



Couplage fonctionnel entre un récepteur et un canal ionique: étude du canal KATP et application pour la création de biocapteurs

Julien Dupuis

► **To cite this version:**

Julien Dupuis. Couplage fonctionnel entre un récepteur et un canal ionique: étude du canal KATP et application pour la création de biocapteurs. Physiologie [q-bio.TO]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. <tel-00320387>

HAL Id: tel-00320387

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00320387>

Submitted on 10 Sep 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier – Grenoble I

UFR de Biologie

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ès SCIENCES DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline: Physiologie – Physiopathologies – Pharmacologie

présentée et soutenue publiquement

par

Julien DUPUIS

le 8 septembre 2008

**COUPLAGE FONCTIONNEL ENTRE UN RECEPTEUR ET UN CANAL
IONIQUE: ETUDE DU CANAL K_{ATP} ET APPLICATION POUR LA
CREATION DE BIOCAPTEURS**

Directeur de thèse

Dr Michel VIVAUDOU

Jury

Président: Pr Michel ROBERT-NICOUD

Rapporteur: Dr Gildas LOUSSOUARN

Rapporteur: Dr Catherine BERRIER

Examineur: Pr Bruno ALLARD

Examineur: Dr Michel VIVAUDOU

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements au Professeur Michel Robert-Nicoud, au Docteur Gildas Loussouarn, au Docteur Catherine Berrier, ainsi qu'au Professeur Bruno Allard pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Merci au Docteur Florent Guillain ainsi qu'au Professeur Eva Pebay-Peyroula de m'avoir successivement accueilli au sein du Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire puis du Laboratoire des Protéines Membranaires et d'avoir permis que ce travail s'effectue dans les meilleures conditions.

Un grand merci à Michel pour son encadrement, sa disponibilité, et sa compagnie. Un grand merci également à Jean et Tof pour leur aide considérable et leur collaboration précieuse, ainsi qu'à Didier Grünwald pour ses conseils précieux en microscopie confocale.

Merci à Nadine et Alain, mes parents, pour ces (longues) années d'accompagnement et d'encouragements. Promis, Tanguy fait son paquetage et apprend à faire lessive, cuisine et déclaration de revenus en solo. A Paulette, Doudou et Tilou mes p'tits razmokets. A mes grands-parents, Yvonne, Edouard, Lucie et Gaston, et à ma famille.

Merci à tous les anciens de BMC: Michèle, Juju, Eric, Jo-la-Fritte, Pat, Vincent, Simon, Clément, Béa, Sandrine, Heidi, Aurélie, Babeth, Anne, Anne-Emmanuelle, Carmen, Jean-Michel, Michel, Greg...au LPM-crew: Aurél, Chlo, Mitch, Lydia, Richard, Eric (le grand), Antoine, Titi, Carlos, Eric (le nain), et les autres.

Merci aux indéfectibles: les potes de bac à sable (Gaby, Chilou, l'Ours, DJ Xav, Tib), la colonie toulousaine (Rémy-la-cisaille, Cyril, Marie la pitchoun ariégeoise, Couicouette, Melon&Rataf et la Nullans Connexion (Jeanne, Léon, Achille, Céleste et Philomène)), et les grenoblois (Sly, Paulo, Hélène, Pierrot, Dam's, Mohammed-la-masse, Fred).

Merci à tous les boys des Centaures de Grenoble et à la colonie du foot US grenoblois, à Brett Favre, à Jerry Rice et Marshall Faulk (are you kidding me?).

A Marie pour tous les bons moments partagés tous les deux et pour tous ceux à venir.

Table des matières

Préambule	15
Introduction	19
Pré-requis : propriétés électriques des membranes et canaux ioniques	21
1. Rôles et caractéristiques générales des membranes	21
2. Propriétés électriques des membranes et canaux ioniques	24
A. Les canaux potassiques sensibles à l'ATP : K_{ATP}	31
1. Architecture moléculaire des canaux K_{ATP}	33
1.1 Composition moléculaire et stoechiométrie du canal K_{ATP}	33
1.2 Assemblage et adressage	35
2. Kir6.x, canal potassique rectifiant entrant	37
2.1 Les canaux Kir	37
2.1.1 Famille des canaux Kir	37
2.1.2 Rectification	39
2.1.3 Structure des canaux Kir	39
2.1.4 Régulation et pathologies associées	44
2.1.4.a Régulation	44
2.1.4.b Pathologies associées aux canaux Kir	46
2.2 Cas particuliers de Kir6.1 et Kir6.2	47
2.2.1 Localisations tissulaires	47
2.2.2 Régulation physiologique	48
3. SUR, un transporteur ABC particulier	50
3.1 Famille des transporteurs ABC	51
3.2 Topologie des transporteurs ABC	52
3.2.1 Organisation en domaines	52
3.2.1.a Domaines transmembranaires (TMD)	53
3.2.1.b Domaines de liaison des nucléotides (NBD)	53
3.2.1.c Autres domaines	53
3.2.2 Données Structurales	54
3.3 Mécanismes de transport	55
3.4 La sous famille ABCC	56
3.5 SUR, un « transporteur » régulant l'activité d'un canal ionique	59
3.5.1 Isoformes et localisations tissulaires	59
3.5.2 Régulation physiologique	60
3.5.3 SUR, régulateur des canaux Kir6.x	62
4. Les canaux K_{ATP} : un modèle de biocapteur physiologique	62
4.1 Association SUR/Kir6.x et couplage fonctionnel	62

4.1.1 Association	62
4.1.2 Couplage fonctionnel	63
4.2 Physiologie des canaux K_{ATP} et pathologies associées	64
4.2.1 Canaux K_{ATP} pancréatiques (diabète, PHHI)	64
4.2.2 Canaux K_{ATP} du système nerveux central	66
4.2.3 Canaux K_{ATP} cardiovasculaires	68
4.2.3.a Canaux K_{ATP} du myocarde	68
4.2.3.b Canaux K_{ATP} des muscles squelettiques	69
4.2.3.c Canaux K_{ATP} des muscles lisses	69
4.2.4 Autres canaux K_{ATP}	70
4.3 Pharmacologie des canaux K_{ATP}	71
4.3.1 Inhibiteurs pharmacologiques	72
4.3.2 Activateurs pharmacologiques	74
B. Récepteurs couplés aux protéines G et biocapteurs	77
1. Propriétés des GPCR	79
1.1 Familles de récepteurs couplés aux protéines G	79
1.1.1. Famille 1 ou A	80
1.1.2 Famille 2 ou B	81
1.1.3 Famille 3 ou C	81
1.1.4 Autres familles	82
1.2 Voies de signalisation des GPCR	82
1.2.1 Protéines G hétérotrimériques	82
1.2.2 Régulation de l'activité des GPCR	86
1.2.3 Voies de signalisation indépendantes des protéines G	88
1.3 Considérations structurales et fonctionnelles	89
1.4 GPCR et santé humaine	93
1.5 Cas particuliers des récepteurs M_2 et D_2	95
2. Régulation des canaux Kir par les GPCR	96
2.1 Régulation des canaux GIRK	96
2.2 Régulation des canaux K_{ATP}	98
3. Interactions directes GPCR/canaux et biocapteurs artificiels	99
3.1 Exemples d'interactions directes GPCR/canaux ioniques	99
3.1.1 Interaction D_1 /NMDA et D_1 / $Ca_v2.2$	99
3.1.2 Interaction D_2 /Kir3 et D_2 /CLIC6	101
3.1.3 Interaction D_5 /GABA _A	102
3.1.4 Interaction β_2 /Kir3 et β_2 / $Ca_v1.2$	103
3.2 Génération de biocapteurs artificiels par couplages GPCR/canaux	104
Matériel et Méthodes	111

1. Biologie moléculaire	114
1.1 Clones et vecteurs d'expression	114
1.2 Construction des protéines chimériques	116
1.2.1 Mutagenèse dirigée	116
1.2.2 Insertion/Délétion de grands fragments	117
1.3 Amplification du matériel génétique	118
1.3.1 Transformation de bactéries compétentes	118
1.3.2 Amplification et purification de l'ADN plasmidique	119
1.4 Séquençage	120
1.5 Transcription in vitro	120
2. Expression hétérologue dans l'ovocyte de Xénope	122
2.1 L'ovocyte de Xénope, outil pour l'expression fonctionnelle	122
2.2 Préparation des ovocytes	124
2.3 Injection des ARNm	124
3. Caractérisation des protéines membranaires exprimées	125
3.1 Contrôle de la synthèse protéique	125
3.2 Contrôle de l'adressage membranaire	127
3.3 Contrôle de la fonctionnalité des protéines	127
3.3.1 Technique du patch-clamp	127
3.3.1.a Principe du patch-clamp	127
3.3.1.b Instrumentation mise en œuvre en patch-clamp	129
3.3.1.c Configurations de travail en patch-clamp	131
3.3.1.d Conditions expérimentales de travail	133
3.3.2 Two Electrode Voltage Clamp (TEVC)	138
3.3.2.a Principe du TEVC	138
3.3.2.b Conditions expérimentales	139
Résultats	141
A. Etude du couplage fonctionnel entre SUR2A et Kir6.2	143
1. Position du problème	145
2. Résultats	146
2.1 Etude du domaine N-terminal TMD0/L0 de SUR2A	146
2.1.1. Suppression du domaine TMD0 de SUR2A	147
2.1.2. Remplacement du domaine TMD0 de SUR2A	149
2.1.3. Insertion du TMD0 de SUR2A dans d'autres ABCC	151
2.1.4. Chimères entre les TMD0 de SUR2A et MRP1	153
2.2 Rôle essentiel d'un domaine C-terminal proximal cytoplasmique	154
2.2.1 Identification d'un défaut de couplage et d'adressage	155
2.2.2 Trois résidus C-terminaux de SUR2A sont essentiels pour	

l'expression des canaux K_{ATP} et leur activation par le P1075	157
2.2.3 Les canaux SUR2A(EIL/AAA) présentent un défaut d'activation par le P1075 sans changement d'affinité	162
2.2.4 Les canaux SUR2A(EIL/AAA) présentent un défaut d'activation par le SR47063 sans changement d'affinité	163
2.2.5 La triple mutation E1305A/I1310A/L1313A dans SUR2A abolit l'activation par le MgADP	165
2.2.6 L'inhibition par l'ATP et le glibenclamide ne sont pas affectés chez le mutant SUR2A(EIL/AAA)	167
3. Discussion	169
3.1 Le domaine TMD0: un élément essentiel pour l'association et les processus d'inhibition?	169
3.2 Implication d'un domaine C-terminal de SUR2A dans les processus d'activation	170
3.2.1 Les résidus E1305, I1310 et L1313 jouent un rôle critique à l'interface entre SUR2A et Kir6.2	171
3.2.2 La partie C-terminale proximale de SUR2A est impliquée dans les processus d'activation couplant la fixation de ligands à SUR2A aux modifications des propriétés d'ouverture de Kir6.2	172
3.2.3 Les processus d'inhibition et d'activation des canaux K_{ATP} reposent sur des voies de transduction différentes	173
B. Création de biocapteurs électriques par assemblage du canal potassique Kir6.2 avec des GPCR	175
1. Position du problème	177
2. Résultats	178
2.1 Génération de biocapteurs hM ₂ -Kir6.2	178
2.1.1 Construction et expression de fusions hM ₂ -Kir6.2	178
2.1.2 Caractérisation fonctionnelle des ICCR hM ₂ -Kir6.2	179
2.1.3 Contrôle du caractère direct du couplage fonctionnel	183
2.2 Génération de biocapteurs hD ₂ -Kir6.2	186
3. Discussion	188
3.1 Les ICCR, un nouveau type de biocapteur électrique moléculaire	188
3.2 ICCR hM ₂ -Kir6.2 et hD ₂ -Kir6.2: implications mécanistiques	189
Conclusion et Perspectives	191
Références Bibliographiques	195

Liste des abréviations

ABC	ATP-Binding-Cassette
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADP	Adénosine Di-Phosphate (MgADP: Magnésium-ADP)
Amp	Ampicilline
AMPc	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine Tri-Phosphate (MgATP: Magnésium-ATP)
BSA	Bovine Serum Albumin
CAM	Constitutively Active Mutants
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
C-ter	Extrémité Carboxy-terminale d'une protéine
DAG	DiAcylGlycerol
DAPCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DEPC	DiEthyl PyroCarbonate
EGTA	Ethylene Glycol-bis-(β -aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
GABA	γ -Amino Butyric Acid
GAP	GTPase Activating Proteins
GDP	Guanidine Di-Phosphate (MgGTP: Magnésium-GDP)
GIRK	G protein-coupled Inwardly-Rectifying K ⁺ channel
GPCR	G Protein-Coupled Receptors
GRK	G-protein Receptor Kinases
GTP	Guanidine Tri-Phosphate (MgGTP: Magnésium-GTP)
HA	HemAgglutinin
hM ₂	human Muscarinic receptor 2
hD ₂	human Dopaminergic receptor 2
IC ₅₀	concentration de demi-inhibition
ICD	IntraCellular Domain
ICCR	Ion Channel Coupled Receptor
K _{ATP}	Canal potassique sensible à l'ATP
KCO	K ⁺ Channel Opener

Kir	K ⁺ inward rectifier
L0	Loop 0
LB	Luria-Bertani
LC-CoA	Long-Chain acyl-CoenzymeA
LTC ₄	LeukoTriene C ₄
μA	microAmpère
μM	microMolaire
mM	milliMolaire
mV	milliVolt
MDR	MultiDrug Resistance
MET	Microscopie Electronique en Transmission
MRP	Multidrug Resistance Protein
NBD	Nucleotide Binding Domain
nM	nanoMolaire
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
N-ter	Extrémité amino-terminale d'une protéine
pA	picoAmpère
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pgp	P-glycoprotein (= MDR1: MultiDrug Resistance 1)
Pi	Phosphate inorganique
PHHI	Persistent Hyperinsulinemic-Hypoglycemia of Infancy
PIP ₂	Phosphatidyl Inositol 4,5-bis Phosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PTX	Pertussis ToXin
RGS	Regulator of G protein Signaling
SBP	Substrate Binding Protein
SUR	SulfonylUrea Receptor
TBS	Tris Buffer Saline
TMD	TransMembrane Domain
UDP	Uridine Di-Phosphate (MgUDP: Magnésium-UDP)
UTP	Uridine Tri-Phosphate (MgUTP: Magnésium-UTP)
YCF1	Yeast Cadmium Factor 1

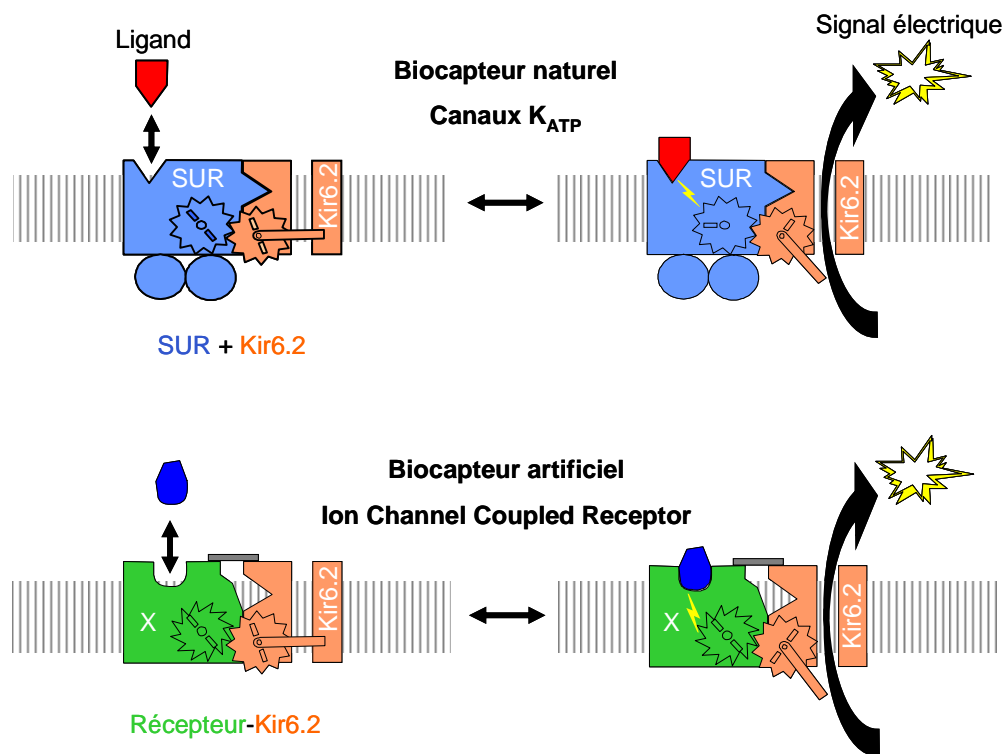
Préambule

Les canaux ioniques sont des constituants essentiels des membranes des cellules excitables, participant à de nombreuses fonctions physiologiques telles que la transmission nerveuse, l'activité cérébrale ou l'activité cardiaque. Parmi cette classe de protéines membranaires, les canaux potassiques sensibles à l'ATP, ou K_{ATP} , jouent un rôle primordial dans la sécrétion pancréatique d'insuline et participent au contrôle du tonus vasculaire ainsi que de l'excitabilité des cellules musculaires cardiaques et neuronales. Constitués de l'assemblage unique d'un récepteur membranaire appartenant à la famille des transporteurs à ATP-Binding-Cassette (ABC), le récepteur des sulphonylurées SUR, et d'un canal potassique rectifiant entrant, Kir6.2, ces canaux couplent le métabolisme cellulaire au potentiel membranaire et constituent en ce sens un modèle naturel de biocapteur.

Le caractère unique de cet assemblage tient au fait qu'en plus d'interagir physiquement avec Kir6.2, SUR est capable de réguler l'activité du canal suite à la fixation de ligands: ainsi, la fixation de nucléotides, d'activateurs ou d'inhibiteurs pharmacologiques à SUR entraîne des modifications des propriétés d'ouverture de Kir6.2. Si les sites d'interaction de ces effecteurs sont désormais connus, les mécanismes par lesquels la communication s'établit entre les deux sous-unités restent obscurs. La première partie de ce travail a donc été consacrée à la recherche des déterminants moléculaires intervenant dans le couplage fonctionnel du récepteur des sulphonylurées SUR au canal potassique rectifiant entrant Kir6.2. Utilisant une stratégie chimérique, nous avons identifié une région C-terminale de l'isoforme SUR2A essentielle aux mécanismes d'activation du canal, assurant le lien entre la fixation de ligands à SUR et l'ouverture de Kir6.2.

Parallèlement à ce travail, nous avons utilisé notre connaissance du modèle du canal K_{ATP} pour développer, dans le cadre du projet européen Receptronics, un nouveau type de biocapteur fondé sur le couplage fonctionnel entre Kir6.2 et d'autres récepteurs membranaires substitués à SUR. L'essor du criblage haut-débit de molécules pharmacologiques implique une miniaturisation nécessitant un affranchissement des systèmes de détection cellulaires ainsi que des techniques à base de fluorescence ou de radioactivité classiquement employés. De ce fait, le développement de capteurs électriques moléculaires représente une solution séduisante, et la mise au point de systèmes intégrant sur puce électronique des récepteurs artificiellement couplés avec des canaux ioniques, ou Ion Channel Coupled Receptors (ICCR), pourrait constituer une alternative intéressante aux technologies actuelles: la fixation

d'un ligand spécifique sur le récepteur entraînerait l'activation du canal et l'apparition de flux ioniques mesurables en temps réel *via* l'interface électronique. Dans cette optique, avons cherché à remplacer SUR par d'autres récepteurs et à les coupler fonctionnellement à Kir6.2.



Représentation schématique du canal K_{ATP} , biocapteur naturel, et des biocapteurs électriques artificiels basés sur son modèle. La fixation d'un ligand à SUR entraîne l'ouverture de Kir6.2. Dans le cas des biocapteurs artificiels, SUR est remplacé par un récepteur X.

Notre choix s'est porté sur les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Ceux-ci constituent l'une des plus larges familles de récepteurs membranaires, impliqués dans de nombreux processus physiologiques (et pathologiques) tels que le contrôle de l'excitabilité neuronale et cardiaque, et sont des cibles pharmacologiques majeures. De plus, certains d'entre eux interagissent naturellement avec des canaux ioniques et régulent leur activité, ce qui en fait de bons candidats pour une telle approche. Ainsi, par ingénierie protéique, nous avons créé deux modèles d'ICCR impliquant respectivement les récepteurs muscarinique M_2 et dopaminergique D_2 .

Introduction

**Pré-requis: propriétés électriques des
membranes et canaux ioniques**

1. Rôles et caractéristiques générales des membranes

Toutes les cellules de l'organisme sont limitées par une membrane plasmique hydrophobe garantissant l'intégrité cellulaire et permettant la compartimentation, la régulation des échanges cellule/environnement, ou encore le contrôle des flux d'informations entre les cellules. En plus de cette membrane plasmique, les cellules eucaryotes sont également dotées de membranes internes délimitant des organites intracellulaires et assurant quelques-uns des rôles fondamentaux des mitochondries, chloroplastes ou lysosomes.

La membrane plasmique est principalement composée de lipides (phospholipides, glycolipides et cholestérol) organisés en deux feuillets tête-bêche formant une barrière physique imperméable entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme. Les autres composants essentiels de la membrane sont les protéines membranaires, assurant les fonctions de transport et de communication avec le milieu extracellulaire indispensables à la survie cellulaire. Celles-ci peuvent être intrinsèques ou extrinsèques selon qu'elles traversent intégralement la bicouche lipidique ou qu'elles soient périphériques, et peuvent être glycosylées ou non.

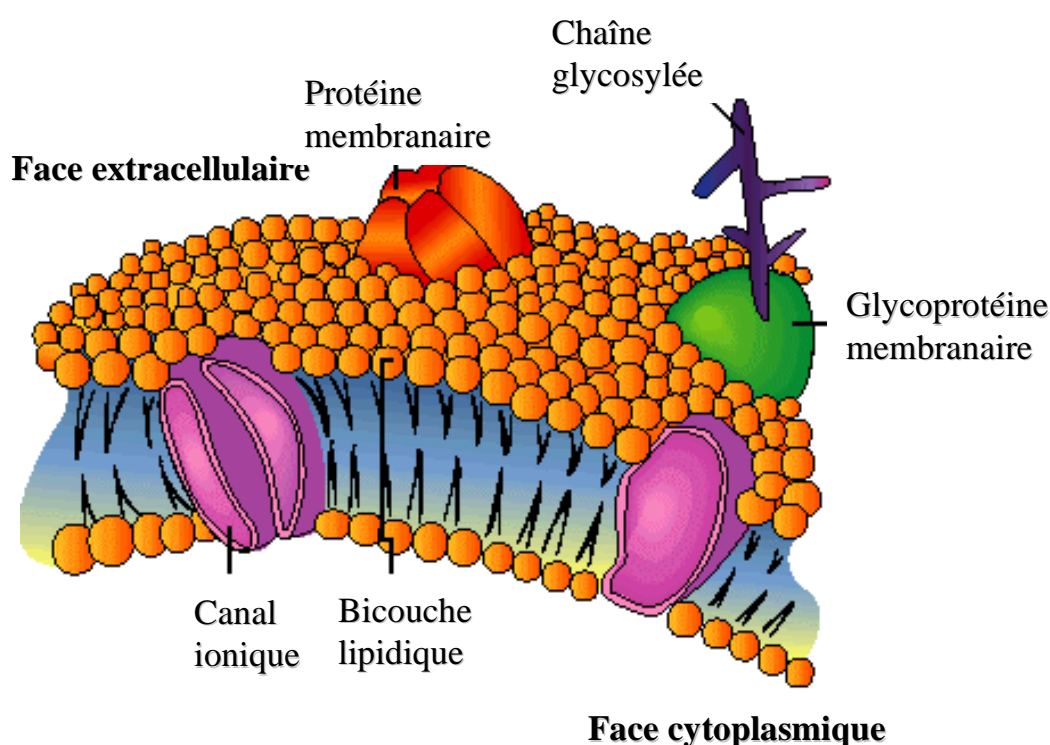


Figure 1 : Représentation schématique de la membrane plasmique.

La nature lipidique de la membrane lui confère une relative imperméabilité vis-à-vis des

molécules hydrosolubles. Le transport des ions et des molécules polaires telles que les sucres ou les acides aminés est donc assuré par des protéines transmembranaires spécialisées: les transporteurs et les canaux ioniques. Les transporteurs utilisent l'énergie de gradients de concentration (transport passif) ou de l'hydrolyse de l'ATP (transport actif) pour faire passer des ions ou des molécules d'un côté à l'autre de la membrane (vitesse de transport comprise entre 10 et 10^3 molécules par seconde). Les canaux ioniques laissent passer spécifiquement des ions (flux allant jusqu'à 10^7 voir 10^8 ions par seconde) et leurs ouverture/fermeture sont régulées par différents facteurs suivant la nature des canaux considérés: variation du potentiel membranaire, de la pression, ou encore fixation d'un ligand.

2. Propriétés électriques des membranes et canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des éléments essentiels des membranes des cellules excitables. Permettant le passage d'ions (les ions ne diffusent pas spontanément à travers la bicouche lipidique qui leur est imperméable), ils interviennent dans la modulation du potentiel de membrane, engendrent des signaux électriques, et régulent des flux d'ions. Ils contrôlent également le volume cellulaire, l'excitation des cellules nerveuses et musculaires (propagation rapide de signaux électriques sur de longues distances), la transmission synaptique, la contraction musculaire, et certains phénomènes de sécrétion entre autres activités (Hille, 2001).

L'étude de ces canaux repose essentiellement sur la mesure des phénomènes électriques qu'engendrent les flux ioniques qui les traversent. Tout courant électrique I (en ampères A) est défini par un flux de charges passant par un point donné par unité de temps (seconde): les courants ioniques correspondent donc à des flux d'ions passant par un point donné (canal ionique) par seconde, et sont généralement compris entre quelques picoampères (pA) et quelques microampères (μ A) suivant que l'on observe l'activité d'un ou plusieurs canaux simultanément. Par convention, l'intensité I d'un courant dit « entrant » (flux entrant de cations ou sortant d'anions) est négative, et positive pour un courant dit « sortant » (flux sortant de cations ou entrant d'anions).

Comme toute particule chargée, un ion gagne ou perd de l'énergie en se déplaçant d'un point à un autre de potentiels différents, cette différence de potentiel étant notée ΔV (en volts, V). C'est ce qui se produit lorsqu'un ion passe d'une face à l'autre de la membrane plasmique présentant des potentiels différents. Cette différence de potentiel entre la face interne et la face

externe de la membrane est appelée potentiel de membrane, noté E_m :

$$E_m = V_{\text{int}} - V_{\text{ext}} \quad (1)$$

On appelle généralement potentiel de repos (E_r) le potentiel de membrane lorsque la cellule est à l'état d'équilibre et qu'aucun courant net de charges ne traverse la membrane. Par convention, on dit qu'on dépolarise la membrane lorsqu'on applique un potentiel moins négatif (ou plus positif) que E_m et qu'on l'hyperpolarise lorsqu'on applique un potentiel plus négatif (ou moins positif). La valeur du potentiel de membrane E_m dépend des potentiels d'équilibres respectifs de l'ensemble des ions perméants présents de part et d'autre de la membrane plasmique, et donc des concentrations respectives de ces ions de chaque côté de la membrane. Cette valeur se rapproche généralement du potentiel d'équilibre de l'ion x (E_x) le plus perméant (conductance ionique dominante), donné par la loi de Nernst (équation (4)). Au repos, la membrane étant plus perméable aux ions K^+ que Na^+ , Ca^{2+} et Cl^- , le potentiel de repos de la cellule est donc proche du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ , et est généralement compris entre -50 et -80 mV.

Du fait de son épaisseur (3 nm environ) et de son imperméabilité aux ions, la membrane plasmique peut être schématiquement assimilée à un condensateur de capacité C (en farads, F) capable d'accumuler des charges (Q , en Coulombs C) en réponse à l'application de variations de potentiel ΔV : plus la surface de la membrane est grande, et plus sa capacité C est importante.

$$C = \frac{Q}{\Delta V} \quad (2)$$

Dans son état ouvert, un canal ionique peut être assimilé à une résistance. Par commodité, on parle dans le cas des canaux ioniques de conductance γ ou G (en Siemens, S) plutôt que de résistance R , la conductance étant l'inverse de la résistance ($G = 1 / R$), pour exprimer la facilité avec laquelle un courant traverse un canal. Cette conductance est définie par la loi d'Ohm ($U = R.I$), qui appliquée aux membranes biologiques a la forme suivante:

$$E = R \times I \quad \text{ou} \quad I = G \times E \quad (3)$$

où la tension U (différence de potentiel électrique) est remplacée par le potentiel de membrane E (également différence de potentiel $V_{\text{int}} - V_{\text{ext}}$).

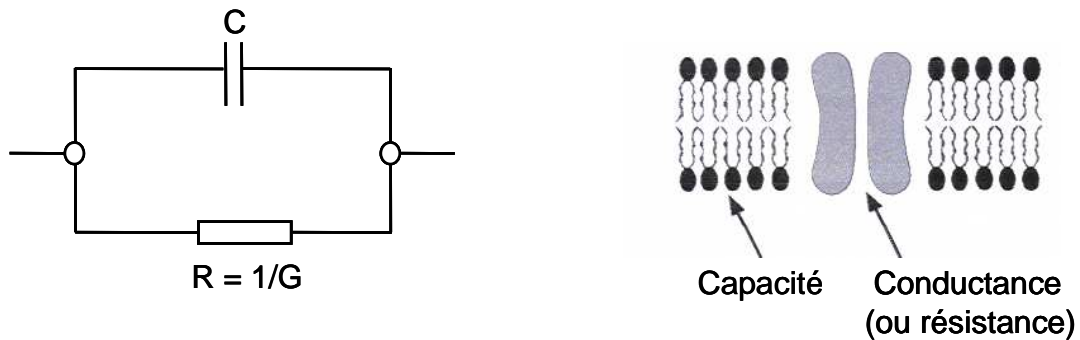


Figure 2 : La membrane plasmique se comporte comme un condensateur électrique (capacité C) monté en parallèle avec une résistance R (ou conductance G).

On peut donc représenter un canal ionique comme un circuit électrique avec une résistance (ou conductance = canal), un interrupteur (état ouvert / état fermé du canal) et une pile (potentiel d'inversion du courant ionique). Si le canal est très sélectif et perméable à un seul type d'ion, le potentiel d'inversion est égal au potentiel de Nernst de l'ion considéré.

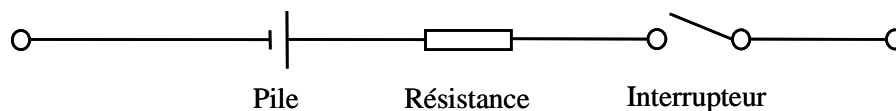


Figure 3 : Représentation schématique du circuit électrique correspondant à un canal ionique.

Dans les cellules eucaryotes, la distribution des ions de part et d'autre de la membrane est inégale: les ions Na^+ , Ca^{2+} et Cl^- sont plus concentrés à l'extérieur qu'à l'intérieur des cellules, et inversement pour les ions K^+ (**Tableau 1**). Ces gradients de concentration, produits de l'activité de transporteurs actifs et de l'imperméabilité membranaire vis-à-vis des ions, sont les moteurs des transferts ioniques passifs par diffusion.

	Concentration intracellulaire	Concentration extracellulaire
Na ⁺	5-15 mM	135-145 mM
K ⁺	140 mM	3.5-5 mM
Cl ⁻	5-15 mM	110 mM
Ca ²⁺	0.1 μM	1-2 mM

Tableau 1 : Concentrations moyennes des espèces ioniques libres à l'intérieur et à l'extérieur d'une cellule de mammifère.

