

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

IDENTIFICATION DE NOUVEAUX PARTENAIRES
D'INTERACTION DE TRPC3 ET TRPC6 PAR SPECTROMÉTRIE
DE MASSE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DES
SCIENCES DE LA SANTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
MAÎTRE ÈS SCIENCES (M.SC.)

PAR
NANCY FRANCOEUR

JUIN 2007



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-31384-8
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-31384-8

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

*« La vie a plus d'imagination
qu'en portent nos rêves »*

Christophe Colomb, 1492

Table des matières

•	Liste des publications.....	VII
•	Liste des abréviations.....	VIII
•	Liste des figures.....	XI
•	Liste des tableaux.....	XII
•	Résumé.....	XIII
•	Introduction.....	1
○	1.1 Le Calcium.....	1
▪	1.1.1 Signalisation calcique chez les cellules non excitables.....	2
▪	1.1.2 Entrée capacitative du calcium, SOCE et ROCE.....	4
▪	1.1.3 La découverte des TRPs : le Transient Receptor Potential de la drosophile.....	7
▪	1.1.4 La famille des TRPs et les nomenclatures.....	10
▪	1.1.5 Propriétés générales des TRPCs.....	13
▪	1.1.6 Hypothèses d'activation des TRPCs.....	16
▪	1.1.7 Partenaires d'interaction des TRPCs.....	20
○	1.2 La spectrométrie de masse : un outil en plein essor.....	27
▪	1.2.1 Préparation des échantillons.....	27
▪	1.2.2 L'ionisation.....	28
▪	1.2.3 L'analyse des ions.....	31
○	1.3 But de l'étude.....	38
•	Matériel et méthodes.....	39
○	2.1 Matériel.....	39

○ 2.2 Méthodes.....	40
▪ 2.2.1 Amplification du C-terminal de TRPC6.....	40
▪ 2.2.2 Séquençage.....	42
▪ 2.2.3 Sous-clonage du C-terminal dans pGEX-4T-1N.....	43
▪ 2.2.4 Extraction de l'ADN plasmidique.....	44
▪ 2.2.5 Amplification de GST et de GST-CT6.....	45
▪ 2.2.6 Préparation de protéines cytosoliques et membranaires de tissus de souris.....	46
▪ 2.2.7 Essais de liaison à la GST.....	47
▪ 2.2.8 Digestion dans le gel.....	48
▪ 2.2.9 Analyse par spectrométrie de masse.....	50
▪ 2.2.10 Culture cellulaire et transfections.....	50
▪ 2.2.11 Mesure de la $[Ca^{2+}]_i$	51
▪ 2.2.12 Séparation protéique au carbonate de sodium.....	53
▪ 2.2.13 Immunoprécipitations.....	54
▪ 2.2.14 Immunobuvardages.....	54
▪ 2.2.15 Marquage métabolique.....	55
▪ 2.2.16 Biotinylation des protéines de surface.....	56
▪ 2.2.17 Électrophorèse bidimensionnelle.....	57
● Résultats.....	59
○ 3. Stratégies d'identification employées.....	59
○ 3.1 Comparaison de l'expression des protéines.....	59
○ 3.2 Co-immunoprécipitation.....	61

○ 3.3 Identification de partenaires d'interaction potentiels par des essais de liaison de type GST.....	64
▪ 3.3.1 Construction des protéines de fusion.....	64
▪ 3.3.2 Observation de protéines pouvant interagir avec TRPC3 et TRPC6.....	66
▪ 3.3.3 Spectrométrie de masse.....	72
▪ 3.3.4 Identification de partenaires d'interaction potentiels de TRPC3 et TRPC6.....	74
▪ 3.3.5 La pompe H ⁺ -ATPase comme partenaire de TRPC3 et TRPC6.....	76
▪ 3.3.6 L'inhibition de la pompe H ⁺ -ATPase V ₀ V ₁ n'affecte pas l'entrée de Ca ²⁺ par TRPC6.....	79
▪ 3.3.7 N-Ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) comme partenaire de TRPC3 et TRPC6.....	81
▪ 3.3.8 NSF interagit avec le C-terminal de TRPC3 et TRPC6 possiblement via leur domaine CIRB.....	83
▪ 3.3.9 La protéine NSF module l'entrée de Ca ²⁺ par TRPC6.....	86
▪ 3.3.10 La surexpression de TRPC6 en présence de NSF et NSF-DN influence la présence du canal à la membrane.....	89
▪ 3.3.11 La surexpression de TRPC6 en présence de NSF et NSF-DN affecte la maturation du canal.....	91
• Discussion.....	93
• Conclusion.....	102

- Remerciements.....104
- Bibliographie.....105

Liste des publications

- Francoeur N, Klarskov K, Boulay G. NSF (*N*-Ethylmaleimide sensitive fusion protein) interagit avec la portion C-terminale de TRPC3 et TRPC6. 48^e réunion annuelle du Club de recherches cliniques du Québec (CRCQ), St-Alexis-des-Monts, Québec, 2006. *Médecine/Science*, (22) supp.2, p26.
- Francoeur N, Boulay G, Klarskov K. Utilisation de la spectrométrie de masse pour l'identification de protéines interagissant avec la partie C-terminale de TRPC3 et TRPC6. 74^e congrès annuel de l'Association francophone pour le savoir (Acfas), Université McGill, Montréal, Québec, 2006.
- Francoeur N, Boulay G, Klarskov K. Proteomic identification of proteins interacting with C-terminus of TRPC3 and TRPC6 calcium channels. 6th International conference of the Canadian proteomics initiative (CPI), University of Alberta, Edmonton, Alberta, 2006.
- Francoeur N, Klarskov K, Boulay G. Identification de protéines interagissant avec la partie C-Terminale de TRPC3. 47^e réunion annuelle du Club de recherches cliniques du Québec (CRCQ), Bromont, Québec, 2005. *Médecine/Science*, (21) supp.2, p29.

Liste des abréviations

[Ca ²⁺] _i :	Concentration intracellulaire de calcium
CCE :	« Capacitative calcium entry », entrée capacitative du calcium
CCh :	Carbachol
CID :	« Collision-induced dissociation », dissociation induite par collision
CIF :	« Calcium influx factor », facteur de l'influx calcique
CIRB :	« Calmodulin and IP ₃ R binding », domaine d'interaction à la calmoduline et à l'IP ₃ R
DAG :	Diacylglycérol
DN :	Dominant négatif
ESI :	« Electrospray ionisation », ionisation de type électrospray
F-ATPase :	Pompe à protons ATP synthase mitochondriale
GPCR :	« G protein coupled-receptor », récepteur couplé à une protéine G
GST :	Glutathione S-transférase
IP ₃ :	Inositol 1,4,5-trisphosphates
m/z :	Masse/Charge
M5 :	Récepteur muscarinique de type 5
MALDI :	« Matrix-assisted laser desorption/ionisation », désorption/ionisation laser assistée par matrice
NSF :	« N-Ethylmaleimide-sensitive factor », facteur sensible au N-Ethylmaleimide
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphates

PLC :	Phospholipase C
PMCA :	« Plasma membrane Ca ²⁺ ATPase », pompe Ca ²⁺ ATPase de la membrane plasmique
RE :	Réticulum endoplasmique
ROCE :	« Receptor-operated calcium entry », entrée de Ca ²⁺ dépendante d'un récepteur
RTK :	Récepteur tyrosine kinase
SERCA :	« Sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase », pompe Ca ²⁺ ATPase du reticulum sarcoplasmique et endoplasmique
SNARE :	« Soluble <i>N</i> -Ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor », récepteur des protéines d'attachement du facteur soluble sensible au <i>N</i> -Ethylmaleimide
SOCE :	« Store-operated calcium entry », entrée de Ca ²⁺ dépendante des réserves intracellulaires de Ca ²⁺
TM :	Transmembranaire
TOF :	« Time-of-flight », analyseur de type temps-de-vol
TRP :	« Transient Receptor Potential », potentiel transitoire de récepteur
TRPA :	Canaux TRP de la famille de l'ankyrine
TRPC :	Canaux TRP de la famille canonique
TRPL :	« TRP-like », potentiel semblable au potentiel transitoire de récepteur
TRPM :	Canaux TRP de la famille mélastatine
TRPML :	Canaux TRP de la famille mucolipine
TRPP :	Canaux TRP de la famille polycystine

TRPV : Canaux TRP de la famille vanilloïde

V-ATPase : Pompe à protons ATPase vésiculaire

WT : Type sauvage

Liste des figures

Figure 1 : Signalisation calcique chez les cellules non excitables.....	3
Figure 2 : Entrée capacitative du calcium.....	6
Figure 3 : Dépolarisation des cellules photoréceptrices de la Drosophile.....	9
Figure 4 : Représentation schématique d'un TRPC et ses principaux domaines.....	14
Figure 5 : Hypothèses d'activation des TRPCs.....	18
Figure 6 : Interaction de Homer et de la Junctionate avec l'IP ₃ R et les TRPCs.....	23
Figure 7 : Principaux types d'ionisation en spectrométrie de masse.....	30
Figure 8 : Analyse des peptides ions générés par MALDI.....	33
Figure 9 : Séquençage peptidique.....	36
Figure 10 : Augmentation de l'expression de l'IP ₃ R3 chez les cellules surexprimant TRPC6-GFP.....	60
Figure 11 : Analyse des lysats cellulaires par électrophorèse 2D.....	62
Figure 12 : Analyse 2D des protéines co-immunoprécipitées avec TRPC6.....	63
Figure 13 : Expression des protéines de fusion GST-CT6 et GST-CT3a ainsi que de la GST seule.....	65
Figure 14 : Observation de protéines de cœurs/poumons de souris interagissant avec le C-terminal de TRPC3 et/ou de TRPC6.....	68
Figure 15 : Observation de protéines de reins de souris interagissant avec le C-terminal de TRPC3 et/ou de TRPC6.....	69
Figure 16 : Observation de protéines de cerveaux de souris interagissant avec le C- terminal de TRPC3 et/ou de TRPC6.....	70

Figure 17 : Observation de protéines de lysats de cellules T6.11 interagissant avec le C-terminal de TRPC3 et/ou de TRPC6.....	71
Figure 18 : Exemple d'identification des protéines interagissant avec le C-terminal de TRPC3 et/ou TRPC6 par spectrométrie de masse.....	73
Figure 19 : Comparaison structurale de la pompe vésiculaire V-ATPase et de la pompe mitochondriale F-ATPase.....	77
Figure 20 : Effet de la bafilomycine A1 sur l'entrée de calcium.....	80
Figure 21 : NSF dans le transport vésiculaire.....	82
Figure 22 : Essais de liaison à la GST.....	85
Figure 23 : Effet de la surexpression de NSF et NSF-DN sur l'entrée de Ca ²⁺ par TRPC6.....	87
Figure 24 : NSF affecte la maturation de TRPC6.....	90

Liste des tableaux

Tableau 1 : Familles des TRPs et leurs membres.....	11
Tableau 2 : Liste des protéines interagissant avec le C-terminal de TRPC3 et/ou TRPC6 identifiées par spectrométrie de masse.....	75

Résumé

Identification de nouveaux partenaires d'interaction de TRPC3 et TRPC6 par spectrométrie de masse

Par
Nancy Francoeur

Université de Sherbrooke
Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

Les protéines de type TRPC (*transient receptor potential canonical*) forment les canaux ioniques responsables de l'entrée de calcium chez les cellules non excitables suite à la stimulation d'un récepteur couplé à une protéine Gq ou d'un récepteur de type tyrosine kinase. De récentes études ont mis en évidence l'association de certaines protéines avec ces canaux permettant leur modulation, tels la calmoduline, l'IP₃R, la cavéoline etc. La partie C-terminale des TRPCs possède plusieurs motifs dont un domaine TRP, un domaine riche en proline, un domaine d'interaction pour la calmoduline et l'IP₃R ainsi qu'un domaine super hélice qui sont des sites d'interaction potentiels. Dans le but d'identifier des protéines qui interagissent avec ces motifs de la sous-famille de TRPC3, 6 et 7, nous avons produit des colonnes d'affinité où des protéines chimériques contenant les acides aminés Glu⁶⁷⁶ à Lys⁷⁹⁵ de TRPC3 ou Met⁷²⁵ à Arg⁹³¹ de TRPC6, fusionnées à la glutathione S-transférase (GST-CT3a et GST-CT6), ont été attachées sur des billes de glutathione-sépharose. Des protéines extraites de cœurs/poumons, de reins ou de cerveaux de souris, ou encore de lysats de cellules surexprimant de façon stable TRPC6, ont été incubées avec ces colonnes d'affinité. Les protéines retenues sur la colonne ont été éluées, séparées par SDS-PAGE, extraites du gel et digérées à la trypsine. Les extraits peptidiques obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse grâce à un système nano-LC-ESI-TOF-MSMS. Nous avons identifié de cette façon 14 partenaires d'interaction potentiels des TRPCs, dont des protéines du cytosquelette, des chaperonnes, des protéines membranaires, des enzymes mitochondriales ainsi que d'autres protéines cytosoliques dont le rôle est plus ou moins bien connu. Deux de ces protéines ont capté notre intérêt soit la pompe à protons mitochondriale de type F₀F₁ ainsi que le N-Ethylmaleimide-sensitive factor (NSF). Par des essais de liaison à la GST de type pull down, nous démontrons dans cette étude que NSF interagit directement avec TRPC3 et TRPC6, soit sans intermédiaire, et possiblement au niveau du domaine CIRB de ces canaux. Nous démontrons également, grâce à l'utilisation d'un dominant négatif de NSF, que cette protéine module l'entrée de Ca²⁺ par TRPC6, suite à la stimulation de la cellule au CCh, en plus de jouer un rôle dans la maturation du canal.

Introduction

1.1 Le calcium

Les fluctuations de la concentration intracellulaire de calcium ($[Ca^{2+}]_i$) sont à la base de plusieurs processus physiologiques et biochimiques observables chez tous les types de cellules eucaryotes. Une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ au niveau du cytoplasme de la cellule, habituellement observable en réponse à une stimulation par une hormone ou par un autre type de stimuli, aura comme conséquence l'activation d'enzymes, de facteurs de transcription ou d'autres protéines. L'activation de ces dernières peut être à la base de réponses cellulaires importantes telles que la relâche de neurotransmetteurs, la contraction musculaire, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'exocytose et l'apoptose. Au repos, la $[Ca^{2+}]_i$ d'une cellule se situe habituellement entre 50 et 100 nM. En réponse à une stimulation, cette concentration augmente rapidement pour atteindre de 300 à 500 nM. Pour parvenir à ces niveaux, les cellules puisent dans deux différentes sources soit le réticulum endoplasmique (RE), qui est une réserve intracellulaire de calcium, ainsi que le milieu extracellulaire. Les concentrations de calcium du RE et du milieu extracellulaire sont environ 20 000 fois plus élevées que celle à l'intérieur de la cellule et varient de 1 à 2 mM. En réalité, la signalisation via l'ion Ca^{2+} joue un rôle central dans une large variété de processus et tout cela est majoritairement dû à sa versatilité, soit à sa localisation ainsi qu'à sa vitesse de mobilisation rapide au niveau du cytoplasme.

1.1.1 Signalisation calcique chez les cellules non excitables

L'augmentation du calcium cytosolique chez les cellules eucaryotes peut être causée par différents phénomènes. En fait la voie utilisée va dépendre majoritairement du type de cellules stimulées soit s'il s'agit d'une cellule excitable ou non excitable. Chez les cellules excitables, l'augmentation de calcium est majoritairement due à l'ouverture des canaux calciques voltages dépendants suivant la dépolarisation de la membrane cellulaire. Chez les cellules non excitables, l'augmentation de calcium se fait habituellement suite à la stimulation de la cellule par la liaison d'un ligand à un récepteur couplé à une protéine Gq. La signalisation calcique engendrée aura comme effet d'augmenter les concentrations de calcium intracellulaires en favorisant la relâche de l'ion de sa réserve intracellulaire (figure 1).

La liaison du ligand au récepteur a pour effet d'entraîner un changement de conformation de la protéine Gq associée, permettant ainsi l'échange du GDP par un GTP sur la sous-unité α de la protéine. Cet échange entraîne la dissociation de la sous-unité α des sous-unités $\beta\gamma$ et ultérieurement l'activation de la phospholipase C β (PLC β) par la sous-unité α . Cette enzyme clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphates (PIP $_2$), qui est un lipide membranaire, en inositol 1,4,5-trisphosphates (IP $_3$) et en diacylglycérol (DAG).

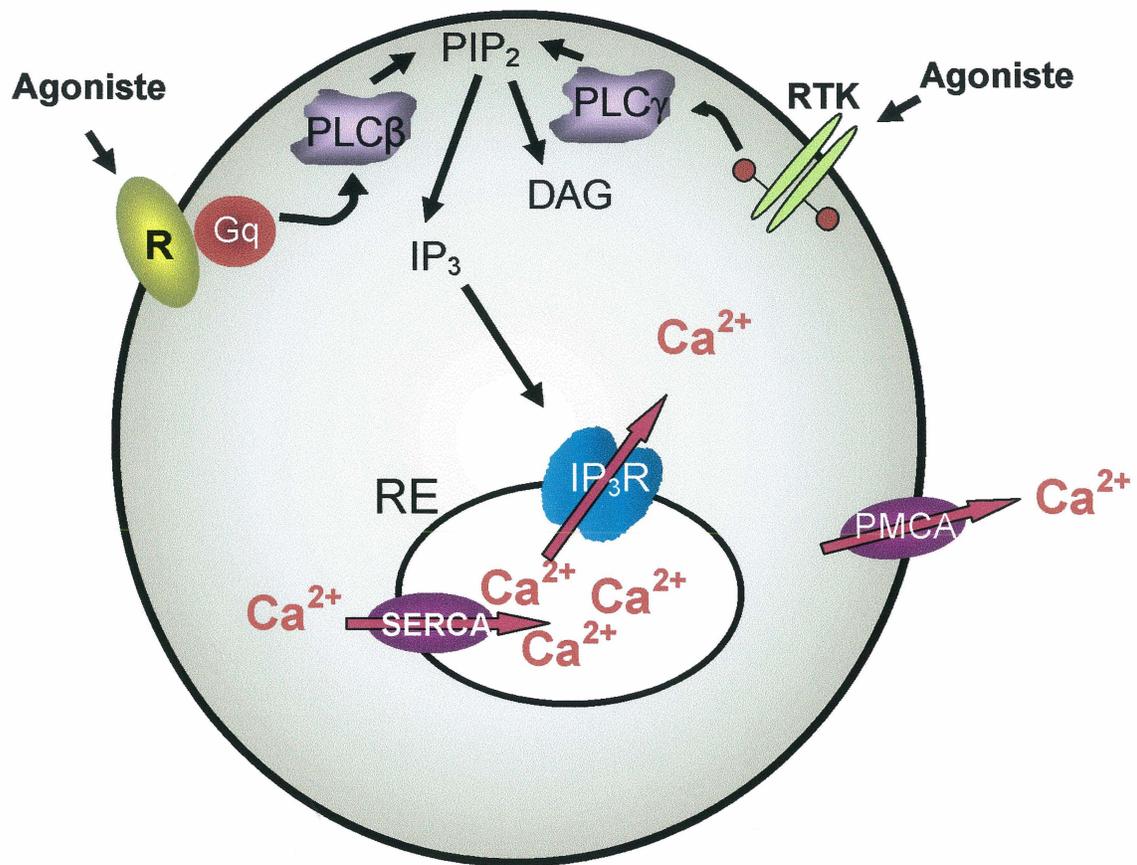


Figure 1 : Signalisation calcique chez les cellules non excitables. La cascade peut être enclenchée par la liaison d'un agoniste à un GPCR ou à un récepteur tyrosine kinase.

L'IP₃ libéré au niveau du cytoplasme lie son récepteur (IP₃R) qui se situe au niveau de la membrane du RE et induit ainsi une relâche rapide de calcium du réservoir vers le milieu intracellulaire. Un processus similaire est observé suite à la stimulation d'un récepteur tyrosine kinase (figure 1). La liaison du ligand au récepteur amène la dimérisation de ce dernier ainsi que son autophosphorylation. Une fois phosphorylé, le récepteur active la phospholipase C γ (PLC γ) qui à son tour vient cliver le PIP₂ membranaire pour générer le DAG et l'IP₃ permettant l'activation de l'IP₃R et la relâche du calcium.

Toutefois, des niveaux élevés de calcium cytoplasmique ne peuvent être maintenus très longtemps puisqu'ils peuvent être dommageables pour la cellule. La cellule retournera donc rapidement au repos et le calcium sera alors repompé au niveau du RE et du milieu extracellulaire par l'intermédiaire de pompes ATP-dépendantes comme la PMCA (Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase) et la SERCA (Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase) (figure 1). La PMCA servira à l'évacuation du calcium vers le milieu extracellulaire alors que la SERCA se chargera de retourner le calcium au niveau du RE jusqu'à son niveau initial (Berridge, 1993).

1.1.2 Entrée capacitative du calcium, SOCE et ROCE

En mettant en évidence le fait qu'une portion du Ca²⁺ relâché à l'intérieur de la cellule, suite à l'action de l'IP₃ sur son récepteur, est repompé vers

l'extérieur de la cellule par les PMCA et que la concentration de calcium à l'intérieur du RE doit regagner l'état basal, la question s'est rapidement posée à savoir quel était le processus par lequel la cellule regagnait du calcium. La mesure des mouvements de calcium, grâce à l'apparition de sondes fluorescentes pour le calcium tel que le fura-2, a permis l'observation d'un influx de calcium au niveau de la membrane plasmique. La relâche du Ca^{2+} des réserves intracellulaires comme le RE semble induire ce processus d'entrée bien que le mécanisme est encore inconnu. Il a été démontré en 1986 par l'équipe de Putney que l'influx calcique observé suite à la relâche du calcium était maintenu jusqu'à ce que la concentration de l'ion dans le RE regagne environ 1 mM, ce qui correspond au niveau basal, ou encore tant que la cellule était stimulée (figure 2). Cette entrée fut donc appelée entrée capacitative du calcium (CCE) ou encore SOCE (Store-operated calcium entry) puisqu'elle semblait être majoritairement régulée par la concentration luminale de calcium dans le RE. L'utilisation d'un inhibiteur de la SERCA, la thapsigargine, est venue plus tard confirmer cette hypothèse (Thastrup et al., 1990; Thastrup et al., 1994). La thapsigargine produit une fuite de calcium du RE vers le cytoplasme selon le gradient de concentration. Il a été démontré que cette diminution de calcium au niveau du RE induisait un influx calcique membranaire, semblable à celui engendré par l'activation de la PLC, sans que cette voie ne soit en cause. Toutefois, sous toutes autres conditions, l'activation d'un récepteur (couplé à une protéine G ou tyrosine kinase) est nécessaire pour qu'il y ait entrée de calcium au niveau de la membrane plasmique (Hofmann et al., 2000). Ce phénomène a

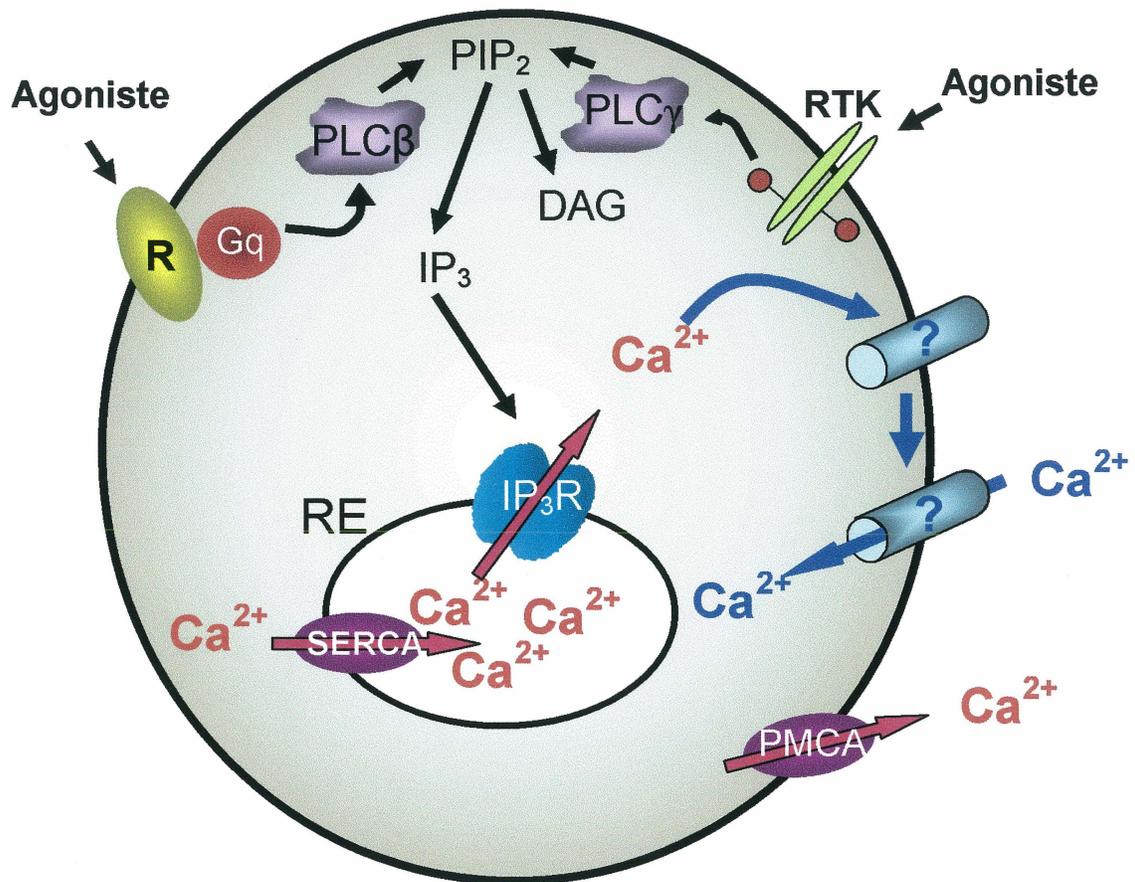


Figure 2 : Entrée capacitative du calcium. La relâche de l'ion calcium du RE entraîne une entrée de calcium au niveau de la membrane plasmique : l'entrée capacitative du calcium ou SOCE.

été nommé le ROCE pour Receptor-operated calcium entry.

1.1.3 La découverte des TRPs : Le Transient Receptor Potential de la drosophile

TRP est une abréviation de « *transient receptor potential* » employée pour désigner un gène mutant découvert chez la mouche à fruit *Drosophila melanogaster*. La découverte de la mutation dans le gène *trp* de la drosophile s'est faite suite à l'observation d'une réponse altérée du système de transduction visuel de la mouche à la lumière (Cosens et Manning, 1969). La perception de la lumière chez la drosophile implique la signalisation calcique via l'activation d'un récepteur couplé à une protéine Gq, le récepteur à la rhodopsine, dont la stimulation amène l'activation d'une PLC. Bien que chez l'humain la lumière induit une hyperpolarisation du potentiel membranaire des cellules photoréceptrices de l'oeil, chez la drosophile l'activation de la PLC entraîne une ouverture de certains canaux sodiques et/ou calciques et subséquentement une dépolarisation de la membrane. Chez la drosophile de type sauvage, l'illumination prolongée de l'œil entraîne une dépolarisation de la membrane en pic, suivie d'une transition rapide vers un état de plateau soutenu et un retour au niveau basal (figure 3A). Chez la mouche mutante *trp*, pour qu'une dépolarisation membranaire semblable au phénotype sauvage se produise, on doit stimuler les photorécepteurs avec un flux lumineux dix fois supérieur par rapport au type sauvage et contrairement à la réponse sous forme de plateau obtenu par

l'illumination de la mouche sauvage, le potentiel obtenu chez la mouche *trp* est de type transitoire (figure 3B), ce qui a valu le nom de TRP : transient receptor potential.

