Gm, Rosado JA (2009) Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca (2+) entry pathways. *Biochem J* 420 :267-276

Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. (2008) Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney international.* 74, 22–36

Jia Y, Wang X, Varty L, Rizzo CA, Yang R, Correll CC, Phelps PT, Egan RW, Hey JA. (2004) Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 28(7), 272–278

Jiang L, Ding J, Tsai H, Li L, Feng Q, Miao J, et al. (2011) Over-expressing transient receptor potential cation channel 6 in podocytes induces cytoskeleton rearrangement through increases of intracellular Ca²⁺ and RhoA activation. *Exp Biol Med (Maywood).* 236,184–193

Johnson WC. (1988) Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu rev Biophys Biophys Chem.* 17, 145-166

Johnson WC. (1999) Analysis protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins : Struct. Funct. Genet.* 35, 307-312

Ju M., Shi, J., Saleh S.N., Albert, A. P. et Large W.A. (2010) Ins(1,4,5)P₃ interacts with PIP₂ to regulate activation of TRPC6/C7 channels by diacylglycerol in native vascular myocytes. *J Physiol* 588, 1419-1433.

Jung S, Strotmann R, Schultz G, et Plant TD. (2002) TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282, C347-59

Kanda S, Harita Y, Shibagaki Y, Sekine T, Igarashi T, Inoue T, et al. (2011) Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC-gamma1 and nephrin: effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis. *Mol Biol Cell.* **22**, 1824–1835

Karacsonyi C, Miguel AS, Puertollano R. (2007) Mucolipin-2 localizes to the Arf6-associated pathway and regulates recycling of GPI-APs. *Traffic.* **8 (10)**, 1404–14

Kawasaki BT, Liao Y, Birnbaumer L (2006) Role of Src in C3 transient receptor potential channel function and evidence for a heterogenous makeup of receptor- and store-operated Ca²⁺ entry channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 :335-340

Kelly SM, Jess TJ. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta.* **1751 (2)**, 119-139

Keseru B, Barbosa-Sicard E, Popp R, Fisslthaler B, Dietrich A, Gudermann T, Hammock BD, Falck JR, Weissmann N, Busse R, Fleming I (2008) Epoxyeicosatrienoic acids and the soluble epoxide hydrolase are determinants of pulmonary artery pressure and the acute hypoxic pulmonary vasoconstrictor response. *Faseb J* 22 :4306-4315

Kim EY, Anderson M, Wilson C, Hagmann H, Benzing T, Dryer SE. (2013) NOX2 interacts with podocyte TRPC6 channels and contributes to their activation by diacylglycerol: essential role of podocin in formation of this complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* **305**, C960–971

Kim J Y, et Saffen D. (2005) Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *J Biol Chem.* **280**, 32035-47

Kini V, Chavez A, et Mehta D. (2010) A new role for PTEN in regulating transient receptor potential canonical channel 6- mediated Ca²⁺ entry, endothelial permeability and angiogenesis. *J Biol Chem.* **285(43)**, 33082-91.

- Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE.** (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. **427(6972)**, 360-364
- Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, Muallem S** (1998) Functional interaction between InsP3 receptor and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396 :478-482
- Krishtal O, Iozovaya N, Fisunov A, Tsintsadze T, Pankratov Y, Kopanitsa M, Chatterjee SS** (2001) Modulation of ion channels in rat neurons by the constituents of *Hypericum perforatum*. *Pharmacopsychiatry* 34 Suppl 1:S74-82
- Kwon Y, Hofmann T, Montell C.** (2007) Integration of Phosphoinositide and Calmodulin Mediated Regulation of TRPC6. *Molecular Cell*. 25(4) 491-503
- Kohn JE, Millett IS, Jacob J, Zagrovic B, Dillon TM, Cingel N, Dothager RS, Seifert S, Thiagarajan P, Sosnick TR, Hasan MZ, Pande VS, Ruczinski I, Doniach S, Plaxco KW.** (2004) Random-coil behavior and the dimensions of chemically unfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**,12491–12496
- Kopp RF, Leech CA, Roe MW** (2013) Resveratrol interferes with fura-2 intracellular calcium measurements. *J Fluoresc* 24 : 279-284
- Krall P, Canales CP, Kairath P, Carmona-Mora P, Molina J, Carpio JD, et al.** (2010) Podocyte-specific overexpression of wild type or mutant *trpc6* in mice is sufficient to cause glomerular disease. *PLoS one*. **5**, e12859
- Kretsinger RH.** (1976) Calcium-binding proteins. *Ann Rev Biochem*. **45**, 239-266.
- Kruse M, Schulze-Bahr E, Corfield V, Beckmann A, Stallmeyer B, Kurtbay G, Ohmert I, Schulze-Bahr E, Brink P, Pongs O.** (2009) Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J. Clin. Invest*. **119**, 2737–2744

- Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Hill JA, Olson EN.** (2006) TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest.* **(12)**, 3114-26
- Kwan HY, Huang Y, Yao X.** (2004) Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**, 2625–2630
- Kwon Y, Hofmann T, et Montell C.** (2007) Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol Cell.* **25**, 491-503
- Lainez S, Schlingmann KP, van der Wijst J, Dworniczak B, van Zeeland F, Konrad M, Bindels RJ, Hoenderop JG.** (2014) New TRPM6 missense mutations linked to hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Eur J Hum Genet.* **22(4)**,497-504
- Lampson MA, Schmoranzler J, Zeigerer A, Simon SM, McGraw TE.** (2001) Insulin-regulated release from the endosomal recycling compartment is regulated by budding of specialized vesicles. *Mol. Biol. Cell,* **12**, pp. 3489-3501
- Large WA, Saleh SN, Albert AP** (2009) Role of phosphoinositol 4,5-bisphosphate and diacylglycerol in regulating native TRPC channel proteins in vascular smooth muscle. *Cell Calcium*
- LaPlante JM, Ye CP, Quinn SJ, Goldin E, Brown EM, Slaugenhaupt SA, Vassilev PM.** (2004) Functional links between mucolipin-1 and Ca²⁺-dependent membrane trafficking in mucopolipidosis IV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1384-1391
- Leathers V. L., Linse S., Forsen S., Norman A. W.** (1990) Calbindin-D28k, a 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced calcium-binding protein, binds five or six Ca²⁺ ions with high affinity. *J. Biol. Chem.* **265**, 9838–9841

Lee KP, Yi EC, Kim IG, Jeon JH, Ryu H, So I. (2015) Increased TRPC5 glutathionylation contributes to striatal neuron loss in Huntington's disease. *Brain*. 138, 3030-3047

Lee N, Chen J, Sun L, Wu S, Gray KR, Rich A, Huang M, Lin JH, Feder JN, Janovitz EB, Lemonnier L, Trebak M, Lieuvremont JP, Bird GS, Putney JW Jr. (2006) Protection of TRPC7 cation channels from calcium inhibition by closely associated SERCA pumps. *FASEB J*. **20(3)**, 503-505

Lemonnier L, Trebak M, Putney JW Jr. (2008) Complex regulation of the TRPC3, 6 and 7 channel subfamily by diacylglycerol and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Cell Calcium*. **43(5)**, 506-514

Lemos VS, Poburko D, Liao CH, Cole WC, van Breemen C (2007) Na⁺ entry via TRPC6 causes Ca²⁺ entry via NCX reversal in ATP stimulated smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352 :130-134

Lepage PK, Lussier MP, Barajas-Martinez H, Bousquet SM, Blanchard AP, Francoeur N, Dumaine R, Boulay G. (2006) Identification of two domains involved in the assembly of transient receptor potential canonical channels. *J Biol Chem*. **281**, 30356-64

Lessard CB, Lussier MP, Cayouette S, Bourque G, et Boulay G. (2005) The overexpression of presenilin2 and Alzheimer's-disease-linked presenilin2 variants influences TRPC6-enhanced Ca²⁺ entry into HEK293 cells. *Cell Signal*. **17**, 437-45

Leuner K, Kazanski V, Muller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, Harteneck C, Muller WE (2007) Hyperforin a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *Faseb J* 21 : 4101-4111

- Leuner K, Kraus M, Woelfle U, Beschmann H, Harteneck C, Boehncke WH, Schempp C, Muller WE.** (2011) Reduced TRPC Channel Expression in Psoriatic Keratinocytes Is Associated with Impaired Differentiation and Enhanced Proliferation. *PLoS One.* **(2)** e14716, 1-11
- Levesque PC, Blonar MA.** (2003) Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTrPM3). *J. Biol. Chem.* **278**, 20890–20897
- Lewiner RD, Skinner K, Julius D, Basbaum AI.** (2004) Immunoreactive TRPV-2 (VRL-1), a capsaicin receptor homolog, in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol.* **470**, 400-408
- Li M, Jiang J et Yue L.** (2006) Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol.* **127**, 525-37
- Li Y, Jia Yc, Cui K, Li N, Zheng ZY, Wang YZ, Yuan XB.** (2005) Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature.* **434(7035)**, 894-8
- Liao CF, Themmen APN, Joho R, Barberis C, Birnbaumer M, et Birnbaumer L.** (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 7328–7337
- Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L.** (2007) Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 4682-4687.
- Lichtenegger M, Stockner T, Poteser M, Schleifer H, Platzer D, Romanin C, Groschner K** (2013) A novel homology model of TRPC3 reveals allosteric coupling between gate and selectivity filter. *Cell Calcium* **54**, 175-185
- Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S.** (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell.* **103**, 525–535

- Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS.** (2001) Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. **104**, 545–556
- Lim WK, Rösgen J, Englander SW.** (2009) Urea, but not guanidinium, destabilizes proteins by forming hydrogen bonds to the peptide group. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **106 (8)**, 2595–2600
- Lintschinger B, Balzer-Geldsetzer M, Baskaran T, Graier WF, Romanin C, Zhu MX, Groschner K.** (2000) Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca²⁺-sensitive cation channels. *J Biol Chem*. **275**, 27799–27805
- Lombardi D, Soldati T, Riederer MA, Goda Y, Zerial M, Pfeffer SR.** (1993) Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans golgi network *EMBO J.*, **12**, pp. 677-682
- Loui-Jeune C, Andrade-Navarro MA, Perex-Iratxeta C.** (2012) Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins*. Vol 80-2
- Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F.** (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron*. **40**, 551–561
- Lussier MP, Cayouette S, Lepage PK, Bernier CL, Francoeur N, St-Hilaire M, Pinard M, Boulay G.** (2005) MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the Ankyrin-like repeat domain of TRPC. *J Biol Chem*. **280**, 19393-400
- Ma L, Fogo AB.** (2001) Role of angiotensin II in glomerular injury. *Seminars in nephrology*. **21**, 544–553
- Maguire ME, Cowan JA.** (2002) Magnesium chemistry and biochemistry. *Biometals*. **15**, 203-210

- Maguire ME.** (2006) Magnesium transporters: properties, regulation and structure. *Front Biosci.* **11**, 3149-3163
- Malvern Instruments** (2014) TN101104 Intensity Volume Number. Malvern Instruments Limited
- Manavalan P, Johnson WC Jr.** (1987) Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* **167**, 76-85
- Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G.** (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including and update of nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1111-1122
- Martin RB.** (1990) Bioinorganic Chemistry of Magnesium. Marcel Dekker, Inc., New York
- Mathar I, Vennekens R, Meissner M, Kees F, Mieren GVD, Londono JEC, Uhi S, Voets T, Hummerl B, Bergh AvD, Herjigers P, Nilius B, Flockerzi V, Schweda F, Freichel M.** (2010) Increased catecholamine secretion contributes to hypertension in TRPM4-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 3267–3279
- Mattes RD.** (2011) Accumulating evidence supports a taste component for free fatty acids in humans. *Physio Behave.* **104 (4)**, 624-31
- McMeekin SR, Dransfield I, Rossi AG, Haslett C, Walker TRé** (2006) E-selection permits communication between PAF receptors and TRPC channels in human neutrophil. *Blood*; **107** : 4938-4945
- Mederos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, Gollasch M, Gudermann T** (2008) Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *Embo J* **27** :3092-3103

- Medina MA, Martinez-Poveda B, Amores-Sanchez MI, Quesada AR** (2006) Hyperforin : more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci* 79 :105-111
- Meves H** (1994) Modulation of ion channels by arachidonic acid. *Prog Neurobiol* 43 :175-186
- Meyer Zu Heringdorf D., Himmel H.M., Jakobs K.H.** (2002) Sphingosylphosphorylcholine- biological functions and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.* **1582**, 178-189.
- Minke, B., Wu, C. & Pak, W. L.** (1975) Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* **258**, 84-7
- Mizuno N, Kitayama S, Saishin Y, Shimada S, Morita K, Mitsuhashi C, Kurihara H, Dohi T.** (1999) Molecular cloning and characterization of rat trp homologues from brain. *Brain Res Mol Brain Res.* **64**, 41-51
- Moller CC, Flesche J, Reiser J .** (2009) Sensitizing the slit diaphragm with TRPC6 ion channels. *J Am Soc Nephrol.* **20**, 950-953
- Montagne M, Naud JF, McDuff F-O, Lavigne P.** (2005) Toward the Elucidation of the Structural Determinants Responsible for the Molecular Recognition between Mad1 and Max. *Biochem J.* **44**, 12860-12869
- Montell, C. & Rubin, G. M.** (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron.* **2**, 1313-23
- Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus J, Murray N, Spencer KS, Andahazy M, Story GM, Patapoutian A.** (2005) Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science.* **307(5714)**, 1468–1472
- Mount DB.** (2014) Thick ascending limb of the loop of Henle. *Clinical journal of the American Society of Nephrology. CJASN.* **9**, 1974–1986