De ce fait, les ions K⁺, en excès à l'intérieur de la cellule, ont tendance à sortir par diffusion passive sous l'effet de leur gradient de concentration. Néanmoins, les flux ioniques ne sont pas régis uniquement par les gradients chimiques: les ions étant des espèces chargées, leur répartition inégale de part et d'autre de la membrane induit l'apparition de gradients électriques. La somme de ces deux gradients permet de définir le potentiel électrochimique d'équilibre de l'ion x considéré, ou potentiel de Nernst, indiquant la valeur de potentiel à laquelle les gradients sont également opposés et les flux pour cet ion sont nuls:

$$E_x = \left(\frac{R \times T}{z \times F} \right) \times \ln \left(\frac{[x]_e}{[x]_i} \right) \quad (4)$$

avec E_x, le potentiel d'équilibre de l'ion x considéré

R, la constante des gaz parfaits

T, la température absolue (en kelvins, K)

z, la valence de l'ion x considéré

F, la constante de Faraday

[x]_i et [x]_e, concentrations intra- et extracellulaires de l'ion x considéré

Un flux de 10⁷ ions monovalents (cas du K⁺) par seconde à travers un canal correspond à un courant électrique d'une intensité de 1,6 pA. L'intensité de courant unitaire i traduit la facilité avec laquelle l'ion traverse le canal. Elle est décrite par la loi d'Ohm:

$$\Delta V = (E_m - E_{ion}) = r_{ion} \times i_{ion} \quad (5)$$

$$\text{donc } i_{ion} = \gamma_{ion} \times (E_m - E_{ion})$$

avec γ_{ion} , la conductance du canal (inverse de la résistance r_{ion})

E_m , le potentiel de membrane

E_{ion} , le potentiel d'équilibre de l'ion

$E_m - E_{ion}$, la force électromotrice (driving force) appliquée à l'ion

Si on généralise à l'ensemble de la cellule, l'intensité de courant I traversant l'ensemble des canaux est notée:

$$I_{ion} = g_{ion} \times (V_m - E_{ion}) \quad (6)$$

avec g_{ion} , la conductance pour l'ion considéré de l'ensemble des canaux de la cellule

On parle alors non plus de courants unitaires mais de courants macroscopiques.

Très souvent, l'étude d'un canal ionique donné passe par la construction, grâce à la technique du patch-clamp (Neher et Sakmann, 1976; cf. partie Matériel et Méthodes), de courbes de courant (I) représenté comme une fonction du potentiel imposé (V), ou courbes « I-V », constituant la signature du canal. Si on se place en conditions équimolaires de part et d'autre de la membrane, le flux de courant à travers un canal idéal suit alors la loi d'Ohm et la pente de la droite obtenue correspond à la conductance γ du canal.

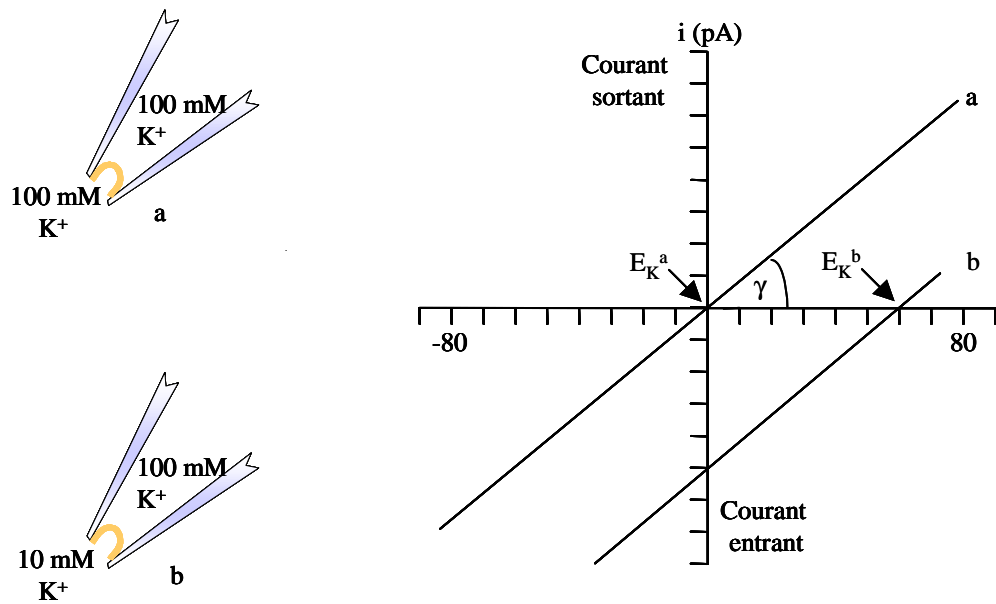


Figure 4 : Variation de courant en fonction du potentiel de membrane dans le cas où les concentrations en ion K^+ sont identiques (a; $E_K = 0$) et différentes (b; $E_K = + 60$ mV) de part et d'autre de la membrane. La pente donne la valeur de la conductance γ .

Le potentiel d'inversion mesuré E_K nous donne une indication sur la nature des flux d'ions à l'origine du courant observé, tandis que la conductance γ nous renseigne sur le nombre de canaux ouverts par unité de surface membranaire.

A

Les canaux K_{ATP}

1. Architecture moléculaire des canaux K_{ATP}

Produits de l'assemblage unique d'un récepteur membranaire de la famille des transporteurs à ATP-binding cassette (ABC) et d'un canal potassique, les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) sont des canaux potassiques rectifiant entrants inhibés par l'ATP et activés par le MgADP. Cette sensibilité particulière aux nucléotides adénylés intracellulaires leur confère un rôle primordial au sein des cellules excitables où ils couplent le métabolisme cellulaire au potentiel de membrane. Présents au sein de tissus variés tels que les muscles cardiaques, les muscles squelettiques et muscles lisses, les neurones ou encore le pancréas, ils interviennent de ce fait dans de nombreuses fonctions essentielles telles que le contrôle de la durée du potentiel d'action cardiaque, de la relaxation des muscles vasculaires lisses, de la libération de neurotransmetteurs ou encore de la sécrétion d'insuline.

1.1 Composition moléculaire et stoechiométrie du canal K_{ATP}

Les canaux K_{ATP} résultent de l'assemblage de deux sous-unités: le canal sélectif au potassium rectifiant entrant Kir6.x (~450 acides aminés), associé au récepteur des sulphonylurées SUR (~1600 acides aminés). Suivant les tissus considérés, on trouve deux isoformes différentes de Kir6.x (*i.e.* Kir6.1 dans les muscles lisses et Kir6.2 dans le pancréas, le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques) et trois isoformes de SUR (*i.e.* SUR1 dans le pancréas, SUR2A dans le cœur et les muscles squelettiques, et SUR2B au niveau des muscles lisses des vaisseaux sanguins). De structure hétérooctamérique, les canaux sont constitués d'un pore central formé de quatre sous-unités Kir6.2, entouré par quatre sous-unités SUR (Clement *et al.*, 1997) jouant un rôle régulateur (**Figure 5**). L'ensemble forme un complexe d'environ 950 kDa. La présence simultanée des deux sous-unités est indispensable pour que le canal soit fonctionnel à la membrane plasmique (Inagaki *et al.*, 1995a), et leur association physique a été confirmée dans le cas du canal K_{ATP} cardiaque par des études de co-immunoprécipitation (Lorenz et Terzic, 1999).

A l'image de nombreux autres membres de la famille des canaux potassiques rectifiant entrants (Kir), Kir6.2 s'assemble en tétramère pour former le pore potassique central des canaux K_{ATP} (Clement *et al.*, 1997; Shyng et Nichols, 1997). La stoechiométrie finale du complexe a pu être déterminée grâce à l'utilisation de tandems SUR1-Kir6.2 fusionnés: la construction SUR1-Kir6.2 présente des propriétés similaires à celles des canaux natifs,

contrairement aux tandems SUR1-Kir6.2-Kir6.2 ne permettant pas spontanément la formation de canaux sauf si ils ont coexprimés avec SUR1. Ceci indique que chaque sous-unité Kir6.2 requiert une sous-unité SUR et suggère qu'une stoechiométrie 1:1 est nécessaire pour le bon fonctionnement des canaux (Clement *et al.*, 1997; Inagaki *et al.*, 1997). La structure octamérique du canal K_{ATP} a été confirmée par des études biochimiques qui montrent que la masse moléculaire du complexe est d'environ 950 kDa, ce qui correspondrait à quatre sous-unités SUR1 et quatre sous-unités Kir6.2 (Clement *et al.*, 1997) (**Figure 5**).

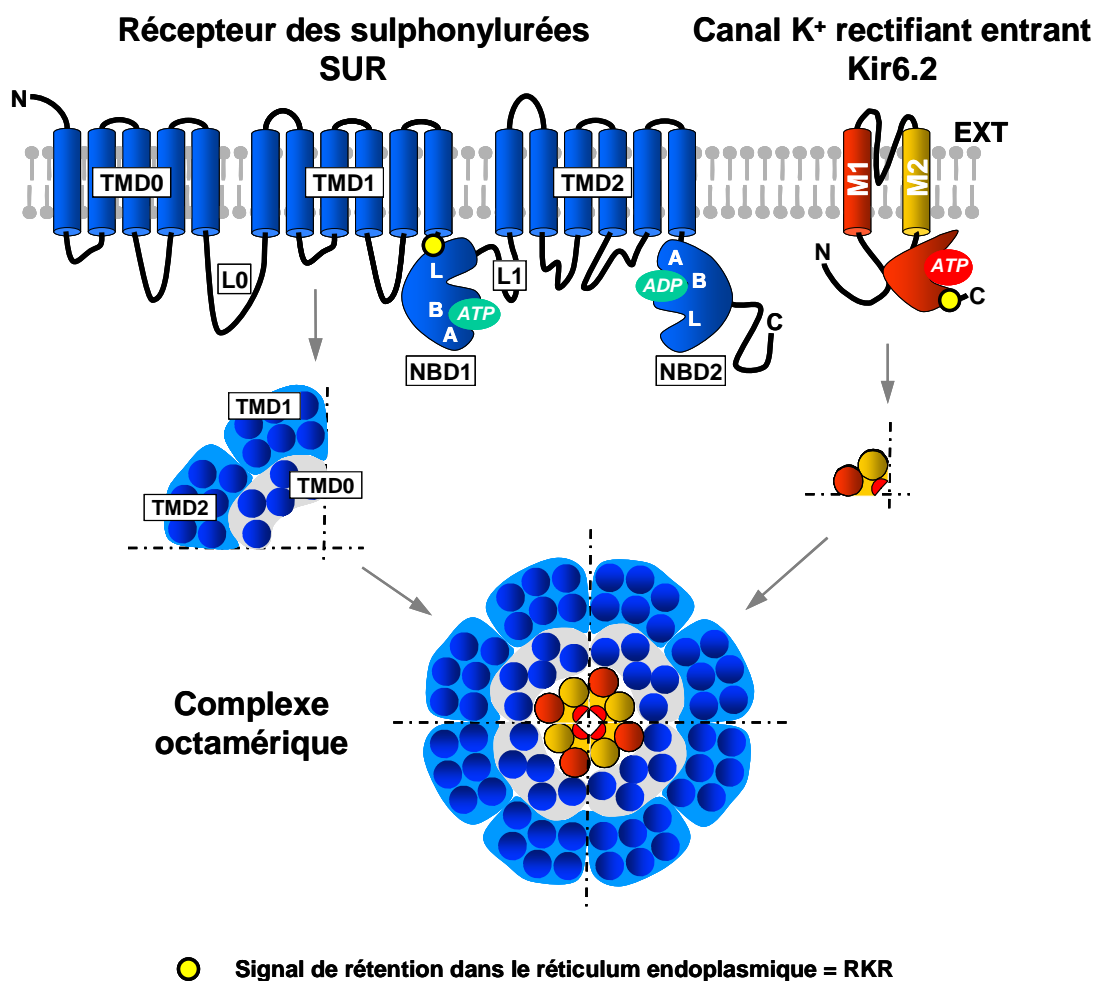


Figure 5 : Topologie et stoechiométrie du canal K_{ATP} . Kir6.2 possède deux hélices transmembranaires et un site de liaison des nucléotides; SUR possède trois domaines transmembranaires (TMD0,1&2) et deux domaines de liaison des nucléotides (NBD1&2) comportant les séquences consensus Walker A, Walker B et Linker L (= signature ABC). La présence de signaux de rétention dans le réticulum endoplasmique sur les deux sous-unités permet de restreindre l'adressage membranaire aux canaux de configuration octamérique.

De plus, la structure tridimensionnelle du complexe en microscopie électronique à basse résolution (18Å) (Mikhaïlov *et al.*, 2005) confirme cette stoechiométrie avec quatre sous-unités SUR englobant un pore central formé de quatre sous-unités Kir6.2.

1.2 Assemblage et adressage

Les modalités d'assemblage du canal *in vivo* sont encore méconnues, mais certains résultats suggèrent que SUR1 interagit rapidement avec Kir6.2 monomérique dans le réticulum endoplasmique, et non pas avec des tétramères de Kir6.2, et stabilise cette forme monomérique. La formation du complexe octamérique se ferait alors à partir de ces hétéromères SUR1/Kir6.2 (Crane et Aguilar-Bryan, 2004). Un certain nombre de zones d'interaction entre sous-unités potentiellement mises en jeu au cours de cette assemblage ont été rapportées: ainsi, le domaine N-terminal TMD0 de SUR1 s'associe fortement à Kir6.2 et module son adressage ainsi que ses propriétés d'ouverture (Chan *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2006), de même qu'un segment cytoplasmique de SUR2A reliant les domaines TMD2 et NBD2 interagit également avec Kir6.2 et perturbe l'adressage du canal natif lorsqu'il est coexprimé avec SUR2A et Kir6.2 (Rainbow *et al.*, 2004a/2004b).

L'observation de Tucker *et al.* (1997) que Kir6.2 tronqué de ses trente-six résidus C-terminaux est capable de former en absence de SUR des canaux donnant lieu à des courants à la membrane plasmique s'explique par la présence dans ces trente-six résidus d'une séquence riche en arginines de trois acides aminés, RXR (**Figure 5**), qui agit comme signal de rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique (Zerangue *et al.*, 1999). Un signal identique est présent chez SUR, localisé dans le segment cytoplasmique reliant les domaines TMD1 et NBD1. Ce signal interviendrait au moment de l'assemblage des canaux K_{ATP} et interagirait avec des dimères de protéine 14-3-3 (Yuan *et al.*, 2003): dans un premier temps, SUR1 masquerait stériquement le signal de rétention de Kir6.2, puis 14-3-3 masquerait celui de SUR1, permettant ainsi la sortie du réticulum endoplasmique et l'adressage à la membrane plasmique (Heusser *et al.*, 2006) (**Figure 6**).

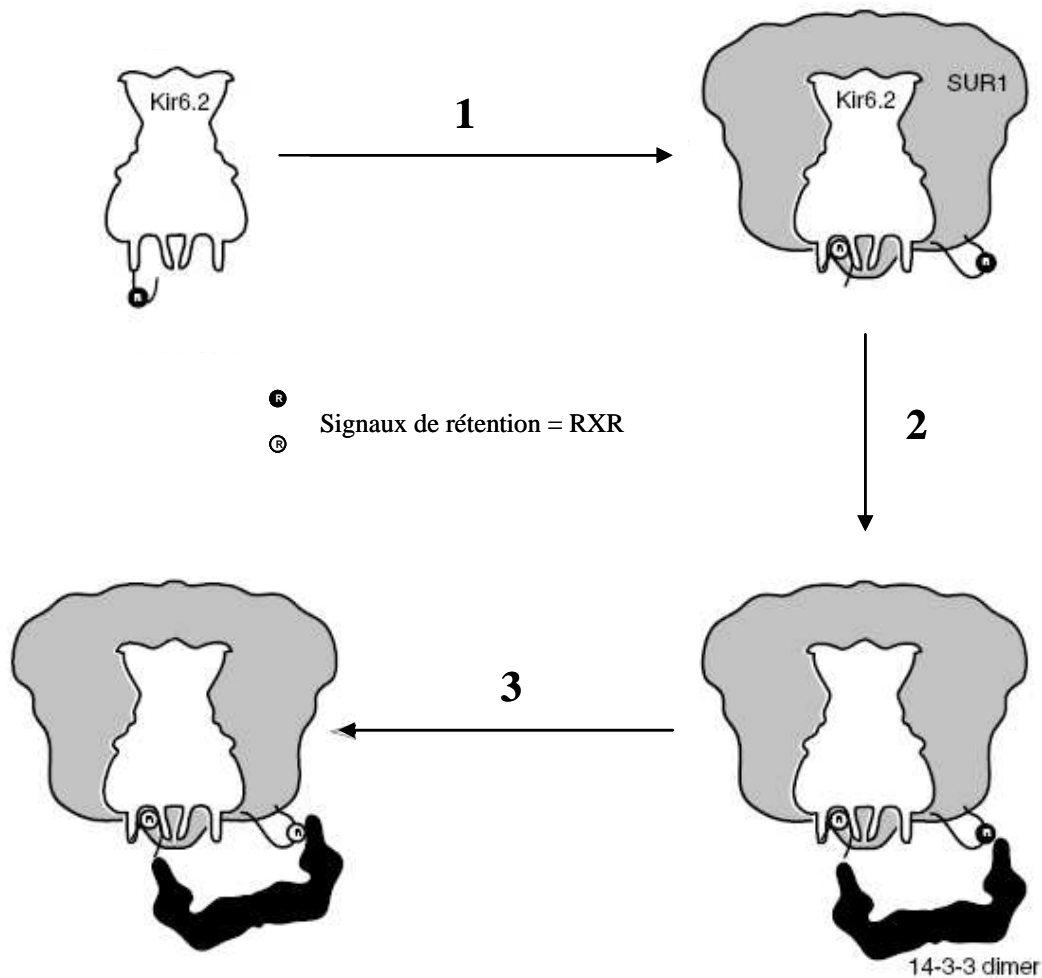


Figure 6 : *Modèle hypothétique d'assemblage des canaux K_{ATP} dans le réticulum endoplasmique (d'après Heusser et al., 2006). SUR1 s'associe avec Kir6.2 et masque son signal de rétention. 14-3-3 reconnaît ensuite Kir6.2 puis masque le signal de rétention de SUR1, permettant la sortie du réticulum et l'adressage à la membrane plasmique du complexe.*

L'assemblage hétérodimérique confirme l'idée selon laquelle une interaction transitoire entre 14-3-3 et les dimères SUR/Kir6.2 pourrait être un facteur clé de la rétention au niveau du réticulum endoplasmique et du contrôle qualité des canaux natifs.

D'autres facteurs modulent également la présence à la membrane plasmique des canaux K_{ATP} par des mécanismes méconnus. Par exemple, l'application de sulphonylurées permet de rétablir l'expression à la membrane plasmique de canaux porteurs de mutations dans SUR1 prévenant leur association avec Kir6.2 (Yan *et al.*, 2004), de même que le fait de diminuer la température (Yang *et al.*, 2005).

2. Kir6.x, canal potassique rectifiant entrant

Les canaux Kir6.x appartiennent à la famille des canaux potassiques rectifiant entrants (en anglais: K⁺ inward rectifier, ou Kir). Il en existe deux isoformes chez l'homme, de localisations tissulaires distinctes, Kir6.1 (Ämmälä *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1997) et Kir6.2 (Inagaki *et al.*, 1995a, 1995b, 1995c; Sakura *et al.*, 1995a, 1995b), l'isoforme Kir6.2 étant principalement exprimée dans les cellules β pancréatiques, le cerveau, le coeur et le muscle squelettique, tandis que Kir6.1 s'exprime essentiellement dans le muscle lisse. Une troisième isoforme, Kir6.3, a récemment été identifiée chez le poisson zèbre (Zhang *et al.*, 2006). Les trois isoformes sont extrêmement proches et partagent ~70 % d'identité de séquence en acides aminés, les seules divergences de séquences entre ces isoformes étant concentrées au niveau de la boucle extracellulaire entre les deux hélices transmembranaires M1 et M2 et dans la partie C-terminale cytoplasmique. Le gène codant pour Kir6.2 (*kcnj11*) est dépourvu d'introns et semble apparié à celui de SUR1, puisqu'il le suit immédiatement sur le chromosome 11 au niveau du locus 11p15.1 (Inagaki *et al.*, 1995b). Les gènes codant pour Kir6.1 (*kcnj8*), contenant 3 exons, et SUR2 sont eux localisés sur le chromosome 12, respectivement aux loci 12p11.23 et 12p12.1 (Inagaki *et al.*, 1995c; Chutkow *et al.*, 1996).

2.1 Les canaux Kir

2.1.1 Famille des canaux Kir

La famille des canaux Kir humains comporte 17 membres répartis dans sept sous-familles, de Kir1.1 à Kir7.1 (Reimann et Ashcroft, 1999). Les liens évolutifs entre ces diverses sous-familles sont illustrées par l'arbre phylogénétique présenté en **Figure 7**:

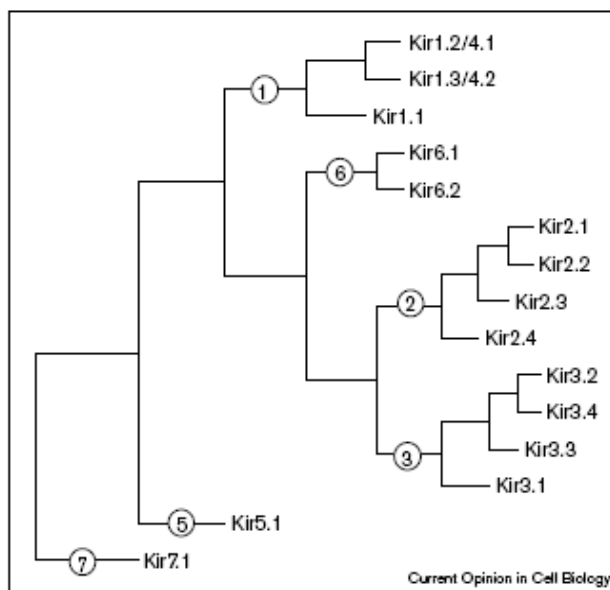


Figure 7 : *Arbre phylogénétique représentant les sous-familles de canaux potassiques rectifiant entrants Kir. Chaque sous-famille est composée de membres partageant entre 50 et 60 % d'identité de séquence, et les différentes sous-familles présentent entre 30 et 40 % d'identité entre elles (d'après Reimann et Ashcroft, 1999).*

Les canaux Kir remplissent deux principaux rôles physiologiques: ils stabilisent le potentiel membranaire de repos proche du potentiel d'équilibre du potassium, et ils assurent le transport d'ions K^+ à travers les membranes (Nichols et Lopatin, 1997; Doupnik *et al.*, 1995). Les différents membres de cette famille de canaux sont caractérisés par des localisations tissulaires et des tâches différentes. La famille des canaux Kir1.x est impliquée dans le transport au niveau des membranes transépithéliales, en particulier dans le rein. La famille Kir2.x contrôle l'excitabilité du coeur et du cerveau. Kir3.x forme des canaux activés par des protéines G et contrôle les effets des récepteurs couplés aux protéines G sur l'activité du coeur, des nerfs et des cellules neurosécrétrices (Yamada *et al.*, 1998). Kir4.1 semble jouer un rôle important dans la régulation de nombreuses fonctions au niveau des cellules gliales. Les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}), composés des sous-unités Kir6.x et SUR, sont régulés par les nucléotides cytosoliques et lient le métabolisme cellulaire à l'activité électrique et au flux d'ions K^+ (Ashcroft et Gribble, 1998). Ils interviennent notamment dans la régulation de la sécrétion d'insuline au niveau pancréatique, la réponse à une ischémie cérébrale ou cardiaque et le contrôle du tonus vasculaire des muscles lisses. Les rôles physiologiques des canaux Kir5.x et Kir7.x n'ont pas encore été pleinement élucidés.

S'ils jouent des rôles divers, tous les canaux Kir sont néanmoins unis par des propriétés communes, à commencer par leur capacité à exercer une rectification entrante des courants.

2.1.2 Rectification

Les canaux Kir sont dits rectifiant entrants, c'est-à-dire qu'ils favorisent les flux d'ions entrants par rapport aux flux sortants. En d'autres termes, ils conduisent plus le courant quand le potentiel de membrane est hyperpolarisé que quand il est dépolarisé. Cette propriété résulte principalement d'un blocage voltage-dépendant des courants sortants par des cations cytoplasmiques, essentiellement le Mg^{2+} et les polyamines, qui entrent dans le pore sous l'effet du voltage et empêchent ainsi l'efflux de K^+ (Nichols et Lopatin, 1997; Doupnik *et al.*, 1995).

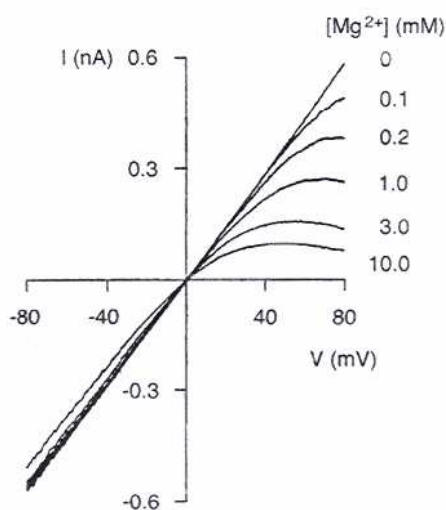


Figure 8 : Le magnésium intracellulaire est responsable de la rectification entrante. Les ions Mg^{2+} bloquent la sortie des ions K^+ du canal Kir1.1 quand le potentiel est positif, de façon d'autant plus importante que sa concentration augmente. Ce blocage est dépendant du potentiel puisque les ions Mg^{2+} affectent uniquement le courant sortant, et que le courant entrant est peu modifié (d'après Ascroft, 2000).

Aux potentiels positifs, ces cations interagissent avec des résidus chargés négativement de l'hélice transmembranaire M2 et/ou de la partie C-terminale et obstruent le pore, induisant la rectification entrante (**Figure 8**). Il a été suggéré que les polyamines se lient au site C-terminal, qui devient ainsi chargé positivement et qui agirait comme un domaine inactivateur en bloquant le pore de son côté cytoplasmique de manière analogue à l'inhibition des canaux potassiques voltage-dépendants (Lee *et al.*, 1999).

2.1.3 Structure des canaux Kir

Les canaux Kir sont des tétramères de quatre sous-unités identiques (homomères) ou distinctes (hétéromères) qui ont chacune deux domaines transmembranaires TM liés par une boucle contenant la signature des canaux potassiques GYG ou GFG (Nichols et Lopatin, 1997; Doupnik *et al.*, 1995) (**Figure 9**). Kir1.x, Kir2.x et Kir6.x sont des homotétramères *in vivo*, à l'inverse des canaux Kir3.x qui existent sous forme d'hétéromères dans le cerveau (Kir3.1 et Kir3.2) et dans le coeur (Kir3.1 et Kir3.4).

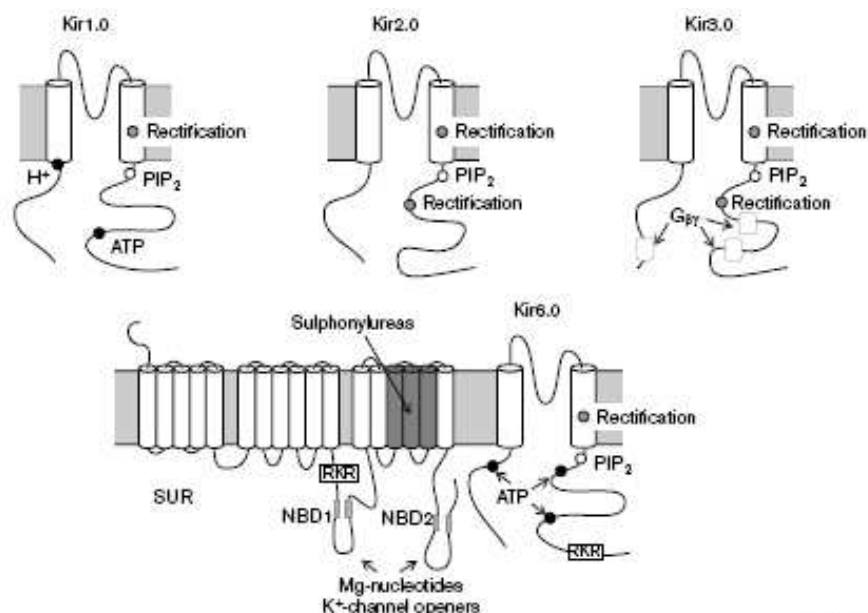


Figure 9 : Exemples de topologies de canaux Kir. Chaque sous-unité est constituée de deux domaines transmembranaires reliés par une boucle formant le pore. Les extrémités N et C-terminale sont intracellulaires, avec une extrémité C-ter plus longue et contenant des résidus impliqués dans l'interaction avec le PIP₂. Les résidus impliqués dans la rectification, la modulation par le PIP₂, l'inhibition par l'ATP ou par les protons sont indiqués ainsi que les régions impliquées dans la régulation par le G_{βγ}, les nucléotides, les ouvreurs potassiques ou les sulphonylurées. RKR désigne le motif de rétention au réticulum endoplasmique des sous-unités SUR et Kir6.2 (d'après Reimann et Ashcroft, 1999).

Le cas des canaux Kir6.x est unique dans la mesure où ils s'associent à une sous-unité régulatrice – le récepteur des sulphonylurées (SUR) – pour former un canal octamérique de stoechiométrie 4:4 (Clement *et al.*, 1997; Ashcroft et Gribble, 1998).

La publication des premières structures cristallographiques de canaux potassiques a permis de préciser l'organisation des canaux Kir. L'analyse cristallographique de KcsA (Doyle *et al.*, 1998) – canal potassique de la bactérie *Streptomyces lividans* – révèle une architecture tétramérique avec quatre sous-unités identiques disposées symétriquement et délimitant un pore central. Chaque sous-unité contient deux hélices α transmembranaires (TM1 et TM2), liées par une boucle de 30 acides aminés qui forme le pore et contient la séquence signature des canaux potassiques (GYG). Les quatre hélices TM2 forment un tipi inversé. Comme le suggérait les analyses mutationnelles, le pore forme un filtre de sélectivité étroit (longueur ~ 8 Å), proche de face extracellulaire, contenant les résidus TVGYG conservés dans tous les canaux potassiques. La sélectivité résulte de l'interaction de l'ion K^+ déshydraté avec les groupes carbonyles des liaisons peptidiques reliant les résidus formant le filtre de sélectivité. La chaîne latérale de la tyrosine du motif GYG pointe à l'extérieur de la lumière du pore et son interaction avec les résidus adjacents permet de fixer le diamètre du pore pour une chélation optimale des ions K^+ . Sous ce filtre de sélectivité s'étend une large cavité (10 Å de diamètre) composée de résidus hydrophobes.

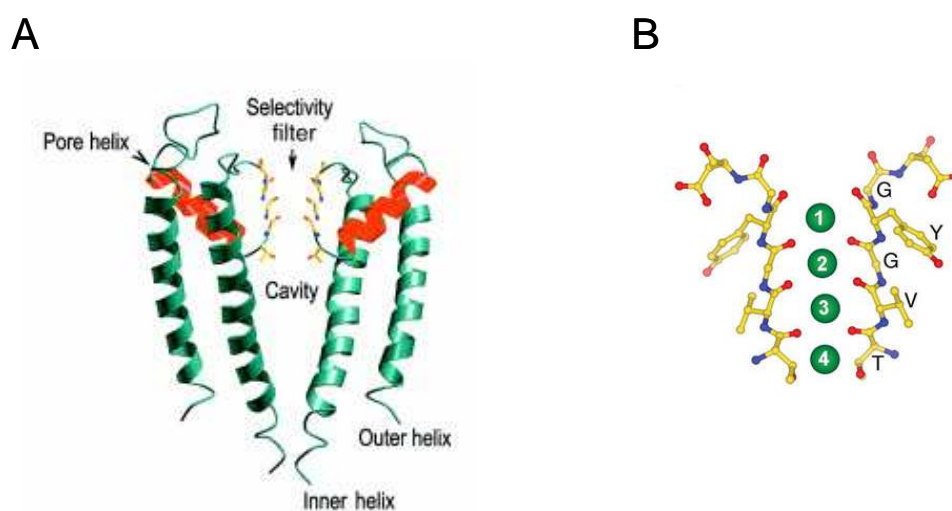


Figure 10 : Sites de liaison du K^+ sur KcsA. (A) Représentation de deux sous-unités de KcsA disposées symétriquement, permettant de distinguer le filtre de sélectivité et la cavité membranaire du canal (d'après Gulbis et Doyle, 2004). (B) Représentation du filtre de sélectivité de KcsA avec les ions K^+ (1-4) localisés au niveau des quatre sites de liaison; le site 1 est proche de la face extracellulaire tandis que le site 4 est proche de la cavité aqueuse (d'après Morais-Cabral *et al.*, 2001).