La première évidence expérimentale démontrant que le gène *trp* codait en fait pour un canal calcique a été obtenue suite à l'analyse de pigments granulaires présents chez les cellules photoréceptrices de la drosophile dont le déplacement est dépendant de la lumière (Lo et Pak, 1981). Ce déplacement s'est également avéré dépendant des niveaux de calcium intracellulaires et il a été observé que le déplacement de ces granules chez les mouches ayant la mutation était transitoire versus les mouches sauvages. Des évidences ont par la suite été amenées suite à des expérimentations de type « patch clamp », mesurant les courants calciques dans des cellules isolées de la drosophile (Hardie et Minke, 1992). Ces études ont permis de démontrer que le courant calcique était 10 fois plus faible chez les cellules de mouches *trp* que chez les cellules de type sauvages suggérant ainsi que la mutation du gène *trp* affectait un canal calcique. Toutefois une question demeurait non résolue : puisque la réponse à la lumière n'est pas complètement abolie chez la drosophile mutante, existe-t-il un autre canal impliqué dans ce processus? En 1994, une étude démontra l'existence de TRPL, qui est un canal non sélectif et constitutivement actif (Hu et al., 1994). Il a également été démontré plus tard qu'une double mutation dans *trp* et dans *trpl* amenait une abolition complète de la réponse à la

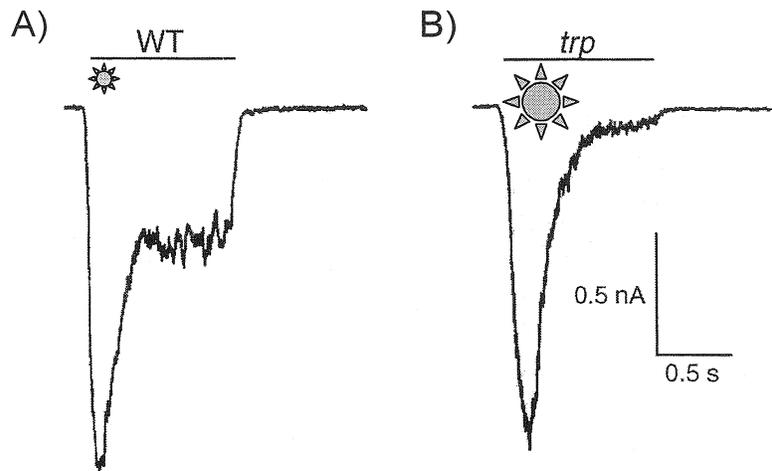


Figure 3 : Dépolarisation des cellules photoréceptrices de la Drosophile. Graphiques types de la dépolarisation des cellules photoréceptrices de la mouche WT (A) et de la mouche mutante *trp* (B) suite à une stimulation à la lumière. La taille des symboles lumineux est proportionnelle à l'intensité de la lumière. Adapté de Minke et Cook, *Physiol rev*, 82, p. 429-472, 2002.

lumière (Niemeyer et al., 1996; Reuss et al., 1997). La première démonstration de l'implication des TRPs en tant que canaux impliqués dans la CCE a été réalisée en 1994 par le groupe de Schilling. Cette étude démontrait que l'expression de TRP, mais non celle de TRPL, produisait un influx membranaire aux propriétés similaires à un influx associé à l'activation d'un récepteur couplé à Gq et à l'activation subséquente de la cascade de signalisation passant par la PLC et l'IP₃ (Vaca et al., 1994).

1.1.4 La famille des TRPs et les nomenclatures

Basée sur l'homologie de leurs acides aminés, la superfamille des canaux TRPs peut être divisée en sept familles : TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML et TRPN, dont tous les membres proviennent de gènes différents (tableau 1) (Montell et al., 2002). La famille TRPC (Canonical) et la famille TRPM (Melastatine) comprennent respectivement sept et huit différents canaux présents chez les mammifères soit TRPC1 à TRPC7 et TRPM1 à TRPM8. La famille TRPV (Vanilloïde) comprend présentement six membres, TRPV1 à TRPV6 également présents chez les mammifères. La famille TRPML (Mucolipine) comprend trois membres, TRPML1 à TRPML3 et la famille TRPP (Polycystine) comprend trois membres qui sont des canaux, TRPP2, TRPP3 et TRPP5 ainsi que cinq membres qui ne sont pas des canaux. Ces familles sont encore très peu connues, mais gagnent présentement en popularité suite à la

Familles des TRPs	Membres de cette famille	Permettent le passage de l'ion calcium
TRPC	TRPC1-TRPC7	Tous les TRPCs
TRPM	TRPM1-TRPM8	TRPM1, 2, 3, 6, 7 et 8
TRPV	TRPV1-TRPV6	Tous les TRPVs
TRPML	TRPML1-TRPML3	Tous les TRPMLs
TRPP	TRPP2, TRPP3, TRPP5 *	TRPP2, 3 et 5
TRPA	TRPA1	TRPA1
TRPN	TRPN **	Aucun

* TRPP comprend aussi cinq membres qui ne sont pas des canaux.

** TRPN a seulement été décelé chez le *Caenorhabditis elegans*, la drosophile et le zebra fish.

Tableau 1 : Familles des TRPs et leurs membres. La majorité d'entre eux laissent passer le calcium, mais avec des niveaux de perméabilité différents.

découverte de leur implication probable dans plusieurs maladies humaines comme la mucopolysaccharidose de type IV (TRPML) ou la polykystose rénale autosomique dominante (TRPP) (Bach, 2004; Wu et Solmo, 2000). La famille la plus récente identifiée, TRPA (Ankyrine), comprend seulement un membre mammifère TRPA1. Finalement, TRPN ('NO- Mechano- Potential C' (NOMPC)) a pour sa part seulement été détecté jusqu'à présent chez le *Caenorhabditis elegans*, chez la drosophile et chez le zebra fish et a été proposé pour être un canal mécanosensible (Walker et al., 2002; Sidi et al., 2003). Tous les TRPCs (1 à 7), les TRPVs (1 à 6), TRPM1, 2, 3, 6, 7 et 8, TRPA1, TRPP2, 3 et 5 ainsi que TRPML1, 2 et 3 permettent le passage de l'ion calcique et ont des perméabilités très différentes avec des ratios P_{Ca}/P_{Na} passant de 0,5 pour TRPM2 à des valeurs supérieures à 100 pour TRPV5 et TRPV6 (Nilius et Voets, 2005). Il est à noter que la numérotation des protéines de chaque sous-famille est en accord avec l'ordre de leur découverte et qu'il existe également plusieurs subdivisions à l'intérieur même de ces groupes. Plusieurs de ces TRPs peuvent être activés de diverses façons. Cette sensibilité à plusieurs types d'activations suggère que le stimulus physiologique adéquat pour chaque TRP va dépendre du contexte cellulaire de chacun. Les sections qui vont suivre mettront l'emphase sur les TRPCs, sujet de cette étude.

1.1.5 Propriétés générales des TRPCs

De toute la superfamille des TRPs, les TRPCs sont ceux qui possèdent la plus grande homologie avec les canaux TRP et TRPL de la drosophile (30 à 40% d'homologie). D'abord identifiées « short »TRPs, les protéines de ce sous-groupe sont caractérisées par une taille relativement courte (800 à 1 000 acides aminés). Le premier membre identifié de cette famille, TRPC1, a été cloné en 1995 (Wes et al., 1995; Petersen et al., 1995; Zhu et al., 1996). La famille des TRPCs comprend sept membres nommés TRPC1 à TRPC7 selon l'ordre de leur identification. En se basant sur leurs homologies de séquences et sur leurs similarités fonctionnelles, les canaux TRPCs ont été divisés en quatre sous-familles : TRPC1, TRPC2, qui est un pseudo gène chez l'humain, mais qui peut former des canaux fonctionnels chez d'autres espèces, TRPC3, 6 et 7, qui possèdent près de 80 % d'homologie entre eux et finalement TRPC4 et 5.

Basé sur l'analyse informatique des séquences des TRPCs, il a été observé qu'ils possèdent tous une structure de base commune (figure 4). Les extrémités N-terminale et C-terminale de ces protéines ont une localisation intracellulaire et sont séparées par six segments transmembranaires (TM1 à TM6) incluant un court segment hydrophobe entre TM5 et TM6 identifié comme étant la région présumée du pore (Vannier et al., 1998; Dohke et al., 2004). Le N-terminal de chacune des protéines est composé de trois à quatre répétitions de l'ankyrine, d'une région super hélice et d'une région présumée pour la liaison

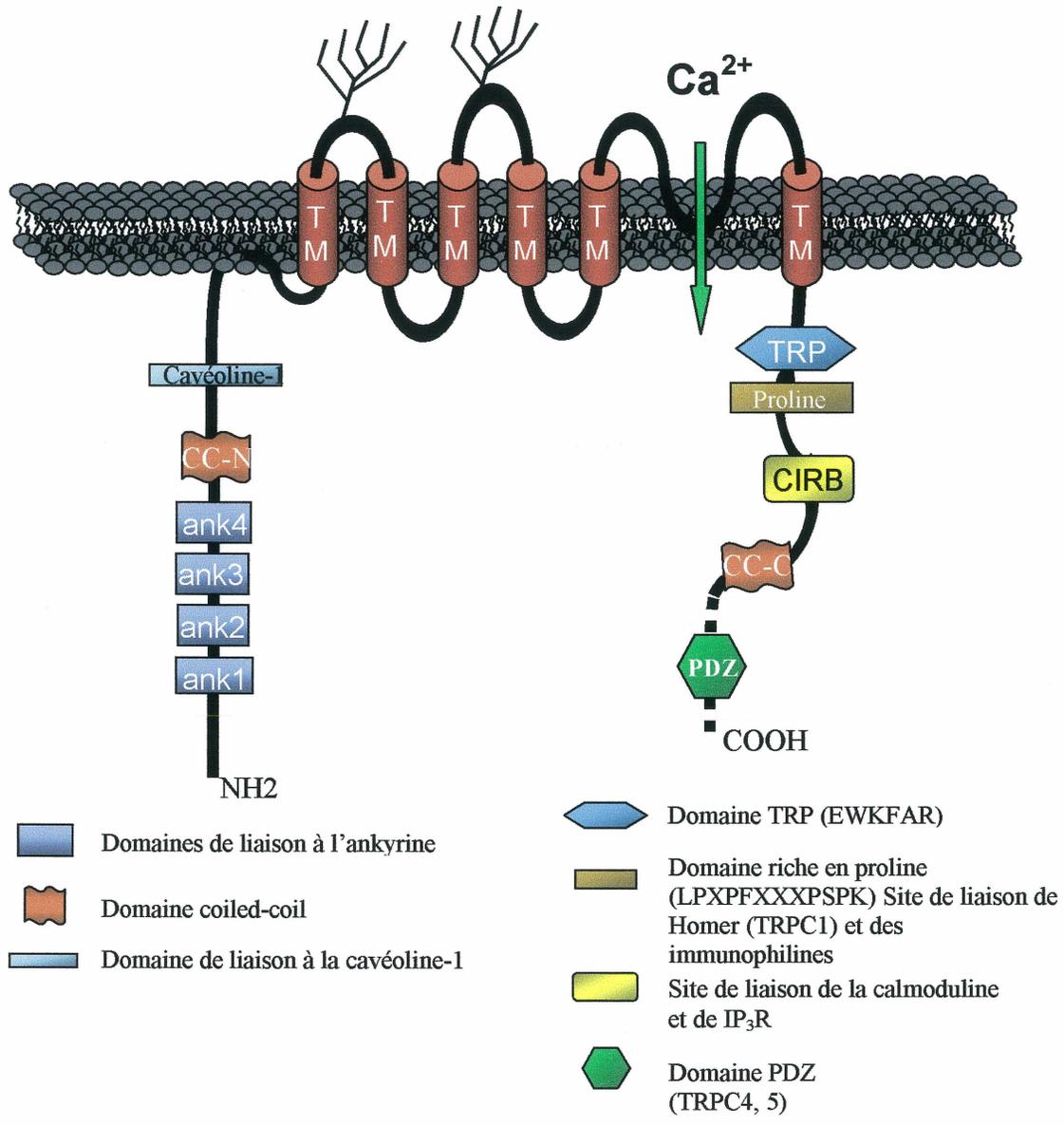


Figure 4 : Représentation schématique d'un TRPC et ses principaux domaines

à la cavéoline. La portion C-terminale inclut quant à elle une région conservée « TRP box », un motif riche en prolines, une région d'interaction avec la calmoduline et le récepteur à l'IP₃, CIRB (Calmoduline and IP₃ Receptor Interaction), une région super hélice et pour TRPC4 et TRPC5, une extension du C-terminal contenant un motif PDZ (Pedersen et al., 2005). Différents patrons de N-glycosylation sont observés chez les membres de la sous-famille TRPC. Ces patrons de glycosylation variables auraient été évoqués pour expliquer entre autres certains niveaux d'activité constitutive chez TRPC3 et TRPC6 (Dietrich et al., 2003).

Les protéines TRPCs forment des homotétramères (assemblage de quatre TRPCs identiques) ou des hétérotétramères (assemblage de quatre TRPCs non identiques). Il a été démontré par différentes approches que l'assemblage des canaux se fait habituellement à l'intérieur d'une même sous-famille soit les assemblages TRPC3/TRPC6/TRPC7 et TRPC4/TRPC5. TRPC1 fait exception à cette règle et peut s'associer avec TRPC4 et TRPC5, avec lesquels il partage beaucoup d'homologie (Strubing et al., 2001; Hoffmann et al., 2002; Goel et al., 2002). Il peut également s'associer avec TRPC3 (Liu et al., 2005) pour former des canaux fonctionnels. Les déterminants moléculaires impliqués dans la tétramérisation des TRPCs sont encore mal connus. En 2002, Engelke et al. démontraient que le domaine super hélice en N-terminal de TRPC1 était impliqué dans son oligomérisation. En 2005, Liu et al. démontraient que la première répétition du domaine de l'ankyrine de TRPC1 interagissait avec

le N-terminal de TRPC3. Puis, en 2006, Lepage et al. ont démontré que deux domaines d'interaction sont impliqués dans l'oligomérisation des canaux TRPC4 et TRPC6 : un premier en N-terminal comprenant la deuxième à la quatrième répétition du domaine de l'ankyrine et les 50 acides aminés en aval du domaine super hélice et un deuxième domaine comprenant la région supposée du pore et le C-terminal cytoplasmique. Le premier domaine servirait à l'interaction avec le N-terminal des TRPCs adjacents alors que le domaine en C-terminal servirait d'interaction avec le N-terminal de sous-unités adjacentes et ne serait pas nécessaire à l'activité du canal contrairement à la première interaction.

1.1.6 Hypothèses d'activation des TRPCs

Nous savons que l'entrée de calcium au niveau du cytosol, à travers les canaux TRPCs, est en rapport avec la relâche de l'ion des réserves de la cellule. L'activation de ces canaux et l'entrée de calcium sont en fait les points culminants de la signalisation calcique. Toutefois le mécanisme menant à cette activation est encore très peu connu.

Trois hypothèses à ce sujet ont été proposées jusqu'à présent. La première propose qu'un messager cytosolique soluble nommé CIF (Calcium influx factor) serait relâché du RE suite à la déplétion du réservoir de calcium et que ce dernier diffuserait dans le cytoplasme pour activer les canaux de type SOCE présents à la membrane plasmique (figure 5A) (Randriamampita et al.,

1993; Clapham, 1993). Ce messenger pourrait également être généré de novo dans le cytoplasme suivant la relâche calcique. Toutefois, la relâche à partir du RE semble être le principe ayant retenu le plus d'intérêt. Jusqu'ici aucune identification ou purification du composé n'a pu être obtenue et ce modèle semble être de moins en moins supporté.

La deuxième hypothèse est basée sur l'interaction entre l'IP₃R au niveau du RE et les canaux ioniques membranaires (figure 5B). Cette hypothèse stipule qu'une protéine du RE, possiblement le récepteur à l'IP₃ lui-même, servirait de senseur des niveaux de calcium à l'intérieur du réticulum endoplasmique et transmettrait le signal de la déplétion de la réserve aux canaux de la membrane plasmique par une interaction physiologique directe avec ces derniers (Lievremont et al., 1994; Berridge, 1995). Suite à la déplétion du réservoir calcique, l'IP₃R changerait de conformation et serait en mesure d'interagir avec les canaux calciques membranaires. Ce modèle est supporté par la copurification de la fraction membranaire avec l'IP₃R, prouvant ainsi la proximité des composantes potentiellement impliquées, et par l'interaction directe entre l'IP₃R et les TRPCs (Boulay et al., 1999; Kiselyov et al., 1998, 1999.).

La troisième hypothèse propose que la relâche de calcium entraîne la fusion de vésicules et l'insertion de canaux TRPCs supplémentaires à la membrane (figure 5C). Une étude récente a démontré que l'entrée de calcium chez certaines cellules endothéliales était observée seulement suite à la

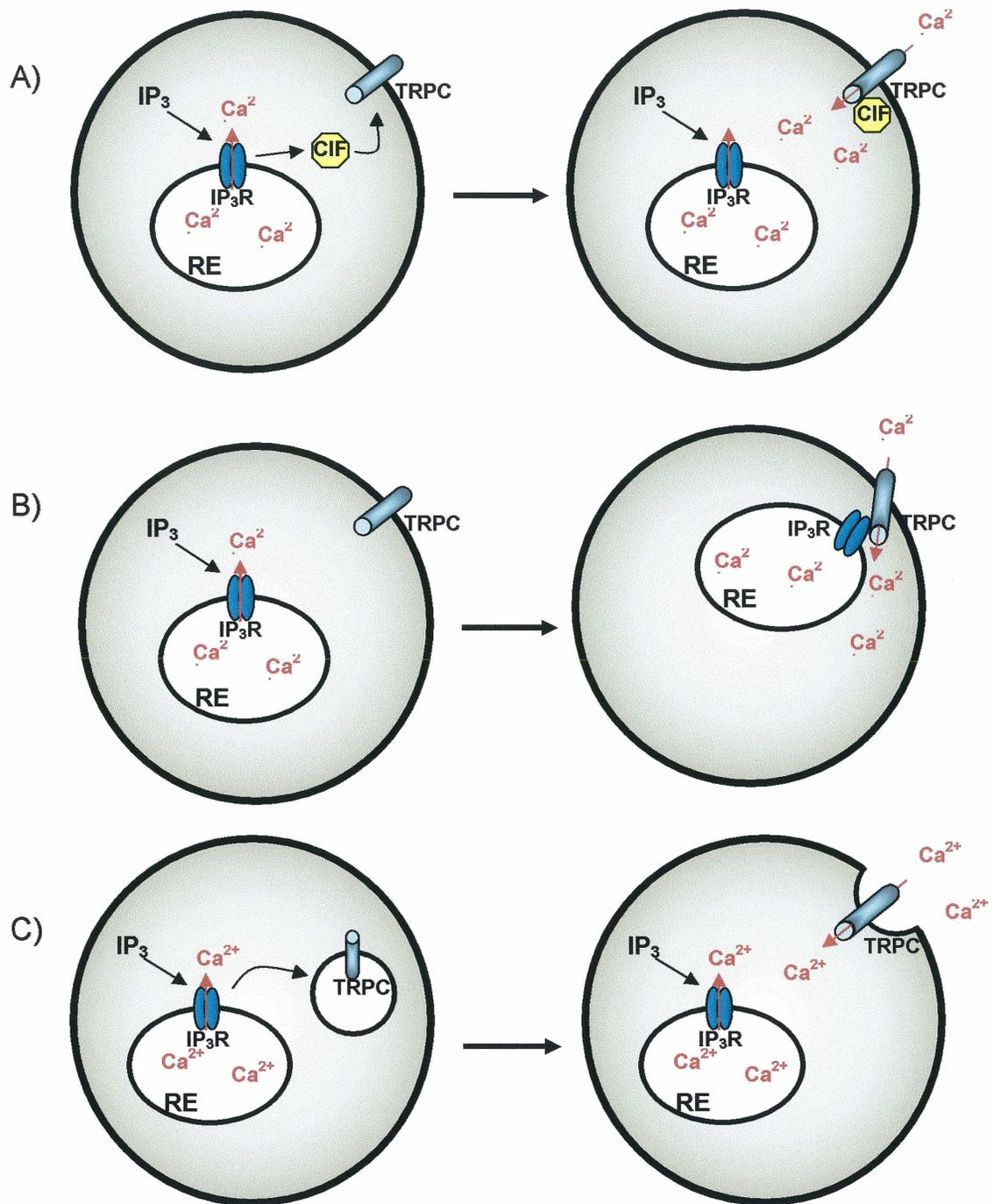


Figure 5 : Hypothèses d'activation des TRPCs. (A) Le CIF. (B) le couplage conformationnel. (C) L'insertion des TRPCs à la membrane.

translocation du complexe TRPC1-IP₃R à la membrane plasmique et cela de façon dépendante des protéines Rho qui sont de petites protéines G connues pour leur implication dans le routage des protéines (Mehta et al., 2003). Une deuxième étude est venue supporter cette hypothèse en mettant en évidence une augmentation des canaux TRPC6 à la membrane plasmique suite à l'activation des GPCRs (Cayouette et al., 2004). Cette augmentation serait due à la translocation rapide et réversible du complexe TRPC6-IP₃R présent dans les cavéoles, à la membrane plasmique. La translocation observée serait également dépendante de la concentration d'agoniste, mais indépendante de la [Ca²⁺]_i. Puis, une troisième étude a démontré qu'il existait une interaction fonctionnelle entre TRPC3 et certains membres de la famille des SNARE (Soluble *N*-Ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor) comme VAMP2 (Vesicle-Associated Membrane Protein 2) et α SNAP (α Soluble *N*-Ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein), qui sont des protéines impliquées dans la fusion de vésicules avec la membrane plasmique (Singh et al., 2004). Cette étude a démontré que l'augmentation de TRPC3 à la membrane suite à une stimulation des GPCRs était dépendante de VAMP2, mais indépendante de la relâche calcique. Il est intéressant de penser qu'un mécanisme commun à tous les TRPCs serait à la base de leur insertion à la membrane et que ce mécanisme pourrait être directement activé par des molécules comme le DAG suivant la stimulation de la signalisation calcique par un ligand.

Le mécanisme réel d'activation des TRPCs reste encore à élucider bien que les évidences actuelles semblent privilégier les modèles de translocation et de couplage conformationnel. Il n'est pas exclu que le véritable mécanisme soit en réalité un mélange de ces deux hypothèses.

1.1.7 Partenaires d'interaction des TRPCs

Depuis quelques années, plusieurs groupes ont tenté d'expliquer les variabilités dans l'assemblage, dans l'activation et dans les mécanismes régulateurs des TRPCs. La course aux partenaires d'interaction pouvant expliquer en partie ces variabilités a alors été enclenchée. Depuis, plusieurs partenaires ont été identifiés qui interagissent avec tous les types de TRPCs ou encore avec des familles ou des membres seuls.

L'interaction des TRPCs avec la calmoduline a été l'une des plus étudiée. La calmoduline est une protéine cytoplasmique capable de lier le calcium et connue pour son implication dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires (Saimi et al., 2002). Les premières évidences mettant la calmoduline en relation avec les TRPs remontent aux études effectuées sur les cellules photoréceptrices de la drosophile (Scott et al., 1997; Arnon et al., 1997). Plus récemment, il a été démontré que TRPC3 possédait un site d'interaction pour la calmoduline au niveau de son C-terminal (Zhang et al., 2001). Il a également été démontré dans cette étude que le site de liaison à la calmoduline est également un site de

liaison au récepteur à l'IP₃ et que les deux protéines seraient en compétition pour ce site. Aussi, il a été démontré que la calmoduline pouvait interagir avec tous les types de TRPCs et que la dissociation de la calmoduline de TRPC4 amenait l'activation du canal (Tang et al., 2001).

L'interaction du récepteur à l'IP₃ avec les TRPCs est également connue pour être une interaction ayant grandement contribué à l'élucidation des mécanismes de régulation de ces canaux. Cette interaction a été démontrée pour tous les membres de la famille des TRPCs et vient appuyer l'hypothèse d'activation par couplage conformationnel (figure 5B). La partie N-terminale de l'IP₃R lierait le domaine CIRB des TRPCs (Kiselyov et al., 1999; Boulay et al., 1999). Une importante question concernant cette interaction est de savoir comment elle est régulée. Cette interaction semble être dynamique, vu la compétition avec la calmoduline, et d'autres protéines sont peut-être impliquées au niveau de cette interaction.

L'une de ces protéines pourrait être de la famille des protéines Homers. Les Homers sont des protéines adaptatrices qui se dimérisent via une région super hélice (Xiao et al., 1998). Le domaine EVH1 (Ena/VASP Homology 1) de chaque monomère lie une séquence consensus PPXXF située sur ses protéines cibles (Beneken et al., 2000). De cette façon, Homer servirait de lien entre le C-terminal des TRPCs en liant leur domaine riche en prolines, conservé chez tous les types de TRPCs, et le N-terminal de l'IP₃R (figure 6A) (Yuan et al., 2003).

Cette liaison a été démontrée jusqu'à maintenant pour TRPC1 et TRPC5 et semblerait réguler la liaison IP₃R/TRPC1 ainsi que l'activité du canal. La liaison de Homer vient également supporter l'hypothèse d'activation des TRPCs par couplage conformationnel.

La Junctate est une autre protéine potentiellement impliquée dans la communication entre le RE et la membrane plasmique. La Junctate est en fait une protéine ancrée à la membrane du RE qui lie le calcium (Treves et al., 2000). Cette protéine lierait l'IP₃R à la membrane du RE et TRPC3 à la membrane plasmique par son N-terminal (figure 6B) (Treves et al., 2004). Une surexpression de cette protéine serait associée à une augmentation de l'influx calcique suite à l'activation des GPCRs. De leur localisation, il a été suggéré que la Junctate et Homer pourraient avoir des rôles complémentaires, la Junctate permettant le rapprochement entre l'IP₃R et les TRPCs et Homer permettant l'interaction entre les deux protéines (figure 6C) (Kiselyov et al., 2005).

L'interaction de TRPC3 avec VAMP2 vient pour sa part appuyer l'hypothèse d'insertion des TRPCs à la membrane plasmique (figure 5C) (Singh et al., 2004). Comme mentionné auparavant, VAMP2 est une protéine faisant partie de la famille des SNARE, qui sont des protéines impliquées dans la fusion vésiculaire. VAMP2 interagirait avec TRPC3 au niveau de son N-terminal et serait à la base de l'augmentation du canal à la membrane plasmique suite à

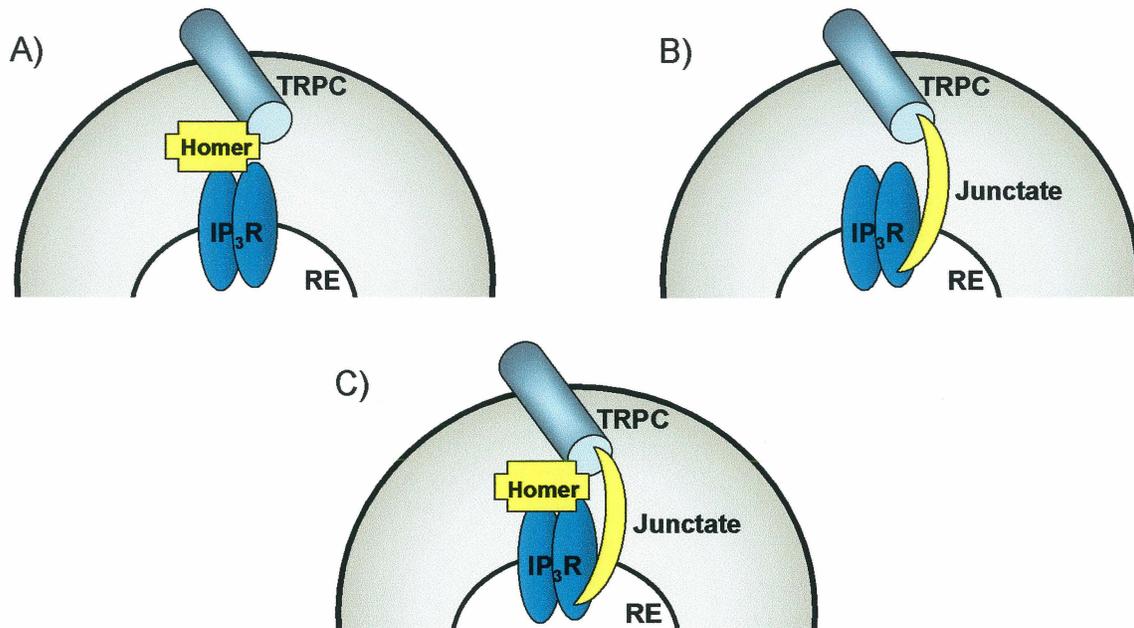


Figure 6 : Interaction de Homer et de la Junctate avec l'IP₃R et les TRPCs. (A) Représentation schématique de l'interaction de l'IP₃R et des TRPCs avec Homer. (B) Interaction avec la Junctate. (C) Hypothèse selon laquelle Homer et la Junctate collaboraient à l'activation des TRPCs.

l'activation d'un GPCR et de façon indépendante à la vidange des réserves de calcium.

Une autre interaction supportant cette hypothèse est celle impliquant certains TRPCs avec la cavéoline. La cavéoline est une protéine enrichie au niveau de la membrane cytoplasmique, plus précisément à l'intérieur de micro-domaines appelés caveolae (structure riche en sphingolipides et en cholestérol), impliquée dans le routage des protéines membranaires (Brown et al., 1992; Simons et Ikonen, 1997; Hooper, 1999). La liaison de la cavéoline-1 se produit dans une région riche en résidus aromatiques (Couet et al., 1997), connue pour être conservée au niveau du N-terminal de tous les TRPCs. La co-localisation de TRPC1, TRPC3 et TRPC6 avec la cavéoline a d'ailleurs été démontrée par différents groupes (Lockwich et al., 2000; Lockwich et al., 2001; Brazer et al., 2003; Cayouette et al., 2004).

Les domaines de l'ankyrine sont présents chez plus de 4 000 protéines différentes et sont ainsi les domaines les plus fréquemment impliqués dans les interactions protéines/protéines (Gorina et al., 1996; Batchelor et al., 1998). Contrairement à d'autres domaines d'interaction connus, les domaines de l'ankyrine ne reconnaissent pas de séquences consensus, permettant l'interaction d'une large quantité de partenaires pouvant réguler les protéines possédant ces domaines (Mosaviet al., 2004). Une étude a démontré récemment que le deuxième domaine de l'ankyrine des TRPCs (qui en possède de trois à

quatre) interagit avec le C-terminal de MxA, un membre de la superfamille des Dynamines GTPase (Lussier et al., 2005). De plus, il a été démontré que l'interaction entre MxA et TRPC6 augmente l'activité du canal suivant l'activation d'un GPCR et pourrait être impliquée au niveau de l'exocytose de ce canal.