Muller M, Essin K, Hill K, Reschmann H, Rubant S, Schempp CM, Gollasch M, Boehncke WH, Harteneck C, Muller WE, Leuner K. (2008) Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation. *J Biol Chem.* **283(49)**, 33942-54.

Murakami M, Xu F, Miyoshi I, Sato E, Ono K, Lijima T. (2003) Identification and characterization of the murine TRPM4 channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 522–528

Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y. (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res.* **93**, 829-838

Murata K et Wolf M. (2018) Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. *Biochimica and Biophysica Acta.* **1862(2)**, 324–334

Nakamura M, Sanuki R, Yasuma TR, Onishi A, Nishiguchi KM, Koike C, Kadowaki M, Kondo M, Miyake Y, Furukawa T. (2010) TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness. *Mol. Vis.* **16**, 425-437

Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J. (2005) Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci.* **25**, 4052–4061

Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, et Zhou J. (2003) Polycystines 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics.* **33**, 129-137

Niemeyer, B. A., Suzuki, E., Scott, K., Jalink, K. & Zuker, C. S. (1996) The *Drosophila* light activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell.* **85**, 6519

Nijenhuis T, Sloan AJ, Hoenderop JG, Flesche J, van Goor H, Kistler AD, et al. (2011) Angiotensin II contributes to podocyte injury by increasing TRPC6 expression via an NFAT-mediated positive feedback signaling pathway. *Am J Pathol.* **179**, 1719–1732

- Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V.** (2003) Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J. Biol. Chem.* **278**, 30813–30820
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA.** (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* **87(1)**,165–217.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T** (2008) Transient receptor potential channels meet phosphoinositides. *Embo J* 27:2809-2816
- Nilius B et Owsianik G.** (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* **12**, 218–229
- Noben-Trauth K.** (2011) The TRPML3 channel: from gene to function. *Adv Exp Med Biol.* **704**, 229-237
- Oancea, E., Wolfe, J. T. & Clapham, D. E.** (2006) Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow. *Circ Res.* **98**, 245-53
- Oancea E, Vriens J, Brauchi S, Jun J, Splawski I, Clapham DE.** (2009) TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes. *Sci. Signal.* **2(70)**, 1-25.
- Obukhov AG, Nowycky MC.** (2008) TRPC5 channels undergo changes in gating properties during the activation-deactivation cycle. *J Cell Physiol.* **216**, 162–171
- Oike H, Wakamori M, Mori Y, Nakanishi H, Taguchi R, Misaka T, Matsumoto I, Abe K** (2006) Arachidonic acid can function as a signaling modulator by activating the TRPM5 cation channel in taste receptor cells. *Biochim Biophys Acta* 1761:1078-1084
- Okada T, Shimizu S, Wakamori M, Maeda A, Kurotaki T, Takada N, Imoto K, Mori Y.** (1998) Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain. *J Biol Chem.* **273 (17)**, 10279–10287

Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Kurosaki T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K, Mori Y. (1999) Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7 Ca²⁺ permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem.* **274(39)**, 27359-2737

Onohara N, Nishida M, Inoue R, Kobayashi H, Sumimoto H, Sato Y, Mori Y, Nagao T, Kurose H. (2006) TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Embo J.* **25(22)**, 5305-16

Ordaz B, Tang J, Xiao R, Salgado A, Sampieri A, Xhu MX, Vaca L. (2005) Calmodulin and calcium interplay in the modulation of TRPC5 channel activity. Identification of a novel C-terminal domain for calcium/calmodulin-mediated facilitation. *J Biol Chem.* **280**, 30788–30796

Pace CN. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, 266-280.