En milieu aqueux, les ions K^+ sont entourés par les atomes d'oxygène des molécules d'eau formant une sphère de solvation. Le filtre de sélectivité de KcsA reproduit cette sphère de solvation (**Figure 10**): chaque ion K^+ est entouré par quatre atomes d'oxygènes (carbonyles des résidus de la chaîne principale formant le filtre). Il permet ainsi la déshydratation, le transfert et la réhydratation d'un ion K^+ en ~ 10 ns.

Le filtre de sélectivité contient quatre sites successifs de fixation: deux ions se trouvent simultanément dans le filtre de sélectivité, et passent d'une première configuration $K^+-H_2O-K^+-H_2O$, où les sites 4 et 2 sont occupés, à une configuration $H_2O-K^+-H_2O-K^+$, où les sites 3 et 1 sont occupés. L'arrivée d'un nouvel ion K^+ depuis la cavité au niveau du site 4 entraîne la libération de l'ion K^+ présent dans le site 1 dans le milieu extracellulaire (**Figure 11**).

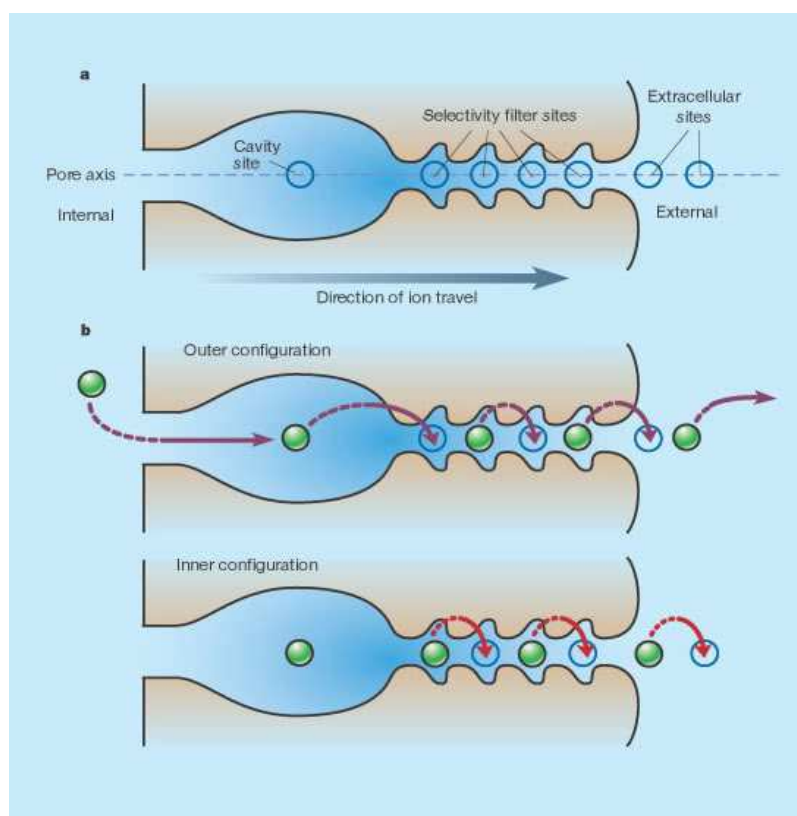


Figure 11 : Cheminement des ions K^+ à travers KcsA. a. On distingue 7 sites principaux pour les ions K^+ le long du pore (bleu). b. deux configurations (inner et outer) sont envisagées (Miller, 2001 ; Zhou et al., 2001)

L'essentiel du mécanisme de conduction des ions K^+ décrit chez KcsA est généralisable à l'ensemble des canaux potassiques. Initialement, un certain nombre de travaux portant sur Kir2.1 suggéraient l'existence de distinctions entre les canaux Kir et KcsA, tant en termes de taille du pore que de mécanisme de sélectivité ou d'organisation des hélices transmembranaires M1 et M2 (Lu et al., 1999; Silvermann et al., 1998; Minor et al., 1999). Néanmoins, le développement de stratégies de « docking » moléculaire mettant en œuvre des

dérivés du méthaneethiosulfonate a permis de montrer que les structures et tailles respectives des pores des canaux Kir, et plus largement des canaux potassiques, sont semblables (Loussouarn *et al.*, 2001).

Depuis la première structure en trois dimensions du canal potassique KcsA (Doyle *et al.*, 1998) de nouvelles structures représentatives des trois grandes familles de canaux potassiques sont sorties : MthK, canal calcium-dépendant (Jiang *et al.*, 2002) ; KvAP et Kv1.2, canaux voltage-dépendant (Jiang *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2007) et les canaux rectifiant entrants KirBac1.1 (Kuo *et al.*, 2003) et Kir3.1 (Nishida *et al.*, 2007) (la structure du canal bactérien KirBac3.1 devrait également être prochainement publiée, Gulbis *et al.*, en préparation). Même si l'architecture du pore est semblable, les structures présentent une variabilité de conformation considérable (**Figure 12**).

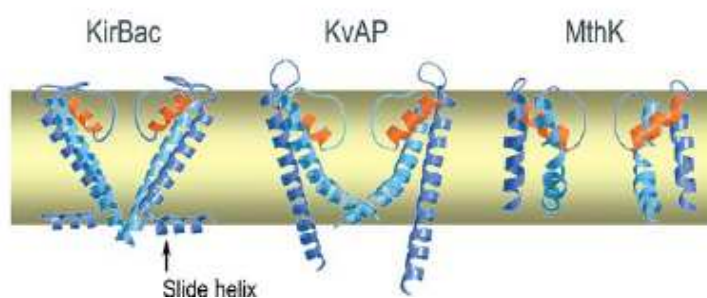


Figure 12 : Architecture de canaux K^+ . Deux sous-unités des trois familles de canaux K^+ sont représentées et illustrent la variabilité conformationnelle qui les distingue (d'après Gulbis et Doyle, 2004).

Notre centre d'intérêt étant les canaux Kir, nous nous focaliserons ici sur les structures des canaux KirBac1.1 et Kir3.1. La structure de KirBac1.1 consiste en une section membranaire en hélices α et en un domaine intracellulaire essentiellement en feuillets β . On distingue cinq régions: le filtre de sélectivité, la cavité, l'entrée, les liaisons flexibles et le vestibule cytoplasmique (**Figure 13**). Cette structure permet l'identification de contacts intramoléculaires qui sont responsables de la complète occlusion du pore sur la face intracellulaire de la membrane. Ces contacts sont supposés être « la porte d'activation » de tous les canaux K^+ .

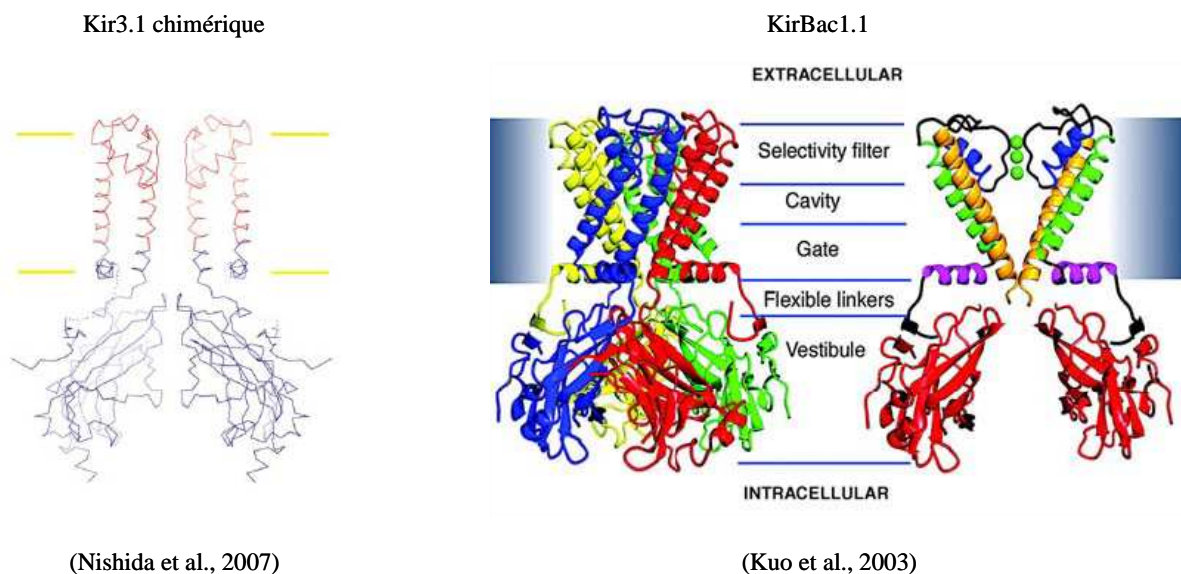


Figure 13 : Structures des canaux potassiques rectifiant entrants *KirBac1.1* et *Kir3.1* chimérique. Dans les deux cas, on distingue nettement cinq domaines: le filtre de sélectivité, la cavité, l'entrée, les liaisons flexibles et le vestibule cytoplasmique.

Le canal *KirBac1.1* adopte une forme de sablier, résultant d'une constriction du pore sur la face intracellulaire due à un réseau de liaisons hydrogènes impliquant les domaines intracellulaires. Trois ions occupent le filtre de sélectivité dans la structure de *KirBac1.1*, ce qui correspond à la moyenne de deux configurations: une ou un ion occupe le site central, et une avec deux ions occupant deux sites distants de 7 Å.

La structure du canal chimérique *Kir3.1* a été obtenue en remplaçant les trois quarts du pore transmembranaire de *Kir3.1* par la zone équivalente du canal bactérien *KirBac1.3* (Nishida *et al.*, 2007). Elle révèle une grande similitude avec *KirBac1.1* et un filtre de sélectivité identique aux autres canaux K^+ de structures connues, indiquant que la sélectivité au K^+ requiert une conservation extrême de la structure tridimensionnelle. En outre, on observe la présence de deux constriction, au niveau du paquet d'hélices cytoplasmique et à l'apex du pore cytoplasmique, pouvant jouer le rôle de porte du canal.

2.1.4 Régulation et pathologies associées

2.1.4.a Régulation

Les canaux Kir sont modulés par une grande variété de ligands intracellulaires, incluant le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂), l'ATP, les protons et les sous-unités Gβγ des protéines G hétérotrimériques.

Le régulateur le plus commun des Kir est le PIP₂, qui régule entre autres Kir1.1, Kir2.1, Kir3.1/Kir3.4, et Kir6.2 (Huang *et al.*, 1998). Une caractéristique de la plupart de ces canaux est que leur activité s'éteint lentement après l'excision du patch, phénomène désigné par le terme de « rundown » (Becq, 1996). Le « rundown » résulterait d'une perte graduelle de phospholipides membranaires (PIP₂) suite à l'excision du patch. En effet, l'application de PIP₂ ou de MgATP, qui augmente la formation de PIP₂ endogène, permet de se débarrasser de ce phénomène (Hilgemann et Ball, 1996). Le PIP₂ aurait donc une influence activatrice, même si il a également été décrit comme inhibant l'activité de KirBac1.1 reconstitué en liposomes (Enkvetchakul *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, la manière dont le PIP₂ active directement les canaux Kir reste méconnue. La liaison du PIP₂ aux canaux ferait intervenir des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène et/ou des interactions hydrophobes (Fan et Makielski, 1997) entre des résidus basiques, hydrophobes et hydrophiles et la tête phosphate du PIP₂. Ce processus stabiliserait les canaux dans un état conformationnel ouvert (Huang, 2007).

Le PIP₂ est également capable de moduler l'activité des Kir indirectement. Ainsi, l'activation des canaux hétéromériques Kir3.1/Kir3.4 par les sous-unités Gβγ ou par le Na⁺ dépend du PIP₂ (Sui *et al.*, 1998). Réciproquement, l'interaction entre le PIP₂ et Kir3.x est stabilisée par Gβγ (Huang *et al.*, 1998). Le phospholipide diminue également la sensibilité des canaux K_{ATP} pour l'ATP (Shyng et Nichols, 1998; Baukrowitz *et al.*, 1998). Le mécanisme par lequel le PIP₂ modifie la sensibilité à l'ATP n'est pas encore connu mais plusieurs hypothèses ont été émises (Fan et Makielski, 1997; Shyng et Nichols, 1998; Baukrowitz *et al.*, 1998): (i) le PIP₂ agirait de manière indirecte sur la probabilité d'ouverture du canal; (ii) le PIP₂ et l'ATP seraient en compétition du fait d'un chevauchement de leurs sites de liaison sur Kir6.2 (Nichols, 2006); (iii) la diminution de la concentration en ATP locale résulterait des effets électrostatiques des charges négatives du PIP₂.

Les membres de la famille Kir3.x sont également régulés par les sous-unités Gβγ de protéines G hétérotrimériques. C'est notamment le cas de Kir3.1 qui présente deux motifs, un au niveau du C-ter et un au niveau du N-ter, impliqués dans la liaison du complexe Gβγ (Yamada *et al.*, 1998). Les deux extrémités lient Gβγ, même si le C-ter a dix fois plus

d'affinité pour le ligand (Huang *et al.*, 1995). Les extrémités N-ter et C-ter se lient également entre elles, ce qui semble favoriser la liaison du G $\beta\gamma$. Kir3.2 et Kir3.4 possèdent les mêmes motifs aux extrémités N-ter et C-ter proximales, mais ne présentent pas les motifs à l'extrémité C-ter distale (Doupnik *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 1995). L'activation par le GTP des canaux cardiaques Kir3.1 + Kir3.4 montre une coopérativité positive et corrobore l'hypothèse selon laquelle quatre G $\beta\gamma$ doivent se lier pour activer le canal.

2.1.4.b Pathologies associées aux canaux Kir

Un certain nombre de mutations dans les gènes codant pour les canaux Kir sont responsables de maladies héréditaires chez l'homme et chez la souris (**Tableau 2**). Ainsi, certaines mutations dans le gène codant pour le canal Kir1.1 sont associées au syndrome de Bartter de type III, un désordre du tubule rénal caractérisé par des rejets salés, une hypocalcémie et une acidose métabolique. Les mutations de Kir1.1 qui ont été analysées fonctionnellement révèlent soit une abolition soit une diminution marquée des courants Kir1.1 (Derst *et al.*, 1997).

Des mutations dans le gène *kcnj2* codant pour le canal Kir2.1 sont associées à plusieurs pathologies: (i) syndrome d'Andersen (ou syndrome du QT long 7), caractérisé par des paralysies périodiques, ectopie ventriculaire, dysmorphies; (ii) syndrome du QT court ou encore (iii) fibrillations atriales (Terzic *et al.*, 2008).

Le canal Kir3.2 est également associé à une pathologie murine, dite des souris *weaver*. La souris *weaver* résulte d'une mutation dans le pore de Kir3.2, ce qui rend le canal perméable aux ions Na⁺. La mutation conduit à une mort sélective des neurones du cerveau et ainsi à une démarche ataxique caractéristique du phénotype *weaver*. Des animaux homozygotes knock-out qui n'expriment pas Kir3.2 ne présentent pas d'ataxie et leur cerveau a une morphologie normale (Signorini *et al.*, 1997). Ainsi, il semble que l'augmentation de l'influx de Na⁺, plutôt que la perte de Kir3.2, soit responsable de la mort neuronale chez les souris *weaver*.

Canal	Localisation tissulaire	Régulation	Pathologies associées	Références
Kir1.1 (ROMK)	Rein	Protons, ATP	Syndrome de Barrter de type III	Yano <i>et al.</i> , 1994
Kir2.1 (IRK)	Cœur Système nerveux	Phosphorylation	Syndrome d'Andersen QT court, fibrillations	Raab-Graham <i>et al.</i> , 1994
Kir3.1 (GIRK1)	Cœur Cerveau	Protéines G		Stoffel <i>et al.</i> , 1994
Kir3.2 (GIRK2)	Cerveau	Protéines G	Souris <i>weaver</i>	Sakura <i>et al.</i> , 1995b
Kir3.3 (GIRK3)	Cerveau	Protéines G		Lesage <i>et al.</i> , 1995
Kir3.4 (GIRK4)	Cœur	Protéines G		Tucker <i>et al.</i> , 1995
Kir4.1 Kir5.1	Cerveau			
Kir6.1 (K _{ATP})	Ubiquitaire	ATP/ADP		Inagaki <i>et al.</i> , 1995b
Kir6.2 (K _{ATP})	Pancréas, cœur, cerveau, muscles	ATP/ADP	Diabète PHHI	Inagaki <i>et al.</i> , 1995c
Kir7.1	Cellules épithéliales, Cerveau, reins, poumons			Partiseti <i>et al.</i> , 1998

Tableau 2 : Canaux potassiques rectifiant entrants et principales pathologies associées.

Les pathologies associées aux mutations dans le gène *kcnj11* codant pour Kir6.2, telles que l'hypoglycémie hyperinsulinémique persistante du nourrisson (PHHI) et le diabète seront présentées par la suite.

2.2 Cas particulier de Kir6.1 et Kir6.2

2.2.1 Localisations tissulaires

Kir6.1 est une protéine de 424 acides aminés initialement identifiée dans les îlots pancréatiques de rat (Inagaki *et al.*, 1995b). Elle est exprimée de manière ubiquitaire (Yamada *et al.*, 1997), notamment dans la membrane des cellules musculaires lisses dans lesquelles Kir6.1 est le seul canal Kir6.x exprimé (Suzuki *et al.*, 2001). Elle a également été mise en évidence dans la membrane interne des mitochondries (Suzuki *et al.*, 1997a), suggérant qu'elle compose le pore des canaux K_{ATP} mitochondriaux, mais cette hypothèse n'a pas été confirmée à ce jour et reste très controversée.

Kir6.2 a été clonée à partir d'une banque génomique humaine en utilisant Kir6.1 comme sonde (Inagaki *et al.*, 1995a). Cette protéine de 390 acides aminés, qui possède 71 % d'identité avec son isoforme Kir6.1, est fortement exprimée dans les cellules pancréatiques α (sécrétrices de glucagon), β (sécrétrices d'insuline) et δ (sécrétrices de somatostatine) (Suzuki *et al.*, 1997b), et plus faiblement dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau.

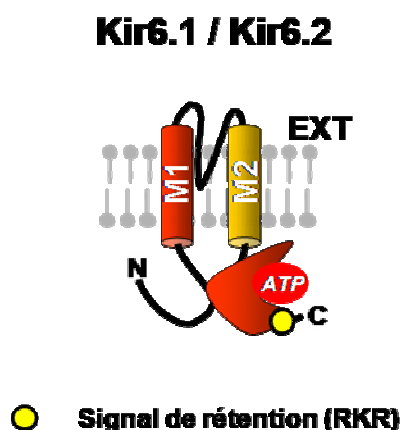


Figure 14 : Topologie des canaux Kir6.1 et Kir6.2. Les deux canaux partagent 71 % d'identité et ont donc une organisation similaire avec des extrémités N et C-terminales cytoplasmiques, 2 hélices transmembranaires et une boucle H5 formant le pore.

Kir6.1 et Kir6.2 présentent des topologies similaires reprenant les canons des canaux Kir: les deux isoformes présentent des extrémités N et C-terminales cytoplasmiques, deux segments transmembranaires (M1 et M2) reliés par une boucle H5 qui possède la séquence signature des canaux potassiques (GYG ou GFG).

2.2.2 Régulation physiologique

A l'instar des autres canaux Kir, Kir6.1 et Kir6.2 sont régulés par les nucléotides, les lipides (PIP_2), et le pH. Leur activité est également modulée par des phosphorylations par des kinases.

Régulation par les nucléotides

Les canaux K_{ATP} sont inhibés par l'ATP intracellulaire. La découverte que Kir6.2 pouvait former seul des canaux à la membrane, moyennant délétion de 26 résidus C-terminaux contenant le signal de rétention RKR (Tucker *et al.*, 1997), a montré que Kir6.2 est inhibé par l'ATP et possède un site propre de fixation des nucléotides. Ce site fait intervenir à la fois des résidus des régions C et N-terminale cytoplasmiques (Tucker *et al.*, 1998; Drain *et al.*, 1998; Trapp *et al.*, 2003). Ajoutée aux données structurales (Nishida et MacKinnon, 2002; Kuo *et al.*, 2003), cette information a permis de délimiter un site de fixation d'ATP constitué de résidus N-terminaux d'une sous-unité Kir6.2 associés à des résidus C-terminaux d'une autre sous-unité Kir6.2 (Dong *et al.*, 2005; Antcliff *et al.*, 2005). L' IC_{50} de Kir6.2 pour l'ATP est d'environ 200 μM , contre environ 10 μM pour le canal SUR + Kir6.2, et la liaison d'ATP sur une seule sous-unité Kir6.2 suffit à bloquer le tétramère (Markworth *et al.*, 2000). Le site lie préférentiellement l'ATP, et a de manière générale une spécificité pour les bases adénylées (Tucker *et al.*, 1998; Dabrowski *et al.*, 2004; Tammaro *et al.*, 2006). De plus, l'affinité est maximale pour les nucléosides triphosphates (Tucker *et al.*, 1998; Ribalet *et al.*, 2003).

Régulation par les lipides

Les canaux K_{ATP} , et donc les canaux Kir6.x comme les autres Kir, sont activés par le PIP_2 (Furukawa *et al.*, 1996). Celui-ci joue un double rôle: il contre le « rundown » des canaux (Hilgemann et Ball, 1996; Fan et Makielski, 1997) et antagonise l'inhibition par l'ATP en réduisant l'affinité apparente de ce dernier pour le canal (Shyng et Nichols, 1998; Baukrowitz *et al.*, 1998; Fan et Makielski, 1999). Le PIP_2 , chargé négativement, module l'activité de Kir6.2 en établissant des interactions électrostatiques avec des résidus acides de l'extrémité C-terminale de Kir6.2 (Fan et Makielski, 1997; Shyng *et al.*, 2000), son site de liaison étant en partie chevauchant avec celui de l'ATP (Enkvetchakul et Nichols, 2003). Ce site impliquerait des résidus des parties N-ter (K39, N41, R54), transmembranaire (K67) et C-ter (R176, R177, E179, R301) de Kir6.2 interagissant avec la tête polaire du PIP_2 , tandis que sa chaîne hydrophobe serait enchâssée dans la membrane (Haider *et al.*, 2007).

Une autre classe de lipides anioniques est également capable de moduler l'activité des canaux Kir6.x (et donc les K_{ATP}): les esters d'acides gras à longue chaîne associés au coenzyme A (LC-CoA). Les LC-CoA activent les canaux Kir6.x par un mécanisme proche de

celui du PIP₂ et sont comme lui capables de contrer le « rundown » et l'inhibition par l'ATP (Gribble *et al.*, 1998; Branstrom *et al.*, 1998; Shumilina *et al.*, 2006).

Régulation par le pH

L'activité de Kir6.2 est modulée par les protons de trois manières: (i) activation par une acidification légère, (ii) inactivation par une acidification forte, (iii) rectification renforcée par une alcalinisation. Lorsque le pH s'acidifie, les canaux sont d'abord activés réversiblement (pK_a ~7,2) puis inactivés définitivement (pK_i ~6.8) (Xu *et al.*, 2001a), l'activation résultant d'un raccourcissement des périodes de fermeture (Wu *et al.*, 2002). L'activation repose sur une histidine en position 175, sur la face cytoplasmique de l'hélice M2, tandis que l'inactivation dépend des histidines 186, 193 et 216 C-terminales cytosoliques (Xu *et al.*, 2001b). La déprotonation de l'histidine 216 est également responsable du renforcement de la rectification lors d'alcalinisations du milieu (Baukrowitz *et al.*, 1999).

Régulation par des phosphorylations

Kir6.1 et Kir6.2 sont également régulés par des phosphorylations par des kinases. Kir6.2 est activé par phosphorylation par les kinases PKA et PKC, tandis que Kir6.1 est activé par phosphorylation par PKA mais inhibé par PKC (Rodrigo et Standen, 2005; Thorneloe *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2003). Les résidus S372 et T224 de Kir6.2 ainsi que S385 de Kir6.1 sont impliqués dans l'activation *via* la PKA (Beguín *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2004), et la thréonine 180 de Kir6.2 dans l'activation par la PKC (Light *et al.*, 2000).

3. SUR, un transporteur ABC particulier

Le récepteur des sulphonylurées SUR appartient à la famille des protéines ABCC, au même titre que la protéine CFTR (dont certaines mutations provoquent la mucoviscidose), et la protéine MRP1 (impliquée dans la résistance aux agents anti-cancéreux). Chez l'homme, il existe trois isoformes de SUR de localisations tissulaires distinctes: SUR1 est exprimé dans les cellules β pancréatiques et le système nerveux (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995). SUR2A et SUR2B, produits de l'épissage alternatif d'un même gène (Inagaki *et al.*, 1996; Aguilar-Bryan *et al.* 1998), s'expriment respectivement dans les muscles striés et dans les muscles lisses.

SUR2B diffère de SUR2A par la présence de 42 acides aminés C-terminaux qui ressemblent davantage à ceux de SUR1.

Le gène *abcc8* codant pour SUR1 possède 39 exons. Il est localisé sur le bras court du chromosome 11 (locus 11p15.1), en aval du gène *kcnj11* codant pour Kir6.2, et code pour une protéine de 1581 acides aminés. Le gène *abcc9* codant pour SUR2 est localisé sur le bras court du chromosome 12 (locus 12p11.12) en amont du gène *kcnj8* codant pour Kir6.1. Il possède 40 exons et code alternativement pour deux protéines: SUR2A (1549 acides aminés) et SUR2B (1591 acides aminés).

SUR comporte trois domaines transmembranaires comprenant respectivement cinq, six et six hélices transmembranaires prédites sur la base de profils d'hydrophobicité et d'alignements de séquences avec des transporteurs ABC homologues (Raab-Graham *et al.*, 1999; Tusnady *et al.*, 2006). Il possède également deux domaines cytoplasmiques de liaison des nucléotides, ou NBD (Nucleotide Binding Domain), présentant les motifs consensus de liaison des nucléotides Walker A et Walker B, ainsi que le motif signature des ABC, une glutamine et une histidine conservées (souvent appelées Q-loop et H-loop).

3.1 Famille des transporteurs ABC

Les transporteurs à ATP-Binding-Cassette, ou transporteurs ABC, forment l'une des plus larges familles de protéines. On les rencontre chez toutes les espèces, de la bactérie à l'homme en passant par les plantes: 5 % du génome d'*Escherichia coli* code pour des transporteurs ABC (Linton et Higgins, 1998) et on en dénombre une cinquantaine chez l'homme (Dean *et al.*, 2001). La plupart sont des transporteurs actifs qui transportent leur substrat à travers la membrane contre le gradient de concentration en utilisant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP, et ils sont impliqués dans le transport de nombreuses substances biologiques (peptides, hormones, sucres, ions) mais également de substances toxiques (métaux lourds, drogues) et sont donc d'une importance capitale. Ils sont entre autres responsables de nombreux phénomènes de résistance (résistance aux antibiotiques, aux agents anti-fongiques, aux antiparasitaires, aux herbicides, ou aux anticancéreux). Chez l'homme, des mutations de gènes codant pour des transporteurs ABC sont la cause de maladies génétiques graves: la mucoviscidose (mutation du gène *abcc7* associée à un défaut d'excrétion des ions Cl⁻; Riordan *et al.*, 1989), la maladie de Tangier (mutation du gène *abca1* associée à une accumulation d'esters de cholestérol dans les macrophages; Rust *et al.*, 1999; Bodzioch *et al.*, 1999; Brooks-Wilson *et al.*, 1999), le syndrome de Dubin-Johnson (mutation

du gène *abcc2* associée à un défaut d'excrétion d'anions organiques tels que la bilirubine; Paulusma *et al.*, 1996) ou la maladie de Startgardt (mutation du gène *abca4* associée à une forme héréditaire de dystrophie maculaire; Allikmets *et al.*, 1997).

3.2 Topologie des transporteurs ABC

3.2.1 Organisation en domaines

L'archétype du transporteur ABC est constitué de quatre domaines principaux: deux domaines transmembranaires (TMD) et deux domaines de liaisons des nucléotides (NBD). Ces domaines peuvent être des peptides indépendants et donc le produit de gènes différents.

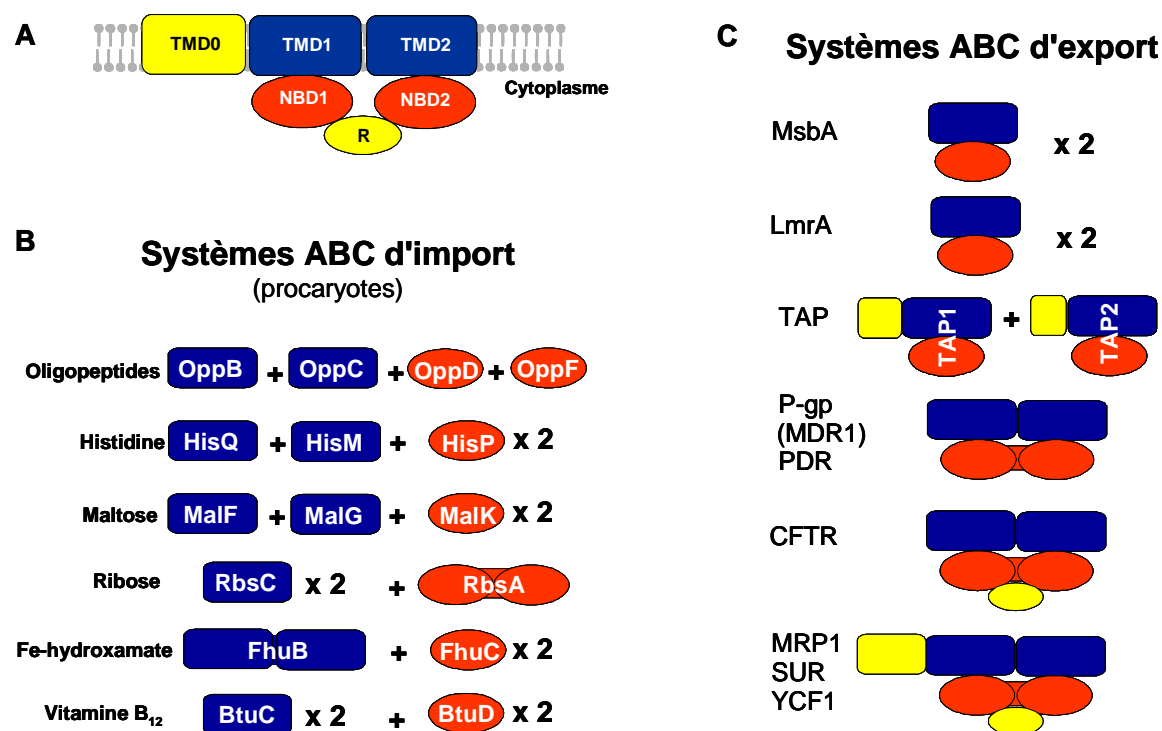


Figure 15 : Architecture modulaire des transporteurs ABC. (A) Un transporteur ABC comporte quatre domaines: deux TMD (bleu) et deux NBD (rouge). Des domaines optionnels existent chez certains ABC, tels que les domaines régulateurs (R) ou un domaine transmembranaire supplémentaire (TMD0). Ces domaines peuvent être exprimés sous forme de sous-unités indépendantes, cas de figure fréquent chez les procaryotes, ou sous la forme d'une seule chaîne peptidique, cas de figure fréquent chez les eucaryotes. (B) Exemples de transporteurs ABC d'import procaryotes. (C) Exemples de transporteurs ABC d'export.

3.2.1.a Domaines transmembranaires (TMD)

Les deux TMD traversent plusieurs fois la membrane *via* des hélices α hydrophobes. Typiquement, il y a six hélices par domaine, soit un total de douze hélices par transporteur. Des variations dans cette formule peuvent refléter des fonctions auxiliaires de ces hélices, telle que l'insertion membranaire ou l'activité importatrice du transporteur.