Les immunophilines sont des protéines chaperonnes qui seraient impliquées dans la voie de repliement des protéines (Harrar et al., 2001 ; Ratajczak et al., 2003). Ces protéines sont des peptidylprolyl *cis-trans* isomérases qui reconnaissent des dipeptides XP spécifiques chez leurs partenaires d'interaction (Marks, 1996). Ce sont des protéines exprimées de façon ubiquitaire et ni leur activité ou leur niveau d'expression ne semblent être régulés directement par le calcium. FKBP12 a été démontré pour interagir avec TRPC3, 6 et 7 et FKBP52 avec TRPC4 et 5 et ces interactions se font toutes via le domaine riche en proline des TRPCs se situant au niveau de leur C-terminal (Sinkins et al., 2004). Le FK506, connu pour déplacer les immunophilines de leurs cibles, est capable d'inhiber le courant calcique chez TRPC6. La liaison des FKBP s pourrait également permettre l'interaction d'autres protéines avec les TRPCs, comme la calcineurine. L'interaction de FKBP12 avec le récepteur à la ryanodine et avec l'IP₃R permet la liaison de la calcineurine, altérant la phosphorylation de ces canaux et régulant le flux calcique (Cameron et al., 1995 ; Cameron et al., 1997; Shin et al., 2002). Toutefois, ce type de régulation des TRPCs par les immunophilines et la calcineurine n'a toujours pas été démontré.

TRPC4 et TRPC5 possèdent un prolongement en C-terminal qui se termine par un motif de liaison PDZ. Ce motif est impliqué dans la liaison d'une protéine adaptatrice nommée NHERF. La liaison à NHERF permettrait l'ancrage de TRPC4 et TRPC5 au niveau du cytosquelette. La délétion du motif PDZ chez TRPC4 entraîne non seulement une diminution de sa présence à la surface de la cellule mais aussi un changement dans sa distribution cellulaire générale (Tang et al., 2000; Mery et al., 2002).

D'autres protéines ont également été identifiées comme étant des partenaires d'interaction des TRPCs. La protéine Fyn, qui est une kinase de la famille des Src, semble interagir via son domaine SH2 avec la région N-terminale de TRPC6 et amène ainsi la phosphorylation de résidus tyrosine augmentant l'activité du canal (Hisatsune et al., 2004; Shi et al., 2004). La pompe Na^+/K^+ -ATPase semble également être un partenaire d'interaction pour TRPC5 et TRPC6 (Goel et al., 2005). Toutefois le rôle de cette interaction n'a toujours pas été démontré.

Malgré la grande quantité de partenaires identifiés, les mécanismes de régulation des TRPCs restent toujours encore mal compris. Certains liens entre ces différentes interactions vont être nécessaires pour une meilleure compréhension de ces mécanismes. D'autres partenaires d'interaction devront fort probablement être identifiés. Un des outils développés pour l'étude des protéines et qui est de plus en plus utilisé dans l'identification de partenaires

d'interaction est la spectrométrie de masse. La prochaine section mettra l'emphase sur cette technique, qui fut mise à profit dans la présente étude.

1.2 La spectrométrie de masse : un outil en plein essor

La spectrométrie de masse est une approche très puissante dans l'étude et la caractérisation des protéines. Grâce à cette technique, il est possible d'obtenir certaines informations sur des protéines d'intérêt comme leur masse et leur séquence en acides aminés (Graves et al., 2002). Ces informations peuvent être ensuite utilisées afin d'identifier ces protéines dans des banques de données ou encore de déterminer le type et la localisation de modifications post-traductionnelles présentes sur ces protéines. Les trois étapes impliquées dans l'analyse par spectrométrie de masse sont la préparation de l'échantillon, l'ionisation de l'échantillon et l'analyse des ions formés.

1.2.1 Préparation des échantillons

Pour ce qui est de la préparation des échantillons, dans la grande majorité des cas, les protéines sont dénaturées et séparées par SDS-PAGE 1D ou 2D et extraites du gel pour être ensuite digérées par une protéase comme la trypsine (Rosenfeld et al., 1992; Shevchenko et al., 1996). Les peptides en solution obtenus peuvent par la suite être purifiés et concentrés avant d'être ionisés et analysés.

1.2.2 L'ionisation

L'apparition de l'ionisation de type MALDI (Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization) et de type ESI (Electrospray Ionization) à la fin des années 1980 est venue révolutionner l'analyse protéique par spectrométrie de masse (Karas et al., 1988; Fenn et al., 1989). Ce sont encore aujourd'hui les deux techniques d'ionisation les plus utilisées. L'ionisation a pour but premier de donner une charge aux peptides générés suite à la digestion dans le gel, permettant par la suite la séparation et l'analyse de ces peptides par divers types d'analyseurs.

Dans l'ionisation de type MALDI, l'échantillon est incorporé à de la matrice (comme l'acide sinapinique ou α -cyano-4-hydroxycinnamique), co-cristallisé sur une surface métallique et soumis à des photons pulsés par une source laser dans l'UV (figure 7A) (Karaset al., 1988; Qinet al., 1997). La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon soumis au faisceau laser incident et d'amener l'échantillon en phase gazeuse. Ces molécules d'échantillon, suite à des collisions avec des molécules de matrice, forment des ions de types monochargés ou multichargés. Ces ions seront ensuite analysés. L'ionisation de type MALDI peut être appliquée à une large gamme de molécules d'intérêt en permettant l'analyse de peptides de moins de 1 kDa et de protéines de plus de 100 kDa avec une très bonne précision et une très bonne reproductibilité. Un avantage majeur de ce type d'ionisation est le fait que les échantillons peuvent

être utilisés directement suivant la digestion dans le gel (suite à une purification et une concentration sur une colonne C18 de type Zip tip), ce qui diminue de beaucoup le temps d'analyse.

Le principe d'ionisation par « Elettrospray » (ESI) consiste à faire passer l'échantillon en solution dans un capillaire qui est porté à un haut potentiel électrique (figure 7B) (Fenn et al., 1989; Yates et al., 1997). À la sortie du capillaire, les peptides sont présents dans de très fines gouttelettes qui, grâce au champ électrique imposé, se dirigent vers l'analyseur formant un cône nommé cône de Taylor. Les gouttelettes, lors du transport vers l'analyseur, vont libérer les ions suite à l'évaporation du solvant. Les ions formés sont majoritairement de type multichargé et pourront par la suite être analysés. L'ionisation de type ESI est très souvent employée en présence de mélanges complexes de peptides. Son avantage réside dans le fait qu'il peut être couplé à un système de chromatographie liquide (HPLC) permettant la séparation et la purification simultanée des peptides avant leur entrée dans le capillaire (McCormack et al., 1997; Link et al., 1999).

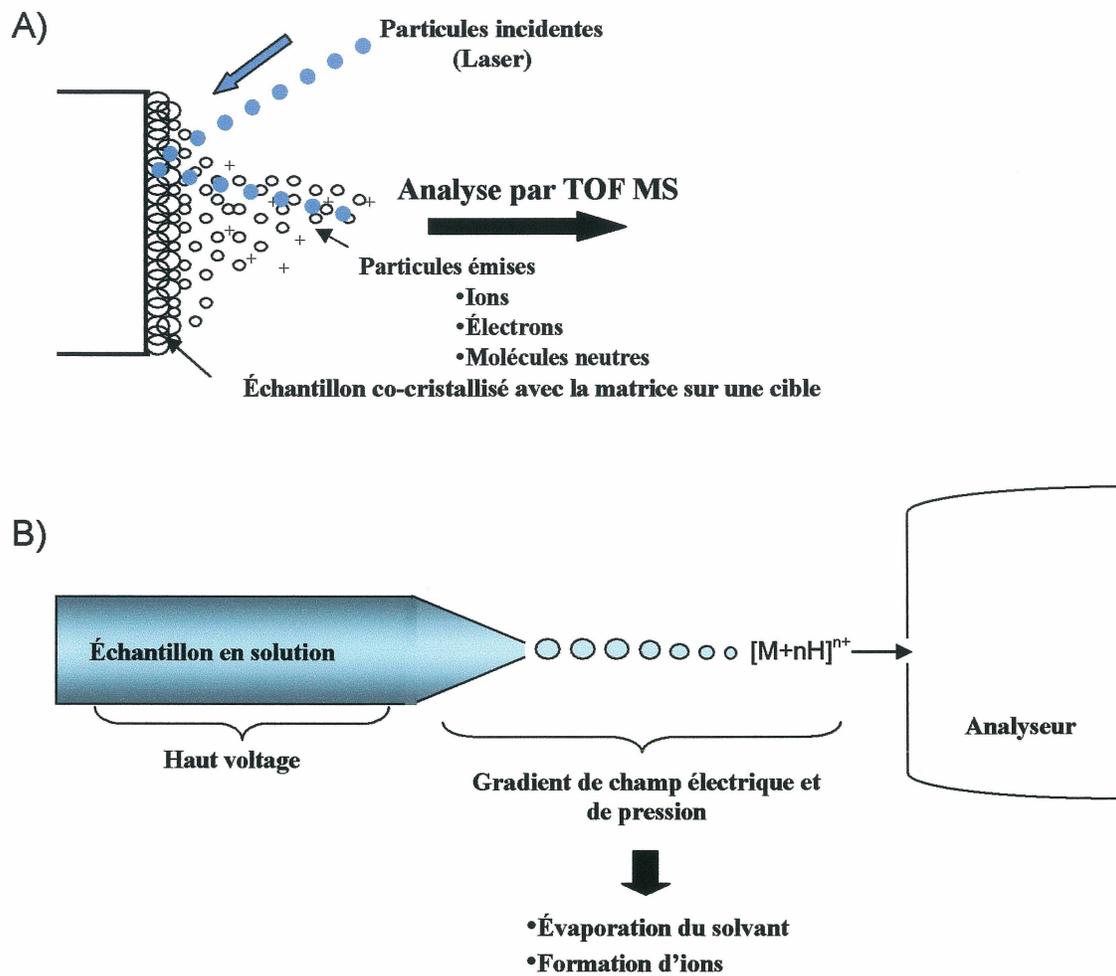


Figure 7 : Principaux types d'ionisation en spectrométrie de masse. (A) MALDI.
(B) Electrospray.

1.2.3 L'analyse des ions

Après l'ionisation, les échantillons vont entrer dans l'analyseur qui séparera les ions formés selon leur ratio masse/charge (m/z). Il existe diverses façons d'analyser ces ions. L'ionisation peut être suivie d'une séparation par un analyseur seul ou encore par deux types d'analyseurs en tandem (MS/MS). Les analyseurs de type temps de vol (TOF), trappe ionique, quadrupole et à résonance ionique cyclotronique à transformée de Fourier (FTICR) sont ceux les plus utilisés présentement dans le domaine de la protéomique (Guerrera et Kleiner, 2005).

L'ionisation de type MALDI est habituellement couplée à un analyseur en temps de vol TOF pour Time-of-Flight (figure 8A). Les ions formés suite à l'ionisation seront dans un premier temps accélérés sur une même distance et par la même force avant d'entrer dans un tube de vol libre de champ, ce qui permettra leur séparation en fonction de leur temps de vol qui dépend de leur vitesse et donc de leur rapport masse/charge (Aebersold et Goodlett, 2001; Graves et al., 2002; Guerrera et Kleiner, 2005). La détection des ions au bout du tube de vol peut se faire selon deux types de méthodes : la méthode linéaire et la méthode réflectron. La méthode linéaire se fait directement selon la vitesse des ions : les ions de rapport m/z les plus petits seront les premiers détectés. La méthode réflectron, qui est la méthode la plus utilisée et la plus efficace pour l'analyse peptidique présentement, permet grâce à un miroir électrostatique

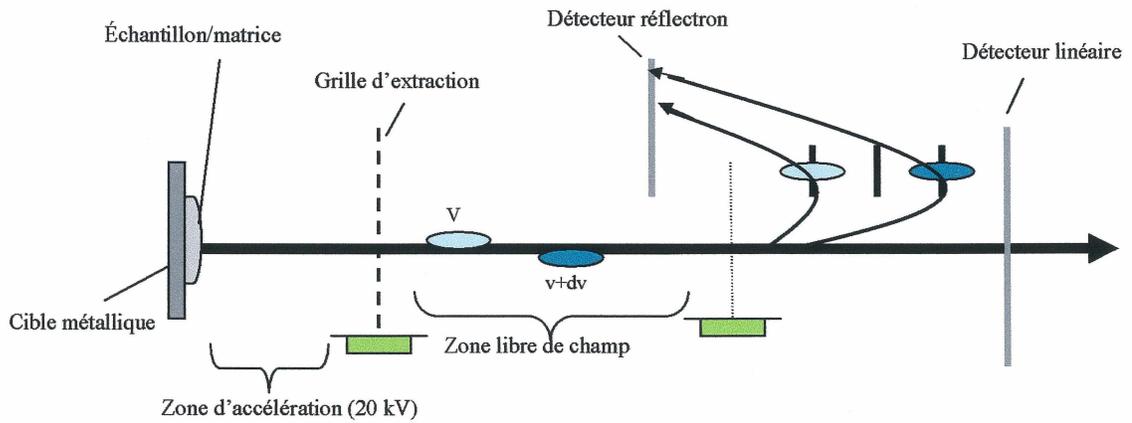
d'imposer un champ électrique s'opposant à la progression des ions et ainsi de focaliser les ions de même rapport m/z sur un même plan augmentant de beaucoup la résolution du spectre de masse obtenue.

La combinaison MALDI-TOF-MS permet entre autres d'identifier une protéine par la masse de ses peptides générés (Yates et al., 1993; Zhang et al., 1994). La protéine, avec une séquence en acides aminés précise, sera clivée par une protéase comme la trypsine, qui coupe en C-terminal d'une lysine (K) ou d'une arginine (R), suite à la digestion dans le gel (figure 8B). Les peptides générés, uniques pour chaque protéine, seront soumis au MALDI-TOF et la masse de ces différents peptides pourra être déterminée (figure 8C). Les masses des peptides obtenues pourront être soumises et comparées à des banques de données, possédant l'ensemble des masses peptidiques obtenues suite à la digestion d'une protéine par divers types de protéases, permettant ainsi l'identification de la protéine. C'est ce que l'on appelle en protéomique le « Peptide Mass Mapping » ou le « Peptide Mass Fingerprinting ».

L'ESI est généralement couplé à un système comprenant deux types d'analyseurs (MS/MS) (Aebersold et Goodlett, 2001). La spectrométrie de masse en tandem permet la fragmentation (en a.a.) d'un peptide ion et l'analyse de chaque fragment généré. Dans la majorité des cas, la fragmentation du peptide est réalisée par un processus de dissociation induite par collisions (CID), par lequel le peptide à analyser est isolé et fragmenté dans une cellule de collision

Figure 8 : Analyse des peptides ions générés par MALDI. (A) Analyse des ions par TOF (Time of flight) et détection de façon linéaire ou réflectron. (B) Séquence primaire en acides aminés de la myoglobine de cheval avec les sites possibles de digestion à la trypsine en gras. (C) Exemple de peptide mass mapping avec quelques masses peptidiques observées suite à la digestion à la trypsine de la protéine et à l'analyse par MALDI-TOF. Adapté d'Aebersold et Goodlett, *Chem. Rev.*, 101, p. 269-295, 2001.

A)



B)

Séquence primaire de la myoglobine de cheval

GLSDGEWQQVLNWWGKVEADIAGHGQEVLR|LFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASEDLKK
 HGTVVLTALGGILKKKGHHEAELKPLAQSHATKHKIPIKYLEFISDAIIHVLHSHKHPGDFGADAQG
 AMTKALELFRNDIAAKYKELGFQG

C)

Exemple de peptide mass mapping

<u>Séquence</u>	<u>Masse monoisotopique</u>
GLSDGEWQQVLNWWGK	1814,895
LFTGHPETLEK	1270,655
ASEDLKK	789,423
ASEDLK	661,328

avant que les fragments soient à leur tour analysés. Dans notre étude, le mode électrospray a été couplé à un analyseur quadripôle (Q) suivi d'un analyseur TOF. Cet assemblage a été utilisé pour la première fois par le groupe de Miller en 1996. Les ions formés suite à l'ESI entrent dans le premier analyseur MS1 (Q) et parmi ces ions, un ion précurseur est sélectionné. Seuls les ions identiques à celui sélectionné seront extraits du MS1. Dans notre cas, MS1 était l'analyseur quadripôle. Cet analyseur est constitué de deux paires de barreaux disposées autour de la trajectoire des ions dans l'analyseur (Miller et al., 1986). Chaque paire de barreaux est portée à un potentiel électrique opposé à l'autre paire de barreaux permettant la filtration des ions selon leur rapport m/z . Les ions sélectionnés (ions précurseurs) se retrouvent à la sortie de MS1 dans une cellule de collision qui est une zone libre de champ contenant des molécules de gaz. Les collisions des ions avec ces molécules de gaz vont augmenter l'énergie des ions et les activer de façon à provoquer leur décomposition en ions fragments. Les rapports m/z de ces ions fragments seront alors analysés dans le second analyseur MS2. Dans notre cas, MS2 était un analyseur TOF comme celui employé pour le MALDI.

Un peptide est composé d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons amides -CO-NH-. Il possède une extrémité N-terminale (groupe NH₂-) et une extrémité C-terminale (-COOH). En spectrométrie de masse tandem, les peptides se fragmentent généralement, dans la cellule de collision, en rompant ces liaisons peptidiques laissant une charge sur l'un ou l'autre des fragments

généérés (Aebersold et Goodlett, 2001). Deux types de fragments sont habituellement générés, soit les fragments N-terminaux et les fragments C-terminaux. Cette nomenclature divise les fragments selon l'acide aminé qui garde la charge suite à la fragmentation (figure 9A) (Roepstorff et Fohlman, 1984). Si la charge demeure sur l'acide aminé en N-terminal de la fragmentation, le fragment est de type N-terminal et sera identifié comme un ion *b* (figure 9B). Si la charge demeure sur l'acide aminé en C-terminal de la fragmentation, le fragment est de type C-terminal et sera identifié comme un ion *y* (figure 9B). Toutefois, il est possible que la rupture se produise à l'intérieur même de l'acide aminé. Dans ces cas, la nomenclature est la même à la différence qu'il y aura identification d'ions de type *a* ou *c* dans des cas de fragments N-terminaux, ou d'ions *x* ou *z* dans des cas de fragments C-terminaux (tout dépendamment de l'endroit de la rupture). Il est à noter que l'indice présent indique le nombre de résidus dans le fragment (à partir du N-terminal pour les types *a*, *b*, *c* et à partir du C-terminal pour les types *x*, *y*, *z*). Le type d'ions observé dépend de plusieurs facteurs incluant la séquence primaire du peptide et la façon dont l'énergie est introduite. Cependant, la fragmentation s'effectue habituellement entre les acides aminés, générant ainsi des ions de type *b* ou *y*. Les peptides obtenus suite à une digestion à la trypsine, comme ceux utilisés dans cette étude, contiennent tous un résidu basique en C-terminal (arginine ou lysine), sauf le dernier peptide de la protéine. Cette charge présente à la partie carboxy-terminale de chaque peptide tend à produire majoritairement des ions de type *y*, soit une fragmentation entre deux acides aminés laissant la charge sur l'acide aminé en C-terminal de la

fragmentation. La masse de chacun de ces fragments est analysée, nous permettant d'identifier la séquence en acides aminés de ce peptide (les différences de masse obtenues correspondent à la masse d'un acide aminé). C'est grâce à ce type de séquençage que l'identification de protéines peut être faite, soit en soumettant les séquences des peptides obtenues à des banques de données. Cette technique peut également nous permettre d'observer une modification post-traductionnelle sur notre protéine et de cibler sur quel acide aminé se produit cette modification.

1.3 But de l'étude

Tel que mentionné précédemment, les mécanismes d'activation et de modulation des TRPCs sont encore très peu connus. Certains partenaires d'interaction ont été identifiés, nous permettant d'émettre certaines hypothèses, mais le processus réel est encore à identifier. Le but de l'étude présentée ici était d'identifier d'autres protéines impliquées dans la modulation de la signalisation calcique intracellulaire grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse. Plus précisément, le but était d'identifier des partenaires d'interaction de certains TRPCs, soit TRPC3 et TRPC6, pouvant moduler leurs activités, soit au niveau de leur activation, de leur assemblage, de leur transport, etc. Par la suite, l'importance de ces interactions sur la signalisation calcique devait être démontrée par différentes techniques de surexpression.

Matériel et méthodes

2.1 Matériel

Le DMEM, le sérum bovin foetal, l'Hepes, la trypsine, l'Opti-MEM I, la LipofectAMINE 2000 et la trousse de clonage TA TOPO Cloning proviennent de Invitrogen (Burlington, ON). Le carbachol (CCh) et le fura-2/AM sont achetés de Calbiochem (San Diego, CA). Les anticorps polyclonaux de lapins et monoclonaux de souris anti-hémagglutinine (HA-spécifiques) proviennent de MediCorp (Mississauga, ON). Les anticorps monoclonaux de souris anti-actine proviennent de chez Millipore (Billerica, MA). Les anticorps monoclonaux de souris anti-IP₃R3 proviennent de BD Bioscience (Oakville, On). Les anticorps polyclonaux de lapins anti-TRPC6 sont obtenus de Chemicon (Temecula, CA). Les anti-IgG de lapins couplés à la peroxydase, les anti-IgG de souris conjugués à la peroxydase, les billes de protéine A-Sépharose CL-4B et les billes glutathione sépharose 4B proviennent de General electric (Baie d'Urfé, QC). Les oligonucléotides proviennent d'Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). La [³⁵S]-méthionine/cystéine (Protein Labelling Mix Easy Tag EXPRESS), le [³⁵S] dATP α S, la membrane de nitrocellulose et le réactif de détection Chemiluminescent Western Lightning sont achetés de Perkin Elmer (Boston, MA). La Taq Polymérase et les trousse de midipreps et de maxipreps sont fournies par QIAGEN (Mississauga, ON). La EZ-link Sulfo-NHS-SS-Biotin ainsi que les billes streptavidine-agarose proviennent de Pierce (Rockford, IL). La trypsine

porcine de qualité Sequencing Grade Modified Trypsin, l'isopropyl-D-thiogalactoside (IPTG) et le kit TNT T7 Reticulocyte Lysate System proviennent de chez Proméga (Madison, WI). Toutes les enzymes de digestion, la T4 ADN Ligase et les anticorps monoclonaux de souris proviennent de Cell Signaling (Danvers, MA). La trousse de séquençage d'ADN provient de USB (Cleveland, OH). La colonne phase inverse C18 a été achetée chez Varian (Mississauga, ON). Tous les autres produits et réactifs sont obtenus de Sigma Aldrich (Oakville, ON), de Fisher (Nepean, ON) ou de Laboratoire MAT (Beauport, QC). Les plasmides pcDNA3,1(-)-WT-NSF et pcDNA3,1(-)-E329Q-NSF ont été donnés par le Dr Marc Coppelino de l'Université de Guelph (ON).

2.2 Méthodes

2.2.1 Amplification du C-terminal de TRPC6

L'amplification du C-terminal de TRPC6 (CT6) a été faite par PCR. La partie à amplifier comprend les acides aminés M⁷²⁵ à R⁹³¹ de la protéine murine. Deux sites de restriction ont été ajoutés à la séquence soit NcoI au début et EcoRI à la fin. L'oligonucléotide sens utilisé pour effectuer l'amplification comprend le site NcoI : 5'-ATT GCC ATG GTC AAT AGT TCA-3' et l'oligonucléotide anti-sens comprend le site EcoRI : 5'-GAA TTC CTA TCT GCG GCT TTC CTC CAG-3'. La séquence d'ADN comprise entre les deux amorces,

correspondant au C-terminal de la protéine, a été amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction) et comprend les deux sites de restriction désirés.

Chaque tube réactionnel de PCR comprend 100 ng d'ADNc codant pour TRPC6, 500 μ M de dNTPs, le tampon Taq Polymérase à une concentration finale de 1X, 0,5mM de $MgCl_2$ et 5 unités de Taq Polymérase. Les tubes contiennent également 1 μ M d'oligonucléotides sens possédant le site NcoI et 1 μ M d'oligonucléotides anti-sens possédant le site EcoRI. Les tubes subissent un premier cycle, dénaturation durant 5 minutes à 95 °C, puis 40 cycles de trois étapes : dénaturation pendant 45 secondes à 95 °C, liaison de l'oligonucléotide durant 40 secondes à 40 °C et élongation par la Taq Polymérase pendant 2 minutes à 72 °C. Les 40 cycles sont suivis d'un cycle d'élongation final de 10 minutes à 72 °C. Tous les PCRs sont terminés par l'incubation des échantillons à 4 °C.

Tous les produits de PCR sont analysés sur gel d'agarose (0,8 à 1 %). Les produits de PCR sont isolés du gel d'agarose et purifiés sur mini-colonnes de fibres de polyester. Les produits finaux de PCR sont clonés dans le plasmide pCR2.1-TOPO. L'amplification du plasmide s'est faite à la suite d'une transformation des bactéries compétentes One Shot de la trousse TA TOPO Cloning selon les recommandations du fabricant. Des minipréparations d'ADN sont effectuées à partir des clones obtenus (Extraction de l'ADN plasmidique, section 2.2.4).

2.2.2 Séquençage

Pour le séquençage, 15 µl d'ADN du C-terminal de TRPC6 contenu dans pCR2.1 est dénaturé 10 minutes à la température ambiante par 0,2 N de NaOH et précipité au minimum 30 minutes à -20 °C en présence de 59 mM NH₄Ac pH 4,3 et d'éthanol 100 %. L'ADN ainsi précipité est récupéré par centrifugation (20 minutes, 4 °C, 13 000 RPM), lavé à l'éthanol 70 %, séché et resuspendu dans 11 µl de tampon sequenase 1X du kit de séquençage USB contenant 15 ng d'oligonucléotides (M13 forward : 5'-CTG GCC GTC GTT TTA C-3' et M13 reverse : 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'). Les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à 37 °C pour ainsi permettre la liaison des oligonucléotides à l'ADN. 5 µl du mélange d'enzymes est additionné à chaque tube (1 µl DTT, 0,8 µl Labelling Mix du kit USB (7,5 µM dGTP, 7,5 µM dCTP, 7,5 µM dTTP), 0,5 µl [³⁵S]dATP, 0,25 µl Sequenase (13 U/µl), 0,13 µl Pyrophosphatase (4 U/µl), 2 µl Tris-HCl pH 8,0 (10 mM), 0,5 µl H₂O) et après une incubation de 5 minutes à température ambiante, 3,35 µl est prélevé de chaque échantillon et transféré dans 2,5 µl de chacun des ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) permettant de différencier l'insertion de chacune des quatre bases. Les échantillons sont ensuite incubés à 37 °C durant 5 minutes permettant la réaction de polymérase. L'ajout de 4 µl de la solution STOP du kit USB permet d'arrêter la réaction. L'ADN des échantillons est ensuite chauffé à 95 °C pendant 5 minutes pour permettre sa dénaturation puis analysé par migration sur gel Acrylamide/Urée pour séquençage (1X TBE, 6,7 % acrylamide 29:1 bis-

acrylamide, 8 M urée). La présence du fragment et des sites de restriction est révélée par autoradiographie. Le produit PCR cloné dans pCR2.1 subit également un séquençage automatique sur les deux brins afin de vérifier l'absence d'erreur pouvant être incorporée par la polymérase (oligo sens M13 Reverse Primer, 5'-CAGGAAA-CAGCTATGAC-3'; anti-sens T7 Promotor, 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

2.2.3 Sous-clonage du C-terminal dans pGEX-4T-1N

Le C-terminal de TRPC6 contenu dans pCR2.1 est excisé par digestion à l'aide des enzymes NcoI et EcoRI selon les recommandations du fabricant. Le plasmide pGEX-4T-1N, qui est un plasmide codant pour la protéine glutathione S-transférase (GST), sera également ouvert au niveau de son site de restriction multiple suite à sa digestion par NcoI et EcoRI. L'insert et le vecteur générés sont isolés sur gel d'agarose 1 %, purifiés sur mini-colonnes de polyester et quantifiés sur gel d'agarose 1 %. La quantification de l'ADN est estimée par la présence du marqueur quantitatif de poids moléculaires, Precision Molecular Mass Standard (Bio-Rad, Mississauga, ON). Les deux fragments sont ligués suite à une incubation de 16 heures à 16 °C avec la T4 ADN Ligase et son tampon, contenant 10 mM d'ATP, selon les recommandations du fabricant. Le produit de ligation (5 µl) est ensuite combiné à 50 µl de bactéries compétentes DH5α et incubé pendant 45 minutes sur glace. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique de 45 secondes à 42 °C puis sont incubées 2

minutes sur glace. Du milieu LB (1 % bacto tryptone, 0,5 % extrait de levure, 1 % NaCl) est additionné dans les tubes et les bactéries transformées sont étalées sur une plaque LB (milieu LB + 1,5 % bacto agar) contenant 75 µg/ml d'ampicilline. Les plaques sont incubées à 37 °C pour une période de 16 heures permettant la croissance des bactéries. Les clones de CT6 dans pGEX-4T-1N ont ensuite été amplifiés par minipreps, midipreps et maxipreps.