Paige A, Winkler, Yihe Huang, Weinan Sun, Juan Du et Wei Lu. (2017) Electron cryo-microscopy structure of a human TRPM4 channel. *Nature* 552,200-204

Parekh B. et Putney W. (2005) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev.* **85**, 767-810

Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D. (2015) Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanism. *Nature* 525,552

Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. (2003) Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiology review.* **83**, 253-307

Perraud AL, A. Fleig, C.A. Dunn, L.A. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A.J. Stokes, Q. Zhu, M.J. Bessman, R. Penner, J.P. Kinet, A.M. Scharenberg. (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature.* **411**, 595-599

Pedersen SF, Owsianik G et Nilius B. (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. **38**, 233-52

Phelan KD, Shwe UT, Abramowitz J, Birnbaumer L et Zheng F. (2014) Critical role of canonical transient receptor potential channel 7 in initiation of seizures. *PNAS*. **11(31)**, 11533-11538

Phillips AM, Bull A et Kelly LE. (1992) Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron*. **8**, 631-42

Philipp S, Wissenbach U, Flockerzi V. (2000) Molecular biology of calcium channels. *J.W.J. Putney (Ed.) Calcium Signaling, CRC Press, Boca Raton, USA*. 321-342

Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Mogrich A, Earley TJ, Hergarden Ac, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. (2002) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science*. **296(5575)**, 2046–2049

Peier AM, Mogrich A, Hergarden Ac, Reeve Aj, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan, S, Patapoutian A. (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*. **108(5)**, 705–15

Pocock TM, Foster RR, et Bates DO. (2004) Evidence of a role for TRPC channels in VEGF-mediated increased vascular permeability in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **286**, H1015-26

Porath J. (1997) From gel filtration to adsorptive size exclusion. *J Protein Chem*. **16**, 463–8.

Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P et Meldolesi J. (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev*. **74(3)**, 595-636.

- Prakriya M et Lewis RS.** (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev.* **95(4)**, 1383-1436.
- Proovencher SW, Glockner J.** (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry.* **20**, 33-37
- Puntambekar P, Van Buren J, Raisinghani M, Premkumar LS, Ramkumar V.** (2004) Direct interaction of adenosine with the TRPV1 channel protein. *J. Neurosci.* **24**, 3663-3667
- Rampino M, Nawy S.** (2011) Relief of Mg²⁺-dependent inhibition of TRPM1 by PKC α at the rod bipolar cell synapse. *J. Neurosci.* **31**, 13596–13603
- Ramsey IS, Delling M et Clapham DE.** (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol.* **68**, 619-647
- Redondo, P. C., Jardin, I., Lopez, J. J., Salido, G. M. & Rosado, J. A.** (2008) Intracellular Ca²⁺ store depletion induces the formation of macromolecular complexes involving hTRPC1, hTRPC6, the type II IP3 receptor and SERCA3 in human platelets. *Biochim Biophys Acta.* **1783**, 1163-76
- Reiser J, Polu KR, Moller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR.** (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet.* **37**, 739–744
- Reisker E, Haik Y, Eisenberg H.** (1977) Bovine serum albumin and aqueous guanidine hydrochloride solutions. Preferential and absolute interactions and comparison with other systems. *Biochemistry.* **16(2)**,197–203
- Ren MD, Xu GX, Zeng JB, De Lemos-Chiarandini C, Adesnik M, Sabatini DD.** (1998) Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar

recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, pp. 6187-6192

Riccio A, Mattei C, Kelsell RE, Medhurst AD, Calver AR, Randall AD, Davis JB, Benham CD, Pangalos MN. (2002) Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca^{2+} influx. *J Biol Chem.* **277** (14), 12302-12309

Romani A, Scarpa A. (1992) Regulation of cell magnesium. *Arch Biochem Biophys.* **298**, 1-12

Romani AM, Maguire ME. (2002) Hormonal regulation of Mg^{2+} transport and homeostasis in eukaryotic cells. *Biometals.* **15**, 271-283

Roostae A, Barbar E, Lehoux JG, Lavigne P. (2008) Cholesterol binding is a prerequisite for the activity of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Biochem. J.* **412**, 553–562

Rustandi RR, Baldisseri DM, Inman KG, Nizner P, Hamilton SM, et al. (2001) Three-Dimensional Solution Structure of the Calcium-Signaling Protein Apo-S100A1 As Determined by NMR. *Biochemistry* 41: 788–796

Ruwhof C, Van Wamel J, Noordzji LA, Aydin S, Harper JC, van der Laarse A. (2001) Mechanical stress stimulates phospholipase C activity and intracellular calcium ion levels in neonatal rat cardiomyocytes. *Cell Calcium* **29**(2),73-83.