3.2.1.b Domaines de liaison des nucléotides (NBD)

Les NBD sont hydrophiles et interagissent avec les boucles intracellulaires des TMD. Ils comprennent plusieurs séquences consensus: la signature ABC qui permet de les identifier mais aussi les motifs A et B de Walker (*Figure 16*). La conservation de ces domaines permet de définir et de délimiter la famille.

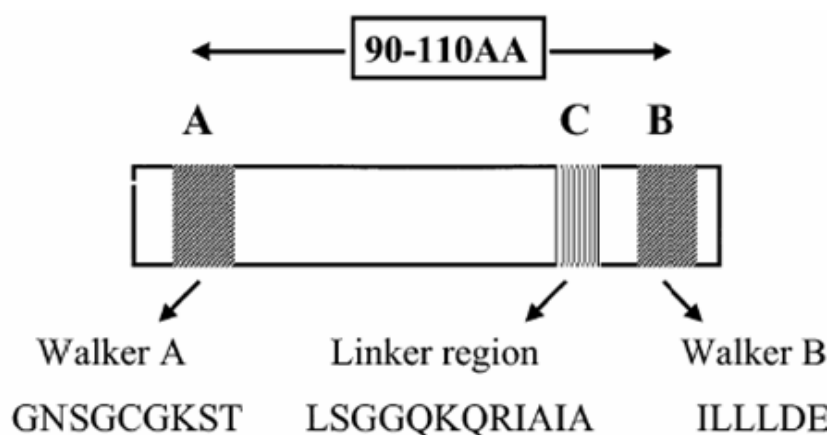


Figure 16 : Séquences consensus présentes dans les NBD. Les motifs A et B de Walker sont distants de 90 à 110 résidus. La signature ABC précède le motif B de Walker (d'après Gottesman et Ambudkar, 2001).

Plusieurs structures cristallines de ces NBD ont été déterminées et présentent toutes un repliement très similaire. Cependant l'interprétation des données cristallographiques diffère significativement quant à l'assemblage oligomérique des NBD.

3.2.1.c Autres domaines

Beaucoup de transporteurs ABC présentent des domaines auxiliaires qui ont des fonctions spécifiques. Chez les systèmes d'import bactériens, des protéines de liaison du substrat (SBP : Substrat Binding Protein) assurent la spécificité et l'unidirectionnalité du transport.

D'autres transporteurs ABC ont des domaines additionnels intrinsèques. C'est le cas de la protéine CFTR qui possède un domaine régulateur R, ou encore de la plupart des

transporteurs de la sous-famille ABCC qui possèdent un troisième domaine transmembranaire N-terminal (TMD0) (*Figure 15*).

3.2.2 Données structurales

A l'image de la plupart des protéines membranaires, l'obtention de données structurales sur les transporteurs ABC est un exercice délicat, du fait de la difficulté de surexprimer, purifier et cristalliser ces protéines dans une forme active.

Les premières données structurales pour un transporteur complet sont donc venues dans un premier temps d'analyses en microscopie électronique, permettant l'accès aux structures à faible résolution de trois transporteurs ABC de mammifères: la P-glycoprotéine, par microscopie électronique en transmission (MET) (résolution: 25 Å) et par cryomicroscopie électronique (résolution: 10 Å) de cristaux à deux dimensions (Rosenberg *et al.*, 1997 et 2001), MRP1 par MET (résolution: 22 Å) et cristaux 2-D (Rosenberg *et al.*, 2001), et TAP à une résolution de 35 Å (Velarde *et al.*, 2001). Ces premiers pas ont apporté des informations générales, telles que la taille approximative du complexe de Pgp (Ø 10 nm) et son pore (Ø 5 nm), l'existence possible de dimères de MRP1, ou encore le caractère hétérodimérique du complexe TAP1/TAP2. Néanmoins, des données beaucoup plus précises ont pu être obtenues par la suite grâce à l'obtention de structures cristallographiques par diffraction aux rayons X. A ce jour, six structures cristallographiques de transporteurs complets ont été rapportées:

- BtuCD, l'importeur de vitamine B12 d'*Escherichia coli* (Locher *et al.*, 2002).
- Sav1866, exporteur de drogues de *Staphylococcus aureus* (Dawson et Locher, 2006)
- ModB2C2, importeur de molybdate d'*Archaeoglobus fulgidus* (Hollenstein *et al.*, 2007a)
- HI1470/1, importeur de chélateurs de métaux de *Haemophilus influenzae* (Pinkett *et al.*, 2007)
- MsbA, exporteur de lipides de *Salmonella typhimurium* (Ward *et al.*, 2007)
- MalFGK2, importeur de maltose d'*Escherichia coli* (Oldham *et al.*, 2007)

Toutes ces structures reprennent l'archétype des transporteurs ABC, avec deux domaines TMD et deux domaines NBD, les structures ne différant qu'au niveau des TMD (nombre d'hélices transmembranaires) et des interactions entre TMD et NBD. Dans le cas des

exporteurs (MsbA et Sav1866), un troisième domaine reliant TMD et NBD a été identifié, appelé domaine intracellulaire ou ICD et composé d'hélices α (**Figure 17**).

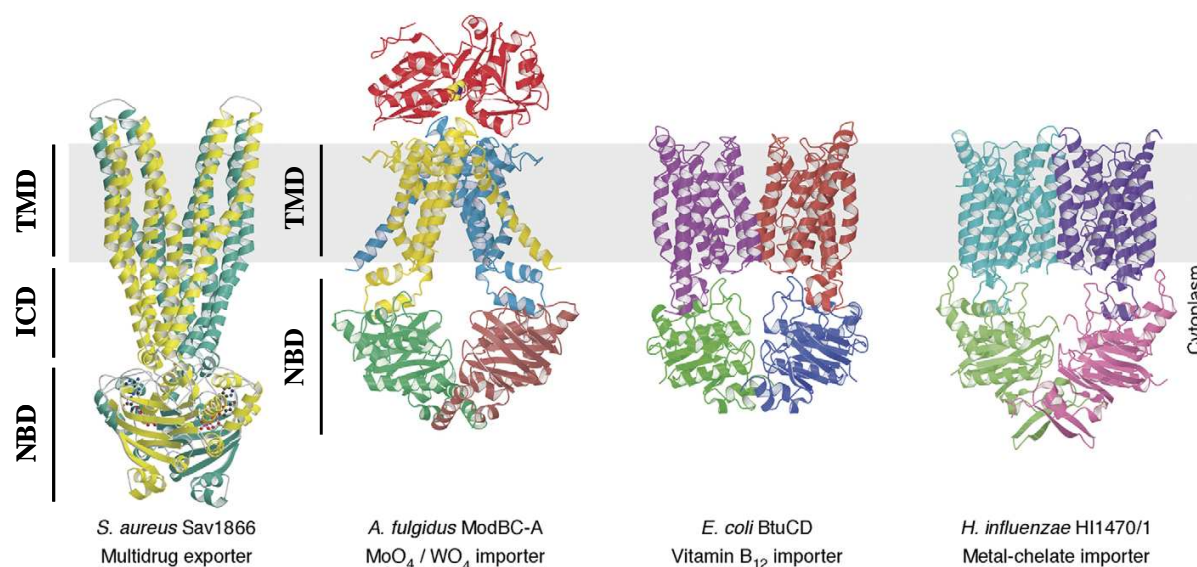


Figure 17 : Structures de transporteurs ABC. Les importeurs comportent deux domaines TMD et deux domaines NBD. Les exporteurs ont la même architecture de base mais possèdent deux domaines ICD supplémentaires composés d'hélices α assurant le lien entre TMD et NBD (d'après Hollenstein et al., 2007b).

Ces domaines ICD agiraient comme des unités de transduction faisant la liaison entre TMD et NBD suite à la liaison du substrat ou des nucléotides. Ces domaines ne sont pas retrouvés chez les importeurs où les NBD sont en contact direct avec les TMD *via* une boucle cytoplasmique localisée entre deux hélices transmembranaires.

Aucune structure de transporteur ABC eucaryote n'a été rapportée à ce jour. Néanmoins, SUR2A présente des homologies respectives de 37 % et 35 % avec les exporteurs bactériens Sav1866 et MsbA, ce qui laisse présager que les transporteurs de la famille ABCC doivent présenter une structure relativement proche comportant des domaines ICD.

3.3 Mécanismes de transport

Un mécanisme de transport commun se dégage de l'ensemble des études sur les transporteurs ABC, impliquant d'importants changements conformationnels (**Figure 18**).

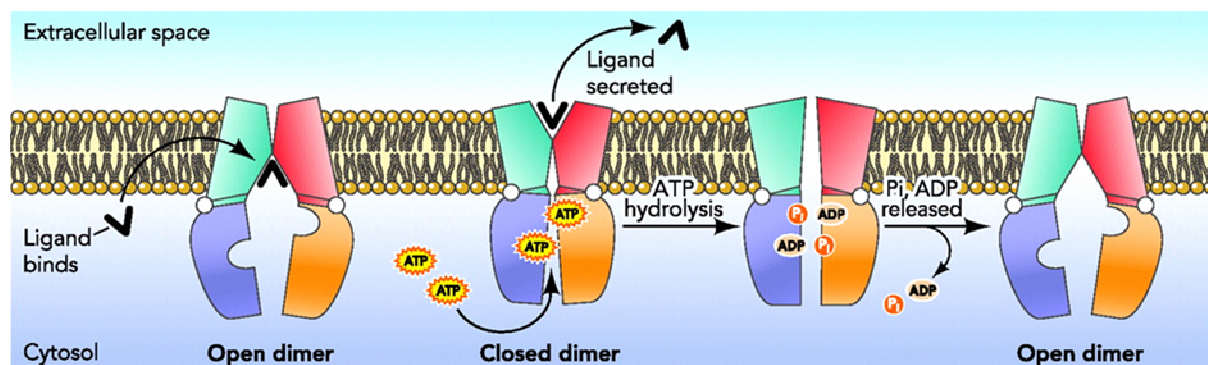


Figure 18 : Mécanisme de transport chez les transporteurs ABC (d'après Linton, 2007). Le cycle de transport peut être découpé en quatre phases: (i) fixation du substrat, (ii) fixation de l'ATP entraînant un changement de conformation permettant la libération du substrat, (iii) hydrolyse de l'ATP permettant (iv) le retour à la conformation initiale.

Le cycle de transport est initié par l'interaction du substrat avec un site de liaison spécifique au niveau des TMD. Cette liaison induit un changement conformationnel au niveau des TMD qui est transmis aux NBD, permettant la fixation d'ATP. Cette fixation d'ATP induit à son tour des changements conformationnels responsables de l'altération de l'affinité et de l'orientation du site de liaison du substrat de telle sorte que celui-ci est relargué de l'autre côté de la membrane (Martin *et al.*, 2001). L'hydrolyse de l'ATP et le relargage de l'ADP et du Pi permettent ensuite de restaurer le transporteur dans sa conformation initiale pour initier un nouveau cycle (Sauna et Ambudkar, 2000). Certains points restent néanmoins à élucider concernant le nombre de molécules d'ATP hydrolysées par cycle, le nombre de sites de liaison du substrat ou encore la nature des changements conformationnels.

3.4 La sous-famille ABCC

Le récepteur des sulfonylurées SUR appartient à la sous-famille ABCC, au même titre que le canal chlorure CFTR dont certaines mutations provoquent la mucoviscidose, la protéine MRP1 impliquée dans la résistance aux médicaments anti-cancéreux, ou encore la protéine YCF1 transportant les métaux lourds dans la vacuole des levures. Toutes ces protéines présentent une grande similitude avec SUR (**Figure 19**), au même titre qu'un autre membre de la famille ABCB: la P-glycoprotéine (Pgp ou MDR pour Multidrug Resistance) impliquée comme MRP1 dans de nombreuses résistances aux agents utilisés en chimiothérapie.

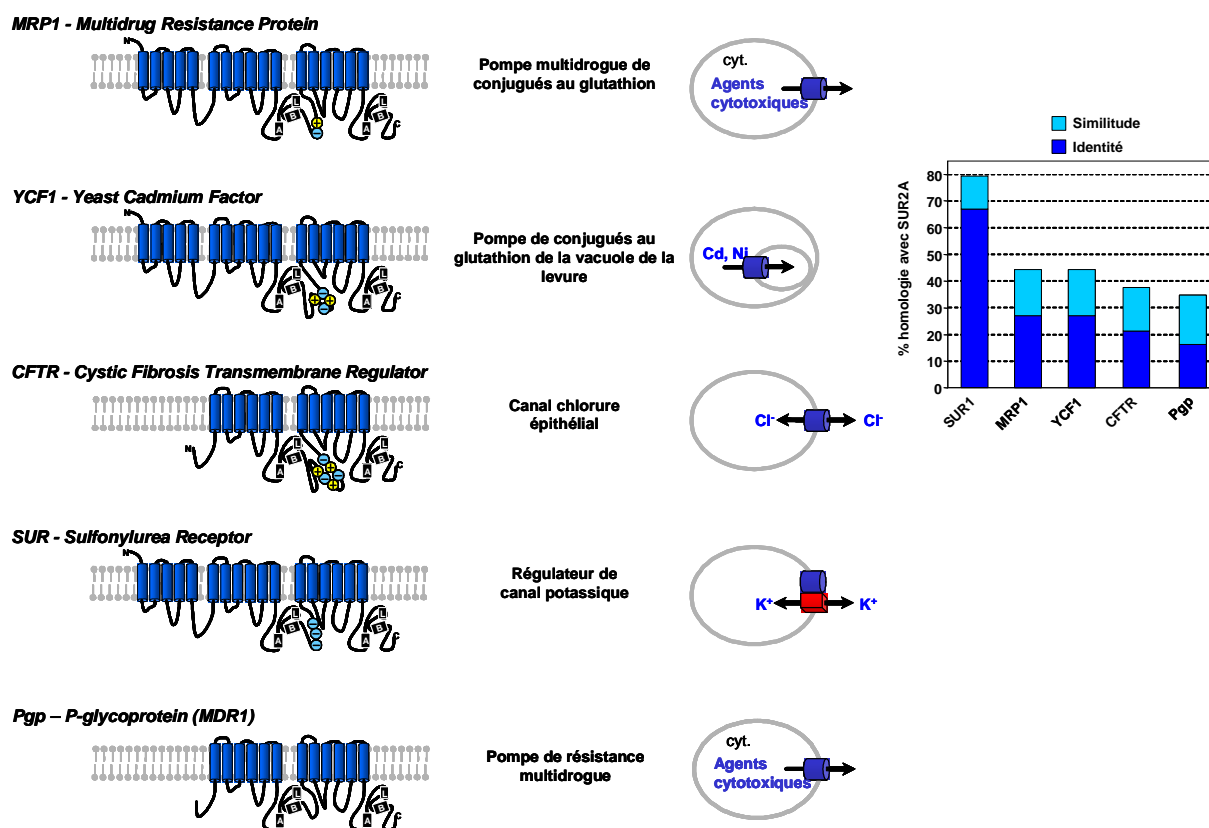


Figure 19 : Topologie et fonction des homologues de SUR de la sous-famille ABCC (MRP1, YCF1, CFTR) et de la P-glycoprotéine (Pgp), et pourcentages d'identité avec SUR2A.

CFTR

La mucoviscidose (~1/2500 naissances en Europe) est le résultat de mutations du gène *abcc7* codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), cloné en 1989 (Riordan *et al.*, 1989). CFTR comporte 1480 acides aminés arrangés en deux domaines TMD, deux domaines NBD et un domaine régulateur R intracellulaire. CFTR est un canal chlorure (Anderson *et al.*, 1991) de faible conductance (~7 pS), dont l'ouverture est contrôlée par phosphorylation du domaine R par la protéine kinase A (PKA). En outre, CFTR régule l'activité de canaux, dont des canaux potassiques (Loussouarn *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2006).

Membres de type MRP (Multidrug Resistance Protein)

La sous-famille ABCC humaine contient treize membres (ABCC1-13), dont neuf de type MRP (MRP1 à MRP9) impliqués dans le transport d'anions amphiphiles et souvent associées

à des résistances multiples aux agents anticancéreux. Leur pourcentage d'identité varie de 34 à 58 %. MRP1/2/3/6 possèdent trois domaines transmembranaires tandis que MRP4 et MRP5 n'en possèdent que deux (Kruh *et al.*, 2001). MRP1 (ABCC1) est une protéine de 190 kDa (1531 résidus), composée de trois domaines transmembranaires (TMD0/1/2) et deux domaines de liaison des nucléotides (NBD1/2), impliquée dans la résistance aux anticancéreux. Son domaine TMD0 ne semble pas être essentiel mais interviendrait dans le mécanisme de transport du LTC₄ (Bakos *et al.*, 1998) et dans la dimérisation de MRP1 (Yang *et al.*, 2007), contrairement à MRP2 chez qui ce domaine est impliqué dans l'adressage à la membrane apicale des cellules MDCKII (Fernandez *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter qu'à l'instar des canaux K_{ATP}, l'activité de MRP1 est augmentée par les substrats se fixant au niveau de l'hélice 17 (Ito *et al.*, 2001), mais aussi inhibée par les sulphonylurées, inhibiteurs des canaux K_{ATP} (Payen *et al.*, 2001).

YCF1

YCF1 (Yeast Cadmiun Factor), protéine de 170 kDa (1515 résidus) comportant trois domaines transmembranaires et deux domaines de liaison des nucléotides, est impliquée dans le transport de métaux lourds à la vacuole de la levure (Rosen, 1999). Son domaine N-ter TMD0 est impliqué dans l'adressage à la vacuole (Mason et Michaelis, 2002). YCF1 est la protéine de cette sous-famille la moins étudiée dans la littérature. Selon toute vraisemblance, son fonctionnement est probablement proche de celui de MRP1, puisque ces deux protéines transportent des substrats conjugués au glutathion.

SUR

Les récepteurs des sulphonylurées (SUR) appartiennent à la sous-famille ABCC mais ne présentent curieusement aucune activité de transport. Leur fonction est de réguler l'activité du canal ionique Kir6.x. Les trois isoformes SUR (SUR1/2A/2B) font environ 190 kDa (~1600 résidus) et sont composés de trois domaines transmembranaires et deux domaines de liaison des nucléotides. Chez SUR, le domaine TMD0 joue un rôle associatif entre les sous-unités, et contribue à réguler l'activité de Kir6.x (Chan *et al.*, 2003 ; Babenko and Bryan, 2003 ; Fang *et al.*, 2006). Comme pour MRP1 et MDR1 (Loo et Clarke, 2001), le site de fixation des activateurs de SUR fait intervenir la dernière hélice transmembranaire du domaine TMD2

(hélice 17 dans le cas de SUR et MRP1) (Moreau *et al.*, 2000).

MDR1

MDR1 (MultiDrug Resistance ou Pgp) est une protéine de 1280 résidus (~170 kDa) composée de deux domaines TMD et deux domaines NBD, mais dépourvue de domaine TMD0. Impliquée dans les mécanismes de résistance aux agents anticancéreux (Juliano et Ling, 1976) au même titre que MRP1 (Frelet et Klein, 2006), elle présente de fortes similitudes de substrats et de régulateurs avec MRP1. Au même titre que SUR, CFTR et MRP1, l'activité de MDR1 est inhibée par le glibenclamide (Golstein *et al.*, 1999), mais elle est également modulée par les activateurs de SUR2A (données non publiées).

3.5 SUR, un « transporteur » régulant l'activité d'un canal ionique

3.5.1 Isoformes et localisations tissulaires

SUR1 est une protéine de 1581 résidus initialement identifiée et clonée à partir des cellules β pancréatiques de rat et de hamster (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995). Elle est essentiellement retrouvée au niveau du pancréas où elle est associée au canal Kir6.2, ainsi que dans le cerveau (Lee *et al.*, 1999; Liss *et al.*, 1999) où elle est associée à Kir6.1 et Kir6.2 (**Tableau 3**).

Localisation tissulaire	SUR	Kir6.x	Références
Neurones	SUR1	Kir6.1/Kir6.2	Lee <i>et al.</i> , 1999
Cellules β pancréatiques	SUR1	Kir6.2	Aguilar-Bryan <i>et al.</i> , 1995
Cœur Muscles squelettiques	SUR2A	Kir6.2	Inagaki <i>et al.</i> , 1996
Muscles lisses vasculaires	SUR2B	Kir6.1	Beech <i>et al.</i> , 1993
Muscles lisses	SUR2B	Kir6.2	Isomoto <i>et al.</i> , 1996

Tableau 3 : Spécificités tissulaires des assemblages SUR/Kir6.x formant les canaux K_{ATP} .

SUR2A et SUR2B sont des protéines de respectivement 1549 et 1591 résidus, issues de l'épissage alternatif du gène *abcc9* cloné à partir de banques génomiques de cœur et de cerveau de rat (Inagaki *et al.*, 1996). SUR2A est fortement exprimé dans le cœur, les muscles squelettiques, les ovaires, et plus faiblement dans le cerveau et les îlots de Langerhans. SUR2B est lui principalement présent dans les muscles lisses et le cerveau, ainsi que dans le cœur et les muscles squelettiques (Isomoto *et al.*, 1996). Les deux isoformes sont identiques à 97 % et ne diffèrent que par 42 résidus C-terminaux.

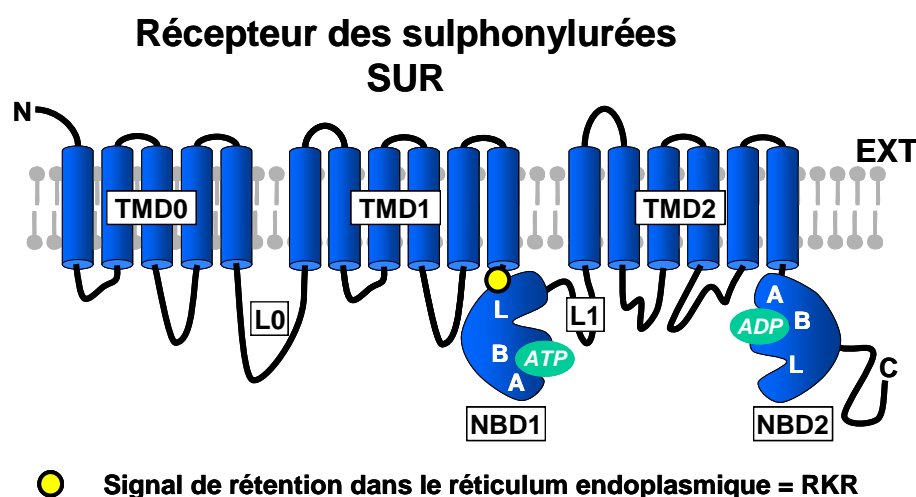


Figure 20 : Topologie du récepteur des sulphonylurées (SUR). Les trois isoformes (SUR1, SUR2A, SUR2B) partagent 67 % d'identité et ont des topologies prédites similaires.

SUR1, SUR2A et SUR2B présentent des topologies très similaires, avec une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale cytoplasmique, trois domaines transmembranaires prédits d'après les profils d'hydrophobicité (TMD0, TMD1 et TMD2) composés respectivement de cinq, six et six hélices transmembranaires, et deux domaines de liaisons des nucléotides cytoplasmiques (NBD1 et NBD2) présentant les motifs Walker A et B ainsi que la signature ABC.

3.5.2 Régulation physiologique

Comme leur nom l'indique, les canaux K_{ATP} sont sensibles aux nucléotides adénylés. A la différence de Kir6.x, les récepteurs des sulphonylurées sont principalement régulés par les nucléotides intracellulaires associés au magnésium (Mg^{2+}). Ils sont également sujet à des régulations impliquant les protéines G hétérotrimériques, ou encore le zinc.

Régulation par le MgADP et les nucléotides associés au magnésium

L'activation par l'ADP est une des propriétés fondamentales des canaux K_{ATP} , conférée par la sous-unité SUR, essentielle à leur fonction de senseur métabolique (Nichols *et al.*, 1996). Cette activation requiert la présence de Mg^{2+} et l'intégrité des deux domaines NBD (Gribble *et al.*, 1997), même s'il semble que le MgADP se fixe préférentiellement sur le site nucléotidique du NBD2 (Ueda *et al.*, 1997). La fixation de MgADP à ce site stabiliserait une conformation post-hydrolytique du cycle catalytique de SUR associée à une sensibilité réduite à l'inhibition par l'ATP, favorisant ainsi l'ouverture du canal (Zingman *et al.*, 2001). Les trois isoformes SUR confèrent aux canaux K_{ATP} des sensibilités à l'ADP différentes, SUR1 et SUR2B étant plus stimulées que SUR2A (Matsuoka *et al.*, 2000).

D'autres nucléotides associés au magnésium sont également capables de stimuler les canaux K_{ATP} *via* SUR, tels le MgATP (Gribble *et al.*, 1997), le MgGDP et le MgGTP (Trapp *et al.*, 1997), ainsi que le MgUDP et MgUTP (Sato *et al.*, 1998).

Régulation par les protéines G hétérotrimériques

La fixation de ligand à un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) entraîne l'activation de protéines $G_{\alpha\beta\gamma}$ hétérotrimériques et le relargage séparé des sous-unités G_{α} et $G_{\beta\gamma}$. Celles-ci agissent alors comme seconds messagers dans des cascades de régulation, et certaines d'entre elles sont capables de réguler l'activité des canaux K_{ATP} comme suggéré par l'activation provoquée par l'application de sous-unités G_{α} en patch-clamp (Terzic *et al.*, 1994). Les sous-unités $G_{\alpha 1}$ stimulent l'activité des canaux SUR1 + Kir6.2 et plus faiblement des canaux SUR2A + Kir6.2 (Sanchez *et al.*, 1998), et les sous-unités $G_{\beta\gamma 2}$ ont également été décrites pour activer les canaux SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2 (Wada *et al.*, 2000).

Régulation par le zinc

Le zinc, métal lourd le plus abondant de l'organisme, est également un activateur des canaux K_{ATP} pancréatiques SUR1 + Kir6.2 (Bloc *et al.*, 2000). Son action reposerait sur la fixation à un site extracellulaire comprenant deux histidines (H326 et H332) présentes dans SUR1 mais pas SUR2A (Bancila *et al.*, 2005). Le zinc aurait également une seconde action activatrice intracellulaire sur les canaux SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2 (Prost *et al.*, 2004).

3.5.3 SUR, régulateur des canaux Kir6.x

Contrairement à la très large majorité des membres de la famille des protéines ABC, SUR n'est impliqué dans aucune activité de transport à ce jour. Son activité ATPasique limitée (Bienengraeber *et al.*, 2000) fait de toute façon de lui un assez mauvais candidat pour la translocation de substrats à travers la membrane plasmique. Son unique fonction est donc de réguler l'activité des canaux potassiques Kir6.x. Outre le fait que Kir6.x ne puisse pas être adressé à la membrane plasmique en l'absence de SUR (et réciproquement) et que ces deux protéines n'aient pas d'activité connue en dehors du canal K_{ATP} , la présence de SUR suffit à modifier les propriétés d'ouverture de Kir6.x. En effet, leur association entraîne l'augmentation de la probabilité d'ouverture (P_o) du canal, et lui confère la sensibilité à l'activation par les nucléotides associés au Mg^{2+} (Gribble *et al.*, 1997) alors que Kir6.x seul est inhibé par les nucléotides. La présence de SUR confère également au canal K_{ATP} sa sensibilité à certains agents pharmacologiques: c'est le cas des sulphonylurées, utilisées dans le traitement du diabète (Sturgess *et al.*, 1985), ainsi que des ouvreurs pharmacologiques (KCO), utilisés dans le traitement de l'hypertension et de l'hyperinsulinémie (Trube *et al.*, 1986; Escande *et al.*, 1988).

4. Les canaux K_{ATP} : un modèle de biocapteur physiologique

4.1 Association SUR/Kir6.x et couplage fonctionnel

Capables de coupler directement le métabolisme cellulaire à l'excitabilité membranaire du fait de leur sensibilité particulière aux nucléotides, les canaux K_{ATP} constituent en quelque sorte des « biocapteurs physiologiques » du niveau énergétique cellulaire. L'association physique et fonctionnelle unique entre un récepteur membranaire (SUR) et un canal ionique (Kir6.x) leur permet de traduire la fixation de ligands endogènes (nucléotides) et synthétiques (pharmacopée) en un signal électrique mesurable entraînant des réponses cellulaires variées suivant les tissus considérés. Ce couplage atypique implique nécessairement des zones de contact physique entre les deux sous-unités, permettant un relais d'information de SUR vers Kir6.x, encore méconnues.

4.1.1 Association

Du fait de l'absence de structure tridimensionnelle à haute résolution du canal K_{ATP} , et malgré une structure tridimensionnelle à 18 Å (Mikhailov *et al.*, 2005) du canal SUR1 + Kir6.2 obtenue en microscopie électronique, peu d'informations sont disponibles à ce jour sur la nature des domaines présents à l'interface entre SUR et Kir6.x, les seules données disponibles provenant d'expériences de co-immunoprécipitation.

Il a néanmoins été montré que le domaine N-ter TMD0 de SUR est en interaction avec Kir6.2 et module son expression, et que la région TMD2-NBD2 participe également dans une moindre mesure à l'interaction avec Kir6.2 (Chan *et al.*, 2003; Babenko et Bryan, 2003). Plus récemment, un fragment de 65 résidus situé dans le linker cytoplasmique reliant les domaines TMD2 et NDB2 a été décrit comme capable de co-immunoprécipiter avec Kir6.2 (Rainbow *et al.*, 2004a). La coexpression de ce fragment avec le canal cardiaque sauvage SUR2A + Kir6.2 suffit à perturber l'expression à la membrane plasmique de Kir6.2 (Rainbow *et al.*, 2004a; Rainbow *et al.*, 2004b), suggérant que ce fragment entre en compétition avec SUR2A pour l'association à Kir6.2 et qu'il est donc localisé à l'interface entre SUR2A et Kir6.2.

Du point de vue de Kir6.x, on dispose d'un certain nombre d'informations indiquant que les parties cytoplasmiques N-ter (Schwappach *et al.*, 2000; Babenko *et al.*, 2002 et 2003; Bryan *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2008) et C-ter (Tammaro *et al.*, 2005, 2007a et 2007b; Shi *et al.*, 2008) et l'hélice transmembranaire M1 seraient impliquées dans l'interaction avec SUR.

4.1.2 Couplage fonctionnel

On entend par couplage fonctionnel le fait que la fixation d'un ligand physiologique ou synthétique à SUR entraîne des modifications des propriétés d'ouverture de Kir6.x. Ainsi, la fixation à SUR de nucléotides au niveau des NBD (Matsuo *et al.*, 2005), d'activateurs pharmacologiques au niveau de l'hélice 17 (Moreau *et al.*, 2000), ou d'inhibiteurs pharmacologiques comme le glibenclamide sur les boucles intracellulaires L0 et sur CL₆ (Mikhailov *et al.*, 2001) entraîne des mouvements conformationnels transmis à Kir6.x *via* des zones de contact qui permettent la régulation du canal.

Les domaines de SUR impliqués dans ce couplage fonctionnel sont encore largement méconnus et seront l'objet de la première partie de cette étude. Le domaine TMD0-L0 joue un rôle important dans ces mécanismes de régulation des propriétés d'ouverture de Kir6.x (Chan *et al.*, 2003; Babenko et Bryan, 2003; Fang *et al.*, 2006). Néanmoins, son implication dans la régulation pharmacologique du canal est encore méconnu, même si une mutation dans la

boucle cytoplasmique CL₂ (F132L) a été décrite comme perturbant la sensibilité à l'ATP et au tolbutamide (Proks *et al.*, 2006). D'autres régions de SUR sont donc nécessairement impliquées. Récemment un domaine riche en aspartate et glutamate localisé entre les domaines NBD1 et TMD2 de SUR2A, dit domaine ED, a été rapporté comme étant crucial pour les mécanismes d'activation et d'inhibition physiologique et pharmacologique (Karger *et al.*, 2008). Ce domaine n'étant pas connu pour interagir physiquement avec Kir6.x, il pourrait néanmoins constituer un relais central dans le processus de transduction. Les régions cytoplasmiques de SUR pourraient donc être impliquées dans le couplage à Kir6.x, dont les segments N-ter et C-ter cytoplasmiques semblent jouer un rôle prépondérant (Giblin *et al.*, 1999). Le fragment reliant les domaines TMD2 et NBD2 décrit par Rainbow *et al.* comme étant en interaction avec Kir6.2 constitue en ce sens un candidat idéal et son implication potentielle a été investiguée ci-après.