2.2.4 Extraction de l'ADN plasmidique

Pour les minipréparations d'ADN, un clone de bactéries transformées est inoculé dans 5 ml de milieu LB (1 % bacto tryptone, 0,5 % extrait de levure, 1 % NaCl) et incubé à 37 °C durant 16 heures. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 3 000 RPM durant 15 minutes, le culot est resuspendu dans 200 µl de solution A (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA) et transféré dans un eppendorf de 1,5 ml. 400 µl de solution B est ajouté (0,2mM NaOH, 1 % SDS), permettant la lyse des bactéries et le mélange est incubé pendant 5 minutes à température ambiante avant l'ajout de 300 µl de la solution C (3 M KAc, 11,5 % acide acétique glaciale), permettant de précipiter l'ADN chromosomique bactérien. Les échantillons sont ensuite incubés 10 minutes sur glace puis centrifugés pendant 10 minutes à 13 000 RPM à 4 °C. Le surnageant est récolté et l'ADN plasmidique présent est précipité pendant 15 minutes suite à l'ajout de 550 µl d'isopropanol. L'ADN est ensuite récupéré par centrifugation (10

minutes, 4 °C, 13 000 RPM), lavé à l'éthanol 70 %, séché et resuspendu dans l'eau + RNase.

Les midipréparations et les maxipréparations d'ADN sont effectuées avec le kit de midipreps et de maxipreps de QIAGEN (Mississauga, ON) selon les recommandations du fabricant.

2.2.5 Amplification de GST et de GST-CT6

Le clone de CT6 dans pGEX-4T-1N ainsi que les clones de CT3a (a.a. E⁶⁷⁶ à K⁷⁹⁵ de TRPC3) et CT3b (a.a. G⁷⁴² à E⁸⁴⁸ de TRPC3) dans pGEX-4T-1N sont transformés dans des bactéries compétentes *Escherichia Coli* BL21 comme mentionné précédemment pour les DH5 α . Les bactéries transformées sont étalées sur une plaque LB contenant 75 μ g/ml d'ampicilline et les plaques sont incubées à 37 °C pour une période de 16 heures. Un clone de bactéries transformées est inoculé dans 100 ml de milieu LB et incubé à 37 °C durant 16 heures. Le 100 ml de culture est ensuite transféré dans un 250 ml de milieu LB frais contenant 75 μ g/ml d'ampicilline et est laissé à 37 °C jusqu'à l'obtention de la phase exponentielle de croissance des bactéries, soit jusqu'à ce que l'on obtienne une densité optique de 1,0 à 595 nm. La synthèse protéique est ensuite induite pendant 2 heures à 30 °C suite à l'ajout de 0,2 mM d'IPTG dans le milieu. Les bactéries sont recueillies par centrifugation (3 000 RPM, 4 °C, 10 minutes) et le culot est resuspendu dans 20 ml de solution de GST (1 % Triton X-100, 5 mM

EDTA, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 µg/ml Soybean Trypsin Inhibitor, 0,1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride) contenant 1 mM de dithiothreitol (DTT). Les bactéries sont ensuite lysées par sonication sur glace (3 X 60 secondes) et centrifugées (3 000 RPM, 4 °C 20 minutes). Les protéines présentes dans le surnageant sont ensuite incubées pendant 1 heure à température pièce avec 200 µl de billes glutathione sépharose 50 % billes/volume, préalablement lavées avec de la solution de GST, la glutathione étant le substrat de la GST. Suite à l'incubation, les billes sont lavées 5X avec de la solution de GST et analysées par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis). La même méthode est employée pour obtenir des billes couplées à la glutathione seule à partir du plasmide pGEX-4T-1N non modifié.

2.2.6 Préparation de protéines cytosoliques et membranaires de tissus de souris

Trois différents tissus ont été prélevés chez des souris mâles et femelles âgées de 6 à 10 semaines, euthanasiées au CO₂: le cerveau, les reins et le système coeur/poumons. Tel qu'approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke, le prélèvement des différents tissus a été effectué à partir d'animaux préalablement euthanasiés pour une autre utilisation. Les tissus sont dans un premier temps coupés en petits morceaux et rincés au PBS sans Ca²⁺/Mg²⁺ froid (37 mM NaCl, 3,5 mM KCl, et 10 mM sodium phosphate buffer pH 7,4). Ils sont ensuite rincés

avec de la solution de GST sans triton. Un volume équivalent à 1 ml de solution de GST par organe est ajouté et les tissus sont ensuite homogénéisés sur glace par un polytron. L'homogénat résultant est centrifugé à 3 000 RPM à 4 °C pendant 10 minutes. Le surnageant est recueilli et centrifugé à 100 000 x g pendant 45 minutes à 4 °C. Au surnageant obtenu, on ajoute le même volume de solution de GST contenant 2 % de triton (protéines cytosoliques). Le culot est resuspendu dans le même volume de solution de GST sans triton que le volume de surnageant prélevé (protéines membranaires). Puis le même volume de solution de GST contenant 2 % de triton est ajouté. Les homogénats ont été aliquotés en 500 µl et gardés à -80 °C jusqu'à utilisation. Une quantité d'homogénat cytosoliques et membranaires est gardée avant l'ajout de la solution GST contenant 2 % de triton permettant ainsi un dosage protéique grâce au BioRad Protein Assays selon les recommandations du fabricant (BioRad, Mississauga, ON).

2.2.7 Essais de liaison à la GST

Une quantité équivalente de billes de glutathione sépharose couplées à la GST seule, à GST-CT3a ou à GST-CT6 est incubée avec un aliquot de protéines cytosoliques ou membranaires isolées des différents tissus de souris pendant 1 heure à la température ambiante. Les billes sont ensuite lavées 5 fois avec 500 µl de solution de GST et resuspendues dans du tampon laemmli 2X contenant 10 % β-mercaptoéthanol. Les protéines retenues sur les billes sont ensuite

séparées par SDS-PAGE (gel séparateur : 10 % acrylamide 38 :1 bis-acrylamide, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % persulfate d'ammonium et 0,08 % TEMED; gel concentrateur : 5 % acrylamide 38 :1 bis-acrylamide, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % persulfate d'ammonium et 0,1 % TEMED) dans du tampon de migration 1X (25 mM Tris-Base, 0,2 M glycine et 3,5 mM SDS). Le gel est coloré au Brilliant Blue G-Colloïdal pendant 16 heures à la température ambiante et décoloré dans du 25 % méthanol pendant 2 heures.

Pour ce qui est du GST pull down, des quantités équivalentes de billes glutathione sépharose couplées à la GST seule, à GST-CT3a et b ou GST-CT6 sont incubées pendant une heure à la température ambiante avec 40 µl de protéines NSF ou de NSF-E329Q (NSF-DN) traduites de façon in vitro avec le kit TNT T7 Reticulocyte Lysate System selon les recommandations du fabricant et marquées au [³⁵S]-méthionine. Les billes sont ensuite lavées 5X avec 500 µl de solution de GST et resuspendues dans du tampon laemmli 2X. Les protéines retenues sur les billes sont ensuite séparées par SDS-PAGE et révélées par autoradiographie.

2.2.8 Digestion dans le gel

Les protéines d'intérêt sont excisées du gel et placées dans des eppendorfs de 0,5 ml. Les morceaux de gel sont lavés dans un premier temps avec 400 µl de 100 mM NH₄HCO₃ pendant 15 minutes à la température

ambiante. La solution est remplacée par 400 μ l d'acétonitrile (ACN) 100 % pendant 15 minutes à la température ambiante. Les protéines dans le gel subissent ensuite une réduction à 37 °C pendant 45 minutes dans 50 μ l de 200 mM NH_4HCO_3 contenant 5 mg/ml de DTT. Les protéines sont soumises à une alkylation en remplaçant la solution précédente par 70 μ l de 200 mM NH_4HCO_3 contenant 25 mg/ml d'iodoacétamide suivie d'une incubation de 30 minutes à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Les morceaux de gel sont rincés pendant 30 minutes à la température ambiante sur un vortex dans 400 μ l d'une solution de 100 mM NH_4HCO_3 contenant 50 % d'ACN. La solution est enlevée et les échantillons sont séchés pendant quelques minutes. Le gel est ensuite réhydraté dans 25 μ l de 100mM NH_4HCO_3 contenant 40 % diméthylformamide et 100 ng/ μ l de trypsine porcine de qualité Sequencing Grade Modified Trypsin pendant 15 minutes à température pièce. La solution est enlevée et remplacée par 50 μ l de 50 mM NH_4HCO_3 et les échantillons sont laissés à 37 °C pour 16 heures. Après l'addition de 1 μ l de 5 M urée, les tubes sont centrifugés quelques secondes et placés par la suite dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes. 10 μ l d'une solution de HCOOH 10 % est ajouté et les échantillons sont soumis à nouveau à des ultrasons pendant 15 minutes. Le surnageant est ensuite transféré dans des tubes à spectrométrie de masse et lyophilisé pendant environ 90 minutes à la température ambiante.

2.2.9 Analyse par spectrométrie de masse

Les spectres LC-MS/MS ont été obtenus à partir d'un spectromètre de masse Q-TOF 2 (Waters, Micromass, UK) couplé à un HPLC utilisant une colonne phase inverse C18. Les masses des peptides obtenues suite à l'analyse ont été utilisées pour faire une recherche sur le logiciel Mascot (<http://www.matrixscience.com>) (Boston, Ma) en utilisant les banques de données Swiss-Prot et NCBI. Les listes de masses obtenues suite au MS/MS ont été générées par le logiciel Masslynx 3,5.

2.2.10 Culture cellulaire et transfections

Les cellules HEK 293T sont maintenues à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplémenté avec 10 % de sérum bovin foetal, 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine. Les cellules T6.11, qui sont des cellules transfectées de façon stable avec TRPC6, contiennent également dans leur milieu 0,4 mg/ml de G418. Les transfections transitoires utilisant les HEK 293T sont effectuées en employant le réactif pour transfection LipofectAMINE 2000. Les plaques 6 puits employées pour les transfections sont préalablement traitées avec 0,1 mg/ml de poly-L-lysine, incubées durant 30 minutes, rincées au PBS 1X sans Ca²⁺/Mg²⁺ (137 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10 mM Sodium Phosphate Buffer pH 7,4) et séchées en conditions stériles. Les différents plasmides (1 µg total)

prédilués dans 250 µl d'Opti-MEM I sont additionnés à chacun des puits avant d'incorporer 2,5 µl de LipofectAMINE 2000 dilué dans 250 µl d'Opti-MEM I. Le mélange ADN-LipofectAMINE 2000 est incubé pendant 20 minutes à température de la pièce. Les cellules HEK 293T sont diluées pour avoir 750 000 cellules dans 1,5 ml de DMEM sans antibiotique par puits. Les cellules sont ensuite incubées à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ pendant 24 heures. Après cette période, le milieu de culture est remplacé par du DMEM 10 % FBS avec antibiotique. Pour les mesures de la [Ca²⁺]_i, chacun des puits de cellules transfectées est trypsinisé et le contenu de chaque puits est distribué sur trois lamelles de verre prétraitées avec 0,1 mg/ml de poly-L-lysine. Les cellules T6.11 sont également distribuées sur des lamelles prétraitées à la poly-L-lysine et utilisées à 80 % de confluence. Pour les immunoprécipitations, le contenu d'un puits de cellules transfectées est trypsinisé et redistribué dans un pétri de 60 mm. Dans tous les cas, les cellules sont incubées pour 24 heures supplémentaires à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

2.2.11 Mesure de la [Ca²⁺]_i

La méthode de Zhu et al. (1996) est employée pour les mesures de [Ca²⁺]_i. Brièvement, les cellules adhérentes aux lamelles de verre sont lavées deux fois avec une solution de HBSS (120 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄, 10 mM glucose, 20 mM hepes pH 7,4 et 1,8 mM CaCl₂) et chargées en fura-2/AM durant 20 minutes, à la température ambiante et dans la noirceur. Le chargement

des cellules en fura-2/AM est suivi d'une étape de dé-estérification (incubation pour une période de 30 minutes, à la température ambiante, dans le noir avec du HBSS frais). Les lamelles de verre sont ensuite placées dans une chambre circulaire dont le fond est ouvert et installées sur le plateau d'un microscope Zeiss Axiovert couplé à un système de photométrie et d'imagerie digitale Attofluor (Attofluor Inc., Rockville, MD).

Les cellules isolées sont sélectionnées et la $[Ca^{2+}]_i$ est mesurée par vidéomicroscopie à fluorescence, à la température de la pièce. Des longueurs d'onde de 334 nm et 380 nm sont employées en alternance pour l'excitation et l'émission de fluorescence est mesurée à 510 nm. La $[Ca^{2+}]_i$ libre dans le cytoplasme est calculée à partir du ratio de fluorescence 334:380 selon la méthode de Grynkiewicz et al. (1985). Tous les réactifs sont dilués à leur concentration finale d'utilisation dans du HBSS et sont appliqués à la surface de la cellule par perfusion. Au temps 0, les cellules sont mises en présence de HBSS et à 30 secondes après le début des mesures, le calcium est retiré du milieu en ajoutant par perfusion une solution de HBSS sans calcium contenant 0,5 mM d'EGTA. Après une période de 30 secondes en absence de Ca^{2+} extracellulaire, les cellules sont stimulées par 50 μ M de carbachol, toujours en absence de Ca^{2+} extracellulaire. Lorsque la $[Ca^{2+}]_i$ revient au niveau basal, l'entrée de calcium est mesurée par l'ajout de HBSS contenant 1,8 mM de $CaCl_2$ et 50 μ M de carbachol. Seules les cellules ayant démontré une relâche induite par le carbachol sont considérées comme transfectées et sont utilisées dans

l'analyse statistique. Les résultats sont représentés comme une moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (S.E.M) obtenue de 8 à 10 lamelles pour chaque condition, chacune des lamelles contenant de 20 à 30 cellules transfectées. Au besoin, nous avons confirmé par le test t de Student que les différences entre les moyennes obtenues à partir de données paires étaient significatives avec un niveau de confiance à 95 % ($p < 0,05$).

2.2.12 Séparation protéique au carbonate de sodium

Les cellules surexprimant TRPC6-GFP ou GFP seules sont lavées trois fois au PBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ puis une quatrième fois avec 100 mM de NaCl. Elles sont ensuite incubées 30 minutes à 4 °C avec 1 ml de carbonate de sodium 100 mM pH 11,5. Les cellules sont ensuite lysées par 5 passages dans un homogénéisateur et centrifugées pendant 60 minutes à 150 000g à 4 °C de façon à séparer les protéines membranaires et les protéines cytosoliques. Le surnageant (protéines cytosoliques) est transféré dans un autre tube et le culot (protéines membranaires) est resuspendu dans 1 ml de carbonate de sodium 100 mM pH 11,5. Les protéines peuvent ensuite être dosées avec le BioRad Protein Assays selon les recommandations du fabricant (BioRad, Mississauga, ON).

2.2.13 Immunoprécipitations

Pour les essais d'immunoprécipitation, les cellules HEK 293T, transfectées avec l'ADNc codant pour les protéines d'intérêt, sont lavées deux fois au PBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ et incubées durant 30 minutes à 4 °C avec 800 µl de tampon de lyse RIPA (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % NP40, 0,5 % acide deoxycholique, 0,1 % SDS, 0,1 mM Phénylméthylsulfonyl Fluoride, 0,5 µM Leupeptin et 1 µg/ml Soybean Trypsin Inhibitor). Les lysats de cellules sont homogénéisés par 20 passages à l'intérieur d'une aiguille 20-gauge et 15 passages à l'intérieur d'une aiguille 25-gauge. Les débris cellulaires ainsi générés sont éliminés par centrifugation durant 15 minutes à 13 000 rpm à 4 °C. 75 µl de billes protéine A-sépharose CL-4B, 5-7 µg d'anticorps de souris anti-HA sont ajoutés au surnageant et le mélange est incubé pour une période de 16 heures à 4 °C. Les billes sont lavées 5X avec 500 µl de tampon de lyse et resuspendues dans du tampon laemmli 2X contenant 10 % β-mercaptoéthanol. Les échantillons sont chauffés pendant 30 minutes à 60 °C et les protéines immunoprécipitées sont subséquentement analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage.

2.2.14 Immunobuvardages

Pour les immunobuvardages, les lysats cellulaires et les protéines immunoprécipitées sont séparés sur gel SDS-PAGE 7 % et transférées sur une

membrane de nitrocellulose 0,2 μm (350 mA, 3 heures, 4 °C) dans du tampon de transfert (150 mM glycine, 20 mM Tris-Base et 20 % méthanol). Après le transfert, la membrane est colorée au Ponceau S pour visualiser le marqueur de poids moléculaire. Elle est ensuite décolorée dans du TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 137 mM NaCl, 0,3 % Tween 20) avant d'être bloquée pour 2 heures à la température ambiante dans du TBST supplémenté avec 7 % de lait en poudre non gras. Les membranes bloquées sont ensuite incubées durant 3 heures à la température ambiante ou toute la nuit à 4 °C en présence d'anticorps de lapin anti-HA (1:1 000), d'anticorps de souris anti-Myc (1:1 500), d'anticorps de souris anti-actine (1:10 000), d'anticorps de souris anti-IP3R (1 :2 500) ou d'anticorps de lapin anti-TRPC6 (1:300) dilués dans du TBST. Les membranes sont lavées trois fois avec du TBST avant d'être incubées 2 heures à la température ambiante avec un anticorps d'âne anti-IgG de lapins couplé à la peroxydase (1:40 000) ou avec un anticorps de mouton anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase (1:20 000) dilués dans du TBST. Après cette période, les membranes sont lavées trois fois au TBST et les complexes immuns sont révélés avec le système de détection Chemiluminescent Western Lightning (Perkin Elmer, Boston, MA) selon les recommandations du fabricant.

2.2.15 Marquage métabolique

Les pétris 10 cm de cellules HEK 293T exprimant de façon stable TRPC6-GFP ou GFP seul sont lavés au PBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ et incubés dans du DMEM

2 % FBS sans méthionine et sans cystéine durant 30 minutes à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ (voir section 2.2.10 : Culture cellulaire et transfections). Le milieu est ensuite remplacé par du DMEM 2 % FBS contenant 20 µCi/ml de [³⁵S]-méthionine et [³⁵S]-cystéine et les cellules sont réincubées pendant 2 heures à 37 °C dans un milieu adéquat. Les pétris sont lavés trois fois avec du PBS sans Ca²⁺/Mg²⁺ et les cellules sont lysées par l'ajout de 1 ml de RIPA pendant 30 minutes, à 4 °C avec agitation. Le lysat cellulaire est passé 20 fois à travers une aiguille 20-gauge et 15 fois à travers une aiguille 25-gauge. Les extraits sont centrifugés pendant 15 minutes à 13 000 rpm à 4 °C pour éliminer les débris cellulaires. Les lysats obtenus ont ensuite été utilisés pour des immunoprécipitations (voir section 2.2.13 : Immunoprécipitations) ou ont été analysés directement par électrophorèse de type SDS-PAGE.

2.2.16 Biotinylation des protéines de surface

Les pétris de cellules HEK 293T transfectées avec les plasmides exprimant les protéines d'intérêt sont placés sur glace, lavés deux fois avec une solution de PBS avec Ca²⁺/Mg²⁺ froid et incubés durant 1 heure à 4 °C en présence de 2 mg/ml de Sulfo-NHS-SS-Biotine avec agitation. La réaction de biotinylation est arrêtée en lavant trois fois les cellules au PBS froid contenant 10 mM de glycine. Les cellules sont ensuite lysées durant 30 minutes à 4 °C avec 300 µl de tampon de lyse RIPA. Les lysats cellulaires sont passés 20 fois à travers une aiguille 20-gauge et 15 fois à travers une aiguille 25-gauge. Les

extraits sont centrifugés durant 20 minutes à 13 000 rpm à 4 °C pour éliminer les débris cellulaires et 50 µl de billes streptavidine-agarose (50 % slurry, pré-équilibrés avec du RIPA) sont ajoutées. Les échantillons sont incubés avec les billes pour une période de 16 heures à 4 °C. Les complexes biotine-streptavidine sont précipités par centrifugation des billes d'agarose à 2 000 rpm à 4°C pendant 2 minutes et les billes sont ensuite lavées 6 fois au RIPA. 50 µl de Laemmli 2X contenant 10 % de β-mercaptoéthanol est utilisé pour resuspendre les billes puis les échantillons sont incubés durant 30 minutes à 60 °C avant d'être analysés par SDS-PAGE et immunobuvardage.

2.2.17 Électrophorèse bidimensionnelle

L'échantillon à analyser est mélangé avec du tampon de réhydratation (50 mM DTT, 2 % CHAPS, 8 M Urée, 0,2 % bio-ampholytes 3-10, trace de bleu de bromophénol) dans un rapport 1/1. Le mélange est ensuite appliqué à une bande de gel avec des pH immobilisés (3-10) d'une longueur de 7, 11 ou 18 cm dépendamment de la concentration protéique de l'échantillon. La bande est recouverte d'huile minérale et réhydratée de façon passive à 20 °C de 12 à 16 heures. La bande est ensuite transférée sur l'appareil à focalisation isoélectrique (IEF) et les protéines contenues dans la bande sont soumises à une migration selon leur point isoélectrique en suivant un protocole en trois étapes qui diffèrent selon la longueur de la bande. La première étape consiste en une augmentation de voltage de 0 à 250 V pendant 20 minutes de façon linéaire identique pour

chaque bande. La deuxième est une augmentation linéaire du voltage jusqu'à 4 000 V (7 cm), 8 000 V (11 cm) ou 10 000 V (18 cm) pendant 2 (7 cm) ou 2,5 heures (11 cm, 18 cm). La dernière étape est une augmentation rapide de la vitesse de migration soit jusqu'à 10 000 V/h (7 cm), 20 000 V/h (11 cm) et 40 000 V/h (17 cm) à des maximums de 4 000 V (7 cm), 8 000 V (11 cm) et 10 000 V (18 cm). Une fois la migration isoélectrique faite, la bande est équilibrée avec le tampon d'équilibration (6 M Urée, 0,375 M Tris pH 8,8, 20 % glycérol et 2 % SDS) contenant 2 mg/ml de DTT pendant 10 minutes avec agitation et ensuite un autre 10 minutes à la noirceur avec le même tampon, mais contenant 25 mg/ml d'iodoacétamide en remplacement du DTT. La bande peut ensuite être lavée dans du tampon d'électrophorèse et appliquée sur un gel SDS-PAGE 10 % (sans concentrateur) pour la deuxième migration.

Résultats

3. Stratégies d'identification employées

L'avènement de la protéomique il y a une vingtaine d'années a permis de développer différentes méthodes mises en place dans le but premier d'identifier toutes les protéines présentes dans une lignée cellulaire, dans un tissu ou dans un organe et de les placer dans différents contextes cellulaires; en d'autres mots de déterminer leurs localisations, leurs interactions, leurs fonctions, etc. Nous avons donc différents choix pour tenter de déterminer des partenaires d'interaction pour les TRPCs. Trois techniques différentes ont été testées.

3.1 Comparaison de l'expression des protéines

Il avait été démontré que l'expression des différents types de récepteurs à l'IP₃ augmentait chez les cellules surexprimant TRPC3 (Kiselyov et al., 1998). Ce phénomène fut aussi observé pour les cellules surexprimant TRPC6 couplé à la protéine fluorescente verte (GFP). Comme on peut le voir à la figure 10, il y a une augmentation de l'expression du récepteur à l'IP₃ de type 3 chez la plupart des clones cellulaires surexprimant TRPC6-GFP versus les cellules surexprimant GFP seul. Cette augmentation est observable surtout chez les clones 5-6, 5-8 et 5-9. Suite à ce résultat, nous avons présumé qu'il était possible que l'expression

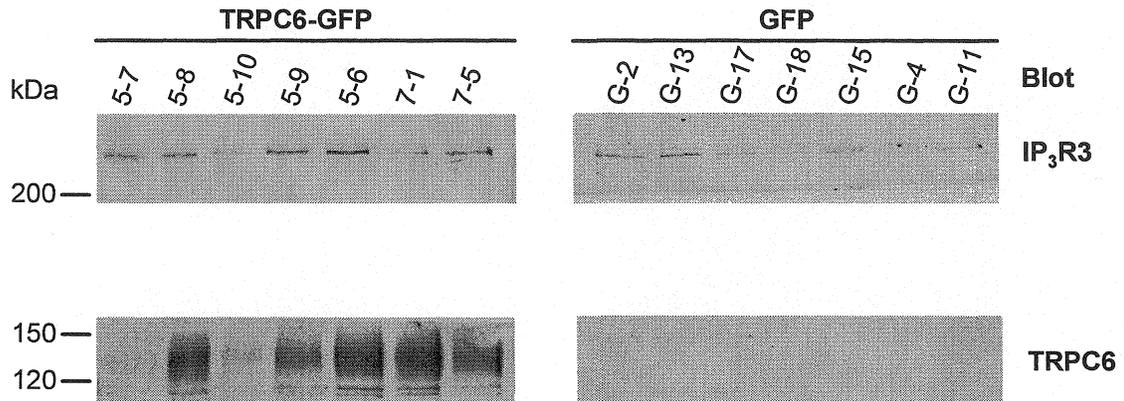


Figure 10 : Augmentation de l'expression de l'IP₃R3 chez les cellules surexprimant TRPC6-GFP. 22 μ g de protéines de lysats de cellules surexprimant TRPC6-GFP (5-7, 5-8, 5-10, 5-9, 5-6, 7-1, 7-5) ou de cellules surexprimant GFP seul (G-2, G-13, G-17, G-18, G-15, G-4, G-11) ont été séparées par SDS-PAGE et les niveaux de TRPC6-GFP et d'IP₃R3 ont été détectés par immunobuvardage.

d'autres protéines pourrait être augmentée lorsque nous surexprimons TRPC6. Nous avons donc comparé les lysats cellulaires des cellules HEK 293T QBI surexprimant de façon stable TRPC6 couplé à GFP (5-8 et 5-9) avec les lysats de cellules surexprimant GFP seul (G-15 et G-17). Les lysats cellulaires ont été divisés en deux parties, la partie cytosolique et la partie membranaire, grâce à une séparation protéique au carbonate de sodium. Ainsi, suite à une analyse de type SDS-PAGE et à une coloration des protéines au bleu colloïdal, les différences dans l'expression d'une protéine dans un type cellulaire versus l'autre type pouvaient être observées. L'analyse a d'abord été faite par électrophorèse 1D et par la suite, vu la complexité du résultat obtenu, par électrophorèse 2D. L'analyse 2D a été effectuée avec différentes concentrations protéiques et donc avec différents systèmes (7, 11 et 18 cm). Toutefois aucune identification n'a pu être faite avec cette méthode vue le nombre élevé de protéines présentes dans les différents lysats (figure 11).

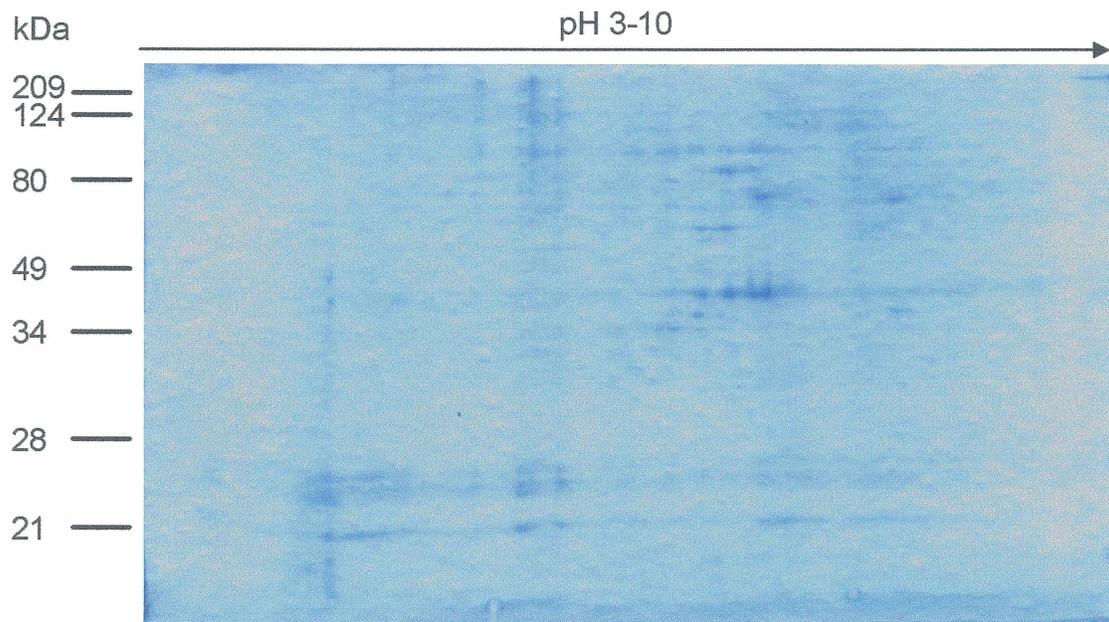
3.2 Co-immunoprécipitation

La deuxième technique utilisée consistait à immunoprécipiter TRPC6 dans des lysats de cellules HEK 293T surexprimant de façon stable TRPC6 et d'identifier les protéines co-immunoprécipitées avec le canal. L'analyse de ces protéines a été effectuée par électrophorèse de type SDS-PAGE 1D et 2D et la coloration des protéines a également été faite avec le bleu colloïdal (figure 12). Cette technique n'a permis aucune identification de protéines et ceci à cause du

Figure 11 : Analyse des lysats cellulaires par électrophorèse 2D. 100 μ g de protéines cytosoliques de lysats de cellules surexprimant TRPC6-GFP (5-9 en A) ou GFP seul (G-17 en B) ont été séparées selon leur point isoélectrique sur une bande pH 3-10 et selon leur poids moléculaire par SDS-PAGE.