Saleh SN, Albert AP, Peppiatt CM, et Large WA. (2006) Angiotensin II activates two cation conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes. *J Physiol.* **577**, 479-95

Sambrook J, et Russell DW. (2001) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 3rd Ed. ed., Cold Spring Harbor, New York

Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS (2006) Calcium-dependent and - independent interactions of the S100 protein family. *Biochemical Journal* 396: 201–214

- Schafer BW, Heizmann CW.** (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins : functions and pathology. *TIBS* 21, 134-140
- Schaefer M, Plant TD, Obukhov AG, Hofmann T, Schultz G.** (2000) Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem.* **275(23)**, 17517-26
- Sheff DR, Daro EA, Hull M, Mellman I.** (1999)The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions *J. Cell Biol.*, 145, pp. 123-139
- Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum J, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M.** (2002) Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet.* **31**, 166-170
- Schoeber JP, Hoenderop JG, Bindels RJ.** (2007) Concerted action of associated proteins in the regulation of TRPV5 and TRPV6. *Biochem Soc Trans.* **35(1)**,115–119
- Schwaller B.** (2010) Cytosolic Ca²⁺ buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2(11)**, 1-20
- Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A** (2007) Rab GTPases at a glance *J. Cell Sci.*, 120, pp. 3905-3910
- Screerama N, Woody RW.** (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism, *Anal. Biochem.* **209**, 32-44
- Shi J, Mori E, Mori Y, Mori M, Li J, Inoue R.** (2004) Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol.* **561 (2)**, 415-432

Shimizu T, Owsianik G, Freichel M, Flockerzi V, Nilius B, Vennekens R. (2009) TRPM4 regulates migration of mast cells in mice. *Cell Calcium*. **45**, 226–232

Singh BB, Lockwich TP, Bandyopadhyay BC, Liu X, Bollimuntha S, Brazer SC, Combs C, Das S, Leenders AG, Sheng ZH, et al. (2004) VAMP2-dependent exocytosis regulates plasma membrane insertion of TRPC3 channels and contributes to agonist-stimulated Ca²⁺ influx. *Mol Cell*. **15**, 635–646

Singh I, Knezevic N, Ahmmed GU, Kini V, Malik AB, Mehta D. (2007) G alphaq-TRPC6-mediated Ca²⁺ entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin. *J Biol Chem*. **282(11)**, 7833-43

Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, David JB. (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*. **418(6894)**, 186–190

Soboloff J, Spassova M, Xu W, He LP, Cuesta N, Gill DL (2005) Role of endogenous TRPC6 channels in Ca²⁺ signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J Biol Chem* **280** :39786-39794

Somlo S, Mundel P. (2000) Getting a foothold in nephrotic syndrome. *Nature Genetics*. **24**, 333-335

Sonneveld R, van der Vlag J, Baltissen MP, Verkaart SA, Wetzels JF, Berden JH, et al. (2014) Glucose specifically regulates TRPC6 expression in the podocyte in an AngII-dependent manner. *Am J Pathol*. **184**, 1715–1726

Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5 and Rab11. *J. Cell Biol.*, **149**, pp. 901-913

- Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J, et Gill DL.** (2006) A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 16586-91
- Staruschenko A.** (2012) Regulation of transport in the connecting tubule and cortical collecting duct. *Comprehensive Physiology.* **2**, 1541–1584
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A.** (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell.* **112**, 819–829
- Suh BC, Hille B** (2005) Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol* **15** :370-378
- Suzuki Y, Kovacs CS, Takanaga H, Peng JB, Landowski CP, Hediger MA.** (2008) Calcium channel TRPV6 is involved in murine maternal-fetal calcium transport. *J Bone Miner Res.* **23(8)**, 1249-56
- Takahashi S, Lin H, Geshi N, Mori Y, Kawarabayashi Y, Takami N, Mori XM, Honda A et Innoue R.** (2008) Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *J Physiol.* **586**, 4209-23
- Tanford C.** (1970) Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv. Protein Chem.* **24**, 1-95.
- Tang J, Lin Y, Zhang Z, Tikunova S, Birnbaumer L, Zhu MX** (2001) Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem* **276** :21303-21310