4.2 Physiologie des canaux K_{ATP} et pathologies associées

Du fait de leur sensibilité aux nucléotides, les canaux K_{ATP} jouent un rôle de senseur métabolique et couplent directement l'excitabilité membranaire au niveau énergétique de la cellule: un niveau énergétique bas entraîne l'ouverture des canaux, et inversement. Leur activation provoque une hyperpolarisation membranaire au repos, et un raccourcissement des potentiels d'action en cas d'activité. A l'inverse, leur inhibition provoque au repos une dépolarisation membranaire, et favorise la formation de potentiels d'action en cas d'activité.

4.2.1 Canaux K_{ATP} pancréatiques

Le rôle le mieux caractérisé des canaux K_{ATP} se situe au niveau des cellules β pancréatiques, où les modifications de l'activité du canal, induites par le métabolisme, jouent un rôle essentiel dans la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (**Figure 21**).

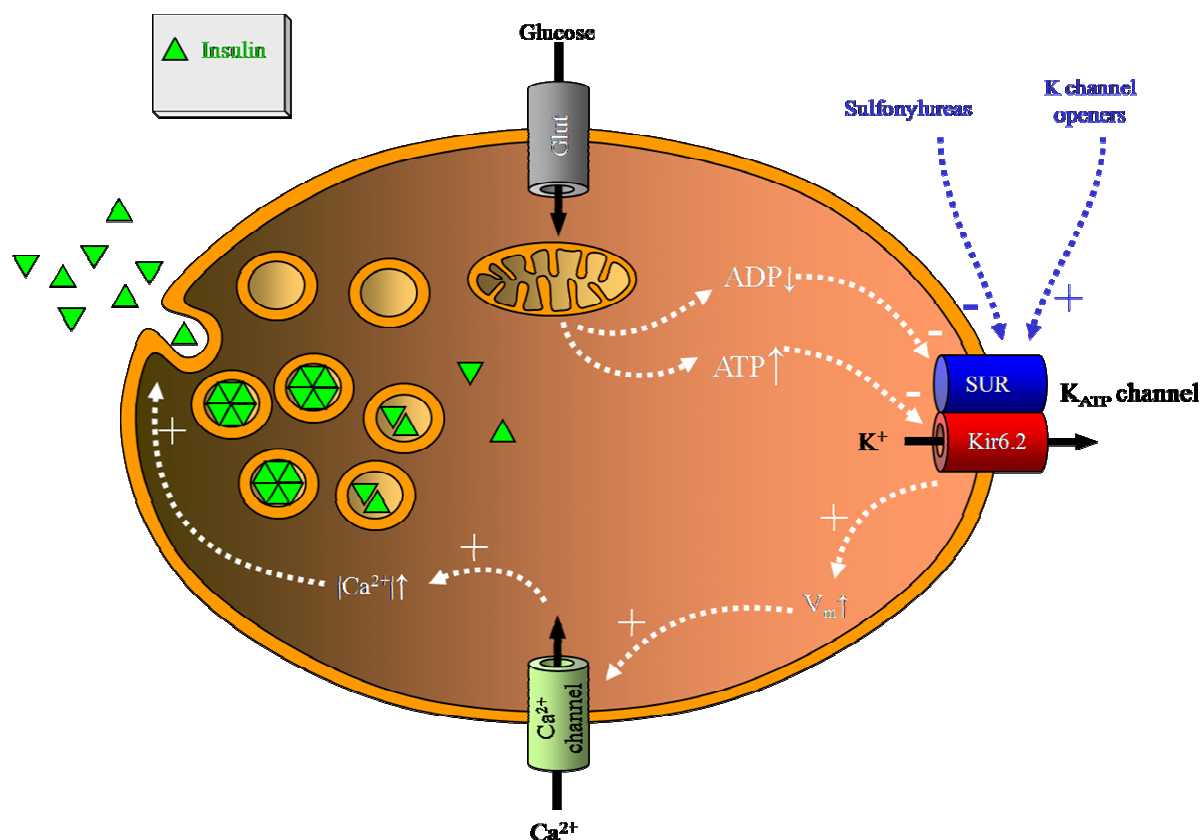


Figure 21 : Implication des canaux K_{ATP} pancréatiques dans la sécrétion d'insuline. L'augmentation de la glycémie provoque l'entrée de glucose dans les cellules β pancréatiques où il est métabolisé. L'augmentation de la concentration intracellulaire en ATP qui en résulte ferme les canaux K_{ATP} , provoquant une dépolarisation membranaire activant des canaux calciques voltage-dépendant et entraînant l'entrée de calcium dans la cellule. Cette entrée de calcium induit l'exocytose des vésicules de sécrétion d'insuline.

Aux faibles concentrations de glucose, les canaux K_{ATP} sont ouverts et leur activité maintient le potentiel membranaire de repos à un niveau hyperpolarisé. L'augmentation de la concentration de glucose dans le sang induit l'entrée de glucose dans la cellule β : sa prise en charge par le métabolisme cellulaire entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire d'ATP, provoquant l'inhibition des canaux K_{ATP} . La fermeture de ces canaux provoque alors une dépolarisation membranaire, et ainsi l'activation de canaux calciques voltage-dépendants, entraînant l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} permet alors l'exocytose des vésicules de sécrétion et la libération d'insuline dans la circulation.

Des canaux K_{ATP} sont également présents dans les cellules α sécrétrices de glucagon (Göpel *et al.*, 2000b) et les cellules δ sécrétrices de somatostatine (Göpel *et al.*, 2000a) du pancréas. Dans les deux types cellulaires, le métabolisme du glucose induit également une fermeture des canaux K_{ATP} . Dans les cellules δ , cela entraîne une sécrétion hormonale (comme dans les cellules β). A l'inverse dans les cellules α , dont l'activité électrique repose sur des canaux Na^+ , Ca^{2+} et K^+ voltage-dépendants, la fermeture des canaux K_{ATP} induit une dépolarisation membranaire inactivant des canaux sodiques voltage-dépendants: il en résulte une modification de l'activité électrique et l'arrêt de la sécrétion de glucagon.

Les canaux K_{ATP} pancréatiques (SUR1 + Kir6.2) jouent donc un rôle crucial dans la régulation de la sécrétion d'insuline et leur dysfonctionnement peut engendrer des désordres sévères: des mutations des sous-unités SUR1 et Kir6.2 sont ainsi associées à l'hypoglycémie hyperinsulinémique persistante (PHHI), pathologie caractérisée par une sécrétion d'insuline excessive et non régulée, ainsi qu'à certains diabètes de type II, caractérisés par l'absence de sécrétion d'insuline malgré une glycémie élevée (Gloyn *et al.*, 2006). La plupart des cas de PHHI sont dus à des mutations « perte de fonction » dans le gène codant pour SUR1 (Ashcroft 2005), qui peuvent être classées en deux groupes: mutations réduisant la densité de canaux à la membrane plasmique (classe I), et mutations réduisant la probabilité d'ouverture du canal (classe II). Dans certains cas, l'application de sulphonylurées permet de restaurer la densité de canaux à la membrane (Yan *et al.*, 2004), et l'application de diazoxide (ouvreurs pharmacologique) d'augmenter la probabilité d'ouverture des canaux déficients (Dunne *et al.*, 2004), mais le bénéfice clinique de telles approches reste à explorer. L'apparition de mutations « gain de fonction » dans SUR1 et Kir6.2 (Gloyn *et al.*, 2004; Babenko *et al.*, 2006; Proks *et al.*, 2006), augmentant l'activité du canal, conduit à un type rare de diabète appelé diabète néonatal. Cette hyperactivité des canaux peut parfois être normalisée par l'application de sulphonylurées (Koster *et al.*, 2005). Suivant l'impact de ce type de mutations sur l'activité basale des canaux, les pathologies associées vont du diabète néonatal transitoire au diabète permanent aggravé de complications neurologiques, retards de développement et épisodes épileptiques (syndrome DEND).

4.2.2 Canaux K_{ATP} du système nerveux central

Les canaux K_{ATP} s'expriment également dans différentes régions du cerveau (Karschin *et al.*, 1997): les neurones GABAergiques de la substance grise expriment sélectivement SUR1 et Kir6.2, tandis que les neurones dopaminergiques de la substance grise expriment SUR1 et

SUR2B conjointement avec Kir6.2 (Liss *et al.*, 1999). On trouve également des canaux composés des isoformes SUR1 et Kir6.1 dans l'hypothalamus (Lee *et al.*, 1999).

L'utilisation de souris transgéniques a facilité la compréhension du rôle des canaux K_{ATP} dans le cerveau. L'hypoxie diminue l'activité des neurones de la substance grise chez les souris sauvages mais augmente l'activité neuronale des souris « knock-out » pour Kir6.2 (Yamada *et al.*, 2001). De plus, ces souris sont sujettes aux attaques cérébrales généralisées après une brève hypoxie, suggérant que l'ouverture des canaux K_{ATP} des neurones de la substance grise protège contre la propagation de l'apoplexie au cours d'un stress métabolique (**Figure 22**): ceci est illustré par le fait que des souris transgéniques surexprimant SUR1 dans le cortex, l'hippocampe et le striatum sont plus résistantes aux attaques induites par l'acide kaïnique que les souris sauvages (Hernandez-Sanchez *et al.*, 2001), indiquant que la surexpression de SUR1 dans le cerveau antérieur les protège des attaques cérébrales et de la destruction neuronale.

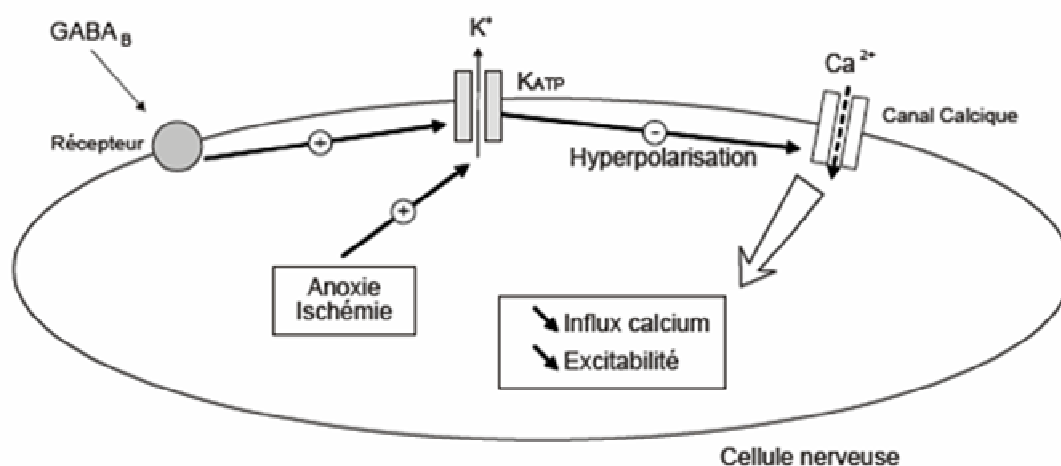


Figure 22 : Implication des canaux K_{ATP} dans l'activité des cellules nerveuses. L'ouverture des canaux K_{ATP} neuronaux prévient la propagation des attaques cérébrales au cours d'un stress métabolique (anoxie ou ischémie).

Les canaux K_{ATP} servent de capteurs de glucose chez les neurones de l'hypothalamus ventromédial, rôle essentiel pour le maintien de l'homéostasie du glucose (Miki *et al.*, 2001). Chez les souris knock-out pour Kir6.2, si la fonction des cellules β est normale, les animaux présentent un défaut sévère de sécrétion périphérique de glucagon en réponse à l'hypoglycémie. Ainsi les canaux K_{ATP} de l'hypothalamus participent à la régulation hypothalamique de la sécrétion de glucagon, et agissent de concert avec les canaux K_{ATP} des cellules β comme capteurs centraux et périphériques pour réguler l'homéostasie du glucose.

4.2.3 Canaux K_{ATP} cardiovasculaires

On retrouve également des canaux K_{ATP} dans le système cardiovasculaire, au niveau du myocarde, des muscles squelettiques et des muscles lisses. Dans ces tissus, à l'inverse du pancréas, les canaux sont fermés en conditions normales et ne s'ouvrent qu'en situation de crise.

4.2.3.a Canaux K_{ATP} du myocarde

Dans le cœur, les canaux K_{ATP} (SUR2A + Kir6.2) s'ouvrent quand la concentration intracellulaire d'ATP chute au cours d'un stress ischémique (Nichols et Lederer, 1990). Cette propriété permet de raccourcir la durée du potentiel d'action, de réduire l'influx de Ca^{2+} , et de diminuer ainsi la force de contraction et la consommation d'ATP, notamment lors d'accidents cardiovasculaires (**Figure 23**). L'activation des canaux K_{ATP} aide donc à protéger le myocarde de l'ischémie (Gumina *et al.*, 2007), ce qui est confirmé par l'étude de souris « knock-out » pour Kir6.2 (Suzuki *et al.*, 2001; Gumina *et al.*, 2003).

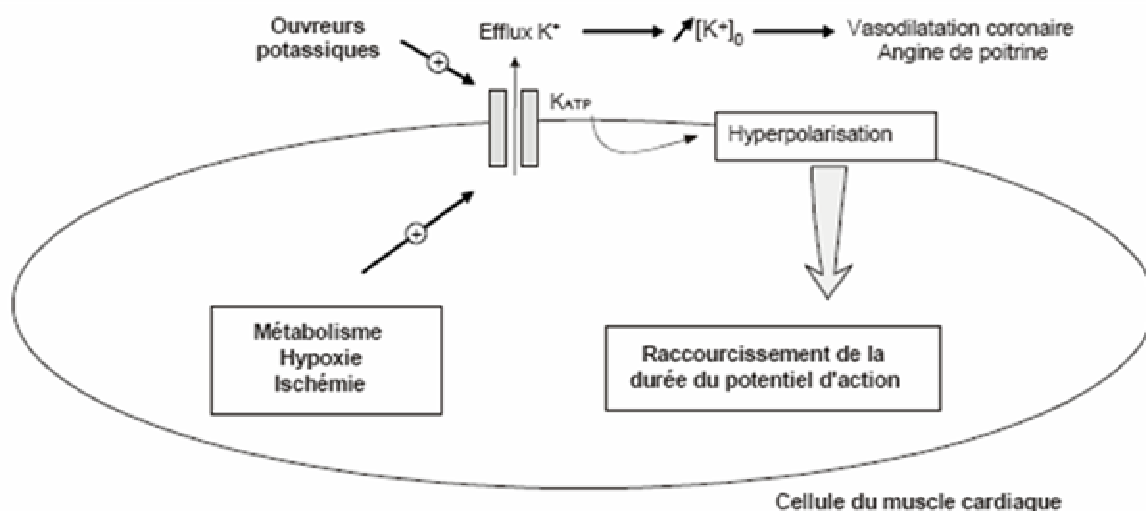


Figure 23 : Rôle des canaux K_{ATP} dans la cellule musculaire cardiaque. L'ouverture des canaux K_{ATP} lors d'un stress (hypoxie ou ischémie), ou via l'application d'ouvreurs potassiques, permet de raccourcir la durée du potentiel d'action et donc des contractions.

La présence de mutations dans SUR2A au niveau du domaine NBD2, conduisant à un dysfonctionnement du canal K_{ATP} , a été rapportée chez des individus souffrant de cardiomyopathie dilatée et d'arythmie ventriculaire (Bienengraeber *et al.*, 2004), ainsi que de fibrillation atriale (Olson *et al.*, 2007), et va donc également dans ce sens.

4.2.3.b Canaux K_{ATP} des muscles squelettiques

La densité de canaux K_{ATP} au niveau de la membrane des muscles squelettiques laisse penser qu'ils jouent un rôle important au cours de l'exercice musculaire (Spruce *et al.*, 1985). Suite à une diminution locale des concentrations d'ATP et à une diminution du pH résultant de la production de lactates, l'ouverture des canaux K_{ATP} permet de réduire l'excitabilité des fibres musculaires et les protège d'un appauvrissement énergétique excessif en créant une dépolarisation membranaire qui s'oppose au potentiel d'action excitateur (**Figure 24**).

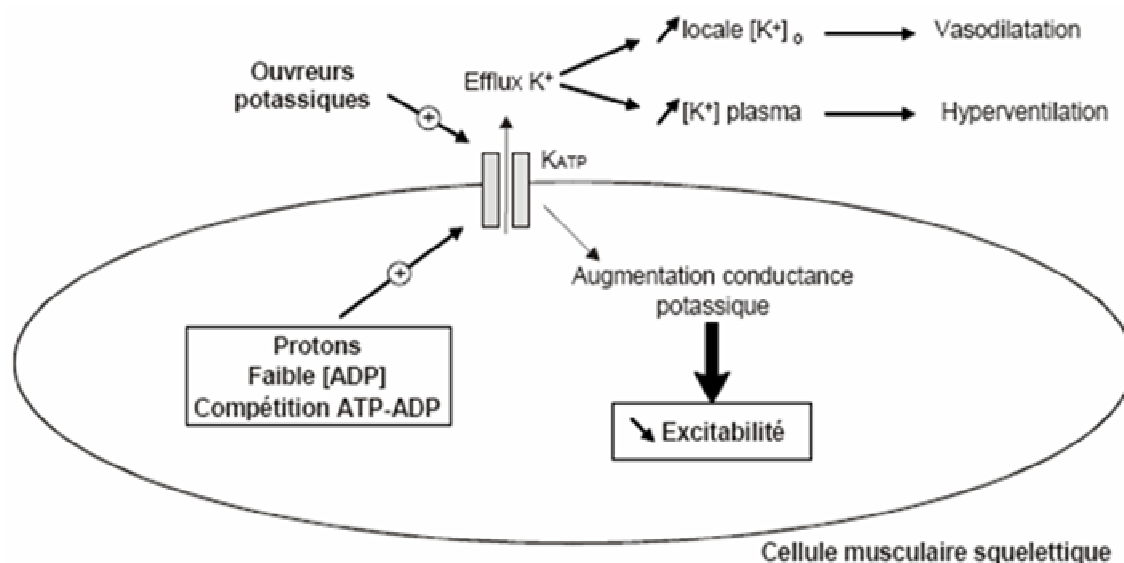


Figure 24 : Rôle des canaux K_{ATP} dans la cellule musculaire squelettique. L'ouverture des canaux K_{ATP} suite à la consommation d'ATP et à la production de lactates crée une hyperpolarisation qui s'oppose au potentiel d'action et donc aux contractions.

4.2.3.c Canaux K_{ATP} des muscles lisses

Les canaux K_{ATP} du muscle vasculaire lisse participent à la régulation du tonus vasculaire, et donc du flux sanguin. Décrits dans les muscles de l'artère mésentérique, ils sont activés par

les ouvreurs potassiques et inhibés par le glibenclamide (Ashcroft et Ashcroft 1990), ce qui explique l'effet hypotensif *in vivo* des ouvreurs potassiques. Ils sont régulés par une large variété de neurotransmetteurs, dont certains agissent *via* la protéine kinase A (qui active les canaux) et/ou la protéine kinase C (qui inhibe les canaux) (Hayabuchi *et al.*, 2001), et exercent un contrôle sur la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , et donc la contraction musculaire, en régulant l'activité de canaux calciques voltage-dépendant (Quast *et al.*, 1994). Seule l'isoforme Kir6.1 contribue à la formation de ces canaux artériels (Inagaki *et al.*, 1995b; Suzuki *et al.*, 2001), et sa co-expression avec SUR2B suffit à reconstituer des canaux K_{ATP} aux propriétés similaires à celles des canaux K_{ATP} vasculaires natifs (Quayle *et al.*, 1997).

Le « knock-out » de l'une ou l'autre des sous-unités du canal (Kir6.1 ou SUR2B) provoque l'apparition de vasospasmes et d'hypertension (Miki *et al.*, 2002; Chutkow *et al.*, 2002), et l'activation des canaux K_{ATP} permet de contrôler la pression artérielle dans la majorité des cas d'hypertension (Jahangir et Terzic, 2005).

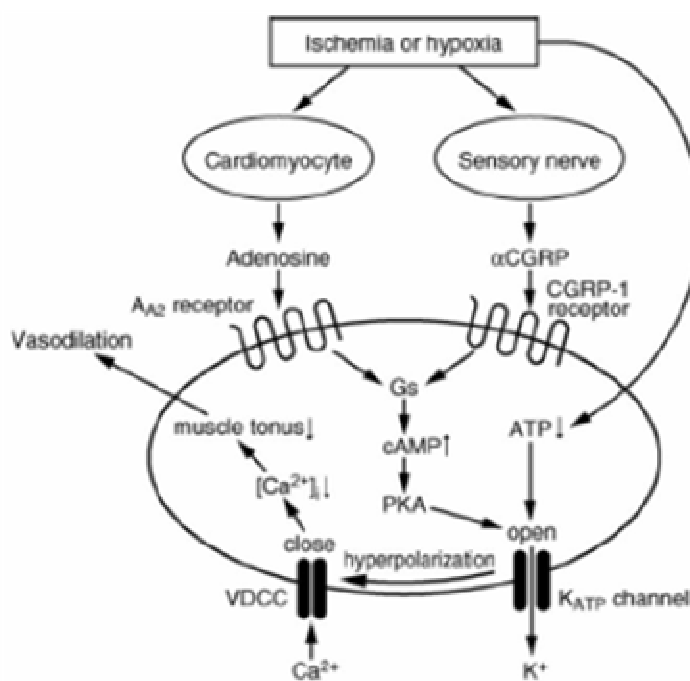


Figure 25 : Rôle des canaux K_{ATP} dans la cellule musculaire lisse. Ceux-ci sont activés lors de d'hypoxies ou ischémies via la PKA et la baisse de concentration en ATP. L'hyperpolarisation qui en résulte provoque la fermeture des canaux VDCC et donc une baisse de Ca^{2+} intracellulaire limitant la contraction et permettant la vasodilatation (d'après Miki et Seino, 2005).

4.2.4 Autres canaux K_{ATP}

On trouve des canaux K_{ATP} dans le système rénal au niveau du tubule proximal et dans l'appareil juxta-glomérulaire. En conditions physiologiques, ces canaux ont une forte probabilité d'ouverture et jouent un rôle important dans la réabsorption d'électrolytes et de solutés aussi bien que dans l'homéostasie du K^+ (Quast *et al.*, 1996).

En outre, les canaux K_{ATP} ne sont pas toujours localisés à la membrane plasmique et on les trouve également dans la membrane interne des mitochondries ainsi qu'au niveau du noyau.

Canaux K_{ATP} mitochondriaux

Les canaux K_{ATP} mitochondriaux ont été initialement mis en évidence dans le foie et sont sensibles à l'inhibition par l'ATP et les sulphonylurées, ainsi qu'à l'activation par le diazoxide (Inoue *et al.*, 1991; Garlid *et al.*, 1996): leur activation par cet ouvreur potassique aurait une action cardio-protectrice lors des accidents ischémiques (Liu *et al.*, 1998). Ces canaux K_{ATP} mitochondriaux sont bloqués spécifiquement par le 5-hydroxydécanoate de sodium (5-HD) qui n'agit pas sur les canaux cardiaques (Hu *et al.*, 1999), et seraient composés de l'isoforme Kir6.1 (Suzuki *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2001). Toutefois, leur composition exacte est encore méconnue et sujette à controverse (Foster *et al.*, 2008). Les mitochondries du cerveau de rat présentent également des canaux K_{ATP} (Bajgar *et al.*, 2001) au profil pharmacologique identique à celui des canaux mitochondriaux cardiaques et hépatiques qui pourraient être impliqués dans la protection des dommages ischémiques cérébraux. Néanmoins, à ce jour, les expériences indiquant un rôle des canaux K_{ATP} mitochondriaux dans le pré-conditionnement et la protection cardiaque ne sont pas concluantes (Hanley et Daut, 2005).

Canaux K_{ATP} nucléaires

Le glucose a plusieurs effets sur les cellules β pancréatiques: régulation de la sécrétion d'insuline, de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, mais aussi de la différenciation et l'expression des gènes. Le mécanisme par lequel le glucose régule les fonctions nucléaires est encore méconnu. Néanmoins, des canaux K_{ATP} semblables à ceux présents sur la membrane plasmique des cellules β pancréatiques sont également présents sur l'enveloppe nucléaire de ces cellules, et leur fermeture déclenche un pulse transitoire de Ca^{2+} induisant la phosphorylation de facteurs de transcription CREB (cAMP Responsive Element Binding protein) permettant l'expression de nombreux gènes (Quesada *et al.*, 2002). Les canaux K_{ATP} nucléaires pourraient donc participer à la régulation de la transcription exercée par le glucose.

4.3 Pharmacologie des canaux K_{ATP}

Les canaux K_{ATP} sont la cible de molécules de structures chimiques variées qu'on peut séparer grossièrement en deux classes: les inhibiteurs de l'activité du canal (molécules de la famille des sulphonylurées principalement), et les activateurs ou ouvreurs potassiques (KCO).

4.3.1 Inhibiteurs pharmacologiques

Les inhibiteurs des canaux K_{ATP} peuvent être répartis en deux groupes: ceux qui interagissent avec Kir6.2 et ceux qui interagissent avec SUR1. Toutes ces molécules stimulent la sécrétion d'insuline et certaines sont utilisées dans le traitement du diabète de type II, telles que les sulphonylurées dont les propriétés hypoglycémiantes sont connues depuis longtemps (Janbon *et al.*, 1942) et qui ont permis le clonage de SUR1 (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995): la prescription de glibenclamide permet ainsi de rétablir la glycémie des patients diabétiques, mais également d'améliorer certains symptômes neurologiques (retard mental, perte de motricité) chez les patients souffrant de syndrome DEND (Mlynarski *et al.*, 2007).

Les imidazoles (phentolamine et cibenzoline) se lient préférentiellement à Kir6.2 (Mukai *et al.*, 1998 ; Proks et Ashcroft, 1997), tandis que les sulphonylurées (tolbutamide, gliclazide, glimepiride) et les dérivés benzamido (meglitinide) se lient à SUR1 avec une forte affinité (Ashcroft et Gribble, 1999). Les sulphonylurées interagissent également avec Kir6.2 (Gribble *et al.*, 1997, 1998), mais avec une affinité beaucoup plus faible.

Les isoformes SUR présentent des sensibilités différentes aux inhibiteurs. De faibles concentrations de tolbutamide suffisent à bloquer les canaux K_{ATP} exprimant la sous-unité SUR1, mais pas ceux exprimant SUR2A ou SUR2B (Gribble *et al.*, 1998). Au contraire le meglitinide bloque les trois types de canaux (**Tableau 4**).

K_i	Tolbutamide	Glibenclamide	Meglitinide
SUR1/Kir6.2	5 μ M	4 nM	0,3 μ M
SUR2A/Kir6.2	1,7 mM	27 nM	0,5 μ M

Tableau 4 : Concentrations semi-inhibitrices des inhibiteurs pour les canaux SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2 (d'après Gribble *et al.*, 1998).

Ceci indiquerait que les sulphonylurées (telles que le tolbutamide) interagissent avec un site de liaison spécifique à SUR1, alors que les composés benzamido (tels que le meglitinide) interagissent avec un site commun à toutes les isoformes SUR. Le glibenclamide, qui

comprend une moitié sulphonylurée et une moitié benzamido, interagirait avec deux sites de SUR1 et un seul de SUR2 (**Figure 26**).

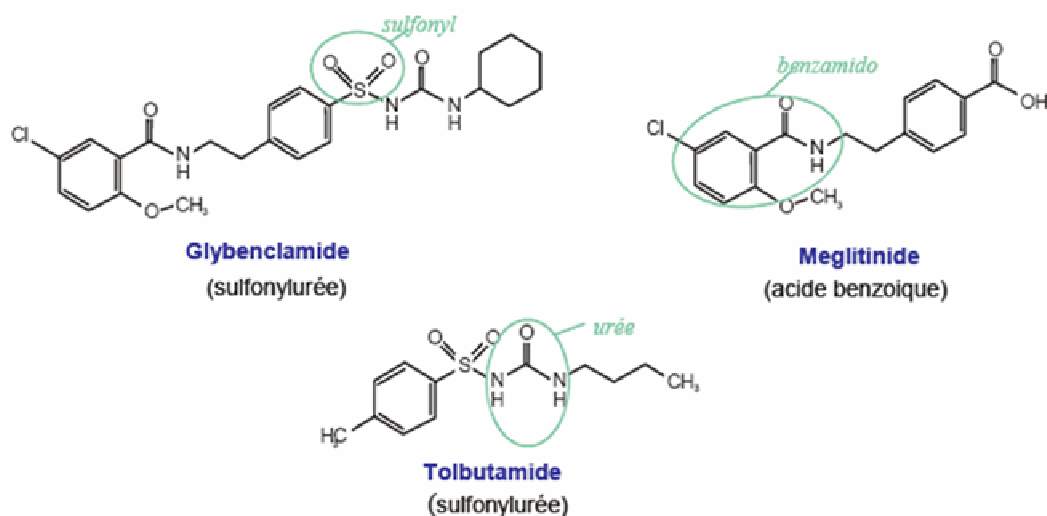


Figure 26 : Formules développées des inhibiteurs utilisés au laboratoire.

Les différences d'affinité des canaux SUR1 + Kir6.2 et SUR2 + Kir6.2 pour le tolbutamide ont été exploitées pour localiser son site de liaison par une approche chimérique (Ashfield *et al.*, 1999; Babenko *et al.*, 1999). Ces études montrent que les hélices transmembranaires 14 à 16 de SUR1 sont requises pour l'inhibition par le tolbutamide et que la sérine 1237, située dans la boucle cytoplasmique entre les hélices transmembranaires 15 et 16, est cruciale pour le blocage.

En revanche, seules les boucles intracellulaires entre les hélices transmembranaires 5 et 6 d'une part et 15 et 16 d'autre part sont nécessaires pour la liaison du [3H]-glibenclamide (Mikhailov *et al.*, 2001): la boucle entre les hélices transmembranaires 15 et 16 formerait le site de liaison du groupe sulphonylurée, tandis que la boucle intracellulaire entre les hélices 5 et 6 (L0) formerait celui du groupe benzamide en association avec le N-ter de Kir6.2 (Ashfield *et al.*, 1999; Babenko *et al.*, 1999; Mikhailov *et al.*, 2001; Vila-Carriles *et al.*, 2007). Par ailleurs, les hélices transmembranaires 14 à 16 pourraient être impliquées dans le processus de transduction couplant la liaison des sulphonylurées à l'inhibition du canal, même si ce mécanisme moléculaire reste méconnu.

Tous ces inhibiteurs présentent une affinité supérieure pour SUR1 que pour SUR2, et seul le développement récent de nouvelles molécules a permis de cibler sélectivement cette isoforme, comme c'est le cas pour la sulphonylthiourée HMR1098 qui a une action inhibitrice

cardiosélective avec une affinité bien supérieure pour SUR2 que pour SUR1 (Russ *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2002). Le développement de nouvelles molécules synthétiques a également permis de cibler sélectivement les isoformes Kir6.1 ou Kir6.2, par exemple avec la guanidine U-37883A qui n'inhibe que les canaux contenant Kir6.1 (malgré le fait que son action passe par SUR) et permet de toucher sélectivement les canaux SUR2B + Kir6.1 vasculaires (Cui *et al.*, 2003; Teramoto, 2006).

Enfin, on notera que les canaux K_{ATP} sont les cibles secondaires d'un certain nombre d'agents pharmacologiques: imidazolines (Plant et Henquin, 1990; Proks et Ashcroft, 1997; Proks *et al.*, 2002; Doyle et Egan, 2003), dérivés de la quinine (Gribble *et al.*, 2000), ou encore agents anti-arythmiques (Mukai *et al.*, 1998; Zünkler *et al.*, 2000; Yunoki *et al.*, 2001) exerçant tous une action inhibitrice sur Kir6.2.