A)

5-9



B)

G-17

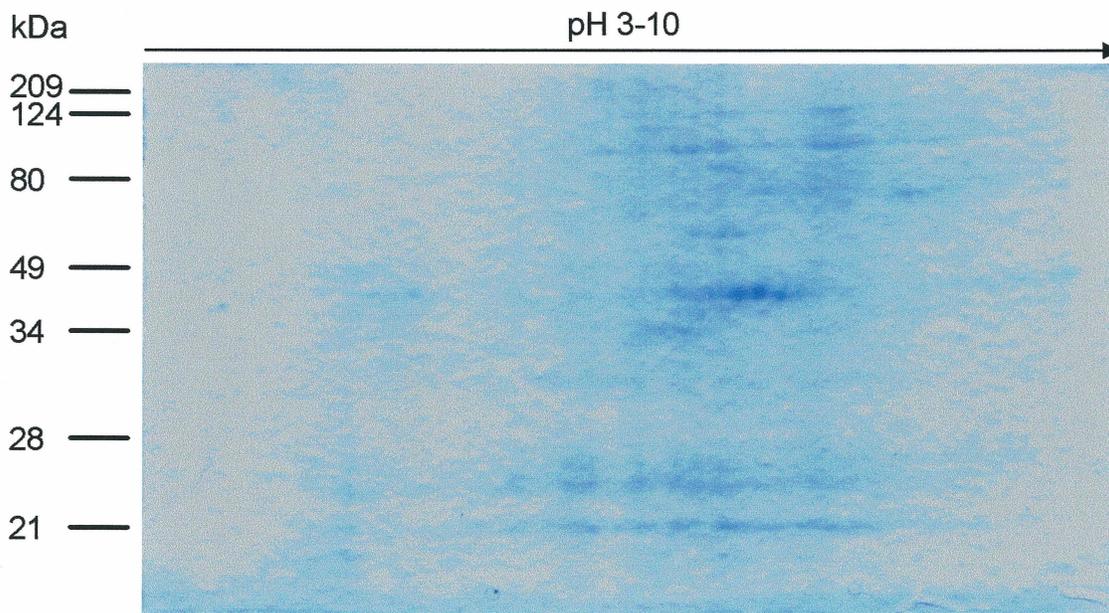
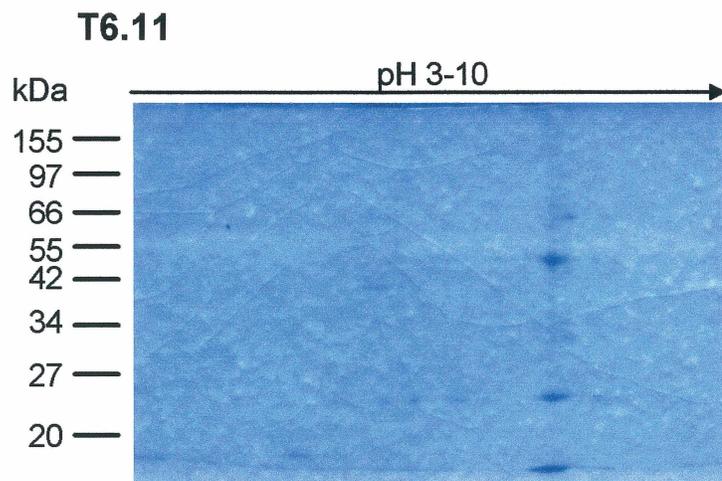
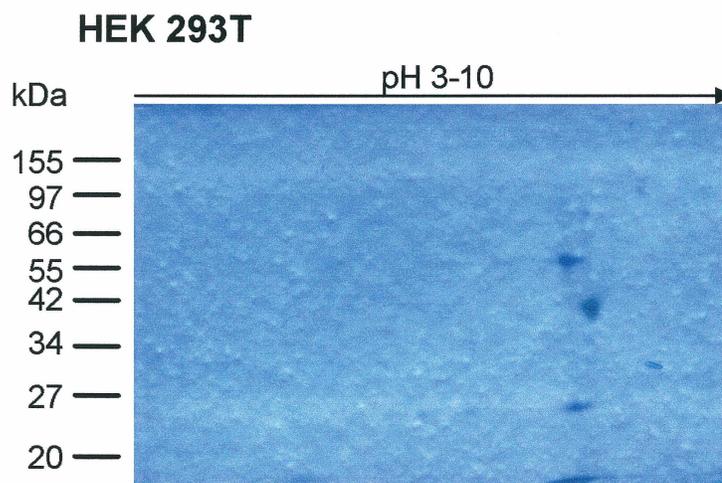


Figure 12 : Analyse 2D des protéines co-immunoprécipitées avec TRPC6. TRPC6 a été immunoprécipité dans des lysats de cellules surexprimant TRPC6 (T6.11 en A) ou non (HEK 293T en B) et les protéines co-immunoprécipitées ont été séparées selon leur point isoélectrique sur une bande pH 3-10 et selon leur poids moléculaire par SDS-PAGE.

A)



B)



fait qu'une très grande quantité de cellules aurait été nécessaire pour détecter par une coloration les protéines co-immunoprécipitées avec TRPC6 augmentant ainsi les possibilités de faux positifs.

3.3 Identification de partenaires d'interaction potentiels par des essais de liaison de type GST

La troisième technique, bien différente des deux premières, consistait à coupler la portion C-terminale de TRPC3 et de TRPC6 à la glutathione S-transférase (GST) et de lier ces protéines à des billes de sépharose couplées à la glutathione (GSH). Ces protéines de fusion étaient par la suite mises en présence d'homogénats de différents organes de souris ou de lysats de cellules surexprimant TRPC6 et les protéines retenues étaient analysées par SDS-PAGE 1D et par une coloration au bleu colloïdal.

3.3.1 Construction des protéines de fusion

Pour la réalisation de ce projet, nous avons construit deux protéines de fusion avec la GST. La première protéine de fusion est formée de la portion C-terminale complète de TRPC6, soit les acides aminés M⁷²⁵ à R⁹³¹, couplée à la GST (GST-CT6). La deuxième protéine de fusion est formée d'une section de la partie C-terminale de TRPC3, soit les acides aminés E⁶⁷⁶ à K⁷⁹⁵, couplée à la

Figure 13 : Expression des protéines de fusion GST-CT6 et GST-CT3a ainsi que de la GST seule. (A) Alignement de la séquence en acides aminés du C-terminal de TRPC6 et de TRPC3, ainsi que leurs principaux domaines d'interaction. Les séquences couplées à la GST sont soulignées pour chaque TRPC. (B) Analyse de l'intégrité des protéines générées : GST seule (28 kDa), GST-CT3a (42 kDa) et GST-CT6 (51 kDa). La bande correspondant à chacune des constructions est pointée par une flèche pleine.

A)

mTRPC6 725-MINSSFQEI^{EDDADV}^{EWK}FARAKLWFSYFEEGRTL^{LPVPFN}^{LVPS}PKSLLYLLLKFKKWMCEL-**786**
 MINSS+QEIEDD+DVEWK^{FAR}+KLW SYF++G+TLP PF+LVPSPKS +Y +++ +

hTRPC3 669-MINSSYQEIEDDSDV^{EWK}FARSKLWLSYFDDGKTL^{PPPF}^{SLVPS}PKSFVYFIMR-----IVNF-**727**

mTRPC6 787-IQGQKQGFQEDAEMNKRNEEKKFGISGSHEDLSKFSLDKNQLAHNKQSSTR^{SE}DYHLNS^F-**847**
 + +++ Q+D EM G+ S L+ F+ QS++R E + NS

hTRPC3 728-PKCRRRRLQ^{KDIEM}-----GMGNSKSR^{LN}LFT-----QSNSRV^FESH^SFN^SI-**769**

mTRPC6 848-SNPPRQYQ^{KIMKRLIKRYV}LQAQIDKESDEVNEGELKEIKQDISSLR^{YELLE}EKSQNS^{EDL}-**908**
 N P +YQ+IMKRLIKRYVL+AQ+DKE+DEVNEGELKEIKQDISSLR^{YELLE}+KSQ +E+L

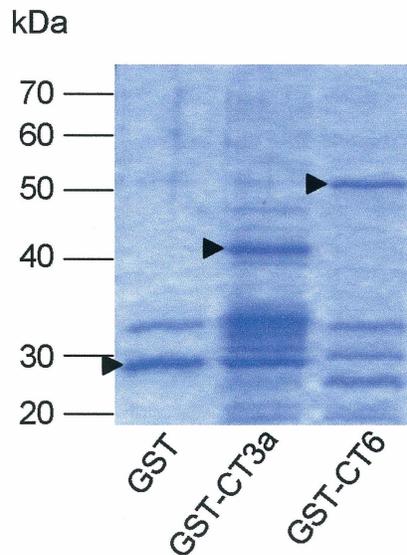
hTRPC3 770-LNQ^{PTRYQ}IMKRLIKRYVLKAQ^{VDK}ENDEVNEGELKEIKQDISSLR^{YELLE}DKSQATEEL-**829**

mTRPC6 909-AELIRKLG^{ERLS}SLEPKKLEESRR-**931**
 A LI KL E+L++ + E

hTRPC3 830-AILI^{HKL}SEKLNPSMLNCE-**848**

Domaine TRP
Domaine riche en proline
Domaine CIRB
Domaine coiled-coil

B)



GST (GST-CT3a). Le C-terminal de TRPC3 possède 55 % d'homologie avec celui de TRPC6. La portion du C-terminal de TRPC3 que nous avons utilisée comprend le domaine TRP, le domaine riche en prolines ainsi que le domaine CIRB, qui sont trois domaines importants pour cibler des interactions potentielles avec d'autres protéines, alors que celui de TRPC6 comprend également le domaine coiled-coil (figure 13A). Une fois les protéines GST exprimées, elles ont été purifiées par leur liaison aux billes de glutathione-sépharose et analysées par SDS-PAGE (figure 13B). Cette analyse par SDS-PAGE nous a permis de visualiser la pureté de nos protéines de fusion et nous a également permis d'estimer la quantité de protéines GST que nous avons purifiée.

3.3.2 Observation de protéines pouvant interagir avec TRPC3 et TRPC6

Une quantité fixe de chacune des protéines GST couplée aux billes GSH a été incubée avec des homogénats de différents tissus de souris (cerveaux, système cœur/poumons et reins) divisés en fractions cytosoliques et membranaires, comprenant plus ou moins 5 mg de protéines. Nous avons utilisé les homogénats de cerveaux puisqu'il s'agit d'un organe qui exprime tous les types de TRPCs (Pedersen et al., 2005). Le cœur et les poumons expriment pour leur part de grande quantité de TRPC3 et TRPC6 (Pedersen et al., 2005), alors que le choix des homogénats de reins est venu suite à la l'observation de Winn et al., démontrant qu'une mutation chez TRPC6 au niveau du rein était à la

base de la glomérulosclérose segmentale focale familiale (Winnet al., 2005). Ces billes ont également été incubées avec des lysats de cellules HEK 293T (~1 500 µg de protéines) transfectées de façon stable avec TRPC6 (T6.11). Les protéines interagissant avec le C-terminal de TRPC6 ou la portion utilisée du C-terminal de TRPC3 ont été séparées et analysées par SDS-PAGE (figures 14 à 17). Les bandes observables seulement dans les pistes suivant l'incubation de nos billes sépharose-GSH-GST-CT6 et sépharose-GSH-GST-CT3a avec nos homogénats et non suite à l'incubation avec les billes sépharose-GSH-GST ont été excisées, de façon à discriminer les protéines interagissant avec la GST. Ces bandes ne devaient également pas faire partie du patron de migration des protéines GST-CT6 et GST-CT3a de façon à rejeter les protéines bactériennes pouvant interagir avec nos protéines de fusion. De cette façon, 7 bandes différentes ont été isolées contenant des protéines interagissant avec TRPC3, TRPC6 ou les deux, provenant d'homogénats de cœurs/poumons de souris, soit 3 protéines cytosoliques et 4 membranaires (figure 14). Quatre bandes différentes ont également été observées provenant de l'incubation de nos protéines de fusion avec des homogénats de reins de souris, soit 3 cytosoliques et une membranaire (figure 15). Onze bandes ont été observées suite à l'incubation avec des homogénats de cerveaux, soit 6 cytosoliques et 5 membranaires (figure 16), puis 3 bandes ont capté notre intérêt suite à l'incubation de nos protéines de fusion avec les lysats de T6.11 (figure 17). Les bandes d'intérêt ont été excisées du gel et les protéines présentes dans les bandes ont été analysées par spectrométrie de masse.

Figure 14 : Observation de protéines de cœurs/poumons de souris interagissant avec le C-terminal de TRPC3 et/ou de TRPC6. Les protéines de fusion GST-CT6 et GST-CT3a couplées aux billes GSH-sépharose ainsi que la GST seule couplée aux billes GSH-sépharose ont été incubées 1 heure à température ambiante avec 5 mg de protéines provenant de fractions cytosoliques (cyto.) ou membranaire (memb.) d'homogénats de cœurs/poumons de souris. Les protéines interagissant avec la GST ou les protéines de fusion ont été analysées par SDS-PAGE sur un gel 10% et colorées au bleu colloïdal. Seules les protéines présentes dans les pistes suivant l'incubation des protéines de fusion avec les homogénats (CT6 + memb., CT6 + cyto., CT3a +memb., CT3a + cyto.) et non présentes dans les pistes suivant l'incubation de la GST avec ces homogénats (GST + memb., GST + cyto.) ont été retenues et extraites du gel pour être analysées. Ces protéines, pointées par une flèche pleine, ne devaient également pas faire partie du patron de migration des protéines de fusion (CT6 et CT3a) pour être retenues.

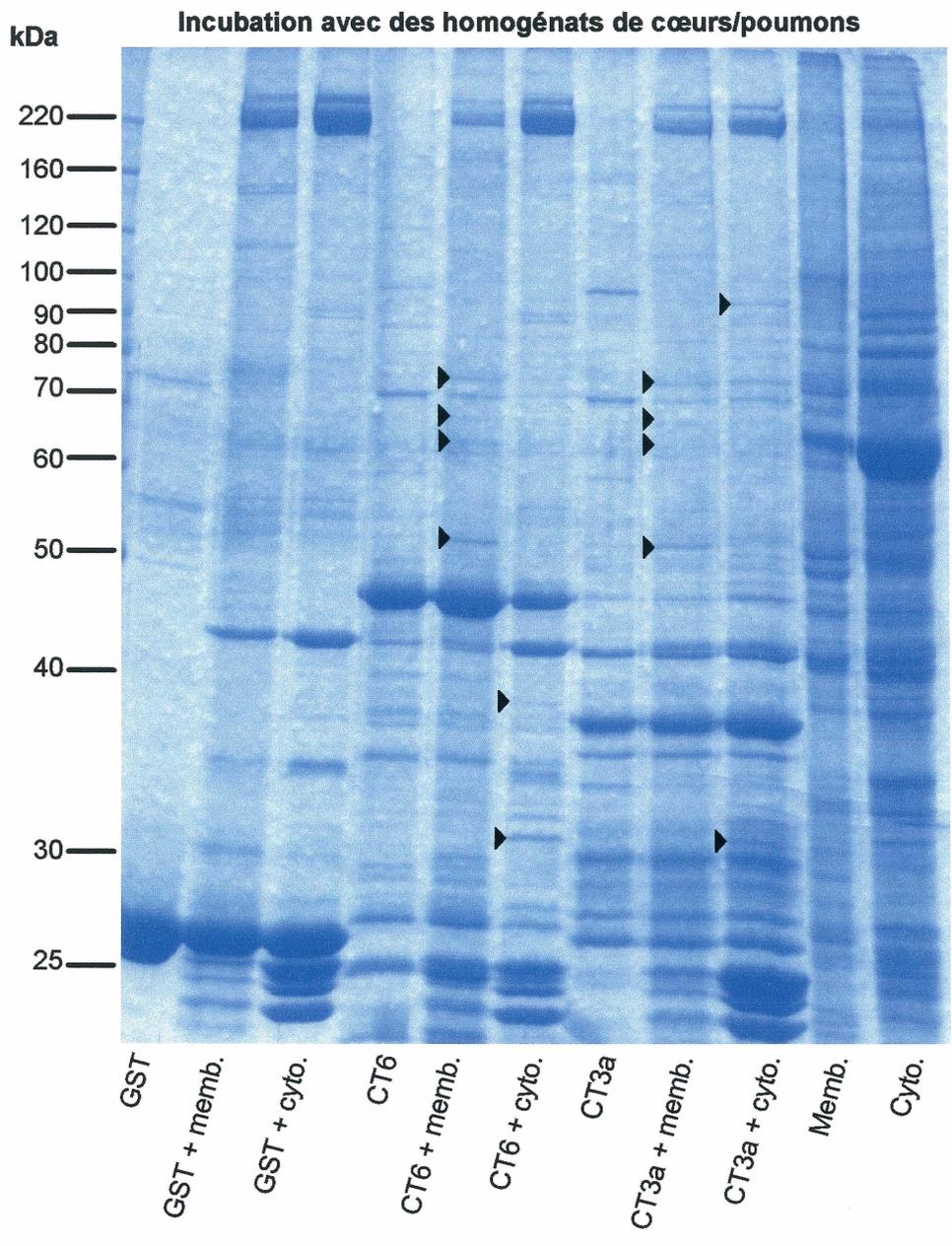


Figure 15 : Observation de protéines de reins de souris interagissant avec le C-terminal de TRPC3 et/ou de TRPC6. Les protéines de fusion GST-CT6 et GST-CT3a couplées aux billes GSH-sépharose ainsi que la GST seule couplée aux billes GSH-sépharose ont été incubées 1 heure à température ambiante avec 5 mg de protéines provenant de fractions cytosoliques (cyto.) ou membranaire (memb.) d'homogénats de reins de souris. Les protéines interagissant avec la GST ou les protéines de fusion ont été analysées par SDS-PAGE sur un gel 10% et colorées au bleu colloïdal. Seules les protéines présentes dans les pistes suivant l'incubation des protéines de fusion avec les homogénats (CT6 + memb., CT6 + cyto., CT3a +memb., CT3a + cyto.) et non présentes dans les pistes suivant l'incubation de la GST avec ces homogénats (GST + memb., GST + cyto.) ont été retenues et extraites du gel pour être analysées. Ces protéines, pointées par une flèche pleine, ne devaient également pas faire partie du patron de migration des protéines de fusion (CT6 et CT3a) pour être retenues.

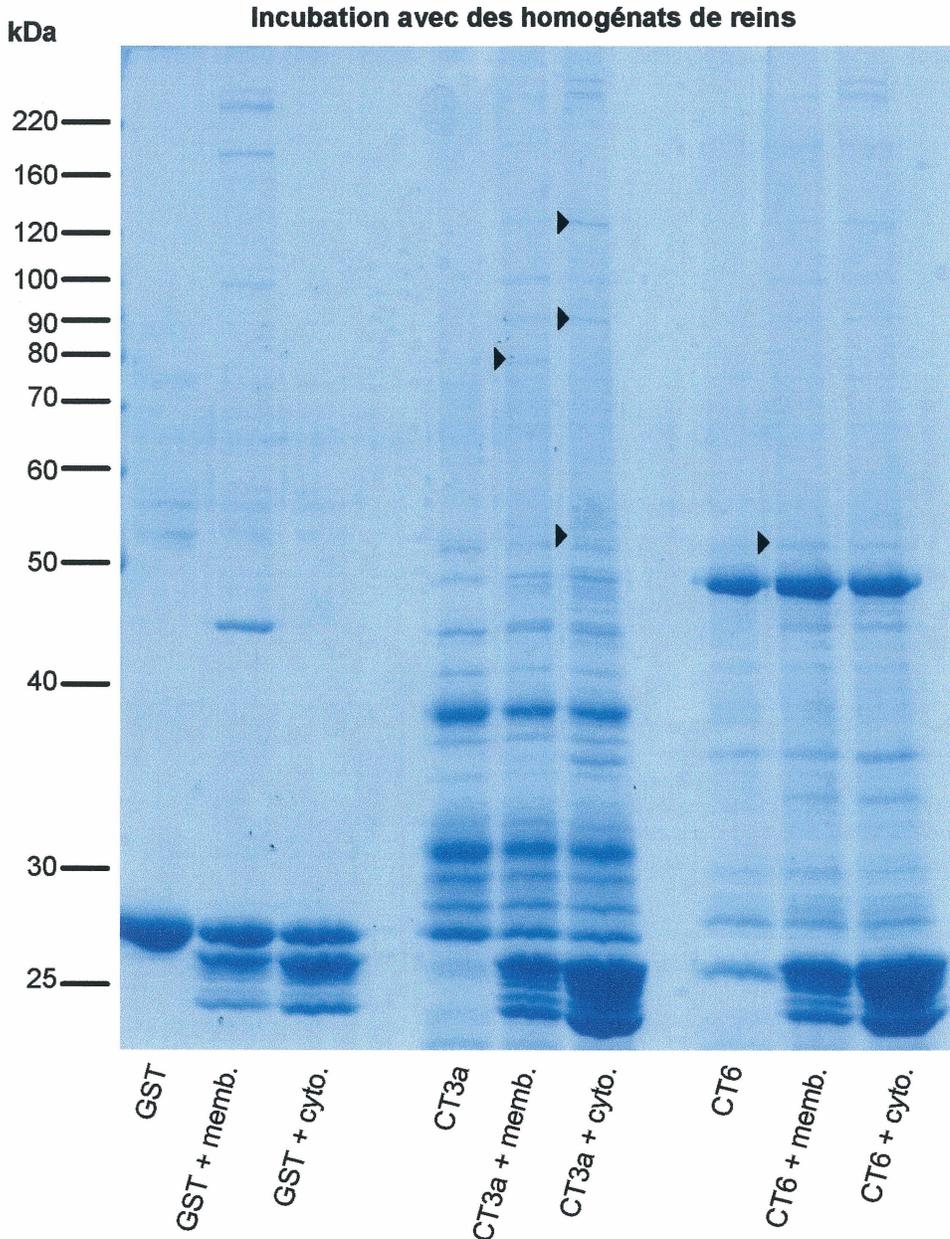


Figure 16 : Observation de protéines de cerveaux de souris interagissant avec le C-terminal de TRPC3 et/ou de TRPC6. Les protéines de fusion GST-CT6 et GST-CT3a couplées aux billes GSH-sépharose ainsi que la GST seule couplée aux billes GSH-sépharose ont été incubées 1 heure à température ambiante avec 5 mg de protéines provenant de fractions cytosoliques (cyto.) ou membranaire (memb.) d'homogénats de cerveaux de souris. Les protéines interagissant avec la GST ou les protéines de fusion ont été analysées par SDS-PAGE sur un gel 10% et colorées au bleu colloïdal. Seules les protéines présentes dans les pistes suivant l'incubation des protéines de fusion avec les homogénats (CT6 + memb., CT6 + cyto., CT3a + memb., CT3a + cyto.) et non présentes dans les pistes suivant l'incubation de la GST avec ces homogénats (GST + memb., GST + cyto.) ont été retenues et extraites du gel pour être analysées. Ces protéines, pointées par une flèche pleine, ne devaient également pas faire partie du patron de migration des protéines de fusion (CT6 et CT3a) pour être retenues.

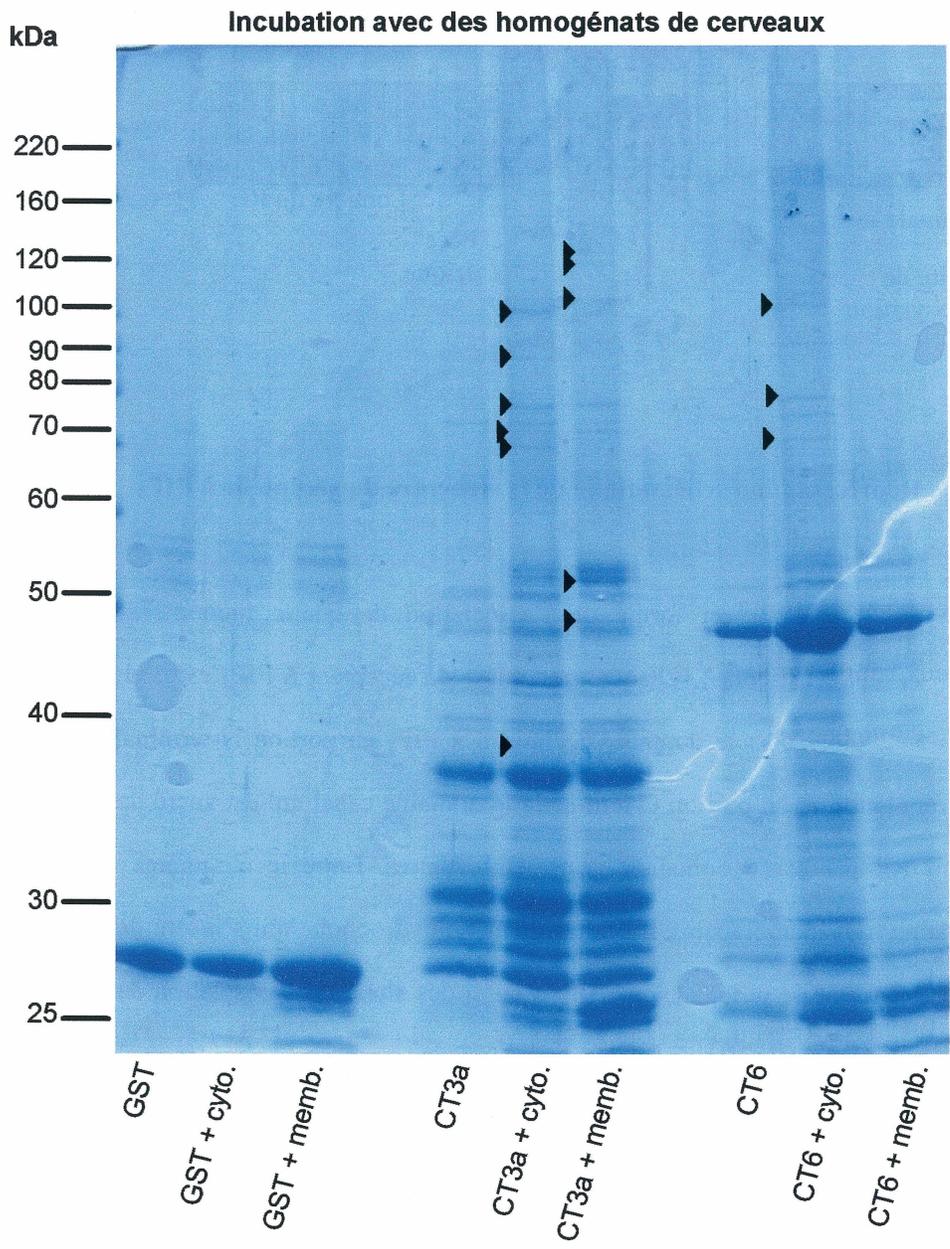
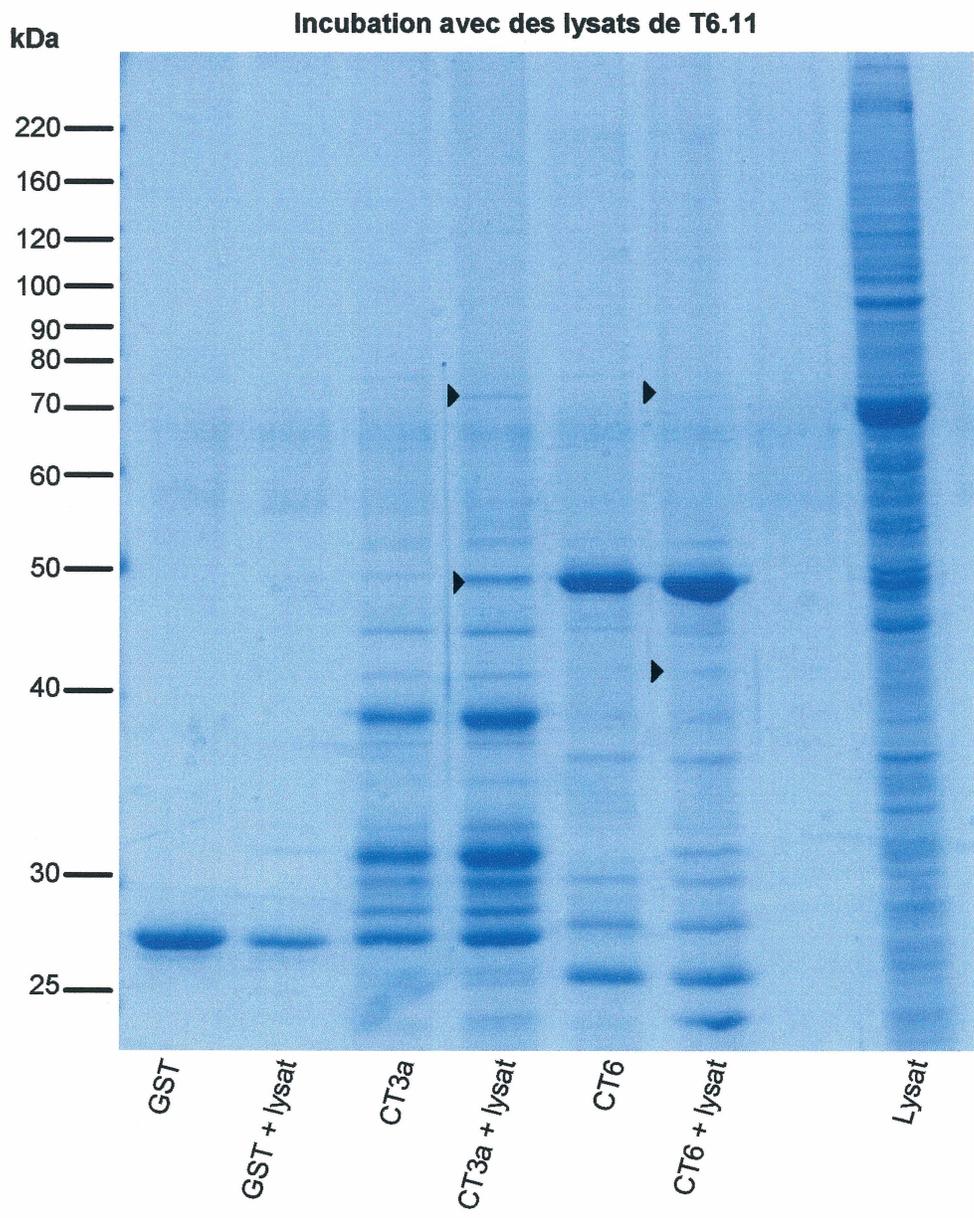


Figure 17 : Observation de protéines de lysats de cellules T6.11 interagissant avec le C-terminal de TRPC3 et/ou de TRPC6. Les protéines de fusion GST-CT6 et GST-CT3a couplées aux billes GSH-sépharose ainsi que la GST seule couplée aux billes GSH-sépharose ont été incubées 1 heure à température ambiante avec 1500 µg de protéines provenant de lysats de cellules T6.11. Les protéines interagissant avec la GST ou les protéines de fusion ont été analysées par SDS-PAGE sur un gel 10% et colorées au bleu colloïdal. Seules les protéines présentes dans les pistes suivant l'incubation des protéines de fusion avec les lysats (CT6 + lysats, CT3a + lysats) et non présentes dans les pistes suivant l'incubation de la GST avec ces lysats (GST + lysats) ont été retenues et extraites du gel pour être analysées. Ces protéines, pointées par une flèche pleine, ne devaient également pas faire partie du patron de migration des protéines de fusion (CT6 et CT3a) pour être retenues.