- Tang Q, Guo W, Zheng L, Wu JX, Liu M, Zhou X, Zhang X, Chen L.** (2018) Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell Research* 28, 746-755
- Tian W, Slanova M, Xu H, Lindsley J, Oyama T, Anderson S, Bachmann S et Cohen D.** (2004) Renal expression of osmotically responsive cation channel Trpv4 is restricted to water-impermeant nephron segments. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **287**, F17–F24
- Thilo F, Lee M, Xia S, Zakrzewicz A, Tepel M.** (2014) High glucose modifies transient receptor potential canonical type 6 channels via increased oxidative stress and syndecan-4 in human podocytes. *Biochemical and biophysical research communications.* **450**, 312–317
- Tobias B. Huber, Bernhard Schermer, Roman Ulrich Muller, Martin Hohne, Malte Bartram, Andrea Calixto, Hernning Hagmann, Christian Reinhardt, Fabienne Koos, Karl Kunzelmann, Elena Shirokova, Dietma Krautwurst, Christian Harteneck, Matias Simons, Hermann Pavenstadt, Donscho Kerjaschki, Christoph Thiele, Gerd Waltz, Martin Chalfie, Thomas Benzing.** (2004) Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *PNAS* 2004. 103.46. 17079-17086
- Trebak M, Hempel N, Wedel BJ, Smyth JT, Bird GS, and Putney JW Jr.** (2005) Negative regulation of TRPC3 channels by protein kinase C-mediated phosphorylation of serine 712. *Molecular Pharmacology.* **67**, 558-563
- Treiber K, Singer A, Henke B, Muller WE** (2005) Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). *Br J Pharmacol* 145:75-83
- Tsegn PH, Lin HP, Hu H, Wang C, Zhu MX, Chen CS** (2004) The canonical transient receptor potential 6 channel as a putative phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate –sensitive calcium entry system. *Biochemistry* 43 :11701-11708

- Tu P, Kunert-Keil C, Lucke S, Brinkmeier H, et Bouron A.** (2009) Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. *J Neurochem.* **108**, 126-38
- Uchida K, Dezaki K, Damdindorj B, Inada H, Shiuchi T, Mori Y, Yada T, Minokoshi Y, Tominaga M.** (2011) Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes* 60(1):119–126
- Urbe S, Huber LA, Zerial M, Tooze SA, Parton RG.** (1993) Rab11, a small gtpase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in pc12-cells *FEBS Lett.*, 334, pp. 175-182
- Varnai P, Hunyady L, Balla T.** (2009) STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 118-128
- Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney J, James W.** (2004) The mammalian TRPC cation channels. *Biochim. Biophys. Acta - Mol Cell Res.* **1742**, 21
- Venkatachalam K et Montell C.** (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem.* **76**, 387-417
- Vennekens R, Olausson J, Meissner M, Bloch W, Mathar I, Philipp SE, Schmitz F, Weissgerber P, Nilius B, Flockerzi V, Freichel M.** (2007) Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat. Immunol.* **8**, 312–320
- Verma R, Wharram B, Kovari I, Kunkel R, Nihalani D, Wary KK, Wiggins RC, Killen P, Holzman LB.** (2003) Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephlin. *J Biol Chem.* **278**, 20716-20723
- Van der Wijst J, Bindels RJ, Hoenderop JG.** (2014) Mg²⁺ homeostasis: the balancing act of TRPM6. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **23(4)**, 361-9

- Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL** (2003) Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* 278 :29031-29040
- Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG.** (2004) TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J Biol Chem.* **279(1)**,19-25.
- Vriens J, Appendino G, Nilius B.** (2009) Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol.* **75(6)**, 1262–1279
- Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T.** (2011) TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron.* **70**, 482–494.
- Wagner TF, Drews A, Loch S, Mohr F, Philipp SE, Lambert S et Oberwinkler J.** (2010) TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic beta cells. *Pflugers Arch.* **460**, 755–765
- Wang S, Raab RW, Schatz PJ, Guggino WB, Li M.** (1998) Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett.* **427(1)**, 103–108
- Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B.** (2002) Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 47044-47051
- Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B** (2003) Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424:434-438
- Weber A. Murray JM.** (1973) Molecular control mechanisms in muscle contraction. *Physiol Rev.* **53 (3)**, 612-673

Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly Rt, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T. (2006) Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103(53)**, 19093–8

Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, et Brayden JE. (2002) Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res.* **90**, 248-50

Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. (1995) TRPC1, a human homolog of a Drosophila trp store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9652-9656

Wimalawansa SJ. (1996) Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr. Rev.* **17**, 533–585

Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB. (2005) A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerotic. *Science.* **308**, 1801-1804

Woody RW, et Dunker AK. (1996) in Circular Dichroism and the conformational Analysis of Biomolecules (Fasman, G.D., ed.), Plenum Press, New York. 109-157

Woroniecki RP, Kopp JB. (2007) Genetics of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatric nephrology.* **22**, 638–644