4.3.2 Activateurs pharmacologiques

Les activateurs des canaux K_{ATP} , ou K_{ATP} channel openers (KCO), forment un vaste groupe de composés assez disparates ne présentant pas de pharmacophore commun. Ces composés sont généralement classés en familles suivant leur structure chimique, parmi lesquelles on trouve notamment les benzothiazidines (diazoxide), les benzopyrans (cromakalim), les cyanoguanidines (pinacidil), les thioformamides (aprikalim), les nicotinamides (nicorandil), les dérivés de pyrimidines (minoxidil), ou encore plus récemment les dihydropyridines (ZM-244085), les cyclobutenediones (WAY-151616) et les carbinols tertiaires (ZD-6169) (Mannhold, 2004; Jahangir et Terzic, 2005).

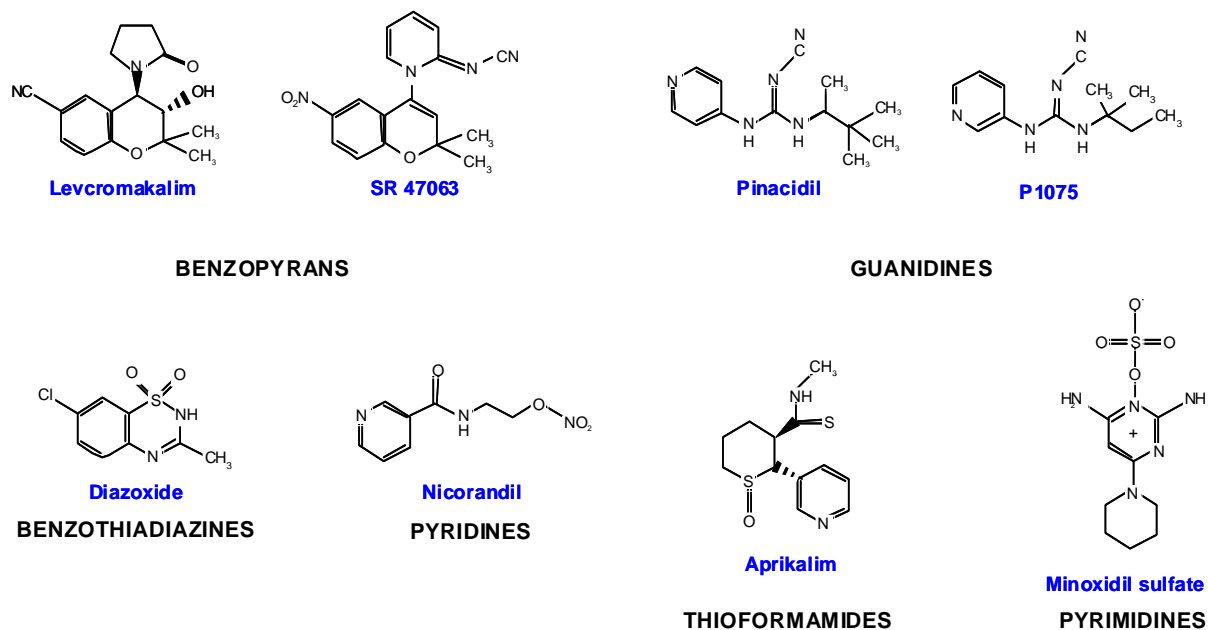


Figure 27 : Formules développées des ouvreurs potassiques les plus représentatifs.

Certains de ces ouvreurs sont utilisés en thérapeutique pour leur action anti-hypertensive, comme c'est le cas pour le diazoxide et le pinacidil dont l'action activatrice permet l'ouverture des canaux K_{ATP} des muscles lisses vasculaires et la réduction de la pression artérielle. Leur action est dépendante des nucléotides, la présence de MgATP étant nécessaire à la liaison des ouvreurs et à leur effet activateur (Dickinson *et al.*, 1997; Atwal *et al.*, 1998; Schwanstecher *et al.*, 1998), et l'introduction de mutations au niveau des motifs de Walker de liaison et d'hydrolyse des nucléotides des NBD abolit ou réduit l'effet du diazoxide (Gribble *et al.*, 1997; Schwanstecher *et al.*, 1998).

La plupart des KCO présentent une sélectivité pour l'isoforme SUR2 et ont une affinité plus faible pour SUR1 (**Tableau 5**). L'exploitation de cette différence a permis de localiser le site d'action des ouvreurs potassiques au niveau de l'hélice transmembranaire 17 du domaine TMD2 (D'hahan *et al.*, 1999a; Moreau *et al.*, 2000; Moreau *et al.*, 2005a) où la thréonine 1253 et dans une moindre mesure la leucine 1249 de SUR2A joueraient un rôle majeur dans l'action des molécules de types benzopyran et guanidine. Ajouté au fait que la boucle cytoplasmique reliant les hélices transmembranaires 13 et 14 semble également participer à ce processus (Uhde *et al.*, 1999), ces observations désignent le domaine TMD2 comme hébergeant le site de fixation des KCO sélectifs de SUR2.

Type de K_{ATP}	Localisation tissulaire	Ouvreurs pharmacologiques
SUR1/Kir6.2	Pancréas, cerveau	Diazoxide
SUR2A/Kir6.2	Myocytes cardiaques, muscles squelettiques	Cromakalim, pinacidil, diazoxide
SUR2B/Kir6.2	Muscles vasculaires	Cromakalim, pinacidil, diazoxide
K_{ATP} mitochondriaux	Cœur, foie	Diazoxide

Tableau 5 : Effets des ouvreurs potassiques sur les différents types de canaux K_{ATP} de l'organisme (d'après Coghlan *et al.*, 2001).

Le diazoxide, ouvreur non sélectif agissant à la fois sur SUR1, SUR2B et SUR2A en présence de MgADP (D'hahan *et al.*, 1999b), semble plutôt activer les canaux K_{ATP} *via* un site de fixation localisé dans le domaine TMD1 (Babenko *et al.*, 2000; Dabrowski *et al.*, 2002; Moreau *et al.*, 2005b).

Là encore, les efforts de synthèse ont permis de développer des activateurs sélectifs de l'isoforme SUR1, tels que les nitropyrazoles (Peat *et al.*, 2004) et les dérivés du diazoxide NNC 55-0118 et NN414 (Dabrowski *et al.*, 2003).

Dans le cadre de la première partie de cette étude, nous avons utilisé les propriétés physiologiques (sensibilité aux nucléotides) et pharmacologiques (réponse aux activateurs et inhibiteurs pharmacologiques) des canaux K_{ATP} pour tenter d'identifier, à l'aide d'une stratégie chimérique, les régions du récepteur des sulphonylurées SUR2A impliquées dans le couplage fonctionnel avec le canal potassique Kir6.2.

B

Récepteurs couplés aux protéines G et biocapteurs

1. Propriétés des GPCR

Les récepteurs couplés aux protéines G, ou GPCR (G-Protein-Coupled-Receptors), sont des protéines de la membrane plasmique transmettant des réponses cellulaires diverses, suite à la fixation de ligands extracellulaires, *via* les protéines G hétérotrimériques liant le GTP ainsi que d'autres partenaires membranaires ou intracellulaires. Constituant la plus grande famille de molécules de surface impliquées dans la transmission du signal, ils représentent 950 gènes chez l'homme soit environ 1 % de la totalité du génome humain (Takeda *et al.*, 2002), et ont été particulièrement préservés au cours de l'évolution (Vassilatis *et al.*, 2003) ce qui augure d'une importance physiologique primordiale. Ces récepteurs sont impliqués dans des fonctions physiologiques aussi variées que la digestion, l'immunité, l'olfaction ou encore la photo-transduction. En outre, leur implication dans de nombreux processus pathologiques (maladies inflammatoires, cancers, troubles neuro-dégénératifs et cardiovasculaires, infections virales) en font des cibles médicamenteuses de choix et les agents pharmacologiques modulant leur activité représentent ~30 % des drogues commercialisées (Hopkins et Groom, 2002).

1.1 Familles de récepteurs couplés aux protéines G

Le clonage des premiers GPCR, le récepteur de la rhodopsine bovine (Nathans et Hogness, 1983) et le récepteur de l'adrénaline (Dixon *et al.*, 1986), a mis en évidence la caractéristique structurelle commune à tous les GPCR qui consiste en la présence de sept segments transmembranaires hydrophobes de 20 à 25 résidus séparés par des boucles hydrophiles de tailles variables (Baldwin *et al.*, 1997). Tous les GPCR présentent donc une extrémité N-terminale extracellulaire suivie de sept segments transmembranaires (TM_I à TM_{VII}) reliés par trois boucles extracellulaires (e₁, e₂, e₃) et trois boucles intracellulaires (i₁, i₂, i₃), et se terminent par une extrémité C-terminale cytoplasmique (**Figure 28**).

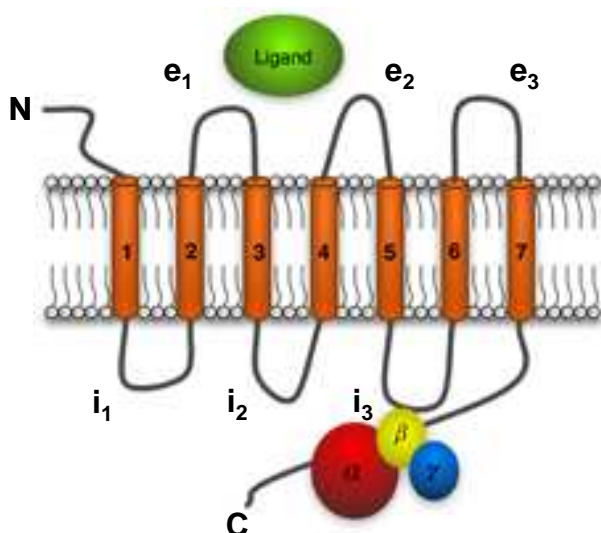


Figure 28 : Représentation schématique d'un récepteur couplé aux protéines G (GPCR). On distingue 7 segments TM, une extrémité N-ter extracellulaire et une extrémité C-ter cytoplasmique. Le ligand extracellulaire ainsi que les protéines G hétérotrimériques associées au récepteur sont représentés ($\alpha/\beta/\gamma$).

Les GPCR sont classiquement répartis en trois familles principales (Foord *et al.*, 2005) sur la base des propriétés suivantes:

- Organisation et taille de l'extrémité N-terminale (de 7 à 595 résidus)
- Taille des boucles (de 5 à 230 résidus)
- Séquence en acides aminés (présence de cystéines)
- Organisation de l'extrémité C-terminale (de 0 à 359 résidus)

1.1.1 Famille 1 ou A

Famille majoritaire et la plus étudiée, elle regroupe les récepteurs aux neurotransmetteurs classiques, aux prostaglandines, à des molécules olfactives, et à une large variété de peptides et neuropeptides. La famille 1 peut être divisée en cinq sous-groupes phylogénétiques (Bockaert et Pin, 1999), dont trois dominant (**Figure 29**):

- Groupe 1a: récepteurs des petits ligands, dont le site de liaison est une cavité formée par les segments transmembranaires
- Groupe 1b: récepteurs des peptides, dont le site de liaison implique l'extrémité N-ter, les boucles extracellulaires et la partie supérieure des domaines extracellulaires
- Groupe 1c: récepteurs des hormones glycoprotéiques, caractérisés par un grand domaine N-ter où se trouve principalement le site de liaison

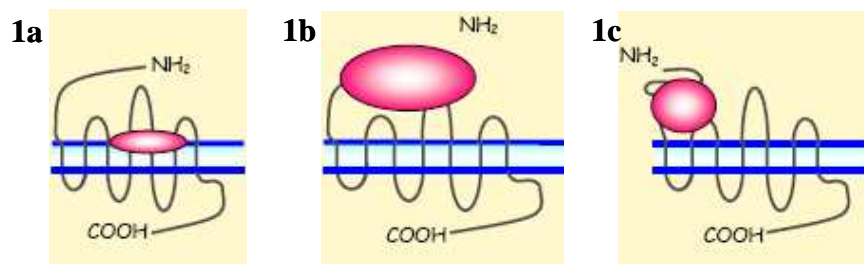


Figure 29 : Schéma représentatif des principales sous-familles de GPCR de la famille 1 (d'après Bockaert et Pin, 1999).

Cette famille est également caractérisée par la présence d'une arginine très conservée, située dans un motif D/E-R-Y appelé « DRY box », au niveau de l'extrémité cytoplasmique du TM_{III}. Ce motif jouerait un rôle dans la stabilité du récepteur et dans son couplage avec les protéines G (Bockaert et Pin, 1999). Deux cystéines sont également retrouvées dans les boucles e₁ et e₃ et forment un pont disulfure important pour la conformation du récepteur.

1.1.2 Famille 2 ou B

La famille 2 regroupe des récepteurs aux hormones peptidiques de grande taille (glucagon, calcitonine). Leur site de liaison implique le domaine N-ter, la première boucle extracellulaire, et le premier segment transmembranaire. Le domaine N-ter est assez long et contient six cystéines conservées formant entre elles des ponts disulfures intervenant dans la liaison du ligand (**Figure 30**).

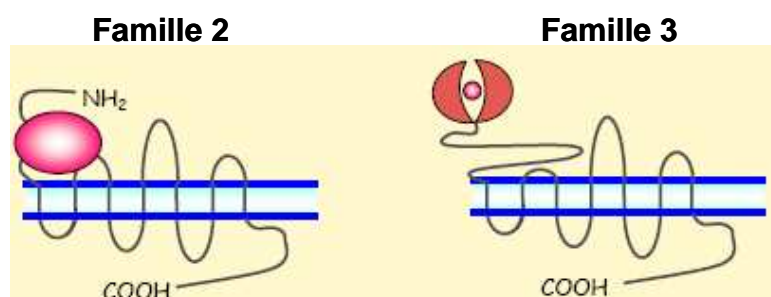


Figure 30 : Schéma représentatif des GPCR des familles 2 et 3 (d'après Bockaert et Pin, 1999).

1.1.3 Famille 3 ou C

Cette famille, regroupant les récepteurs métabotropiques des neurotransmetteurs (glutamate, GABA) et les récepteurs calciques, est caractérisée par un long domaine N-ter (jusqu'à 800 résidus) contenant le site de fixation du ligand. La structure tridimensionnelle de ce domaine révèle une organisation dimérique (Kunishima *et al.*, 2000) avec trois conformations possibles: deux conformations libres et une complexée avec le ligand.

1.1.3 Autres familles

Les trois autres familles sont composées de récepteurs absents chez les Mammifères: récepteurs des phéromones de levure (famille 4), récepteurs Frizzled et Smoothened impliqués dans le développement de la drosophile (famille 5), et récepteurs à l'AMPC de l'amibe *Dictyostelium discoideum* (famille 6) (Fredriksson *et al.*, 2003).

1.2 Voies de signalisation des GPCR

1.2.1 Protéines G hétérotrimériques

Comme leur nom l'indique, suite à la fixation de ligands les récepteurs couplés aux protéines G interagissent avec les protéines G hétérotrimériques et initient ainsi des cascades de signalisation (**Figure 31**). La liaison du ligand induit des changements conformationnels du récepteur, au niveau de la poche formée par les segments transmembranaires, permettant son interaction avec les protéines G qui assurent la transduction de l'information en activant un effecteur pour aboutir à la réponse cellulaire appropriée. La transduction d'un signal par le système GPCR/protéine G/effecteur s'accompagne d'un processus d'amplification: l'activation de l'effecteur entraîne la synthèse de nombreuses molécules de seconds messagers activant à leur tour des protéines cibles (Robishaw et Berlot, 2004).

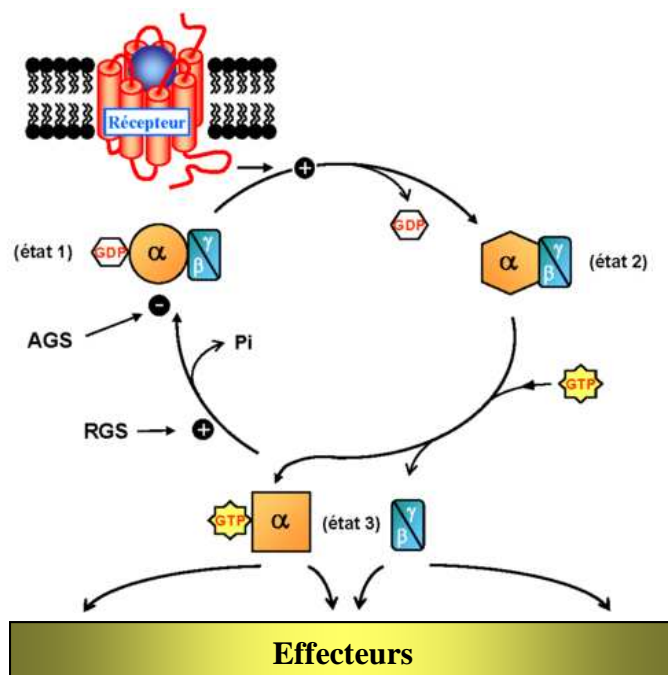


Figure 31 : Schéma représentant la « triade » GPCR/Protéine G/Effecteur. La liaison du ligand au GPCR entraîne le passage de l'état inactif (état GDP-lié) à l'état actif (état GTP-lié, α et $\beta\gamma$ dissociés) des protéines G associées, qui module en retour un effecteur (enzyme, canal) pour aboutir à une réponse cellulaire.

Toutes les protéines G sont constituées de l'association d'une sous-unité α , possédant un site d'interaction avec le GDP/GTP, avec un complexe β/γ . Le transfert d'information entre le GPCR activé par son agoniste et l'effecteur passe par des cycles d'activation/inactivation de ce complexe $\alpha/\beta/\gamma$. Lorsque le complexe est lié au GDP, $\alpha/\beta/\gamma$ sont associées et la protéine G est inactive. L'activation du GPCR par son agoniste favorise l'échange GDP/GTP au niveau du site actif de la sous-unité α : la liaison du GTP induit la dissociation du trimère et libère la sous-unité α d'un côté et le complexe β/γ de l'autre qui peuvent alors interagir avec des effecteurs. L'activité GTPasique de la sous-unité α permet ensuite l'hydrolyse du GTP en GDP et le retour à l'état initial trimérique $\alpha/\beta/\gamma$ inactif.

Le site d'interaction entre le GPCR et le complexe $\alpha/\beta/\gamma$ impliquerait des régions intracellulaires du récepteur, dont les boucles i_2 et i_3 ainsi que l'extrémité C-terminale (Wess, 1997; Gether, 2000). Cette interaction ferait également intervenir le C-ter et la boucle α_4 - β_6 de la sous-unité α , ainsi que les C-ter de β et γ (Oldham et Hamm, 2008) (**Figure 32**).

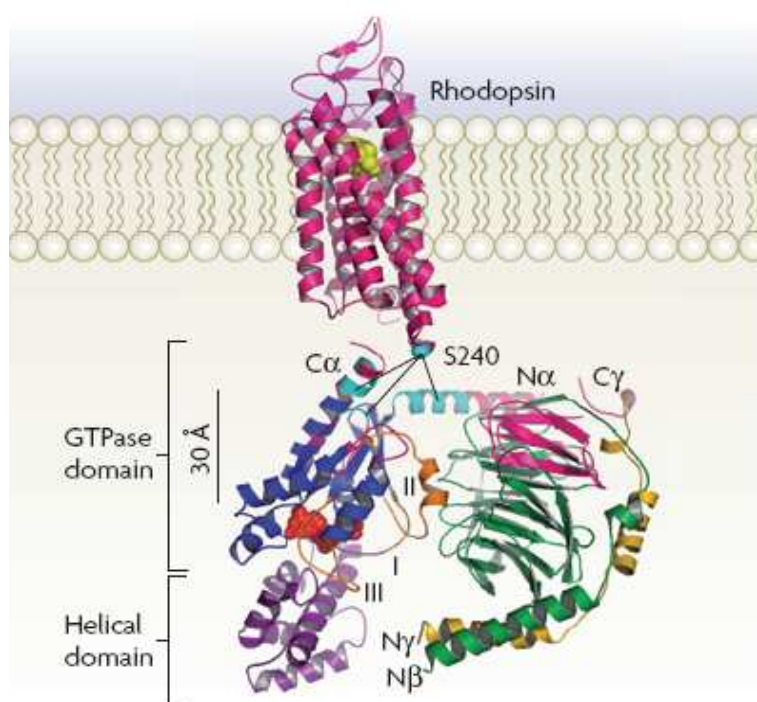


Figure 32 : Représentation de l'interface GPCR-Protéine G basée sur les modèles de la rhodopsine et de la protéine G hétérotrimérique G_r . Les C-ter de α , β et γ et la boucle α_4 - β_6 de α interagissent avec les boucles intracellulaires du récepteur représenté ici par la rhodopsine (d'après Oldham et Hamm, 2008).

La complexité et la spécificité de la signalisation induite par les GPCR repose sur la grande variété des protéines G. Une quarantaine de sous-unités ont été clonées: 23 sous-unités α de 39 à 46 kDa codées par 17 gènes et classées en quatre familles ($G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12}$), 6 sous-unités β de 35 à 37 kDa et 12 sous-unités γ de 6 à 8 kDa (Gudermann *et al.*, 1997).

	PROTEINES G	EFFECTEURS
α_s	$\alpha_{s1}, \alpha_{s2}, \alpha_{s3}, \alpha_{s4}, \alpha_{s5}$	Adénylate cyclase (+)
	$\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{i3}$	Adénylate cyclase (-) Canaux Cl^- et K^+ (+) Phospholipases C et A2 (+)
$\alpha_{i/o}$	$\alpha_{t1}, \alpha_{t2}, \alpha_{olf}$	cGMP-PDE (+)
	α_{o1}, α_{o2}	Canaux Ca^{2+} voltage dépendant (-) Canaux K^+ (+)
$\alpha_{q/11}$	α_z	Adénylate cyclase (-)
	$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}, \alpha_{16}$	Phospholipase C (+)
α_{12}	α_{12}, α_{13}	Phospholipase A2 (+) c-Jun kinase (+) Canaux Ca^{2+} (L) (+)
	β_1 à β_6 γ_1 à γ_{12}	Phospholipases C et A2 (+) Adénylate cyclase I (-), II et IV (+) GIRK (+) Canaux Ca^{2+} (N, P, Q) (-) MAPK (+) Canaux Na^+ (+) Kinases c-Jun kinase PI_3 -kinase (+) PKC et PKD (+)

Tableau 6 : Principales sous-unités des protéines G et leurs effecteurs. (+): stimulation de l'activité; (-): inhibition de l'activité.

Ces différentes sous-unités ciblent une variété conséquente d'effecteurs (**Tableau 6**), et le nombre important d'associations trimériques possibles entre les différentes sous-unités contribue à la grande diversité et à la spécificité des signaux activés par les GPCR.

Sous-unités α des protéines G

Les protéines G se distinguent les unes des autres par leurs sous-unités α leur conférant leur spécificité. Celles-ci jouent un rôle déterminant dans le couplage du récepteur / effecteur, chaque type de sous-unité interagissant spécifiquement avec un groupe de récepteurs et activant un effecteur donné. On distingue généralement quatre groupes de protéines G sur la base de leurs homologies de séquence:

- La famille G_s , stimulant l'adénylate cyclase qui catalyse la conversion de l'ATP cytoplasmique en AMPc. L'activité GTPase des sous-unités α_s , α_t , et α_{olf} est inhibée par la toxine cholérique par un mécanisme d'ADP-ribosylation.

- La famille G_i , comportant les sous-unités α_i , α_o et α_t qui inhibent l'adénylate cyclase, entraînant une diminution de l'AMPc intracellulaire. Celles-ci sont ADP-ribosylées par la toxine pertussique, conduisant à un découplage du récepteur.

- La famille G_q , comportant notamment les protéines α_q et α_{11} qui stimulent la phospholipase C- β , entraînant l'hydrolyse du PIP_2 en inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG). L' IP_3 provoque la libération du calcium des stocks intracellulaires.

- Les familles G_{12} et G_{13} , qui activent les facteurs d'échange de GTP associés à Rho.

Sous-unités β/γ des protéines G

Les sous-unités β/γ forment un complexe fort que seul un détergent peut dissocier (Clapham et Neer, 1997). Elles constituent une unité fonctionnelle capable de réguler de nombreux effecteurs tels que l'adénylate cyclase (Federman *et al.*, 1992), la phospholipase C (Katz *et al.*, 1992), la phospholipase A2 (Kim *et al.*, 1989), les canaux potassiques ou calciques (Kim *et al.*, 1989 ; Ikeda, 1996 ; Medina *et al.*, 2000), ainsi que les protéines de la famille Src (Luttrell *et al.*, 1997). La sous-unité β interagit avec la sous-unité α tandis que la sous-unité γ détermine la spécificité de l'effecteur et participe à l'interaction avec le récepteur (Hou *et al.*, 2000).

Les données structurales disponibles sur les protéines G montrent (Lambright *et al.*, 1996; Sondek *et al.*, 1996; Sunahara *et al.*, 1997; Lodowski *et al.*, 2003; Tesmer *et al.*, 2005) que la sous-unité α est constituée de deux domaines: un domaine GTPase formé de six brins β entourés de six hélices α , et un domaine hélicoïdal, formé d'une longue hélice α centrale et de cinq petites hélices (*Figure 33*).

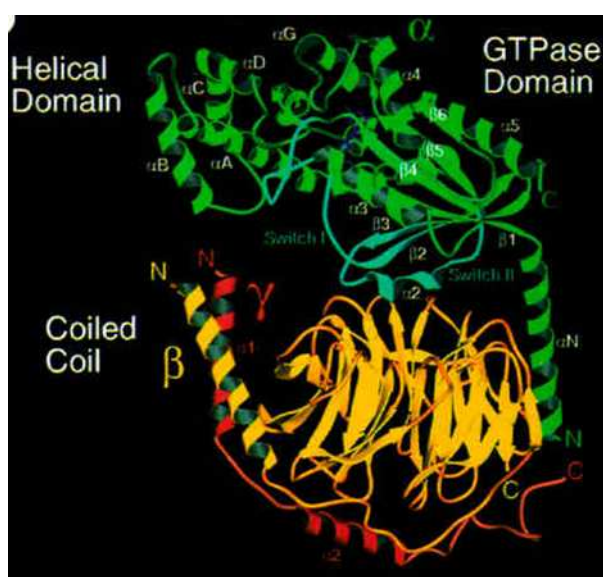


Figure 33 : Structure tridimensionnelle d'une protéine G hétérotrimérique, la transducine (G_t) (d'après Lambright *et al.*, 1996). Les sous-unités α , β et γ sont respectivement représentées en vert, jaune, et rouge.

La sous-unité β se replie en un paquet de feuillets β hautement symétriques, ou « β propeller » précédé en N-ter d'une hélice α . Cette hélice N-terminale permet l'interaction avec la sous-unité γ formée d'une hélice α . Cette forte interaction hélice-hélice entre les sous-unités β et γ serait à l'origine de l'indissociabilité du complexe qu'elles forment.

1.2.2 Régulation de l'activité des GPCR

L'activité des récepteurs couplés aux protéines G repose sur un équilibre entre différents mécanismes contrôlant la signalisation du récepteur et l'arrêt de la réponse. La régulation de cette activité est donc complexe et fait intervenir plusieurs acteurs et processus.

Protéines RGS

Le signal intracellulaire peut être limité par l'intervention de protéines extérieures modulant l'activité GTPase de la sous-unité α et facilitant le retour à l'état inactif. C'est le cas des protéines RGS (Regulator of G protein Signaling) qui modulent l'hydrolyse par $G\alpha$ du GTP en GDP, et donc le signal déclenché par la liaison de l'agoniste au GPCR. Les RGS jouent le rôle de GAP (GTPase Activating Proteins): elles ne possèdent pas d'activité GTPasique mais réduisent le signal transmis par $G\alpha$ liée au GTP (et par $G\beta\gamma$) en facilitant l'hydrolyse du GTP d'un facteur 100 à 1000. La protéine G retourne alors dans son état inactif hétérotrimérique $G\alpha\beta\gamma$ lié au GDP. La famille des RGS comprend plus de 30 membres dont les tailles varient de 17 à 160 kDa, pouvant être membranaires ou cytoplasmiques (McCudden *et al.*, 2005).

Désensibilisation

La signalisation d'un GPCR peut également être modulée par des phénomènes de désensibilisation dus à des phosphorylations par des kinases spécifiques (*désensibilisation homologue*) ou activées par les seconds messagers (*désensibilisation hétérologue*). Suivant l'intensité de la désensibilisation, ses effets varient de l'atténuation de l'efficacité de l'agoniste jusqu'à une extinction complète du signal (Perez et Karnik, 2005).

Un GPCR activé adopte une conformation exposant des séquences consensus favorisant le recrutement et la liaison de kinases qui vont phosphoryler le récepteur au niveau de résidus sérine et thréonine situés sur les boucles intracellulaires ou au niveau de l'extrémité C-ter.

Dans le cas de la *désensibilisation homologue*, cette phosphorylation fait intervenir des sérines/thréonines kinases spécifiques de la famille des GPCR, les GRK (G-protein Receptor Kinases). Elles ont une action spécifique puisque seuls les récepteurs activés par un agoniste sont susceptibles d'être phosphorylés. Les GRK phosphorylent le récepteur au niveau des boucles intracellulaires i_2 et i_3 et de l'extrémité C-ter (Lefkowitz, 1998), permettant ainsi la liaison d'une arrestine sur le récepteur qui masque les séquences d'interaction avec les sous-unités α des protéines G. Ceci a pour conséquence d'empêcher l'interaction récepteur-protéine G, provoquant un découplage (Ferguson, 2001). Ce phénomène est très rapide et peut varier de la milliseconde à la seconde.

La *désensibilisation hétérologue* des GPCR est indépendante de la présence d'un ligand spécifique lié au récepteur, mais provoquée par l'activation d'un autre récepteur sur la même cellule. Cette activation entraîne le recrutement de messagers secondaires, recrutant à leur tour des kinases qui phosphorylent non seulement les récepteurs activés par les agonistes mais également les récepteurs n'ayant pas été stimulés par un ligand. Les protéines kinases mises en jeu dans ce cas sont les sérines/thréonines kinases PKA et PKC, activées respectivement par l'AMPc et le DAG. Elles ont une action équivalente à celle des GRK puisqu'elles provoquent le découplage GPCR-protéine G en phosphorylant le récepteur au niveau des boucles intracellulaires i_2/i_3 et de l'extrémité C-ter, permettant ainsi le recrutement des arrestines et conduisant à l'internalisation du récepteur et donc l'interruption du signal (Ferguson, 2001).

Régulation négative

La régulation négative, ou « down-regulation », intervient après une stimulation prolongée et répétée du récepteur de manière à protéger la cellule des effets délétères liés à une sur-activation (Tsao *et al.*, 2001). Elle peut résulter soit d'une diminution de la synthèse protéique (baisse de l'activité transcriptionnelle ou traductionnelle), soit d'une augmentation de la dégradation secondaire du récepteur (internalisation par endocytose ou séquestration), soit d'une intensification des processus de dégradation du récepteur *via* les lysosomes. Ce processus provoque donc une diminution de la densité de récepteurs à la surface cellulaire.

Dans le cas d'une augmentation de la dégradation ainsi que lors des processus de désensibilisation, les récepteurs sont internalisés. Ce processus repose essentiellement sur la voie des vésicules à clathrine mais peut également emprunter la voie des cavéoles.

Les mécanismes d'internalisation des récepteurs par la voie des vésicules à clathrine font intervenir les β -arrestines, qui servent de protéines adaptatrices: elles interagissent à la fois avec les récepteurs, les clathrines et le complexe adaptateur AP-2 (Laporte *et al.*, 2002) et permettent l'adressage des GPCR vers les puits recouverts de clathrine de la membrane. Une autre protéine membranaire, la dynamine, permet ensuite la scission de la vésicule par hydrolyse de GTP (Claing *et al.*, 2002; Wolfe et Trejo, 2007). Après internalisation, le récepteur est soit déphosphorylé dans les endosomes puis recyclé (re-sensibilisation), soit dégradé dans les lysosomes (régulation négative).