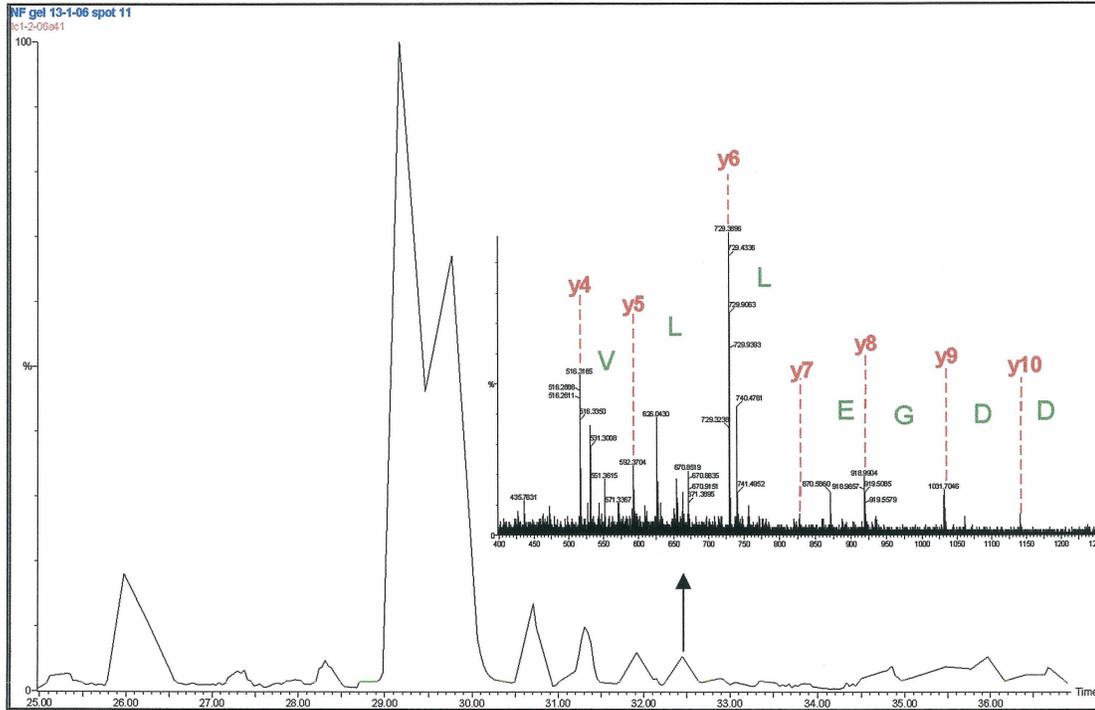


3.3.3 Spectrométrie de masse

Les protéines présentes au niveau des bandes de gel ont été clivées par la trypsine, enzyme qui clive en C-terminal d'une arginine ou d'une lysine. Puis les bandes ont été incubées dans un tampon de 50 mM NH_4HCO_3 de façon à permettre le passage des peptides générés du gel au tampon. Les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse de type ESI-Q-TOF-MS/MS. Les peptides ont donc été sélectionnés et fragmentés de façon à obtenir leur séquence en acides aminés. Le chromatogramme obtenu suite à l'analyse Q-TOF (figure 18A) nous permet de visualiser les différents peptides générés suite au clivage de notre protéine par la trypsine (différents pics). Grâce au logiciel Masslynx 3,5, il nous est possible de visualiser les masses peptidiques des différentes fragmentations générées. Puisque le clivage suite à une digestion à la trypsine s'effectue habituellement entre les acides aminés d'un peptide, les différences de masse obtenues correspondent chacune à un acide aminé précis (figure 18A). Les masses obtenues suite à l'analyse ont été utilisées pour faire une recherche sur le logiciel Mascot en utilisant les banques de données Swiss-Prot et NCBI permettant l'identification de nos différentes protéines (figure 18B).

Figure 18 : Exemple d'identification des protéines interagissant avec le C-terminal de TRPC3 et/ou TRPC6 par spectrométrie de masse. (A) Chromatogramme obtenu suite à l'analyse ESI-Q-TOF-MS/MS des peptides générés suite au clivage à la trypsine d'une des protéines isolées suite à l'incubation de GST-CT3a avec la fraction cytosolique des homogénats de cerveaux, ainsi que le spectre de masse d'un de ces peptides. (B) Identification de la protéine par MASCOT.

A)



B)

Q923C6_MOUSE Mass: 83131 Score: 167 Queries matched: 7

N-ethylmaleimide sensitive fusion protein (Mus musculus ES cells cDNA, RIKEN full-length enriched library.

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
✓ 17	569.2948	1136.5750	1136.5461	0.0289	0	5	1.9e+02	1	K.YVGESEANIR.K
✓ 18	571.8434	1141.6722	1141.6495	0.0227	0	22	4.2	1	R.LLDYVPIGPR.F
19	573.3284	1144.6422	1144.6087	0.0335	0	15	22	2	K.AENSSLNLIGK.A
✓ 22	646.3482	1290.6818	1290.6567	0.0251	0	17	12	1	K.NFSGAELEGLVR.A
✓ 23	647.8495	1293.6844	1293.6604	0.0240	0	48	0.009	1	K.IAESNFFPIK.I
✓ 29	729.4067	1456.7988	1456.7773	0.0216	0	59	0.00088	1	R.VLDDGELLVQQTK.N
32	745.8887	1489.7628	1489.7201	0.0427	0	7	1.2e+02	2	R.QSIINPDWNFEK.M

3.3.4 Identification de partenaires d'interaction potentiels de TRPC3 et TRPC6

Suite aux essais de liaison de type GST et à la spectrométrie de masse, 14 partenaires potentiellement intéressants ont été identifiés. Ces protéines sont présentées dans le tableau 2 ainsi que leur masse, le nombre de peptides reconnus pour chaque identification, leur numéro NCBI, ainsi que le tissu ou le type cellulaire chez lesquels ces protéines ont été extraites. Pour ce qui est des autres bandes soumises à la spectrométrie de masse n'ayant pas permis une identification positive, la majorité se sont révélées être des contaminants tel que la kératine humaine ou de souris. La majorité des protéines identifiées ont été démontrées pour interagir avec les parties C-terminales de TRPC3 et de TRPC6. Toutefois l'aminopeptidase puromycine sensitive et la carbonyl reductase ont été démontrées pour interagir seulement avec le C-terminal de TRPC3 ou de TRPC6 respectivement. Nous avons identifié différents types de protéines pouvant interagir avec les TRPCs. Certaines sont des protéines chaperonnes, comme Hsp 70 et le *N*-Ethylmaleimide-sensitive factor, d'autres des protéines du cytosquelette, comme la β -actine ou la β -tubuline et certaines sont des protéines membranaires, comme la pompe Na^+/K^+ -ATPase ou encore la pompe H^+ -ATPase. D'autres sont des enzymes mitochondriales comme l'Acyl-Coenzyme A deshydrogénase, l'Aconitase 2, l'Hydroxyacyl-Coenzyme A deshydrogénase et la Carbonyl reductase. L'Elongation factor 1-gamma, la Selenium binding protein 2, l'Aminopeptidase puromycin sensitive sont des protéines cytoplasmiques avec

Nom de la protéine	Mr (Da)	Peptides	N° NCBI	Organes/cell.
Carbonyl reductase	30 907	14	15215242	cœurs/poumons
Beta-actine	42 080	15	62897625	T6.11
Beta-tubuline	50 274	38	13542680	cerveaux
Elongation factor 1-gamma	50 298	7	31104	T6.11 + cerveaux
Selenium binding protein 2	53 147	2	18848341	reins
H⁺-transporting two sector ATP synthase α-chain (F₀F₁)	59 830	15	192090	cœurs/poumons
Heat shock 70 kDa protein	70 280	16	55962551	T6.11
Acyl-Coenzyme A deshydrogénase	71 230	6	681192	cœurs/poumons
N-Ethylmaleimide-sensitive factor	83 131	8	13879306	cerveaux + cœurs/poumons
Hydroxyacyl-Coenzyme A deshydrogénase	83 276	6	6171953	reins + cœurs/poumons
Aconitase 2	86 185	5	63101586	reins
Aminopeptidase puromycin sensitive	103 944	3	56270559	reins
Na⁺/K⁺-ATPase	117 548	7	18044918	cerveaux
XPE UV-damaged DNA binding factor	128 027	17	5931596	reins

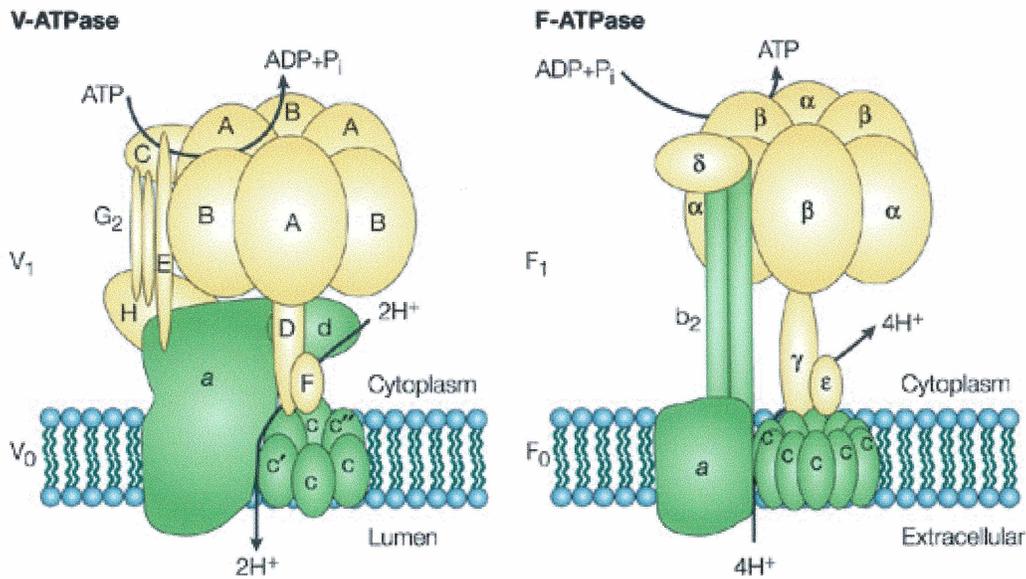
Tableau 2 : Liste des protéines interagissant avec le C-terminal de TRPC3 et/ou TRPC6 identifiées par spectrométrie de masse.

des rôles plus ou moins bien connus alors que la XPE UV-damaged DNA binding factor est une protéine présente au niveau du noyau. Certaines protéines identifiées, comme la β -actine et la pompe Na^+/K^+ -ATPase, ont déjà été décrites dans une étude récente comme étant des partenaires d'interaction de TRPC5 et TRPC6 (Goel et al., 2005). Toutefois le rôle de ces interactions n'a toujours pas été démontré. Ce groupe de recherche proposait dans leur étude une potentielle interaction entre la pompe Na^+/K^+ -ATPase et les domaines à l'ankyrine présents au niveau du N-terminal de TRPC5 et TRPC6. Pour notre part, nous détectons une interaction entre cette protéine et le C-terminal de TRPC3 et de TRPC6. Cette interaction pourrait avoir lieu au niveau de leur domaine TRP, de leur domaine riche en proline ou encore de leur domaine CIRB. Par ailleurs, cette identification nous a permis de valider notre méthode d'identification de protéines.

3.3.5 La pompe H^+ -ATPase comme partenaire de TRPC3 et TRPC6

L'une des protéines ayant capté notre intérêt, interagissant avec TRPC3 et TRPC6, est la pompe à protons ATPase. Il existe deux types de pompe à protons, une à la membrane mitochondriale (F_0F_1) et l'autre à la membrane des vésicules (V_0V_1). Il a déjà été démontré que ces pompes possèdent beaucoup d'homologie entre elles (Bowman et al., 1988; Nelson et al., 1989; Finbow et Harrison, 1997). À la base, elles sont toutes deux composées de deux secteurs distincts soit un secteur transmembranaire (V_0 et F_0) servant à l'ancrage de la

pompe à la membrane, et une région catalytique (V_1 et F_1) permettant l'hydrolyse de l'ATP dans le cas de la pompe V-ATPase, ou encore la synthèse d'ATP dans le cas de la pompe F-ATPase (figure 19). L'hydrolyse ou la synthèse de l'ATP par ces deux pompes enclenchera respectivement l'entrée ou la sortie des protons. Chaque région de ces deux pompes possède plusieurs sous-unités différentes. Certaines de ces sous-unités sont semblables d'une pompe à l'autre et ont été démontrées pour avoir une bonne homologie de séquence. Il existe en fait 25 % d'homologie entre la sous-unité A de la partie catalytique de la pompe V-ATPase et la sous-unité β de la pompe F-ATPase ainsi que 25 % d'homologie entre la sous-unité B de la pompe V-ATPase et la sous-unité α de la pompe F-ATPase. Nous avons recruté, dans nos homogénats de cœurs/poumons, cette sous-unité α de la forme mitochondriale de la pompe. Cependant, à cause de la localisation cellulaire de TRPC3 et TRPC6, il est peu probable qu'ils puissent interagir avec la forme mitochondriale de la pompe. Toutefois une association à la membrane de certaines vésicules entre la forme vésiculaire de la pompe et les TRPCs nous semblait plus probable. L'implication majeure de la pompe à protons V_0V_1 est de permettre l'acidification des vésicules, processus nécessaire entre autres au niveau du recyclage des récepteurs suite à leur endocytose (Nishi et Forgac, 2002). En fonction de la forte homologie entre la forme vésiculaire de la pompe et sa forme mitochondriale, nous avons considéré le fait qu'il était plausible d'avoir une interaction entre la forme vésiculaire de la pompe et TRPC3 et 6.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

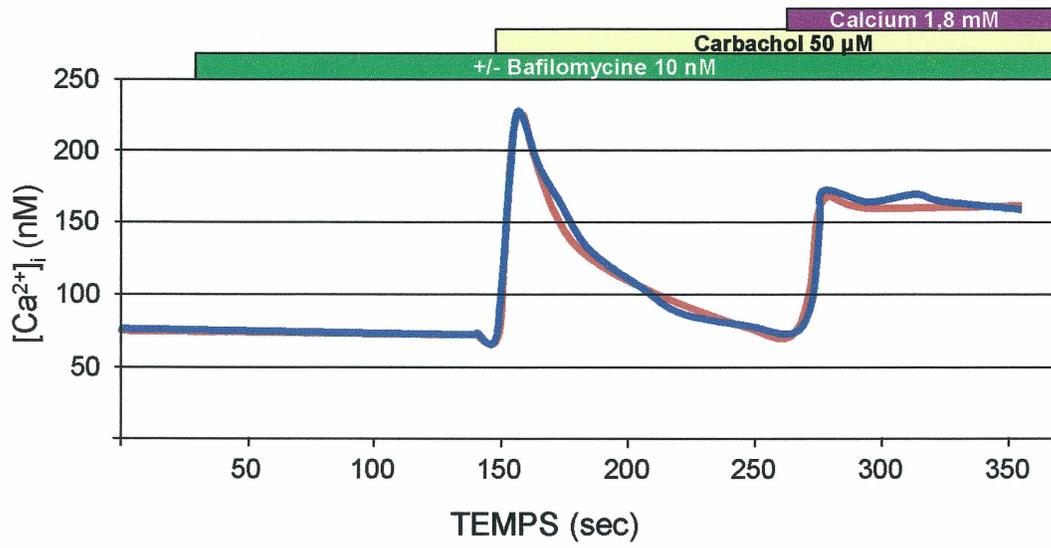
Figure 19 : Comparaison structurale de la pompe vésiculaire V-ATPase et de la pompe mitochondriale F-ATPase. Les deux pompes sont composées de deux parties : une partie transmembranaire (V_0 et F_0) en vert et une partie catalytique (V_1 et F_1) en jaune. L'hydrolyse de l'ATP par la partie catalytique de la pompe V-ATPase entraînera un changement de conformation (mouvement de rotation) de sa partie trans-membranaire permettant l'entrée de protons. Pour la pompe F-ATPase, c'est la sortie de protons qui amènera un changement de conformation au niveau de sa partie catalytique permettant ainsi la synthèse d'ATP. Adapté de Nishi et Forgac. Nature review (3), p. 94-103, 2002.

3.3.6 L'inhibition de la pompe H^+ -ATPase V_0V_1 n'affecte pas l'entrée de Ca^{2+} par TRPC6

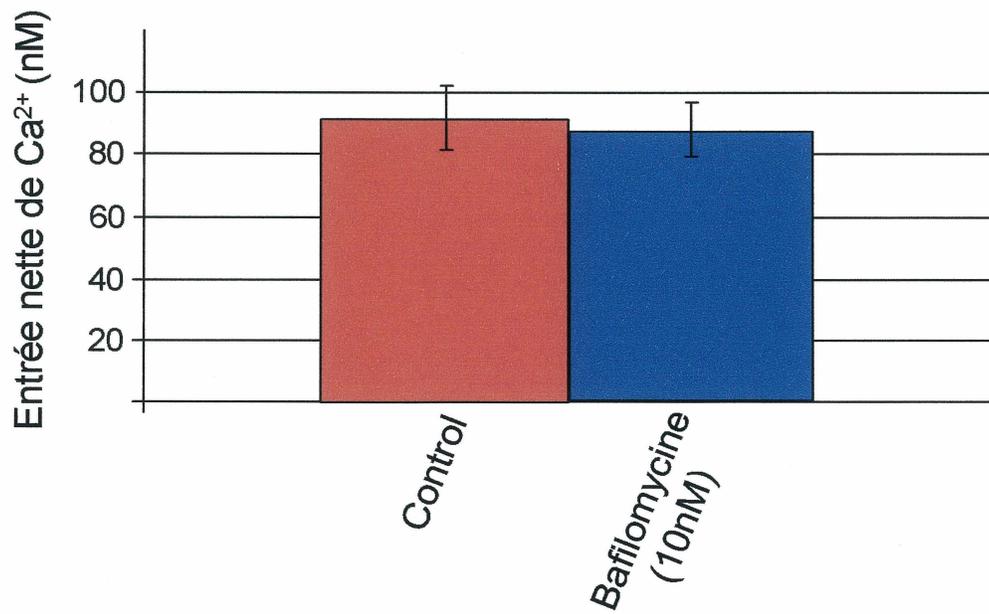
Nous avons utilisé un protocole de mesure de $[Ca^{2+}]_i$ en cellules isolées pour évaluer l'effet d'un inhibiteur sélectif de la pompe H^+ -ATPase vésiculaire, la bafilomycine A1 (Bowman et al., 1988; Yoshimori et al., 1991; Crider et al., 1994), sur l'entrée de calcium. Les cellules T6.11 ont été chargées en fura-2/AM et traitées 2 minutes avec 10 nM de bafilomycine ou non dans un milieu sans calcium. Les cellules ont ensuite été stimulées avec 50 μ M de CCh pour induire la relâche de Ca^{2+} des réserves intracellulaires. Suite au retour du calcium au niveau basal, soit 90 secondes après la stimulation, le calcium extracellulaire était rétabli à 1,8 mM et l'entrée de calcium, due à l'activation de TRPC6, pouvait être observée. Comme démontré à la figure 20A, le fait de traiter les cellules avec la bafilomycine n'affecte ni le niveau basal de calcium (environ 75 nM), ni la relâche de calcium observée suite à la stimulation avec le CCh (environ 230 nM), ni l'entrée de calcium observée suite à l'ajout du calcium extracellulaire (environ 170 nM). La courbe en rouge représente les cellules témoins non traitées à la bafilomycine et la courbe en bleu représente les cellules traitées. Il est à noter que la bafilomycine était également présente dans le milieu au moment de la stimulation et de l'entrée de calcium. L'entrée nette de calcium par TRPC6 représentée en B n'est donc pas modifiée, que les cellules soient traitées avec la bafilomycine ou non. Ainsi, le fait de bloquer la pompe à protons ATPase

Figure 20 : Effet de la bafilomycine A1 sur l'entrée de calcium. Les cellules surexprimant de façon stable TRPC6 ont été traitées ou non avec 10 nM de bafilomycine A1 avant d'être stimulées avec 50 μ M de carbachol. (A) La relâche de calcium des réserves et l'entrée de calcium par les canaux TRPC6 suite à la stimulation ont été observées chez les cellules traitées (en bleu) et non traitées (en rouge). (B) Représentation de l'entrée nette de calcium chez les cellules traitées et non traitées.

A)



B)

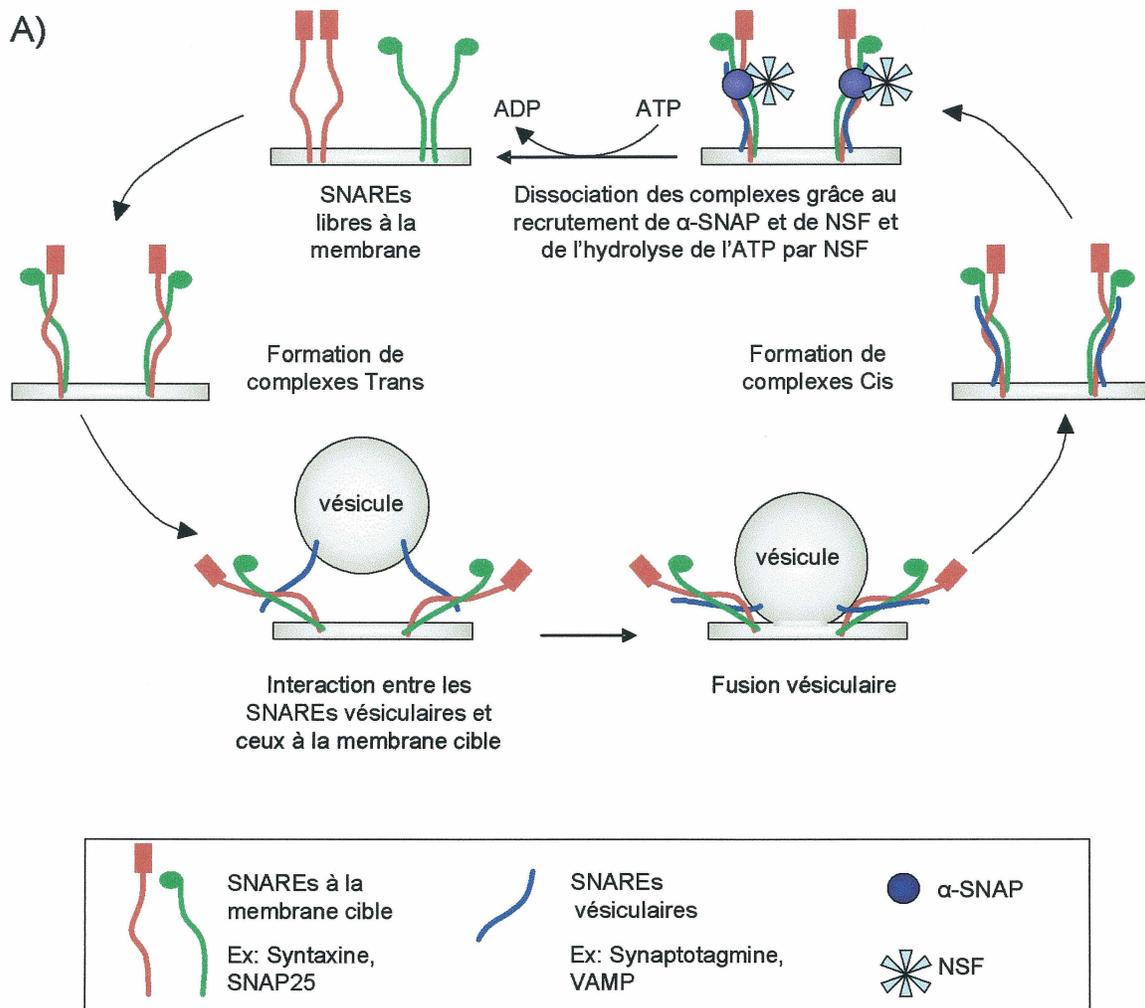


vésiculaire par la bafilomycine A1 ne module pas l'entrée de calcium par les canaux TRPC6.

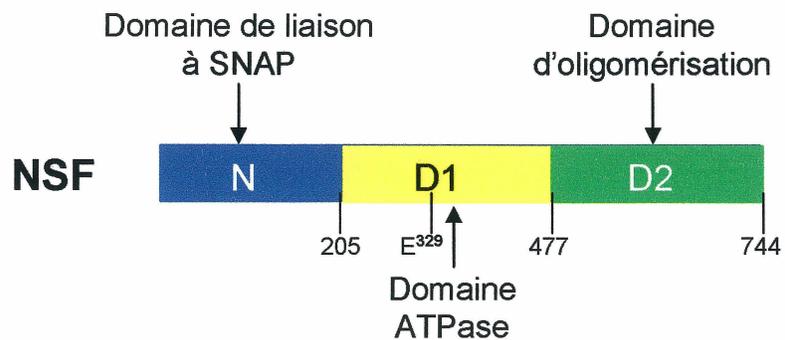
3.3.7 *N*-Ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) comme partenaire de TRPC3 et TRPC6

La protéine NSF a été identifiée pour la première fois en 1988 par le groupe de Rothman (Block et al., 1988). Dans cette étude, les auteurs démontraient que l'ajout de NSF à des membranes traitées au NEM (*N*-Ethylmaleimide) permettait la restauration du transport trans-Golgi. Depuis, de nombreuses études ont démontré le rôle de NSF dans le transport vésiculaire. Ceci a permis d'identifier un processus de fusion vésiculaire utilisé chez pratiquement tous les types cellulaires (Whiteheart et al., 2001). La fusion entre une vésicule et la membrane de son compartiment cible nécessite la présence de protéines membranaires nommées "Soluble NSF Attachment Protein Receptors" (SNARE), présentes à la membrane de la vésicule et du compartiment (figure 21A) (Sutton et al., 1998; Weber et al., 1998). La partie cytoplasmique de ces protéines comprend un domaine coiled-coil permettant la liaison entre les SNAREs localisées à la membrane vésiculaire et celles de la membrane cible. C'est à partir de cette liaison que la fusion membranaire est possible. Le rôle de NSF est de désassembler ces complexes, une fois la fusion complétée, et de permettre le recyclage des SNAREs pour une prochaine

Figure 21 : NSF dans le transport vésiculaire. (A) Représentation schématique de l'implication de NSF dans le transport vésiculaire. (B) Différents domaines de NSF. Adapté de Jahn R. et Scheller RH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (7), p. 631-643, 2006.