Wright NT, Cannon BR, Zimmer DB, Weber DJ (2009) S100A1: Structure, Function, and Therapeutic Potential. *Curr Chem Biol* 3: 138–145

Wu G, Somlo S (2000) Molecular genetics and mechanism of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Genet Metab.* **69**, 1-15

- Wu X, Babnigg G, Zagranichnaya T, Villereal ML** (2002) The role of endogenous human Trp4 in regulating carbachol-induced calcium oscillations in HEK-293 cells. *J Biol Chem* 277:13597-13608
- Xie YF, MacDonald JF, Jakson MF.** (2010) TRPM2 calcium and neurodegenerative disease. *Int J Physiol Pharmacol.* **2(2)**, 95-103
- Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis Clapham DE.** (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature.* **418(6894)**, 181–186
- Xu HX, Blair NT, Clapham DE.** (2005) Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci.* **25**, 8924–8937
- Xu HX, Delling M, Jun JC, Clapham DE.** (2006) Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP Channels. *Nature Neuroscience.* **9**, 628–635
- Xu XZ, Moebius F, Gill DL, Montell C.** (2001) Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **4**, 4
- Yanez M, Gil-Longo J, Campos-Toimil M.** (2012) Calcium binding proteins. *Adv Exp Med Biol.* **740**, 461-82.
- Yamamoto S, Shimizu, Kiyonaka s, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H et Mori Y.** (2008) TRPM2-mediated Ca²⁺-influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature Medicine.* **14(7)**,738–747

- Yasuda N, Akazawa H, Qin Y, Zou Y, Komuro I** (2008) A novel mechanism of mechanical stress-induced angiotensin II type 1-receptor activation without the involvement of angiotensin II. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 377:393-399
- Yip H, Chan WY, Leung PC, Kwan HY, Liu C, Huang Y, Michel V, Yew DT, Yao X.** (2004) Expression of TRPC homologs in endothelial cells and smooth muscle layers of human arteries. *Histochem Cell Biol.* **122(6)**, 553-561
- Yu Y, Fantozzi I, remillard C, Landsberg J, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno D, Thistlethwaite P, Rubin L, Yuan J.** (2004) Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101(38)**, 13861-6
- Yu L, Liao H, Dong X, Lin Q, Feng J, Ye J.** (2018) TGF-beta 1 induces podocyte injury through Smad3-ERK-NF-kappaB pathway and Fyn-dependent TRPC6 phosphorylation. *Cell Physiol Biochem* 26, 869-78
- Zamponi W et Simms A.** (2014) Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels: Structure, Function, and Dysfunction. *Neuron* **82**, 24-45.
- Zbidi H, Jardin I, Woodard GE, Lopez JJ, Berna-Erro A, Salido GM, Rosado JA.** (2011) STIM1 and STIM2 are located in the acidic Ca²⁺ stores and associates with Orai1 upon depletion of the acidic stores in human platelets. *J Biol Chem.* **286(14)**, 12257-70
- Zhang H, Ding J, Fan Q, Liu S.** (2009) TRPC6 up-regulation in Ang II-induced podocyte apoptosis might result from ERK activation and NF-kappaB translocation. *Exp Biol Med (Maywood).* **234**, 1029–1036
- Zhang L, Saffen D** (2001) Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRPC6 Ca²⁺ channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. *J Biol Chem* 276 :133331-13339

- Zhang L, Baritt GJ.** (2004) Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca^{2+} channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Research*. **64**, 8365-8373
- Zheng H, Chruszcz M, Lasota P, Lebioda L, et Minor W.** (2008) Data mining of metal ion environments present in protein structures. *J Inorg Biochem*. **102(9)**, 1765–1776
- Zhou J, Du W, Zhou K.** (2008) Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nature Neuroscience*. **11(7)**, 741-743
- Zhu X, Chu PB, Peyton M, Birnbaumer L.** (1995) Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* *trp* gene. *FEBS Lett*. **373**, 193–198
- Zimmer DB, Chaplin J, Baldwin A, Rast M** (2005) S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51: 201–214
- Zitt C, Zobel A, Obukhov AG, Harteneck C, Kalkbrenner F, Lückhoff A, et Schultz G.** (1996) Cloning and functional expression of a human Ca^{2+} permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron*. **16**, 1189–1196
- Zucchi R., Ronca-Testoni S.** (1997) The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev*. **49**, 1-51.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt.** (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. **400(6743)**, 452–457