Les GPCR peuvent également être internalisés par la voie des cavéoles. Ces microdomaines membranaires invaginés (\varnothing 60 à 80 nm), riches en cholestérol et en sphingolipides et résistants à la solubilisation, contiennent une protéine spécifique: la cavéoline (Fielding et Fielding, 2000). Celle-ci servirait de structure d'attachement pour les récepteurs. Cette voie d'internalisation fait également intervenir la dynamine, permettant la scission des vésicules *via* l'hydrolyse de GTP (Okamoto *et al.*, 2000). Là encore, les récepteurs internalisés par la voie des cavéoles peuvent être soit recyclés vers la membrane, soit adressés aux lysosomes pour être dégradés.

Les rafts, microdomaines riches en cholestérol et en sphingolipides, permettraient également l'internalisation de GPCR, mais les mécanismes conduisant les récepteurs dans ces microdomaines restent méconnus (Kirkham et Parton, 2005).

1.2.3 Voies de signalisation indépendantes des protéines G

Les GPCR ont la capacité d'interagir avec d'autres protéines que les protéines G hétérotrimériques: les boucles extracellulaires et le domaine C-ter des récepteurs présentent en effet des motifs caractéristiques des interactions protéine/protéine. Des protéines se liant directement aux GPCR semblent donc participer à l'assemblage d'un véritable échafaudage protéique fonctionnel autour du récepteur (Brzostowski et Kimmel, 2001; Milligan et White, 2001). Ainsi, les kinases JAK/STAT, Src, ERK, GRK, ainsi que les β -arrestines et les protéines à domaines PDZ semblent capables de relayer directement les signaux induits par

les GPCR indépendamment des protéines G (Sun Y *et al.*, 2007), régulant des processus tels que la différenciation et la croissance cellulaire.

1.3 Considérations structurales et fonctionnelles

Considérations structurales

Seules deux structures cristallographiques de GPCR sont connues: celles de la rhodopsine (Palczewski *et al.*, 2000) et du récepteur β_2 adrénergique (Rasmussen *et al.*, 2007).

La rhodopsine, protéine de 348 résidus, constitue le récepteur modèle de la famille 1 qui regroupe 90 % des GPCR. Fortement exprimée au niveau des bâtonnets rétiniens, elle est activée par la lumière et déclenche une voie de signalisation intracellulaire aboutissant à la vision. Elle comporte quelques caractéristiques uniques comme la présence d'un chromophore covalamment lié aux domaines transmembranaires: initialement présent sous forme de 11-cis-rétinal (forme inactive), la capture d'un photon conduit à sa photoisomérisation en 11-trans-rétinal (forme active). La publication en 2000 de la structure tridimensionnelle de la rhodopsine bovine résolue à 2,8 Å fut la première description d'une structure à haute résolution d'un GPCR à l'état inactif (Palczewski *et al.*, 2000). Elle a confirmé la topologie à sept segments transmembranaires prédite à partir des profils d'hydrophobicité et a mis en lumière certaines précisions concernant la taille des segments transmembranaires, la présence d'un pont disulfure conservé chez les GPCR entre les cystéines 110 et 187 (situées respectivement à l'extrémité de TM_{III} et dans la boucle e_2) conférant une structure particulière à la boucle e_2 contribuant avec le N-ter à fermer le site de liaison du ligand, la présence d'une hélice amphiphile supplémentaire (VIII) située après TM_{VII} à la surface de la membrane plasmique, ou encore l'existence d'un réseau de liaisons hydrogènes entre hélices transmembranaires impliquant les résidus Asn55, Asp83, Asn78 et Trp161.

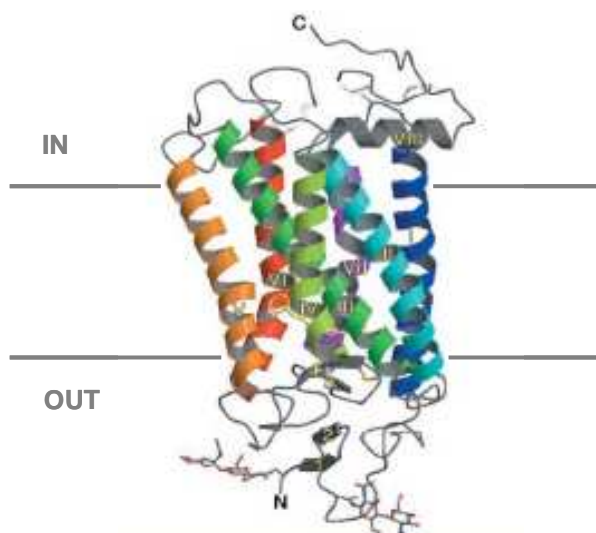


Figure 34 : Structure cristallographique de la rhodopsine bovine (d'après Palczewski *et al.*, 2000). On distingue la présence d'une hélice amphiphile (VIII) supplémentaire ainsi que la structuration particulière de la boucle e_2 .

Les boucles cytoplasmiques i_1 , i_2 et i_3 semblent s'ouvrir pour former l'interface putative avec les protéines G. Les segments TM_I , TM_{IV} , TM_{VI} et TM_{VII} présentent une courbure due à la présence de prolines, et le segment TM_{II} présente une courbure supplémentaire liée à la présence de glycines en positions 89 et 90.

Le récepteur β_2 adrénergique est le deuxième GPCR dont la structure a été résolue, à 3,4 Å/3,7 Å (Rasmussen *et al.*, 2007). Composé de 443 résidus, il appartient à la famille des récepteurs adrénergiques, activés par l'adrénaline et la noradrénaline (catécholamines), et module l'activité des canaux calciques de type L $Ca_v1.2$ et de l'adénylate cyclase *via* les protéines G_S : son activation provoque l'augmentation de la synthèse d'AMPc qui en retour active un certain nombre de kinases dont la PKA. Le récepteur β_2 est notamment impliqué dans la relaxation des muscles lisses, la glycogénolyse et la néoglucogénèse, ou encore la contraction des sphincters et du tractus gastro-intestinal. Des mutations touchant β_2 sont associées à des pathologies telles que l'asthme, l'obésité ou le diabète de type II.

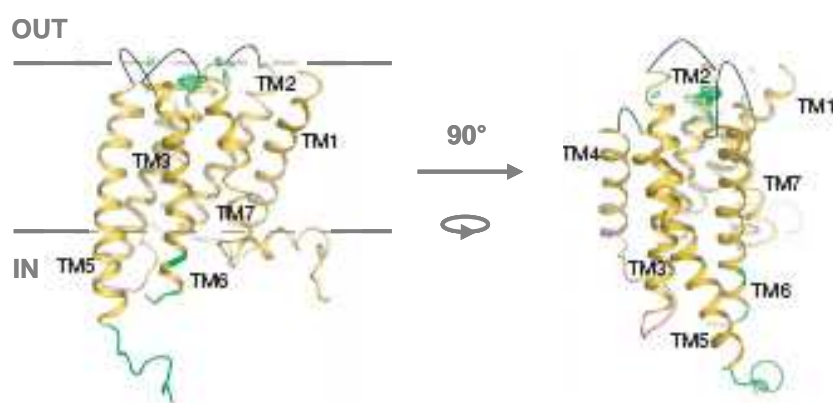


Figure 35 : Structure cristallographique du récepteur β_2 adrénergique (d'après Rasmussen *et al.*, 2007). On distingue là encore la présence d'une hélice amphiphile C-ter.

Sa structure est très proche de celle de la rhodopsine, avec sept segments transmembranaires coudés assortis d'une hélice amphiphile VIII surnuméraire en C-ter. Elle diffère néanmoins sur un point: là où le motif DRY (Glu134/Arg135/Tyr136) de la rhodopsine, situé à l'extrémité intracellulaire de l'hélice III, interagissait fortement avec l'extrémité cytoplasmique de l'hélice VI, cette interaction est beaucoup plus faible chez β_2 .

Considérations fonctionnelles

Plusieurs modèles théoriques ont été développés pour décrire les mécanismes d'activation des GPCR. Le plus répandu est le modèle complexe ternaire étendu (ou modèle à deux états), proposé pour décrire le fait que les récepteurs peuvent spontanément adopter une conformation active et être couplés aux protéines G en absence d'agoniste (Samama *et al.*, 1993; Leff, 1995). Le récepteur serait en équilibre entre un état inactif Ri et un état actif Ra. En l'absence d'agoniste, l'état inactif prévaut mais la barrière énergétique entre les états Ri et Ra est suffisamment faible pour permettre à une partie des récepteurs d'être spontanément dans l'état Ra. Les agonistes ayant plus d'affinité pour les récepteurs dans l'état Ra, l'équilibre est déplacé vers la forme Ra dont la proportion augmente. A l'opposé, les agonistes inverses inhibent l'activité spontanée en stabilisant le récepteur dans la conformation inactive Ri. Les antagonistes sont alors définis comme des ligands intermédiaires capables de lier avec la même affinité les états Ri et Ra et n'induisant donc pas de modification de l'équilibre. Dans le modèle ternaire étendu, le récepteur peut donc être activé et activer en retour les protéines G sans avoir lié son agoniste (**Figure 36**).

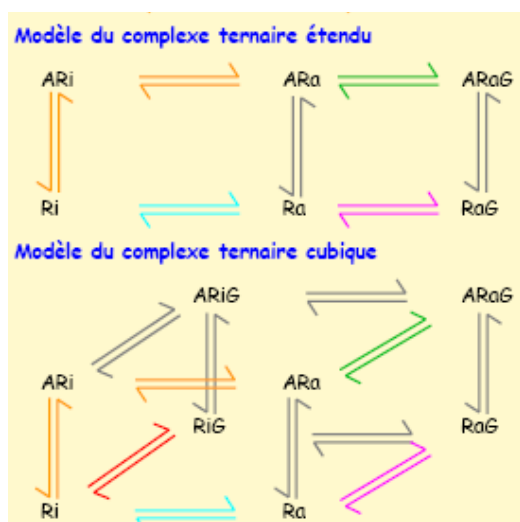


Figure 36 : Modèles d'activation des GPCR (d'après Kenakin, 2004). Ri: état inactif; Ra: état activé; A: agoniste; G: protéine G. On note la présence d'états activés sans fixation d'agoniste, et d'états inactifs liés aux protéines G.

Une variante du modèle ternaire, le modèle ternaire cubique, intègre une forme complexée entre le récepteur inactif et la protéine G (RiG) qui n'a pas la capacité d'induire de signalisation. Ce modèle complexe semble être le plus adapté puisque lui seul décrit l'existence d'un équilibre entre plusieurs états actifs Ra et inactifs Ri. Néanmoins, la situation réelle est probablement plus complexe car plusieurs conformations actives et inactives existent: suivant sa conformation un GPCR peut se coupler avec différents types de protéines G α et un même agoniste peut ainsi activer plusieurs voies indépendantes (Audet *et al.*, 2008).

Environ 40 % des GPCR humains présentent une activité constitutive (Seifert et Wenzel-Seifert, 2002), spontanée et indépendante d'un ligand, conduisant à la production de seconds messagers. En outre, de nombreux mutants constitutivement actifs de GPCR (ou CAM pour Constitutively Active Mutants) ont été décrits (Parnot *et al.*, 2002), actifs et capables d'activer les protéines G en l'absence de ligand. De nombreux récepteurs CAM de la famille 1 présentent une mutation récurrente dans le motif conservé DRY, suggérant que celui-ci est un motif structural majeur qui contraint le récepteur dans une conformation inactive. La fixation du ligand, déplaçant les boucles du récepteur et modifiant la conformation de ce motif, pourrait permettre l'interaction avec les protéines G.

Le schéma usuel de la signalisation des GPCR représente généralement un récepteur activé par la liaison d'un agoniste et entraînant l'activation d'une protéine G (stœchiométrie 1/1). Ce modèle simple permet d'expliquer la libération d'une molécule de GDP et la fixation d'une molécule de GTP, signature de l'activation des GPCR. Néanmoins, il est de plus en plus controversé et l'existence de phénomènes d'oligomérisation des GPCR devient une question récurrente, des preuves biochimiques, biophysiques et pharmacologiques montrant l'existence de dimères ou d'oligomères (Wang *et al.*, 2005). Ce phénomène pourrait être impliqué dans la modulation de propriétés fonctionnelles des GPCR comme la liaison, la signalisation, ou le trafic suivant les récepteurs considérés (Parnot et Kobilka, 2004). L'oligomérisation permettrait ainsi un niveau supplémentaire de modulation de l'activité des GPCR.

Ces interactions peuvent survenir entre membres d'une même famille, comme pour les récepteurs des opiacés chez lesquels la dimérisation κ/δ augmente l'inhibition de l'adénylate cyclase et module la pharmacologie du récepteur (Pascal et Milligan, 2005), mais également entre GPCR de types différents, entraînant la formation d'hétérodimères (Prinster *et al.*, 2005). C'est le cas des récepteurs GABA_B qui ne sont fonctionnels qu'à l'état d'hétérodimères GABA_B-R1/GABA_B-R2, GABA_B-R1 étant essentielle pour la liaison du

ligand et GABA_B-R2 pour l'expression à la surface (Galvez *et al.*, 2001). Parfois des récepteurs de sous-familles distinctes peuvent aussi former des hétérodimères, comme c'est le cas des récepteurs adrénergiques et récepteurs des opioïdes (Jordan et Devi, 1999), même si la signification fonctionnelle de ce phénomène est à ce jour inconnue.

Les mécanismes engendrant la dimérisation ne sont pas clairement établis, celle-ci pouvant survenir au niveau de la membrane plasmique sous l'influence d'un stimulus ou au moment de la synthèse. Ce processus pourrait toutefois être impliqué dans le contrôle-qualité du repliement des récepteurs néosynthétisés et leur adressage à la membrane plasmique, dans la modulation de la transduction du signal en modifiant la sélectivité d'interaction entre un GPCR et une protéine G donnée, ou encore au niveau de l'internalisation du récepteur en favorisant une voie d'endocytose de l'un des partenaires de l'hétérodimère (Bulenger *et al.*, 2005).

1.4 GPCR et santé humaine

Sur l'ensemble du marché pharmaceutique mondial, ~30 % des médicaments ont pour cible un GPCR (Hopkins *et al.*, 2002). On retrouve parmi ceux-ci des composés appartenant à des classes pharmacologiques aussi diverses que les anti-migraineux, anti-psychotiques, anti-histaminiques, les analgésiques ou encore les β -bloquants. En termes de vente, plus de 60 % des prescriptions ciblent des GPCR et l'ensemble des ventes de médicaments ciblant des GPCR ont rapporté 23,5 milliards de dollars aux industries pharmaceutiques en 2002 (Schöneberg *et al.*, 2004). Cette famille de protéines est donc très étudiée pour son implication directe en santé humaine et représente un enjeu financier considérable.

En conditions normales, l'activité d'un récepteur permet d'assurer une fonction physiologique essentielle, et est par conséquent hautement régulée. Néanmoins, des mutations peuvent survenir et entraîner l'apparition de récepteurs constitutivement actifs présentant des activités anormales et non régulées d'activation des protéines G et des effecteurs. Les origines des pathologies associées à des dysfonctionnements de GPCR peuvent être des aberrations chromosomiques ou des malformations de la protéine. On connaît à l'heure actuelle plus de trente maladies et phénotypes cliniques associés à des mutations de GPCR (**Tableau 7**) (Schöneberg *et al.*, 2004). Ainsi à titre d'exemple, une mutation du récepteur de la rhodopsine est à l'origine de défauts de pigmentation rétinienne, un mutant du récepteur de la

vasopressine est associé à des diabètes insipides, et des formes mutées des récepteurs aux hormones TSH et LH/hCG sont également associées à des pathologies humaines.

	Récepteur	Maladie associée
Mutation gain de fonction	Follitropine (FSH)	syndrome d'hyperstimulation ovarienne
	Lutropine (LHCG)	puberté mâle précoce et limitée
	Rhodopsine (RHO)	aveuglement nocturne stationnaire
	Thyrotropine (TSH)	hyperthyroïdie
	Calcium (CaS) PTH	hypoparathyroïdie dominant et sporadique chondrodysplasie, nanisme des membres inférieurs
Mutation perte de fonction	Angiotensine (AT ₂)	retard mental lié au chromosome X
	Vasopressine (V ₂)	diabète néphrogéniques insipides
	Mélanocortine (MC ₄)	obésité
	Rhodopsine (RHO)	rétinite pigmentaire
	MASS1	syndrome de Usher

Tableau 7 : Exemples de pathologies humaines associées à des mutations dans des GPCR.

Les GPCR jouent également un rôle critique vis-à-vis de certains pathogènes: au cours de l'évolution, les virus ont développé de nombreuses stratégies en vue de détourner à leur avantage la machinerie des cellules hôtes et pour échapper au système immunitaire, afin de garantir leur survie et leur propagation. De nombreux virus codent pour des protéines analogues aux GPCR, et certains ont même adopté des gènes de cellules hôtes et optimisé leurs produits à leur profit. Ainsi, certains membres de la famille des Herpesviridae et des Poxviridae ont incorporé dans leur génome certaines chimiokines et leurs récepteurs, et le récepteur ORF74, GPCR codé par l'herpesvirus HHV8, est impliqué dans le processus tumorigène du Sarcome de Kaposi (Couty et Gershengorn, 2004). D'autres GPCR analogues de récepteurs de chimiokines ont été identifiés, les plus connus étant le récepteur U12 codé par l'herpesvirus HHV6 et US28 codé par le cytomégalovirus hCMV, impliqués dans le développement de lymphomes d'athérosclérose (Gao et Murphy, 1994; Isegawa *et al.*, 1998). A l'heure actuelle, plus de dix chimiokines codées par des virus et approximativement le même nombre de récepteurs ont été identifiés par homologie de séquence avec l'équivalent humain (Rosenkilde *et al.*, 2001).

Enfin, le séquençage du génome humain a révélé ~200 nouveaux GPCR « orphelins » sans ligands endogènes identifiés (Im, 2002), et de nombreuses stratégies de pharmacologie

inverse sont mises en place pour identifier la fonction et les ligands de ces récepteurs qui semblent impliqués dans un grand nombre de pathologies humaines et représentant par conséquent un potentiel thérapeutique important (Civelli, 2005; Kutzleb *et al.*, 2005).

1.5 Cas particuliers des récepteurs M_2 et D_2

Ce travail faisant intervenir les récepteurs métabotropiques humains hM_2 et hD_2 , un bref aperçu de leurs propriétés respectives est apporté ci-dessous.

Le récepteur muscarinique M_2

Composé de 466 résidus, le récepteur muscarinique M_2 a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de cortex cérébral de rat (Bonner *et al.*, 1987). Appartenant à la classe des GPCR métabotropiques, son agoniste naturel est l'acétylcholine, mais il est également activé par d'autres molécules telles que la muscarine ou le carbachol, dont l'action est antagonisée par l'atropine. Les récepteurs M_2 agissent *via* un couplage avec les protéines $G_{i/o}$, $G_{\alpha i}$ inhibant l'activité de l'adénylate cyclase et provoquant une diminution de la concentration en AMPc. Cette action peut être inhibée par la toxine pertussique PTX: celle-ci catalyse l'ADP-ribosylation de la sous-unité $G_{\alpha i}$, maintenant cette dernière en configuration GDP-lié et empêchant l'interaction avec le récepteur. Les récepteurs M_2 régulent également l'activité de canaux potassiques *via* les sous-unités $G_{\beta\gamma}$: ils participent ainsi à la régulation des canaux potassiques cardiaques $I_{K_{Ach}}$, composés de l'assemblage hétérotétramérique GIRK1 (= Kir3.1) / GIRK4 (= Kir3.4) (GIRK, G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel) (Krapivinsky *et al.*, 1995). Ils interviennent encore dans la régulation de canaux calciques.

Chez l'homme, les récepteurs muscariniques M_2 sont notamment localisés au niveau cardiaque, où ils exercent plusieurs actions: ils participent au retour à un rythme cardiaque sinusal normal après stimulation par le système nerveux sympathique en ralentissant la vitesse de dépolarisation, mais réduisent également la force de contraction du muscle cardiaque atrial et la vitesse de conduction du nœud atrioventriculaire. On les retrouve également au niveau de la vessie et dans le tractus gastro-intestinal où ils participent à la contraction musculaire, dans le cerveau, dans les yeux où ils participeraient à la constriction / dilatation des pupilles (Abrams *et al.*, 2006).

Le récepteur dopaminergique D₂

Composé de 443 résidus, le récepteur dopaminergique D₂ humain (hD₂) a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de glande pituitaire (Grandy *et al.*, 1989). Lui aussi membre de la famille des GPCR métabotropiques, il est impliqué dans la régulation de la transmission nerveuse, et est activé par la dopamine ainsi que par le quinpirole dont l'action est antagonisée par le sulpiride. Il existe deux isoformes du récepteur issues d'un épissage alternatif: une isoforme courte présynaptique, notée D₂Sh (415 résidus) et aussi appelée « autorécepteur », impliquée dans des mécanismes de feed-back (synthèse, stockage et relargage de dopamine dans la fente synaptique), et une isoforme longue post-synaptique classique, notée D₂Lh (444 résidus), stimulée par les neurotransmetteurs (dopamine) et impliquée dans la poursuite post-synaptique de l'information nerveuse. L'isoforme D₂Lh diffère de D₂Sh par l'insertion de 29 résidus dans la troisième boucle intracellulaire, impliquée dans le couplage du récepteur aux protéines G.

A l'image de M₂, les récepteurs D₂ inhibent l'activité de l'adénylate cyclase *via* un couplage avec les protéines G_{i/o}, provoquant une diminution de la concentration en AMPc. Comme pour M₂, cette action de hD₂ sur l'adénylate cyclase peut être inhibée par la toxine pertussique PTX. Les récepteurs D₂ régulent également l'activité de canaux potassiques *via* les sous-unités G_{βγ}: ils modulent ainsi l'activité de canaux GIRK impliqués dans la régulation négative de l'excitabilité neuronale ou du tonus cardiaque (Kobayashi *et al.*, 2004).

On trouve donc les récepteurs D₂ principalement au niveau du système nerveux central, où ils participent à la conduction de l'information nerveuse, mais aussi au niveau de l'artère pulmonaire et dans les reins où ils affectent la diurèse et la natriurèse. De ce fait, une dérégulation de la signalisation de ces récepteurs est associée avec des désordres neurologiques et psychiatriques sévères, tels que la maladie de Parkinson, la schizophrénie, les troubles obsessionnels compulsifs ou encore la dépendance toxicomaniaque, et les récepteurs dopaminergiques neuronaux sont la cible principale de médicaments antipsychotiques et psycho-stimulant (Girault *et al.*, 2004).

2. Régulation des canaux Kir par les GPCR

2.1 Régulation des canaux GIRK

Comme décrit précédemment dans cette introduction, l'activité des canaux de la famille Kir3.x est en partie régulée par des voies de signalisation initiées par les GPCR, soit par interaction directe avec les protéines G hétérotrimériques soit *via* les voies de signalisation qu'elles activent, d'où la dénomination de canaux GIRK. Ceux-ci participant entre autre au contrôle de l'activité neuronale et du rythme cardiaque, leur régulation fine est primordiale et ils représentent des cibles thérapeutiques de choix (Kobayashi et Ikeda, 2006).

Régulation directe

La régulation directe de canaux GIRK par les GPCR intervient lors de processus rapides visant à diminuer l'excitabilité membranaire (contrôle du rythme cardiaque, relargage synaptique de dopamine modulant l'activité neuronale), l'exemple parfait étant la régulation des canaux cardiaques K_{ACh} (GIRK1/4) par les récepteurs M_2 activés par l'acétylcholine (Sui *et al.*, 1999). Ce processus de régulation fait intervenir les sous-unités β/γ des protéines $G_{i/o}$ qui interagissent directement avec les canaux GIRK, *via* un site composé de motifs présents sur les parties N-ter et C-ter cytoplasmiques des GIRK, et provoquent leur activation en stabilisant leur interaction avec le PIP_2 (**Figure 37**). Il semble que les sous-unités G_α soient également impliquées dans ce processus, se fixant au N-ter de GIRK en configurations $G_{\alpha\beta\gamma}$ et G_α/GDP -lié et permettant l'accès rapide du complexe $G_{\beta\gamma}$ dissocié à GIRK. De ce fait, il est probable que les GPCR, leurs protéines G associées et les canaux GIRK forment un complexe de signalisation au niveau de la membrane (Sadjja *et al.*, 2003).

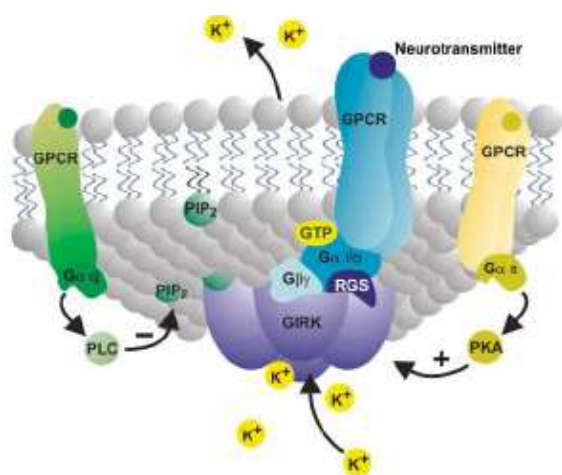


Figure 37 : Représentation schématique du complexe de signalisation des canaux GIRK (d'après Sadjja *et al.*, 2003). Les canaux sont activés directement par $G_{\beta\gamma}$ mais aussi régulés indirectement par des voies impliquant les protéines $G_{\alpha\beta}$ et $G_{\alpha\gamma}$.

Régulation indirecte

Les canaux GIRK sont également activés ou inhibés de manière indirecte par des voies dépendantes des GPCR et faisant intervenir les protéines G (**Figure 37**). Comme l'ensemble des canaux Kir, les GIRK sont activés par le PIP_2 ainsi que par des phosphorylations *via* la PKA. Or, ces mécanismes sont en partie régulés par des voies de signalisation dépendantes des GPCR et des protéines G: ainsi, l'activation des protéines G_{α_q} provoque une augmentation de l'activité de la phospholipase C (PLC), entraînant la dégradation du PIP_2 et provoquant une diminution de l'activité des GIRK. A l'inverse, l'activation des protéines G_{α_s} entraîne l'activation de la PKA qui en retour phosphoryle et active ces canaux. Les canaux GIRK sont donc activés *via* les voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G_{α_s} , et inhibés *via* les voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G_{α_q} . C'est le cas notamment des canaux cardiaques GIRK1/4 (Lei *et al.*, 2003) participant au contrôle du rythme cardiaque.

2.2 Régulation des canaux K_{ATP}

Kir6.2 est activé par le PIP_2 et les phosphorylations, et peut donc être indirectement régulé par les voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G. Ainsi, l'activation des protéines G_{α_q} provoque le recrutement de la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le PIP_2 en diacylglycérol (DAG) et inositol-triphosphate (IP_3): l'hydrolyse du PIP_2 lève son action activatrice sur Kir6.2, et la libération de DAG active la PKC dont l'activité de phosphorylation active Kir6.2 mais inhibe Kir6.1 (**Figure 38**). L'activation des protéines G_{α_s} provoque le recrutement de la PKA qui phosphoryle Kir6.x, entraînant son activation. L'activité des canaux K_{ATP} peut également être modulée directement par un certain nombre de protéines G comme discuté plus haut. Ainsi, ceux-ci peuvent être régulés par l'action de sous-unités $G_{\alpha/o}$ comme suggéré par des expériences de patch-clamp (Terzic *et al.*, 1994). Les sous-unités G_{α_i1} stimuleraient l'activité des canaux SUR1 + Kir6.2 et plus faiblement des canaux SUR2A + Kir6.2 (Sanchez *et al.*, 1998), et les sous-unités $G_{\beta\gamma_2}$ ont également été décrites pour activer les canaux SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2 (Wada *et al.*, 2000).

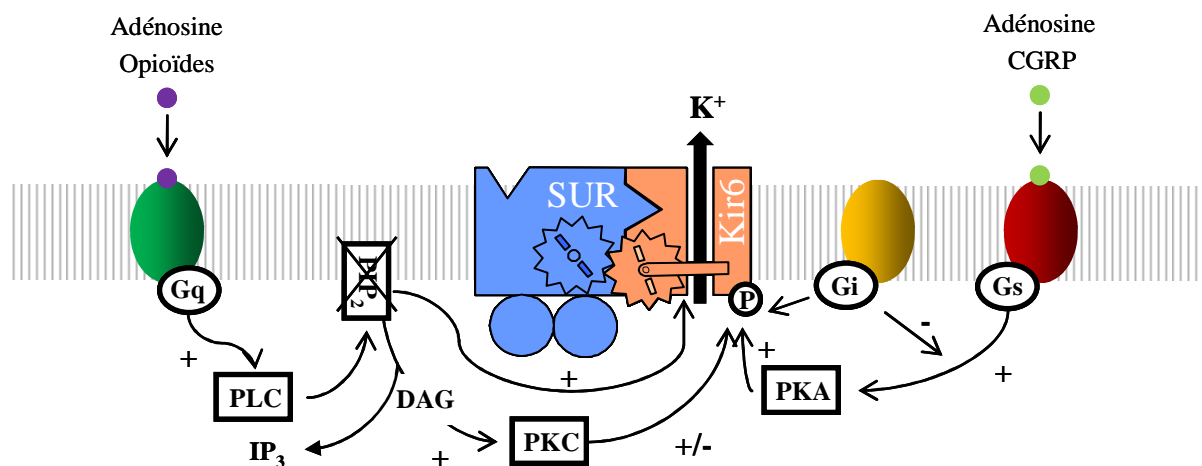


Figure 38 : Régulation des canaux K_{ATP} par les voies de signalisation associées aux GPCR.

3. Interactions directes GPCR/canaux et biocapteurs artificiels

3.1 Exemples d'interactions directes GPCR/canaux ioniques

En plus des mécanismes de régulation directe et indirecte de canaux ioniques, nécessitant l'intervention des protéines G hétérotrimériques, plusieurs études indiquent que les GPCR sont capables d'interagir directement avec un certain nombre de canaux et de réguler leur activité indépendamment de tout intermédiaire et de toute signalisation. C'est le cas notamment du récepteur dopaminergique D_1 , qui interagit avec les récepteurs-canaux NMDA et les canaux $Ca_v2.2$, D_2 , qui interagit avec les canaux Kir3 et CLIC6, et D_5 qui interagit avec les récepteurs-canaux GABA. C'est également le cas du récepteur adrénérgique β_2 qui interagit avec les canaux Kir3 et $Ca_v1.2$.

3.1.1 Interaction D_1 /NMDA et D_1 / $Ca_v2.2$

Le contrôle de l'excitabilité neuronale requiert une régulation fine des flux ioniques à travers la membrane plasmique des neurones, et notamment des influx de Ca^{2+} . Parmi les familles de récepteur-canaux présentes dans le système nerveux, on trouve notamment les récepteur-canaux au glutamate de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate), ou récepteurs canaux NMDA, perméables aux ions Ca^{2+} mais aussi Na^+ et K^+ . Ceux-ci sont principalement post-synaptiques et participent à la régulation de la plasticité neuronale et de l'excitotoxicité

activité-dépendantes. Ils sont impliqués dans des processus physiologiques fondamentaux tels que l'apprentissage et la mémoire ainsi que dans certaines pathologies telles que l'épilepsie, ou certains désordres mentaux. Produit de l'assemblage hétérotétramérique de deux sous-unités, NR1 et NR2, ces récepteurs canaux sont principalement localisés au niveau des dendrites et leur régulation complexe fait intervenir à la fois des agents extracellulaires (Mg^{2+} , Zn^{2+} , H^+ , glycine) et intracellulaires (Ca^{2+} , calmoduline), ainsi que des mécanismes faisant appel à des kinases et des phosphatases sous le contrôle de voies de signalisation associées aux GPCR et en particulier au récepteur dopaminergique D_1 (Greengard, 2001).

Egalement présents dans les dendrites, les récepteurs D_1 présentent la particularité de réguler l'activité de NMDA par l'intermédiaire des voies de signalisation activées par les protéines G_S auxquelles ils sont associés, mais aussi par interaction directe avec les récepteurs canaux. En effet, ils possèdent deux sites d'interaction avec NMDA localisés dans leur région C-ter cytoplasmique et notés t2 et t3: t2 interagit avec la région C-ter de la sous-unité NR1, et t3 avec la région C-ter de la sous-unité NR2A (Lee *et al.*, 2002). L'application d'agonistes spécifiques de D_1 sur des neurones entraîne ainsi de manière directe une inhibition des courants calciques traversant NMDA, possiblement par internalisation de ces récepteurs-canaux. Il convient de noter que cette régulation est réciproque puisque la stimulation de NMDA active en retour la signalisation dopaminergique reposant sur D_1 .