B)



fusion membranaire. NSF peut exécuter son rôle grâce à la présence d'une petite protéine adaptatrice, la α -Soluble NSF Attachment Protéine (α -SNAP), qui lie les complexes SNAREs et la protéine NSF. La liaison de NSF à α -SNAP va enclencher l'activité ATPase de NSF et l'énergie d'hydrolyse de l'ATP permettra la dissociation des complexes.

NSF a été décrit comme un homo-hexamère dont chaque sous-unité, comprenant 744 a.a., est divisée en trois domaines : un domaine N-terminal permettant sa liaison à α -SNAP (1-205), un domaine D1 permettant son activité ATPase (206-477) et un domaine D2 permettant son oligomérisation (478-744) (figure 21B) (Fleming et al., 1998; Whiteheart et al., 2001). L'intérêt de NSF comme partenaire des TRPCs vient du fait qu'une étude récente a démontré une interaction fonctionnelle entre deux membres de la famille des SNAREs (VAMP2 et α -SNAP) et la partie N-terminale de TRPC3 (Singh et al., 2004). Cette étude démontre que l'augmentation de TRPC3 à la membrane cytoplasmique, suite à une stimulation des GPCRs, est dépendante de VAMP2.

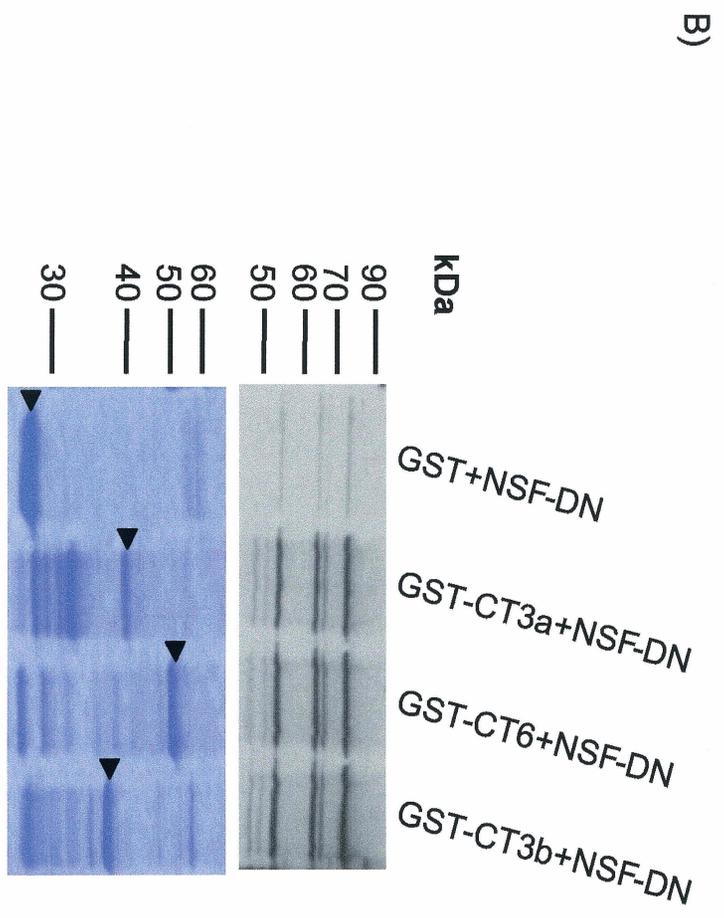
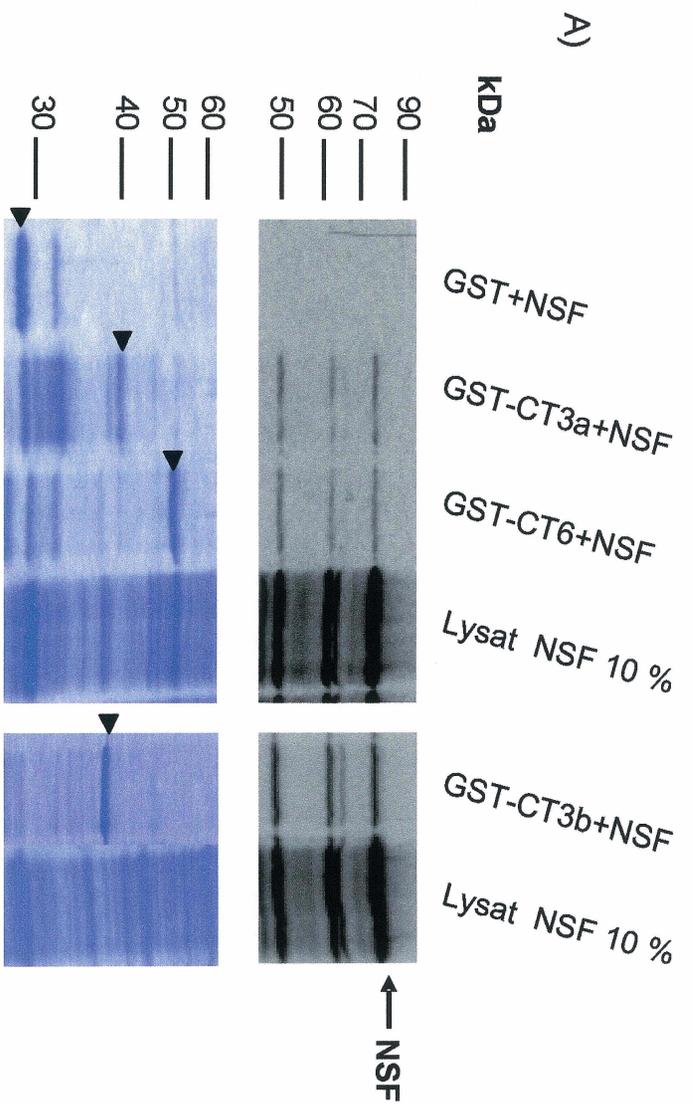
3.3.8 NSF interagit avec le C-terminal de TRPC3 et TRPC6 possiblement via leur domaine CIRB

Pour cibler un peu plus précisément le domaine de TRPC3 et de TRPC6 interagissant avec la protéine NSF, nous avons amplifié une troisième protéine GST, soit GST-CT3b, qui comprend uniquement les acides aminés G⁷⁴² à E⁸⁴⁸ de

TRPC3 (Boulay et al., 1999). Cette région comprend le domaine CIRB de TRPC3 et son domaine coiled-coil (figure 13A). La protéine GST-CT3a, que nous avons utilisée comme appât dans nos essais de liaison à la GST, et la GST-CT3b ont 54 acides aminés (G⁷⁴² à K⁷⁹⁵) en commun, comprenant majoritairement le domaine CIRB (E⁷⁶² à K⁷⁹⁵) de la protéine. L'interaction entre NSF et cette partie de TRPC3 a été confirmée par des essais de liaison à la GST de type pull down. L'ADNc de NSF a été traduit de façon *in-vitro*, en présence de [³⁵S]-méthionine/cystéine, puis incubé avec des billes sépharose-GSH-GST seule, sépharose-GSH-GST-CT3a, sépharose-GSH-GST-CT6 et sépharose-GSH-GST-CT3b. L'interaction de NSF a été révélée par autoradiogramme à la suite d'une analyse SDS-PAGE. Comme présentée à la figure 22A, NSF interagit avec GST-CT6 et GST-CT3 ainsi qu'avec GST-CT3b. Nous pouvons donc penser que le domaine CIRB de TRPC3 et possiblement celui de TRPC6 peut être impliqués dans l'interaction avec NSF.

La même chose a été testée avec un dominant négatif de NSF (NSF^{E329Q} ou NSF-DN). L'acide glutamique 329 de NSF est localisé dans son domaine ATPase (D1) et sa mutation pour une glutamine le rend inapte à hydrolyser l'ATP et à désassembler les SNAREs (Coppolino et al., 2001). Ce mutant prendrait la place du NSF endogène et inhiberait sa fonction cellulaire. Nous avons voulu savoir si cette mutation pouvait affecter la liaison du NSF avec TRPC3 et TRPC6. L'ADNc de NSF-DN a donc été traduit de façon *in vitro*, en présence de

Figure 22 : Essais de liaison à la GST. (A) NSF a été traduit de façon *in vitro*, en présence de [³⁵S]-méthionine/cystéine, puis incubé avec des colonnes d'affinité soit de GST seule, GST-CT3a, GST-CT6 ou GST-CT3b (pointées par des flèches pleines). L'essai de liaison a été révélé par autoradiogramme. (B) Mêmes essais avec NSF-DN traduit *in vitro*.



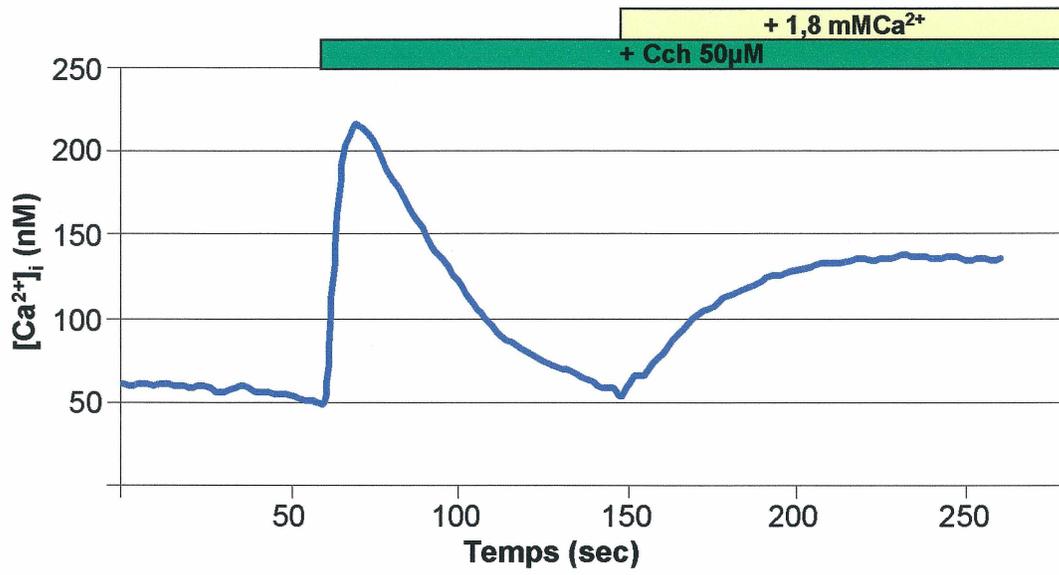
[³⁵S]-méthionine/cystéine, avant d'être incubé avec des billes sépharose-GSH-GST, sépharose-GSH-GSTCT3a, sépharose-GSH-GSTCT6 et sépharose-GSH-GSTCT3b. Comme démontrée à la figure 22B, la mutation présente dans le domaine ATPase de NSF n'affecte pas la liaison de la protéine avec le C-terminal de TRPC3 et de TRPC6.

3.3.9 La protéine NSF module l'entrée de Ca²⁺ par TRPC6

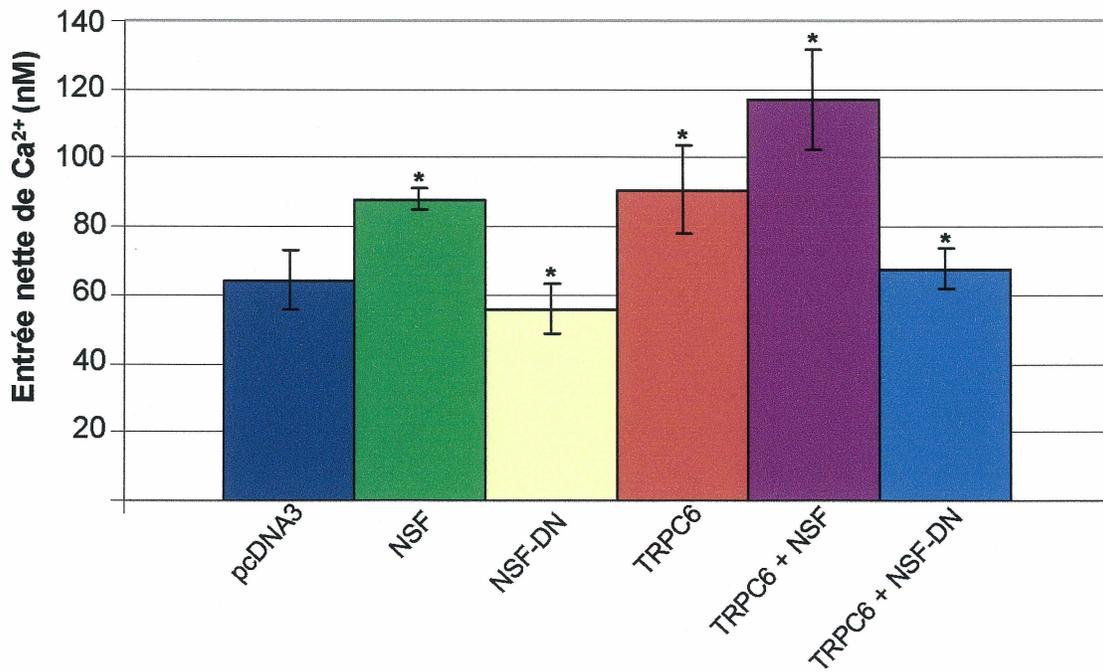
Nous avons évalué par la suite l'importance de cette interaction en observant l'effet de NSF sur l'entrée de calcium par les TRPCs par un protocole de mesure de [Ca²⁺]_i. Pour ce faire, des cellules HEK 293T ont été transfectées avec l'ADNc codant pour le récepteur muscarinique M5 ainsi qu'une combinaison d'ADNc de NSF ou de NSF^{E329Q} (NSF-DN) avec ou sans TRPC6. Les cellules transfectées et chargées en fura-2/AM sont incubées pendant 30 secondes dans un milieu extracellulaire sans calcium avant la stimulation avec 50 µM de CCh. Une fois la [Ca²⁺]_i retournée au niveau basal, soit 90 secondes après la stimulation au CCh, le calcium extracellulaire est rétabli à 1,8 mM pour permettre l'entrée de calcium via les canaux TRPCs (figure 23A). Toutes les conditions étudiées présentent un niveau basal de [Ca²⁺]_i équivalent, soit environ 60 nM. La relâche du Ca²⁺ induite par le CCh est aussi similaire soit environ 215 nM de [Ca²⁺]_i. Le fait de surexprimer NSF ou NSF-DN avec ou sans TRPC6 ne modifie pas ces paramètres. Toutefois, les entrées nettes de calcium pour chacune des conditions, soit la différence entre la [Ca²⁺]_i avant et après l'ajout du Ca²⁺

Figure 23 : Effet de la surexpression de NSF et NSF-DN sur l'entrée de Ca^{2+} par TRPC6. (A) Courbe standard de relâche et d'entrée de calcium chez les cellules HEK 293T transfectées suite à une stimulation au CCh. (B) Effet de l'expression de NSF et NSF-DN sur l'entrée de calcium chez ces cellules. * : $p < 0,05$.

A)



B)



extracellulaire suite à la stimulation au CCh, diffèrent selon la présence de NSF ou de NSF-DN (figure 23B). L'entrée nette de Ca^{2+} observée chez les cellules transfectées avec l'ADNc de pcDNA3 (cellules témoins) est de 64 nM, ce qui correspond à l'entrée de calcium effectuée par les canaux SOCs présents de façon endogène à la membrane plasmique de ces cellules. Les cellules transfectées avec NSF-DN présentent une entrée calcique similaire aux cellules transfectées avec pcDNA3 soit environ 56 nM. Toutefois, l'entrée calcique chez les cellules surexprimant NSF est augmentée de 36 % versus l'entrée observée chez les cellules témoins avec une entrée nette de 87 nM. Chez les cellules surexprimant TRPC6, l'entrée de Ca^{2+} est de 91 nM. Le fait de surexprimer TRPC6 et NSF semble moduler l'entrée de calcium par ce canal. La surexpression de ces deux protéines amène une augmentation de l'entrée calcique de 30 % versus une surexpression de TRPC6 seul, avec une entrée nette de 117 nM. Cependant, le fait de surexprimer TRPC6 et NSF-DN réduit l'entrée calcique dans la cellule à un niveau semblable à celui des cellules témoins avec des valeurs de 67 nM. Ces résultats démontrent que NSF a un rôle à jouer dans la modulation de l'entrée calcique chez TRPC6 ainsi que chez les canaux calciques présents de façons endogènes à la membrane plasmique.

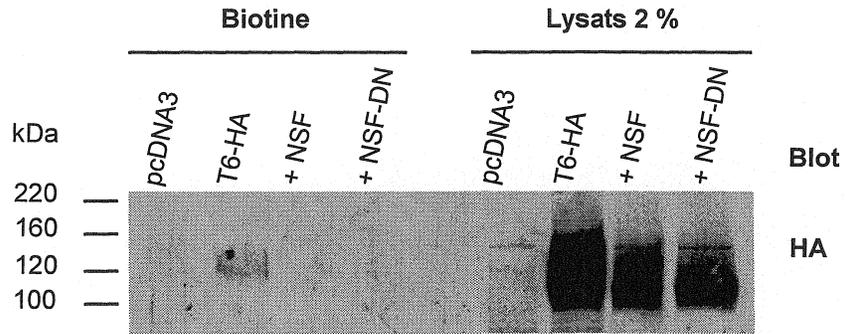
3.3.10 La surexpression de TRPC6 en présence de NSF et NSF-DN influence la présence du canal à la membrane

La modulation de l'entrée de calcium observée par NSF et NSF-DN peut être expliquée de deux façons. Il est possible que NSF augmente la quantité de TRPC6 à la membrane et que NSF-DN ne soit plus disposé à le faire, ou encore que NSF rende plus actifs les canaux déjà présents à la membrane ce que NSF-DN n'a pas la capacité de faire. Pour éclaircir ce point, nous avons effectué un marquage des protéines de surface à la biotine sur des cellules HEK 293T transfectées avec l'ADNc codant pour pcDNA3, ou une combinaison de d'ADNc de TRPC6-HA, NSF ou NSF-DN. Les protéines de surface ont été liées à la biotine et précipitées suite à une incubation avec des billes de streptavidine-agarose. Les niveaux de TRPC6-HA à la membrane ont été détectés par immunobuvardage. Contre toute attente, le fait de surexprimer NSF ou NSF-DN vient empêcher la présence de TRPC6 à la membrane plasmique comme démontré à la figure 24A, sans toutefois interférer avec le niveau d'expression des protéines puisque celles-ci sont présentes au niveau des lysats. En fait, TRPC6-HA est seulement à la membrane plasmique lorsqu'il est exprimé seul, c'est-à-dire sans NSF ou NSF-DN. La surexpression de NSF, qu'il soit WT ou DN, influence donc la présence de TRPC6 à la membrane plasmique.

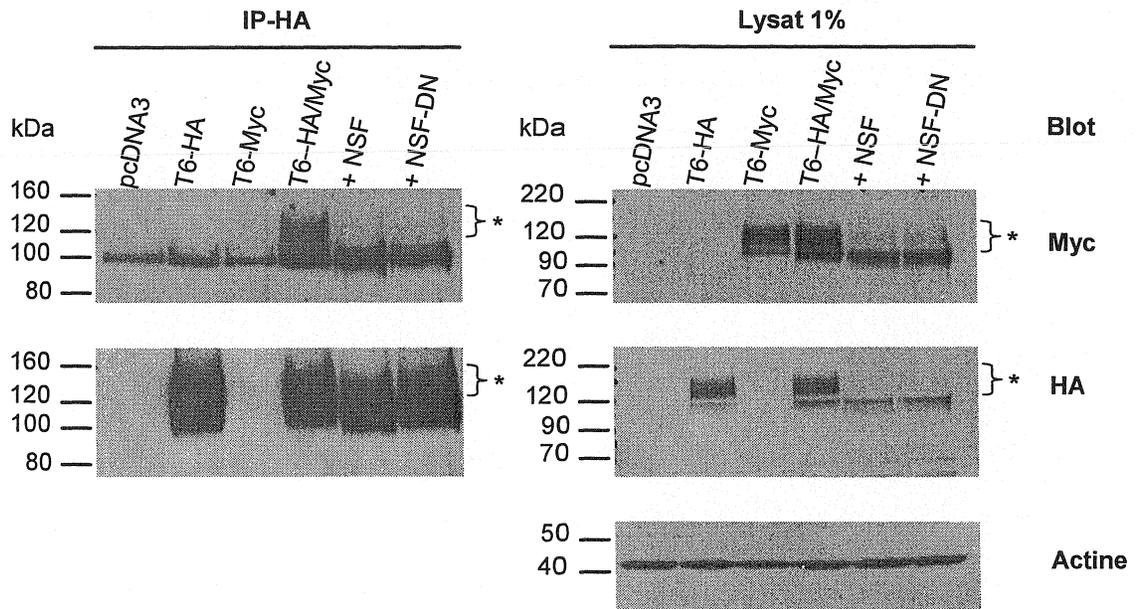
Figure 24 : NSF affecte la maturation de TRPC6. (A) Essais de biotinylation. Les cellules sont transfectées avec l'ADNc de pcDNA3 et TRPC6-HA en combinaison ou non avec NSF ou NSF-DN et les protéines de surface sont liées à la Sulfo-NHS-SS-Biotine. Les cellules sont lysées et les protéines de surface sont précipitées grâce à des billes streptavidine-agarose. Les niveaux de TRPC6 peuvent être par la suite évalués par un immunobuvardage. (B) Évaluation des niveaux d'assemblage des TRPC en fonction de la présence de NSF ou NSF-DN. Les cellules sont transfectées avec l'ADNc de pcDNA3, de TRPC6-HA, de TRPC6-Myc et d'une combinaison TRPC6-HA et TRPC6-Myc en présence ou non de NSF et NSF-DN. Les cellules sont lysées et TRPC6-HA est immunoprécipité. Les niveaux de TRPC6-HA immunoprécipités, de TRPC6-Myc co-immunoprécipités ainsi que leurs niveaux respectifs d'expression dans les lysats ont été évalués par immunobuvardage. Les niveaux d'actine dans les lysats ont été évalués pour s'assurer d'avoir des concentrations protéiques similaires dans chaque puits.

* : TRPC6 sous sa forme glycosylée.

A)



B)



3.3.11 La surexpression de TRPC6 en présence de NSF et NSF-DN affecte la maturation du canal

Puisque les canaux TRPC6 ne peuvent se rendre à la membrane plasmique lorsqu'ils sont surexprimés avec NSF et NSF-DN, nous avons voulu déterminer à quel moment, dans le processus d'assemblage de maturation et de migration des canaux, la surexpression de NSF et de NSF-DN pouvait jouer un rôle. Nous avons donc, dans un premier temps, vérifié les niveaux d'assemblage des canaux en présence de NSF et NSF-DN. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules HEK 293T avec l'ADNc codant pour pcDNA3, TRPC6-HA, TRPC6-Myc et une combinaison de TRPC6-HA et TRPC6-Myc en présence ou non de NSF ou NSF-DN. Nous avons par la suite immunoprécipité TRPC6-HA et évalué les niveaux de TRPC6-Myc co-immunoprécipité, ce qui pouvait nous indiquer les niveaux de canaux formés en présence ou non de NSF ou NSF-DN. Comme démontrée à la figure 24B, la surexpression de NSF ou de NSF-DN ne vient pas modifier les niveaux d'assemblage des canaux TRPC6, puisque les quantités de TRPC6-Myc co-immunoprécipités avec TRPC6-HA dans les trois différentes conditions sont assez similaires. Il est à noter que nous identifions également une bande à environ 100 kDa dans toutes les pistes, correspondant à notre anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation. Bien que les niveaux d'assemblage ne soient pas modifiés, on peut observer sur la même figure, que les niveaux de glycosylation des canaux TRPC6 formés sont diminués grandement, la glycosylation étant un processus important au niveau de la maturation du canal.

On voit toutefois qu'une petite quantité de TRPC6-Myc et TRPC6-HA immunoprécipités est glycosylée. Le fait de surexprimer NSF ou NSF-DN vient donc affecter la maturation des canaux TRPC6, sans toutefois empêcher leur assemblage.

Discussion

Dans cette étude, nous avons identifié 14 partenaires potentiels d'interaction de TRPC3 et de TRPC6. Ces protéines, provenant d'homogénats de cœurs, de poumons, de reins ou de cerveaux de souris ou encore de lysats de cellules T6.11, interagissent avec les parties C-terminale de TRPC3 et de TRPC6. Deux d'entre elles ont capté notre intérêt, soit la pompe à protons mitochondriale (F_0F_1) et le *N*-Ethylmaleimide-sensitive factor (NSF). Bien que nous n'ayons fait aucune étude sur les douze autres partenaires potentiels d'interaction recrutés, nous ne sous-estimons pas la possibilité de ces interactions. Certaines protéines sont cependant plus intéressantes que d'autres, comme c'est le cas pour la protéine chaperonne Hsp70. Il a récemment été démontré dans le laboratoire que Hsp70 co-immunoprécipite avec tous les types de TRPCs présents chez l'humain (Lepage, Francoeur et Boulay, communication personnelle). Cette protéine est une chaperonne qui joue un rôle dans le repliement des protéines (Mayer et Bukau, 2005) et pourrait être impliquée dans l'assemblage des canaux TRPCs. Une autre protéine qui aurait un certain potentiel est la pompe Na^+/K^+ ATPase. Toutefois, puisqu'un autre groupe avait dernièrement démontré cette interaction (Goel et al., 2005), nous avons décidé de ne pas poursuivre l'étude de cette interaction entre les TRPCs et la Na^+/K^+ ATPase. Il est plus difficile de faire un lien entre les TRPCs et les enzymes mitochondriales recrutées comme l'Aconitase 2 ou l'Acyl-Coenzyme A deshydrogénase ou

encore le XPE UV-damaged DNA binding factor qui est présent au noyau. En tenant compte de la localisation cellulaire de ces protéines, il serait surprenant que de telles interactions surviennent avec les TRPCs.

Pour la même raison, une interaction entre la sous-unité α de la pompe mitochondriale (F_0F_1) et les TRPCs *in cellulo* serait surprenante. Cependant, dû à l'homologie entre cette sous-unité et la sous-unité B de la pompe vésiculaire V_0V_1 , nous avons émis l'hypothèse que les TRPCs pourraient interagir avec cette dernière et donc avec la forme vésiculaire de la pompe. De plus, de récentes études ont démontré que certains TRPCs (3, 5 et 6) sont localisés dans des vésicules et qu'ils sont transportés à la membrane plasmique suite à une stimulation par un agoniste (Bezzarides et al., 2004; Cayouette et al., 2004; Singh et al., 2005). Toutefois, l'inhibition de la pompe vésiculaire avec la bafilomycine A1 que nous avons effectuée n'a amené aucun changement dans l'entrée de Ca^{2+} médiée par TRPC6 suivant la stimulation des cellules par le CCh. La majorité des études qui ont été faites sur l'inhibition de la pompe à protons vésiculaire par la bafilomycine A1 démontrent que l'utilisation d'une concentration de 10 nM de bafilomycine A1, la concentration que nous avons utilisée, bloque de 80 à 90 % l'activité ATPase de la pompe (Bowman et al., 1988; Yshimori et al., 1991). Aussi, puisque la bafilomycine inhibe le transport vésiculaire à long terme (Araque et al., 2000), nous avons stimulé les cellules avec le CCh après seulement 2 minutes d'incubation. Ainsi, ces résultats

suggèrent que l'inhibition de la pompe V-ATPase de façon aiguë n'interfère pas avec l'activité de TRPC6.

Nous avons également démontré, au cours de cette étude, que NSF, notre deuxième protéine d'intérêt, interagit spécifiquement au niveau du C-terminal de TRPC3 et de TRPC6 et pourrait être impliqué dans la modulation de ces derniers. Pour ce qui est de l'interaction, nos résultats indiquent qu'elle se ferait via le domaine CIRB de TRPC3 et de TRPC6. Pour ce qui est de la modulation, nous avons démontré que la surexpression de TRPC6 avec NSF augmente de 30 % l'entrée nette de calcium par ce canal, suite à la stimulation du récepteur muscarinique par rapport à TRPC6 seul. La surexpression de NSF-DN avec TRPC6 ramenait, pour sa part, le niveau d'entrée de calcium à celui des cellules témoins.

Pour investiguer le mécanisme par lequel NSF effectue son action, plusieurs scénarios ont été examinés. Dans un premier temps, nous avons pensé qu'il était possible que l'augmentation de l'influx calcique observée suite à la surexpression de NSF et TRPC6 pouvait être associée aux SNAREs. Comme nous l'avons mentionné précédemment, le rôle majeur de NSF est de permettre le recyclage des protéines SNAREs présentes à la membrane plasmique, suite à une fusion vésiculaire, permettant ainsi un nouveau transport vésiculaire. Il a également été démontré que TRPC3 pouvait interagir avec deux membres des SNAREs soit VAMP2 et α -SNAP, supportant l'hypothèse que les TRPCs sont

véhiculés jusqu'à la membrane plasmique et que leur insertion peut être modulée par les SNAREs (Singh et al., 2004). Nous avons donc posé l'hypothèse que le fait de surexprimer NSF peut amener une augmentation du recyclage des SNAREs et donc une augmentation du transport vésiculaire de TRPC6. Les canaux se retrouveraient donc en plus grand nombre à la membrane plasmique et permettraient une plus grande entrée de Ca^{2+} versus lorsque TRPC6 est exprimé seul. Dans le cas de la surexpression de NSF-DN avec TRPC6, le recyclage des SNAREs ne pourrait être effectué, diminuant de beaucoup la quantité de TRPC6 se retrouvant à la membrane, ce qui pourrait expliquer la faible entrée de Ca^{2+} observée dans ces conditions.

C'est dans le but de valider cette hypothèse que nous avons déterminé les niveaux de TRPC6 présents à la membrane plasmique lorsqu'il est surexprimé avec NSF ou NSF-DN. Toutefois, les résultats obtenus nous ont poussés à rejeter en partie notre hypothèse. Le fait de surexprimer NSF et NSF-DN en présence de TRPC6 diminue grandement la présence de TRPC6 à la membrane. L'augmentation de l'influx calcique observée ne peut donc venir du fait que la quantité de TRPC6 à la membrane plasmique est augmentée en présence de NSF. Néanmoins, on pourrait penser qu'une quantité de TRPC6 est tout de même présente à la membrane dans ces conditions, sans que l'on puisse le détecter. Il est en fait possible que la surexpression de NSF augmente la vitesse de recyclage des SNAREs et permettrait donc un plus grand transport du faible taux de TRPC6 en mesure de se rendre à la membrane plasmique. Cette

augmentation du transport vésiculaire pourrait permettre une plus grande entrée de Ca^{2+} versus lorsque TRPC6 est exprimé seul, ce que NSF-DN, ne serait plus en mesure de faire, dû à sa perte d'activité ATPase.

De récentes études sur le rôle de NSF nous amènent à porter une deuxième hypothèse pouvant expliquer l'augmentation de l'entrée de Ca^{2+} observée en surexpression de TRPC6 avec NSF et cela malgré le fait que l'on assiste à une diminution du nombre de canaux à la membrane. Les quelques canaux présents à la membrane plasmique lorsque l'on surexprime NSF pourraient être plus actifs et seraient en mesure de faire entrer une plus grande quantité de Ca^{2+} au niveau de la cellule versus lorsque TRPC6 est exprimé seul. En fait, des études ont démontré que NSF pouvait avoir un rôle bien à lui, indépendant des SNAREs, dans l'activation et la stabilisation de certaines protéines membranaires. En 1998, NSF a été démontré par trois groupes de recherche différents pour interagir avec la sous-unité GluR2 du récepteur au glutamate AMPA (Nishimune et al., 1998; Osten et al., 1998; Song et al., 1998). Depuis, il a été démontré que la liaison de NSF au récepteur AMPA permettrait sa stabilisation à la membrane, en dissociant la protéine PICK1 du récepteur par son activité ATPase (Hanley et al., 2002). La liaison de PICK1 au récepteur AMPA conduit à l'internalisation de celui-ci. NSF a également été démontré pour interagir avec le C-terminal du récepteur β 2-adrénergique (β 2AR) et du récepteur à la vasopressine V2. L'interaction de NSF avec le β 2AR semble jouer un rôle important dans le recyclage du récepteur (Cong et al., 2001). Son interaction

augmente la vitesse de recyclage du récepteur et augmente donc la quantité de récepteurs à la membrane plasmique. NSF interagit également avec le récepteur GABA_B et permet sa stabilisation à la membrane. La stimulation du récepteur avec le GABA mènerait à la dissociation du NSF permettant la liaison de la protéine kinase C et par le fait même la désensibilisation du récepteur (Pontier et al., 2006).

À partir de ces informations, il est possible de concevoir que les canaux TRPCs sont activés ou encore stabilisés à la membrane par NSF d'une façon similaire aux protéines membranaires mentionnées plus haut, ce qui expliquerait l'augmentation de l'entrée de Ca²⁺ observée suite à la surexpression de TRPC6 et de NSF, malgré la diminution du nombre de canaux à la membrane. Il est donc possible, dans un premier temps, que NSF puisse permettre l'activation directement de TRPC6, ce que NSF-DN ne serait pas en mesure de faire, permettant par exemple une augmentation de la fréquence d'ouverture des canaux. NSF pourrait également permettre la liaison d'un activateur des TRPCs ou encore empêcher la liaison d'une protéine impliquée dans l'internalisation du canal comme pour le récepteur AMPA, ce que NSF-DN ne serait pas en mesure de faire par la perte de son activité ATPase. En fait, le rôle de NSF au niveau des SNAREs est de dissocier ces protéines qui interagissent entre elles par leur domaine coiled-coil (Sutton et al., 1998; Weber et al., 1998). Il serait donc possible que la liaison de NSF au niveau du domaine CIRB des TRPC6 permette la dissociation d'une protéine inhibitrice interagissant avec le domaine coiled-coil

de la protéine ce que NSF-DN ne serait pas en mesure de faire du à la perte de son activité ATPase.

Pour investiguer comment la surexpression de NSF et de NSF-DN influence la présence de TRPC6 à la membrane plasmique, nous avons évalué les niveaux d'assemblage et de maturation du canal. Nous avons démontré dans cette étude que la surexpression de NSF ou NSF-DN avec TRPC6 affectait la glycosylation finale de la protéine sans toutefois empêcher l'assemblage des canaux. Il a été démontré en 1997 que les canaux TRPCs subissaient une glycosylation (Boulay et al., 1997), processus se finalisant habituellement au niveau du Golgi (Puthenveedu et Linstedt, 2005). Un autre groupe a démontré que la glycosylation de TRPC6 n'était pas nécessaire à sa sortie du Golgi, ni à son transport de ce compartiment vers la membrane plasmique et qu'elle ne l'était pas non plus pour l'activation du canal et l'entrée de Ca^{2+} (Dietrich et al., 2003). TRPC6 non glycosylé peut donc se rendre à la membrane et permettre l'influx calcique. Dans notre cas, TRPC6 en plus de ne pas présenter le patron de glycosylation habituellement observable à la fin de sa maturation ne se rend pas à la membrane plasmique. Ceci nous porte à croire que le canal, lorsque NSF ou NSF-DN est surexprimé, pourrait rester bloqué au niveau Golgi au cours de sa maturation.

NSF a été reconnu dès le départ pour être impliqué dans le transport intra-Golgi (Block et al., 1988). Nous savons aujourd'hui que son rôle à ce niveau est

de permettre la dissociation des SNAREs présents à la membrane des différents compartiments ainsi que leur recyclage pour une future fusion vésiculaire (Sutton et al., 1998; Weber et al., 1998). Il a toutefois été démontré en 2004 que NSF, et surtout son activité ATPase, était également important pour maintenir l'intégrité du Golgi (Dalal et al., 2004). Dans cette étude, les auteurs ont surexprimé un mutant de NSF ne possédant plus son activité ATPase et ont évalué son impact sur le transport intra-Golgi. En plus de bloquer complètement ce transport, la surexpression de ce mutant amène la dissociation des différents compartiments du Golgi. Les vésicules formées ne peuvent donc plus se lier aux membranes des différents compartiments du Golgi et empêchent donc la maturation des protéines. Ce phénomène pourrait expliquer en partie ce que nous avons observé suite à la surexpression de TRPC6 et NSF-DN. Les vésicules contenant les canaux TRPC6 assemblés ne peuvent se lier au Golgi ce qui empêche la glycosylation finale des canaux ainsi que leur présence à la membrane. Le fait que l'association des canaux ne soit pas modifiée nous porte à croire que l'assemblage pourrait s'effectuer au niveau du réticulum endoplasmique et que NSF ne serait pas impliqué dans ce processus.

L'effet observé suite à la surexpression de NSF est plus difficile à expliquer. Il est toutefois possible que la surexpression de NSF vienne encombrer les SNAREs présents à la membrane du Golgi ou encore la protéine TRPC6 elle-même empêchant son transport dans le Golgi, sa glycosylation et sa

présence à la membrane plasmique. Des études plus approfondies sur ce sujet seront nécessaires.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il existe trois hypothèses d'activation des canaux TRPCs soit l'hypothèse du messager soluble (CIF), celle du couplage conformationnel et celle de l'insertion à la membrane plasmique des canaux. Mes résultats suggèrent que NSF est impliqué au niveau du transport vésiculaire et de l'insertion à la membrane de TRPC6 vue son rôle dans les mécanismes de fusion vésiculaire. Le fait que nous observons une augmentation de l'entrée de Ca^{2+} par TRPC6 en surexpression de NSF versus lorsque TRPC6 est exprimé seul et cela malgré qu'il soit présent en plus faible quantité à la membrane plasmique dans ces conditions, nous porte à croire que NSF, comme dans le cas du récepteur β 2-adrénérique, peut favoriser le recyclage de TRPC6. Toutefois nous ne pouvons ignorer le fait que NSF peut aussi avoir une implication au niveau de l'hypothèse du couplage conformationnel puisqu'il pourrait favoriser la dissociation d'une protéine inhibitrice pouvant interagir avec le domaine coiled-coil de TRPC6. Des études plus approfondies seront nécessaires pour nous permettre de conclure de l'implication réelle de NSF dans l'une ou l'autre de ces deux hypothèses d'activation des TRPCs.

Conclusion

En conclusion, cette étude démontre l'identification de 14 partenaires potentiels de TRPC3 et de TRPC6, dont la pompe à protons mitochondriale F_0F_1 et le *N*-Ethylmaleimide-sensitive factor (NSF). Nous avons démontré que cette protéine interagit directement avec la région C-terminale de TRPC3 et de TRPC6, possiblement au niveau de leur domaine CIRB. Nos résultats démontrent que la surexpression de TRPC6, en présence de NSF, permet une augmentation de l'entrée nette de Ca^{2+} par ces canaux, en réponse à la vidange des pools observée suite à la stimulation de la cellule, alors que la surexpression de TRPC6 en présence de NSF-DN permet une entrée de Ca^{2+} similaire à celle observé chez les cellules témoins. Cet effet pourrait être attribué à une augmentation du transport vésiculaire, supportant ainsi l'hypothèse d'insertion à la membrane de TRPC6 déjà proposée, ou encore à une activation de TRPC6 suite à la liaison de NSF, ce que NSF-DN ne serait pas en mesure de faire par la perte de son activité ATPase. Nous avons également démontré que la surexpression de NSF et NSF-DN avait le même effet au niveau de la maturation de TRPC6, soit une diminution de la quantité de TRPC6 matures (canaux glycosylés) ainsi qu'une diminution des canaux à la membrane plasmique. Ceci nous permet donc de croire que l'augmentation de l'influx calcique observée serait due à la liaison de NSF à TRPC6, permettant son activation, ce que la liaison de NSF-DN ne permettrait pas. En somme, la protéine NSF interagit avec

TRPC3 et TRPC6 et module l'influx calcique observé chez TRPC6. Toutefois le fonctionnement réel de cette modulation nécessitera plus d'approfondissements.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier tout particulièrement mes directeurs de recherche, D^r Guylain Boulay pour m'avoir tout d'abord accueillie dans son laboratoire, mais également pour m'avoir soutenue et fait confiance tout au long de mon apprentissage, et D^r Klaus Klarskov pour nos discussions et ses généreux conseils au sujet de la spectrométrie de masse.

Je désire également remercier D^{re} Nathalie Rivard et D^r Michel Grandbois pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Enfin, je remercie les membres de mon laboratoire, Sylvie Cayouette, Marc Lussier, Pascale Lepage, Simon Bousquet, Maxime Paradis, Alexandre P. Blanchard et Nathalie Nguyen pour leurs précieux conseils, mais surtout pour leur support moral. Je veux aussi remercier toutes les personnes du département qui ont contribué de près ou de loin à rendre mon passage au département plus agréable plus particulièrement les étudiants du laboratoire du D^r Gaétan Guillemette pour avoir été de si bons voisins!!

Bibliographie

Aebersold R and Goodlett DR. (2001). Mass spectrometry in proteomics. *Chemical Reviews* (101), 269-295.

Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG. (2000). SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *The Journal of Neuroscience* (20), 666-673.

Arnon A, Cook B, Montell C, Selinger Z, Minke B. (1997). Calmoduline regulation of calcium stores in phototransduction of *Drosophila*. *Science* (275), 1119-1121.

Bach G. Mucolipin 1: endocytosis and cation channel--a review. (2004). *European Journal of Physiology* (451), 313-317.

Batchelor AH, Piper DE, de la brousse FC, McKnight SL, Wolberger C. (1998). The structure of GABPalpha/beta: an ETS domain- ankyrin repeat heterodimer bound to DNA. *Science* (279), 1037-1041.

Beneken J, Tu JC, Xiao B, Nuriya M, Yuan JP, Worley PF, Leahy DJ. (2000). Structure of the Homer EVH1 domain-peptide complex reveals a new twist in polyproline recognition. *Neuron* (26), 143-154.

Berridge MJ. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* (6410), 315-325.

Berridge MJ. (1995) Capacitative calcium entry. *Biochemical Journal* (312), 1-11

Bezzerrides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE. (2004). Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nature Cell Biology* (6), 709-720.

Block MR, Glick BS, Wilcox CA, Wieland FT, Rothman JE. (1988). Purification of an *N*-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (85), 7852-7856.

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. *The Journal of Biological Chemistry* (272), 29672-29680.

Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K, Birnbaumer L. (1999). Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store

depletion-activated Ca(2+) entry. Proceedings of the National Academy of Sciences (96), 14955-14956.

Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K. (1988). Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences (85), 7972-7976.

Bowman EJ, Tenney K, Bowman BJ. (1988). Isolation of genes encoding the *Neurospora* vacuolar ATPase. The Journal of Biological Chemistry (263), 13994-14001.

Brazer SC, Singh BB, Liu X, Swaim W, Ambudkar IS. (2003). Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated Ca²⁺ influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. The Journal of Biological Chemistry (278), 27208-27215.

Brown D and Wanek GL. (1992). Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. Journal of the American Society of Nephrology (3), 895-906.

Cameron AM, Steiner JP, Sabatini DM, Kaplin AL, Walensky LD, Snyder SH. (1995). Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. Proceedings of the National Academy of Sciences (92), 1784-1788.

Cameron AM, Nucifora FC, Fung ET, Livingston DJ, Aldape RA, Ross CA, Snyder SH. (1997). FKBP12 binds the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *The Journal of Biological Chemistry* (272), 27582-27588

Cayouette S, Lussier MP, Mathieu EL, Bousquet SM, Boulay G. (2004). Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry* (279), 7241-7246.

Clapham DE. (1993). Cellular calcium. A mysterious new influx factor ? *Nature* (364), 763-764.

Cong M, Perry SJ, Hu LA, Hanson PI, Claing A, Lefkowitz, RJ. (2001). Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *Journal of Biological Chemistry* (276), 45145-45152.

Coppolino MG, Kong C, Mohtashami M, Schreiber AD, Brumell JH, Finlay BB, Grinsteins S, Trimble WS. (2001). Requirement for N-ethylmaleimide-sensitive factor activity at different stages of bacterial invasion and phagocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* (276), 4772-4780.

Cosens DJ and Manning A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* (224), 285-287.

Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. (1997). Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *The Journal of Biological Chemistry* (272), 6525-6533.

Crider BP, Xie XS, Stone DK. (1994). Bafilomycin inhibits proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pumps. *The Journal of Biological Chemistry* (269), 17379-17381.

Dalal S, Rosser MFN, Cyr DM, Hanson PI. (2004). Distinct roles for the AAA ATPases NSF and p97 in the secretory pathway. *Molecular Biology of the Cell* (15), 637-648.

Dietrich A, Mederosy Schnitzler M, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T, Gudermann T. (2003). N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *The Journal of Biological Chemistry* (278), 47842-47852.

Dohke Y, Oh YS, Ambudkar IS, Turner RJ. (2004). Turner, biogenesis and topology of transient receptor potential Ca^{2+} channel TRPC1. *The Journal of Biological Chemistry* (279), 12242-12248.

Engelke M, Friedrich O, Budde P, Schafer C, Niemann U, Zitt C, Jungling E, Rocks O, Luckhoff A, Frey J. (2002). Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta. *Federation of European Biochemical Societies Letters* (523), 193-199.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* (246), 64-71.

Finbow ME and Harrison MA. (1997). The vacuolar H^+ -ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochemistry Journal* (324), 697-712.

Fleming KG, Hohl TM, Yu RC, Muller SA, Wolpensinger B, Engel A, Engelhardt H, Brunger AT, Sollner TH, Hanson PI. (1998). A revised model for the oligomeric state of the *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, NSF. *The Journal of Biological Chemistry* (273), 15675-15681.

Goel M, Sinkins WG, Keightley A, Kinter M, Schilling WP. (2005). Proteomic analysis of TRPC channel binding partners reveals interaction with the plasmalemmal Na^+/K^+ -ATPase. *FASEB Journal* (19), A1163-A1164.

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

Goel M, Sinkins WG, Schilling WP. (2002). Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *The Journal of Biological Chemistry* (277), 48303-48310.

Gorina S and Pavletich NP. (1996). Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* (274), 1001-1005.

Graves PR and Haystead TAJ. (2002). Molecular Biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (66), 39-63.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* (260), 3440-3450.

Guerrera IC and Kleiner O. (2005). Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience Reports* (25), 71-93.

Hanley JC, Khatri L, Hanson PI, Ziff EB. (2002). NSF ATPase and alpha-/beta-SNAPs disassemble the AMPA receptor-PICK1 complex. *Neuron* (34), 53-67.

Hardie RC and Minke B. (1992). The TRP Gene is essential for light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptor. *Neuron* (8), 643-651.

Harrar Y, Bellini C, Faure JD. (2001). FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *Trends in plant Science* (6), 426-431.

Hisatsune C, Kuroda Y, Nakamura T, Inoue T, Nakamura T, Michikawa T, Mizutani A, Mikoshiba K. (2004). Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* (279), 40521-40528.

Hoffmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudremann T. (2000) Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *Journal of Molecular Medicine* (78), 14-25.

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (99), 7461-7466.

Hooper NM. (1999). Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae. *Molecular Membrane Biology* (16), 145-156.

Hu Y, Vaca L, Zhu X, Birnbaumer L, Kunze DL, Schilling WP. (1994). Appearance of a novel Ca^{2+} influx pathway in Sf9 insect cells following expression of the transient potential-like (*trpl*) protein of *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* (201), 1050-1056.

Jahn R and Scheller RH. (2006). SNAREs-engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (7), 631-643.

Karas M and Hillenkamp F. (1988). Laser desorption ionisation of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytic Chemistry* (60), 2299-2301.

Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, Muallem S. (1998). Functional interaction between InsP_3 receptors and store-operated Htrp_3 channels. *Nature (London)* (396), 478-482.

Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S. (1999). The N-terminal domain of the IP_3 receptor gates store-operated hTrp_3 channels. *Molecular Cell* (4), 423-429.

Kiselyov K, Kim JY, Zeng W, Muallem S. (2005). Protein-protein interaction and function TRPC channels. *European Journal of Physiology* (451), 116-124.

Lee SH, Liu L, Wang YT, Sheng M. (2002). Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* (36), 661-674.

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 TRPC channels. *The Journal of Biological Chemistry* (281), 30356-30364.

Lievremont JP, Hill AM, Hilly M, Mauger JP. (1994). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is localized on specialized sub-regions of the endoplasmic reticulum in rat liver. *Biochemical Journal* (300), 419-427.

Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR III. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnology* (17), 676-682.

Liu X, Bandyopadhyay BC, Singh BB, Groschner K, Ambudkar IS. (2005). Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3. *The Journal of Biological Chemistry* (280), 21600-21606.

Lo M-VC and Pak WL. (1981). Light-induced pigment granule migration in the reticular cells of *Drosophila melanogaster*. *Journal of General Physiology* (77), 155-175.

Lockwich TP, Liu X, Singh BB, Jadlovec J, Weiland S, Ambudkar IS. (2000). Assembly of TRP1 in a signalling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *The Journal of Biological Chemistry* (275), 11934-11942.

Lockwich TP, Singh BB, Liu X, Ambudkar IS. (2001). Stabilization of cortical actin induces internalization of transient receptor potential 3 (Trp3)-associated caveolar Ca²⁺ signaling complex and loss of Ca²⁺ influx without disruption of Trp3-inositol trisphosphate receptor association. *The Journal of Biological Chemistry* (276), 42401-42408.

Lussier MP, Cayouette S, Lepage PK, Bernier CL, Francoeur N, St-Hillaire M, Pinard M, Boulay G. (2005). MxA, a member of the Dymanine Superfamily, interact with the ankyrine-like repeat domain of TRPC. *The Journal of Biological Chemistry* (280), 19393-19400.

Mayer MP and Bukau B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Science* (62), 670-684.

McCormack AL, Schieltz DM, Goode B, Yang S, Barnes G, Drubin D, Yates JR III. (1997). Direct analysis and identification of proteins mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-fentomole level. *Analytic Chemistry* (69), 767-776.

Mehta D, Ahmmed GU, Paria BC, Holinstat M, Voyno-Yasenetskaya T, Tirupathi C, Minshall RD, Malik AB. (2003). RhoA interaction with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and transient receptor potential channel-1 regulates Ca²⁺ entry. Role in signaling increased endothelial permeability. *The Journal of Biological Chemistry* (278), 33492- 33500.

Mery L, Strauss B, Dufour JF, Krause KH, Hoth M. (2002). The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface expression in HEK293 cells. *Journal of Cell Science* (115), 3497-3508.

Miller PE and Denton MB. (1986). The quadrupole mass filter: basic operating concepts. *Journal of Chemical Ed* (63), 617-622.

Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX. (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular Cell*. (9), 229-231.

Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science* (13), 1435-1448.

Nelson H, Mandiyan S, Nelson N. (1989). A conserved gene encoding the 57-kDa subunit of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* (264), 1775-1778.

Niemeyer BA, Suzuki E, Scott K, Jalin K, Zuker CS. (1996). The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell* (85), 651-659.

Nilius B and Voets T. (2005). TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *European Journal of Physiology* (451), 1-10.

Nishi T and Forgac M. (2002). The vacuolar (H⁺)-ATPases nature's most versatile proton pumps. *Nature review* (3), 94-103.

Nishimune A, Isaac JT, Molnar E, Noel J, Nash SR, Tagaya M, Collingridge GL, Nakanishi S, Henley JM. (1998). NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* (21), 87-97.

Noel J, Ralph GS, Pickard L, Williams J, Molnar E, Uney JB, Collingridge GL, Henley JM. (1999). Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron* (23), 365-376.

Osten P, Srivastava S, Inman GJ, Vilim FS, Khatri L, Lee LM, States BA, Einheber S, Milner TA, Hanson PI, Ziff EB. (1998). The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP-dependant interaction with NSF and alpha – and beta-SNAPs. *Neuron* (21), 99-110.

Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium* (38), 233-252.

Petersen CCH, Berridge MJ, Borgese MF, Bennett, DL. (1995). Putative capacitative calcium entry channels: Expression of *Drosophila* trp and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochemical Journal* (311), 41-44.

Pontier SM, Lahaie N, Ginham R, St-Gelais F, Bonin H, Bell DJ, Flynn H, Trudeau LE, McIlhinney J, White JH, Bouvier M. (2006). Coordinated action of NSF and PKC regulates GABA_B receptor signalling efficacy. *The EMBO Journal* (25), 2698-2709.

Puthenveedu MA and Linstedt AD. (2005). Subcompartmentalizing the Golgi apparatus. *Current Opinion in Cell Biology* (17), 369-375.

Putney Jr JW. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* (7), 1-12.

Qin J and Chait BT. (1997). Identification and characterization of post-translational modifications of proteins by MALDI ion trap mass spectrometry. *Analytic Chemistry* (69), 4002-4009.

Ratajczak T, Ward BK, Minchin RF. (2003). Immunophilin chaperones in steroid receptor signalling. *Current Topics in Medicinal Chemistry* (3), 1348-1357.

Randriamampita C and Tsien RY. (1993). Emptying of intracellular Ca^{2+} Stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* (15), 429-445.

Reuss H, Mojet MH, Chyb S, Hardie RC. (1997). In vivo analysis of the *Drosophila* light-sensitive channels, TRP and TRPL. *Neuron* (19), 1249-1259.

Roepstorff P and Fohlman J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* (11), 601.

Rosenfeld J, Capedeville J, Guillemot JC, Ferrara P. (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytic Biochemistry* (203), 173-179.

Saimi Y and Kung C. (2002). Calmodulin as an ion channel subunit. *Annual Review of Physiology* (64), 289-311.

Scott K, Sun Y, Beckingham K, Zuker CS. (1997). Calmodulin regulation of *Drosophila* light-activated channels and receptor function mediates termination of the light response in vivo. *Cell* (91), 375-383.

Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Boucherie H, Mann M. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (93), 14440-14445.

Shin DW, Pan Z, Bandyopadhyay A, Bhat MB, Kin DH, Ma J. (2002). Ca²⁺-dependent interaction between FKBP12 and calcineurin regulates activity of the Ca²⁺ release channel in skeletal muscle. *Biophysical Journal* (83), 2539-2549.

Shi J, Mori E, Mori Y, Mori M, Li J, Ito Y, Inoue R. (2004). Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *Journal of physiology (London)* (561), 415-432.

Sidi S, Friedrich RW, Nicolson T. (2003) NompC TRP channels required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* (301), 96-99.

Simons K, Ikonen E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* (6633), 569-672.

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

Sinkins WG, Goel M, Estacion M, Schilling WP. (2004). Association of immunophilins with mammalian TRPC channels. *The Journal of Biological Chemistry* (279), 34521-34529.

Song I, Kamboj S, Xia J, Dong H, Liao D, Huganir RL. (1998). Interaction of the *N*-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* (21), 393-400.

Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* (29), 645-655.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2,4 Å resolution. *Nature* (345), 347-353.

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. *The Journal of Biological Chemistry* (276), 21303-21310.

Tang Y, Tang J, Chen Z, Trost C, Flockerzi V, Li M, Ramesh V, Zhu MX. (2000). Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. *The Journal of Biological Chemistry* (275), 37559-37564.

Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of endoplasmic reticulum- Ca^{2+} ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (87), 2466-2470.

Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drobak BK, Bjerrum PJ, Christensen SB, Hanley MR. (1994) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Action* (43), 187-194.

Treves S, Feriotto G, Moccagatta L, Gambari R, Zorzato F. (2000). Molecular cloning, expression, functional characterization, chromosomal localisation, and gene structure of junctate, a novel integral calcium binding protein of sarco(endo)plasmic reticulum membrane. *The Journal of Biological Chemistry* (275), 39555-39568.

Treves S, Franzini-Armstrong C, Moccagatta L, Arnoult C, Grasso C, Schrum A, Ducreux S, Zhu MX, Mikoshiba K, Girard T, Smida-Rezgui S, Ronjat M, Zorzato F. (2004). Junctate is a key element in calcium entry induced by activation of InsP3 receptors and/or calcium store depletion. *Journal of Cell Biology* (166), 537-548.

Vaca L and Kunze DL. (1994). Depletion of intracellular Ca²⁺ stores activates a Ca(2+)-selective channel in vascular endothelium. *American Journal of Physiology* (267), C920-C925.

Vannier B, Zhu X, Brown D, Birnbaumer L. (1998). The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation –scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *The Journal of Biological Chemistry* (273), 8675-8679.

Walker RG, Willingham AT, Zuker CS. (2000). A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science* (287), 2229-2234.

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 glomerulosclerosis. Science (308), 1801-1804.

Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH, Rothman JE. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. Cell (92), 759-772.

Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. (1995). TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. Proceedings of the National Academy of Sciences (92), 9652-9656.

Whiteheart SW, Schraw T, Matveeva EA. (2001). *N*-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) structure and function. Int. Rev. Cytol. (207), 71-112

Wu G and Solmo S. (2000). Molecular genetics and mechanism of autosomal dominant polycystic kidney disease. Molecular Genetics and Metabolism (69), 1-15.

Xiao B, Tu JC, Petralia RS, Yuan JP, Doan A, Breder CD, Ruggiero A, Lanahan AA, Wenthold RJ, Worley PF. (1998). Homer regulates the

association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* (21), 707-716.

Yates JR III, Speicher S, Griffin PR, Hunkapiller T. (1993). Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Analytic Biochemistry* (214), 397-408.

Yates JR III, McCormack AL, Schieltz D, Carmack E, Link A. (1997). Direct analysis of protein mixtures by tandem mass spectrometry. *Journal of protein chemistry* (16), 495-497.

Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. (1991). Bafilomycin A₁, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosome of cultured cells. *The Journal of Biological Chemistry* (266), 17707-17712.

Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, Dehoff MH, Schwarz MK, Seeburg PH, Muallem S, Worley PF. (2003). Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP(3) Receptor. *Cell* (114), 777-789.

Zhang W, Czernick AJ, Yungwirth T, Aebersold R, Chait BT. (1994). Matrix-assisted laser desorption mass spectrometric peptide mapping of proteins

separated by two-dimensional gel electrophoresis: determination of phosphorylation in synapsin I. *Protein Science* (3), 677-686.

Zhang Z, Tang J, Tikunova S, Johnson JD, Chen Z, Qin N, Dietrich A, Stefani E, Birnbaumer L, Zhu MX. (2001). Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (98), 3168-3173.

Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L. (1996). trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* (85), 661-671.