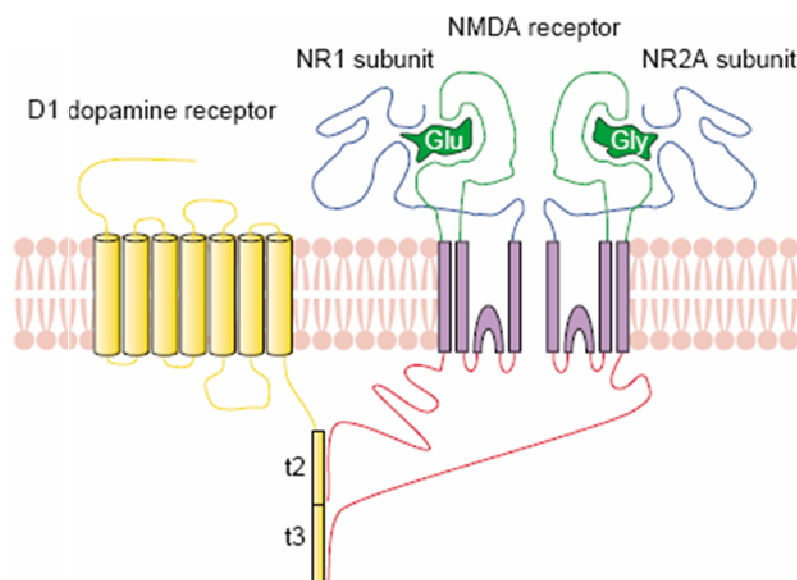


Figure 39 : Représentation schématique de l'interaction D_1 /NMDA (d'après Salter, 2003). Le fragment C-terminal t2 interagit avec la région C-terminale de la sous-unité NR1 et le fragment t3 avec celle de la sous-unité NR2A. La fixation d'un agoniste de D_1 entraîne l'inhibition de l'activité de NMDA.

Les récepteurs D_1 régulent donc par un couplage direct l'activité des récepteurs-canaux NMDA et participent ainsi au contrôle de l'excitabilité neuronale.

Les récepteurs D_1 participent également au contrôle des influx de calcium au niveau des dendrites *via* la régulation par interaction directe d'autres canaux calciques de type N, les canaux $Ca_v2.2$. C'est notamment le cas dans les neurones du cortex préfrontal, qui jouent un rôle prépondérant dans la mémoire, où ces deux protéines sont fortement exprimées. Les récepteurs D_1 y sont la cible principale de la signalisation dopaminergique et participent au maintien des fonctions cognitives. Bien que les mécanismes exacts soient encore méconnus, il semble que ces processus impliquent des variations de la concentration intracellulaire en calcium: l'activation des récepteurs dopaminergiques pré-synaptiques inhibe les entrées de Ca^{2+} *via* les canaux calciques de type N et bloque la libération de neurotransmetteurs. Or, les récepteurs D_1 participent à la régulation de canaux calciques voltages-dépendant et activent les canaux calciques de type L en recrutant la PKA *via* les protéines $G_{\alpha S}$, mais ils régulent également les canaux calciques de type N dans les neurones du cortex préfrontal. En effet, dans ces neurones, l'activation des récepteurs D_1 provoque l'inhibition des canaux $Ca_v2.2$ par interaction directe: la fixation d'agonistes sur les récepteurs D_1 entraînerait l'internalisation des canaux $Ca_v2.2$ auxquels ils sont physiquement couplés, réduisant ainsi les influx de Ca^{2+} présynaptiques et l'activité de neurotransmission synaptique (Kisilevsky *et al.*, 2008). Ainsi, par leur couplage direct avec les canaux $Ca_v2.2$ dans les dendrites des neurones du cortex préfrontal, les récepteurs D_1 contribuent au contrôle de la plasticité neuronale.

3.1.2 Interaction D_2 /Kir3 et D_2 /CLIC6

D'autres membres de la famille des récepteurs dopaminergiques sont capables d'interagir avec des canaux ioniques, dont les récepteurs D_2 . Des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de montrer que ce dernier fait partie de complexes membranaires stables de signalisation où il est en interaction avec les canaux hétérotétramériques Kir3.1/Kir3.2 et Kir3.1/Kir3.4 (Lavigne *et al.*, 2002). De telles associations ont notamment été retrouvées dans des tissus cérébraux de rat. L'assemblage de ces complexes nécessite la présence des sous-unités $G_{\beta\gamma}$ des protéines $G_{i/o}$ associées à D_2 , mais une fois à la membrane plasmique, ceux-ci sont stables indépendamment de $G_{\beta\gamma}$ et ne sont pas dissociés par l'activation du GPCR en présence d'agoniste. Si la formation de tels complexes favorise certainement une signalisation rapide entre le récepteur (D_2) et l'effecteur (canaux Kir3) puisque ceux-ci sont en interaction, l'existence de mécanismes de régulation directs indépendants des protéines G_i n'est pas avérée et reste à élucider.

Les récepteurs dopaminergiques de la famille D₂ ont également été décrits pour interagir physiquement avec des canaux chlorure de la famille CLIC (Chloride Intracellular Channel) de fonction inconnue, les canaux CLIC6: c'est le cas des récepteurs D₂, D₃ et D₄, qui interagissent avec ces canaux *via* leur région C-ter cytoplasmique (Griffon *et al.*, 2003). Associées aux membranes des organelles, les protéines CLIC sont alternativement décrites comme membranaires ou cytosoliques, et présentent la particularité inhabituelle pour un canal ionique de n'avoir qu'un segment transmembranaire putatif. Il semble que CLIC6 soit exprimé sous forme d'homodimère, deux sous-unités identiques s'assemblant par interaction entre leurs régions C-ter. Néanmoins, rien n'indique à ce jour que CLIC6 soit une cible de la signalisation des récepteurs de type D₂, aucune modification des flux de chlore n'étant enregistrée suite à l'application d'agoniste des récepteurs.

3.1.3 Interaction D₅/GABA_A

L'activité de neurotransmission des synapses inhibitrices, participant à la régulation de l'excitabilité neuronale, est fortement dépendante d'un type de récepteurs sensibles à l'acide γ -aminobutyrique (GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central): les récepteurs GABA. Il en existe trois classes différentes, GABA_A, GABA_B et GABA_C, GABA_A et GABA_C appartenant à la famille des récepteurs-canaux et GABA_B à celle des GPCR. L'activation des récepteurs-canaux GABA_A post-synaptiques suite à la fixation de GABA provoque un influx de chlore entraînant une hyperpolarisation inhibant la formation de potentiels d'action post-synaptiques: ceux-ci jouent donc un rôle majeur dans la physiologie nerveuse ainsi que dans certaines pathologies. Les récepteurs GABA_A adoptent une structure hétéropentamérique résultant de l'assemblage de cinq sous-unités distinctes: α , β , γ , δ , et ϵ , composés chacune de quatre hélices transmembranaires. Bien que leur composition puisse différer, la population la plus abondante de récepteurs GABA_A neuronaux est composée de l'assemblage des sous-unités α 1, β 2 et γ 2. Principalement localisés dans les dendrites et au niveau de la jonction soma-axone, l'activité de ces récepteurs est régulée par un certain nombre d'agonistes (GABA, benzodiazépines, barbituriques, anesthésiques, stéroïdes neuroactifs) et d'antagonistes (picrotoxine, bicuculline), ainsi que par des mécanismes de phosphorylation impliquant les protéines kinases PKA et PKC ou des tyrosines kinases.

Egalement présents dans ces régions dans certaines populations de neurones corticaux et de l'hippocampe, les récepteurs D₅ sont capables de réguler l'activité de GABA_A par une

interaction directe. En effet, en présence de leurs agonistes respectifs (*i.e.* dopamine et GABA), D₅ et GABA_A forment un complexe (notamment retrouvé dans des neurones de l'hippocampe) impliquant une interaction intracellulaire entre la région C-ter de D₅ et la boucle cytoplasmique IL2 de GABA_A (Liu *et al.*, 2000). Il en résulte une inhibition de l'activité de GABA_A, possiblement par internalisation de ces récepteurs-canaux, et donc un arrêt de la signalisation synaptique inhibitrice. Là encore cette régulation négative est réciproque puisque la stimulation de GABA_A inhibe en retour la signalisation dopaminergique reposant sur D₅.

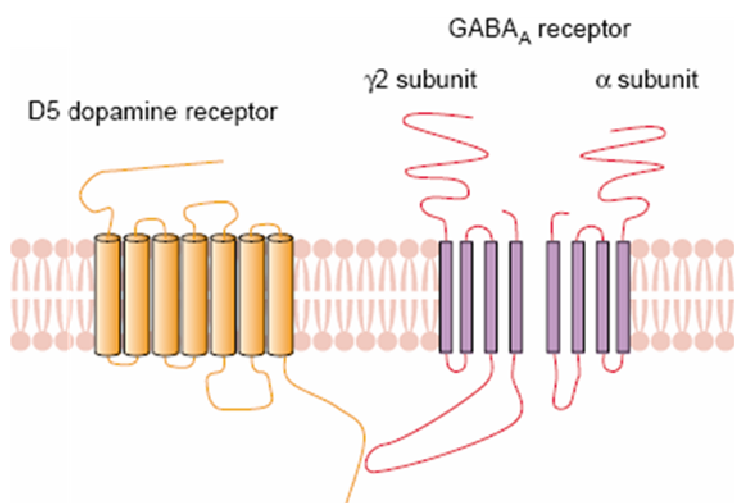


Figure 40 : Représentation schématique de l'interaction D₅/GABA_A (d'après Salter, 2003). La région C-terminale de D₅ interagit avec la boucle cytoplasmique IL2 de la sous-unité γ_2 de GABA_A. La fixation d'un agoniste de D₅ entraîne l'inhibition de l'activité de GABA_A et réciproquement.

Les récepteurs D₅ inhibent donc par un couplage direct l'activité des récepteurs-canaux GABA_A (et réciproquement), bloquant ainsi l'influx de chlore et régulant l'activité de neurotransmission synaptique inhibitrice.

3.1.4 Interaction β_2 /Kir3 et β_2 /Cav1.2

Au jour d'aujourd'hui, la majorité des interactions GPCR/canaux décrites dans la littérature impliquent des récepteurs dopaminergiques. Néanmoins, d'autres familles de GPCR sont également concernées et de telles observations pourraient bientôt se généraliser à l'ensemble des GPCR. Comme les récepteurs dopaminergiques D₂, les récepteurs adrénergiques β_2 ont été rapportés pour interagir physiquement avec les canaux GIRK. Là encore, des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de montrer que ces derniers

font partie de complexes membranaires stables de signalisation où il sont en interaction avec les canaux hétérotétramériques Kir3.1/Kir3.2 et Kir3.1/Kir3.4, ainsi qu'avec d'autres partenaires comprenant entre autres l'adénylate cyclase (Lavine *et al.*, 2002). De telles associations ont notamment été retrouvées dans des tissus cérébraux et cardiaques de rat. Là encore, ces complexes sont stables et ne sont pas dissociés par l'activation du GPCR en présence d'agoniste, mais la question de l'existence de mécanismes de régulation directs indépendants des protéines G reste en suspens.

Les récepteurs β_2 ont également été décrits pour interagir avec les canaux calciques de type L $Ca_v1.2$, là encore au sein de complexes comprenant l'adénylate cyclase mais aussi des protéines G hétérotrimériques, ainsi que les protéines kinase PKA et phosphatase PP2A (Davare *et al.*, 2001). L'extrémité C-ter cytoplasmique de β_2 interagit spécifiquement avec la sous-unité centrale α_{1C} formant le pore de $Ca_v1.2$, et la fixation d'agoniste au récepteur entraîne une activation rapide des canaux calciques impliquant peut-être l'adénylate cyclase et la PKA présentes dans le complexe. Ce type de complexe de signalisation est retrouvé dans les neurones de l'hippocampe, essentiellement au niveau post-synaptique, où il permet une transduction de signal rapide et spécifique entre récepteur (β_2) et effecteur ($Ca_v1.2$).

3.2 Génération de biocapteurs artificiels par couplage GPCR/canaux

Le développement de biocapteurs électriques intégrés sur puces électroniques représente un outil prometteur à la fois pour le diagnostic médical et le criblage à haut débit de molécules d'intérêt pharmacologique. En effet, la détection de signaux électriques permet de s'affranchir des systèmes de détection à base de réactifs marqués, de faire des mesures en temps réel et avec un rapport signal/bruit élevé, et d'intégrer le tout dans des systèmes microélectroniques. Néanmoins, l'obtention de tels outils suppose de parvenir à coupler un système de détection électrique avec l'élément récepteur fixant le composé à détecter. Plusieurs approches ont été développées pour y parvenir, faisant appel à des systèmes intégrant des canaux naturels, hybrides, ou encore à des systèmes dépourvus de canaux. Le domaine des biocapteurs basés sur des pores synthétiques ne sera pas abordé ici.

Biocapteurs basés sur des canaux naturels

Une première catégorie de biocapteurs est basée sur l'utilisation de canaux ioniques

naturels. Un premier exemple implique les canaux potassiques voltage-dépendants maxi- K_{Ca} : exprimés dans des cellules HEK293 déposées sur des transistors, l'activation de ces canaux provoque l'apparition de flux potassiques générant une variation de voltage transmise à la puce de silicium et mesurable au niveau du transistor (Straub *et al.*, 2001), ouvrant la voie au développement de systèmes basés sur la mesure sur puce de phénomènes électriques cellulaires associés à des flux ioniques.

Un autre exemple de capteur basé sur un canal naturel implique le récepteur ionotropique au glutamate iGluR6: couplé covalamment à un photophore (**Figure 41**), celui-ci est activé par émission lumineuse à 380 nm et inhibé de la même manière à 500 nm (Szobota *et al.*, 2007). Ce type de photocapteur est utilisé pour contrôler l'excitabilité neuronale, l'activation du système entraînant l'apparition de trains de potentiels d'action et inversement.

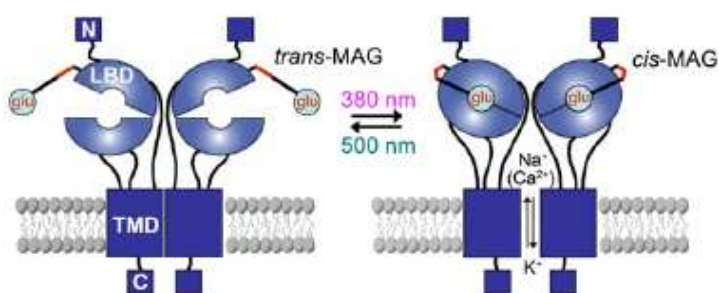


Figure 41 : Représentation schématique d'un photocapteur artificiel. La stimulation à 380 nm entraîne l'ouverture du canal et inversement à 500 nm (d'après Szobota *et al.*, 2007).

Le même type d'approche optique a été développé à partir de la rhodopsine sensible à la lumière ChR2 (Zhang *et al.*, 2006), là encore afin de contrôler spécifiquement l'excitabilité de certaines populations cellulaires: contenant un photosenseur, le all-*trans*-rétinal (ATR), ces récepteurs-canaux sont activés par excitation en lumière bleue à 470 nm.

Biocapteurs basés sur des canaux hybrides

Une troisième catégorie de biocapteurs repose sur la construction de canaux hybrides basés sur le modèle de l' α -hémolysine (α HL) ou des récepteurs aux neurotransmetteurs (GABA, NMDA, récepteur à la sérotonine de type 3A 5-HT_{3A} etc).

Une première approche de ce genre a été menée à partir de l' α -hémolysine (α HL). Cette protéine membranaire de staphylocoque est composée de sept sous-unités identiques

arrangées de manière à former un pore dont la conductance unitaire importante (1 nS) permet un suivi aisé de l'activité. Par ingénierie protéique, celle-ci a pu être modifiée de manière à intégrer au choix dans le lumen un site de reconnaissance aux cations divalents (Braha *et al.*, 1997), à un certain nombre de drogues, de protéines ou d'oligonucléotides: la fixation d'un ligand à son site spécifique dans la cavité luménale de α HL bloque le pore du canal pendant un temps donné, déterminé par son affinité pour le site, jusqu'à ce qu'il soit relargué (Bayley et Cremer, 2001; Martin et Siwy, 2007), générant des successions d'ouvertures/fermetures stochastiques détectables électriquement (**Figure 42**).

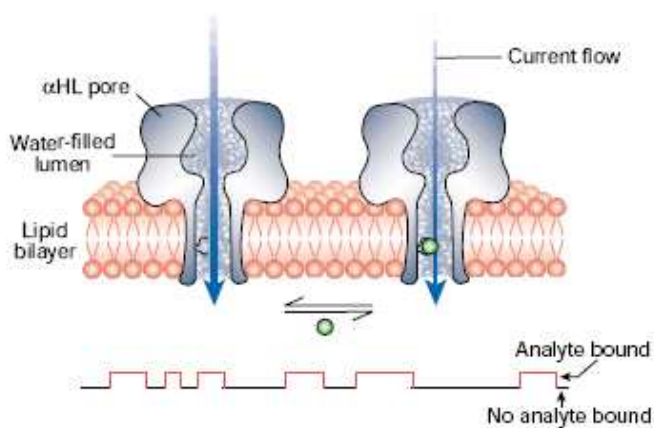


Figure 42 : Représentation schématique d'un biocapteur hybride basé sur l' α HL. La fixation d'un ligand sur un site spécifique introduit par ingénierie protéique bloque le pore du canal (d'après Bayley et Cremer, 2001).

Un autre exemple caractéristique repose sur un travail visant à comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine du couplage entre fixation du ligand et ouverture du pore chez le récepteur 5-HT_{3A}, impliqué dans la transmission synaptique. Dans cette étude, une chimère a été réalisée entre le domaine de liaison à l'acétylcholine de la protéine AchBP et le pore du récepteur 5-HT_{3A} (Bouzat *et al.*, 2004). Le remplacement de trois boucles intracellulaires, faisant face au pore ionique, de AchBP par leurs régions équivalentes chez 5-HT_{3A} suffit à générer un récepteur-canal hybride activé par l'acétylcholine. Il est donc possible, par ingénierie protéique, de coupler un domaine récepteur à un domaine pore pour créer un biocapteur fonctionnel hybride.

Biocapteurs dépourvus de canaux

En marge des approches mimétiques inspirées de modèles biologiques, une quatrième catégorie de biocapteurs peut être définie, ne reposant pas sur l'utilisation de canaux ioniques mais sur des techniques biophysiques de détection d'interaction entre puce de mesure et

matériel biologique. Ces systèmes de détection peuvent être basés sur le suivi de réactions red/ox, de flux ioniques à travers des pores artificiels.

Une première illustration de ce type de système est un capteur développé pour détecter la présence d'œstrogène, basé sur l'interaction spécifique entre l'hormone et son récepteur fixé sur une électrode d'or fonctionnalisée au nickel à l'aide d'un tag histidine (Murata *et al.*, 2001). La fixation d'œstrogène à son récepteur empêche la réalisation de réactions red/ox, entraînant des mouvements ioniques mesurables, à la surface de la puce et peut donc être détectée par suivi électrique (**Figure 43**).

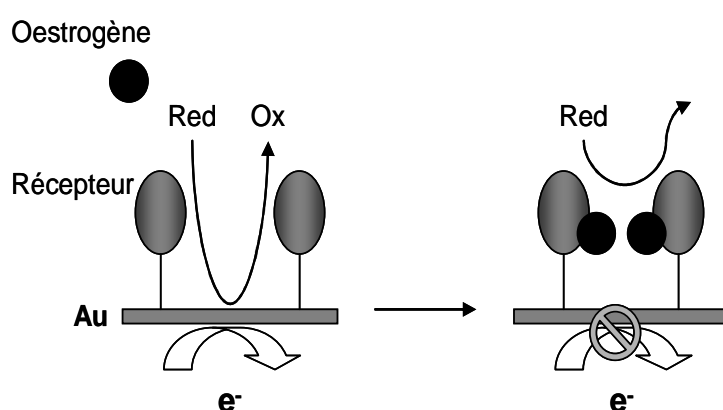


Figure 43 : Représentation schématique d'un biocapteur permettant la détection d'œstrogène. La liaison de l'hormone à son récepteur empêche la réalisation de réactions red/ox mesurables électriquement.

Un dispositif de détection et d'analyse d'ADN constitue une seconde illustration de ce type de biocapteur. Ce système repose sur la mesure de flux ioniques à travers des nanopores synthétiques, de diamètre suffisant pour permettre le passage de molécules d'ADN linéaires, percés dans une surface isolante séparant deux compartiments (**Figure 44**). L'application d'un voltage permet l'établissement de flux ioniques d'un compartiment à l'autre *via* les pores: le passage d'une molécule d'ADN linéaire à travers un pore interrompt ces flux ioniques et peut donc être détecté électriquement (Healy, 2007). L'analyse de la durée du blocage permet de déterminer certaines propriétés de la molécule en présence (taille et même séquence).

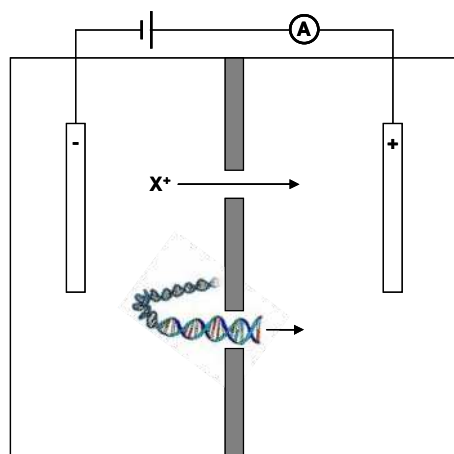


Figure 44 : Représentation schématique d'un biocapteur permettant la détection et l'analyse des propriétés de molécules d'ADN linéaires. L'ADN linéarisé traverse les pores et interrompt les flux ioniques les empruntant.

Biocapteurs basés sur le couplage GPCR/Kir6.2

L'idée de développer des biocapteurs basés sur des GPCR en soi n'est pas nouvelle, et des approches cellulaires ont déjà été proposées pour le criblage de candidats pharmaceutiques, la détection de composés ou la détermination d'affinités d'interaction (Zaman, 2004). Une approche de ce type reposant sur des fibroblastes déposés sur microélectrode d'or exprimant des GPCR endogènes activés par les nucléotides, les récepteurs purinergiques P2Y, a récemment été développée pour détecter la présence d'ATP (**Figure 45**): en présence d'ATP, l'activation de ces récepteurs entraîne le relargage des stocks de calcium intracellulaire, détectable par imagerie calcique, ainsi que la sécrétion de norépinéphrine dont l'oxydation à la surface de l'électrode entraîne des courants électriques mesurables (Feng *et al.*, 2007).

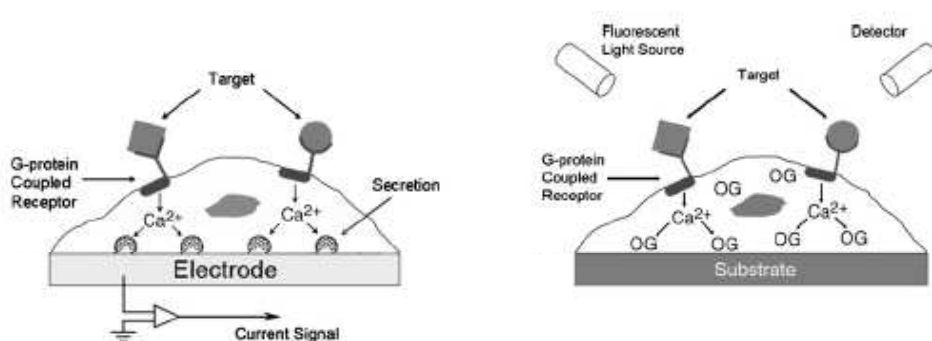


Figure 45 : Système cellulaire de détection d'ATP basé sur des fibroblastes exprimant des GPCR endogènes. La fixation d'ATP peut être détectée soit par mesure des courants résultant de l'oxydation de la norépinéphrine, soit par imagerie calcique (d'après Feng *et al.*, 2007).

Néanmoins, la miniaturisation nécessaire au criblage haut-débit impose de s'affranchir de ce type de systèmes et de développer des systèmes acellulaires. Les solutions proposées à l'heure actuelle reposent sur des techniques lourdes nécessitant l'emploi de la fluorescence, de la résonance plasmonique de surface ou de ligands marqués radioactifs (Leifert WR *et al.*, 2005) et nécessitent des étapes délicates d'expression et de purification des récepteurs et leur incorporation dans des membranes. Une premier pas dans l'affranchissement vis-à-vis des systèmes cellulaires a été franchi grâce à l'incorporation de GPCR synthétisés *in vitro* dans des membranes lipidiques artificielles (Robelek *et al.*, 2007). Reste néanmoins à parvenir à coupler ces récepteurs avec des systèmes de détection adéquats capables de rapporter la fixation de ligands.

Dans le cadre de la deuxième partie de cette étude, nous avons essayé de développer par ingénierie protéique un système couplé où l'activité d'un canal ionique pourrait être directement régulée par la liaison de ligands à un récepteur physiquement couplé au canal, permettant une détection électrique directe de la présence de ligands. Nous inspirant du modèle du canal K_{ATP} , où la fixation de ligands à SUR entraîne des modifications des propriétés d'ouverture de Kir6.2, nous avons cherché à coupler fonctionnellement Kir6.2 à d'autres récepteurs, notre choix se portant sur les GPCR. Outre le fait que ceux-ci constituent l'une des plus larges familles de récepteurs membranaires et qu'ils représentent des cibles pharmacologiques majeures en santé publique, nous avons pu voir au-dessus que certains d'entre eux ont la particularité d'interagir physiquement avec des canaux ioniques et de réguler leur activité, ce qui en fait de bons candidats pour une telle approche.

Matériel et Méthodes

Le mode opératoire mis en œuvre au cours de ces travaux pour la caractérisation fonctionnelle des canaux ioniques peut être résumé selon un schéma en quatre étapes :

- première étape : génération des constructions d'ADN par biologie moléculaire, puis transcription *in vitro* en ARN messagers codant pour les protéines d'intérêt.
- deuxième étape : injection des ARN messagers dans l'ovocyte de Xénope permettant l'expression hétérologue des protéines modifiées.
- troisième étape : vérification de l'expression des protéines par Western Blot sur les ovocytes de Xénope.
- quatrième étape : caractérisation fonctionnelle des canaux par patch clamp (configuration inside-out) ou microélectrode sur ovocytes.

L'ensemble de ces étapes est schématisé sur la **Figure 46**.

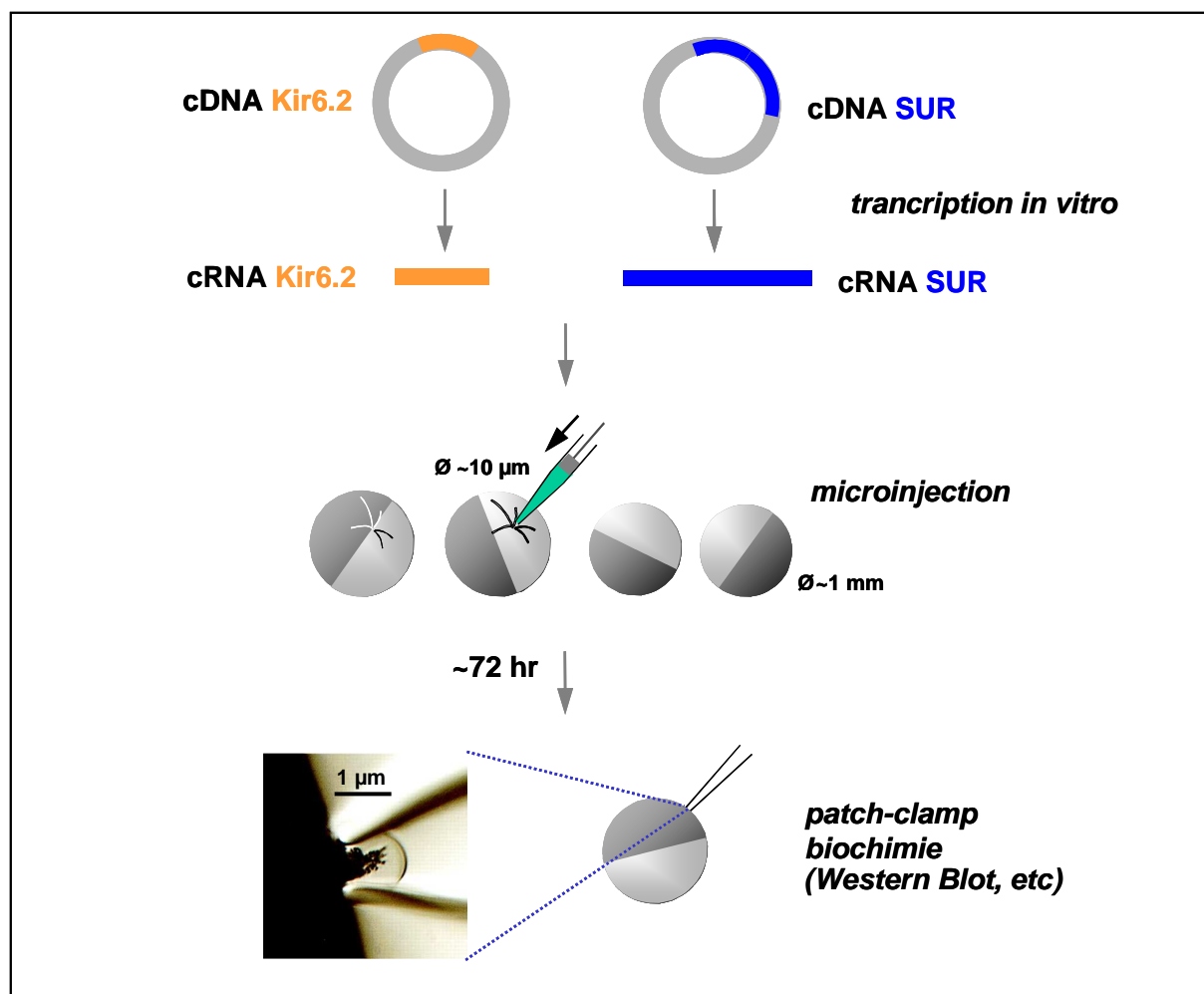


Figure 46 : Représentation schématique du mode opératoire expérimental permettant l'étude des canaux K_{ATP} modifiés

1. Biologie moléculaire

Les deux sous-unités SUR2A et Kir6.2 du canal K_{ATP} ont été clonées dans des vecteurs propres à l'expression dans l'ovocyte de Xénope. Les manipulations ont ensuite consisté à construire des récepteurs des sulphonylurées sauvages, chimériques ou mutants par mutagenèse dirigée. Les constructions d'ADN obtenues ont alors été amplifiées par culture bactérienne puis transcrites in vitro en ARNm pour expression dans l'ovocyte de Xénope.

1.1 Clones et vecteurs d'expression

Le clone de SUR1 (ABCC8) de hamster (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; 1581 ac. am., référence DDBJ/EMBL/N° d'accession dans GenBank: L40623) nous a été aimablement fourni par le Dr J. Bryan (Baylor College of Medicine, Houston, USA). Les clones de SUR2A (ABCC9) de rat (Inagaki *et al.*, 1996; 1545 ac. am., référence DDBJ/EMBL/N° d'accession dans GenBank: D83598) et de Kir6.2 (KCNJ11) de souris (Inagaki *et al.*, 1995; 390 ac. am., référence DDBJ/EMBL/N° d'accession dans GenBank: D50581) nous ont également été aimablement fournis par le Dr S. Seino (Chiba University School of Medicine, Japan). Le clone de MRP1 (ABCC1) humain (Cole *et al.*, 1992; 1531 ac. am., référence DDBJ/EMBL/N° d'accession dans GenBank: P33527) nous a été aimablement fourni par le Dr S. Cole (Queen's University, Kingston, Canada). Les clones des récepteurs couplés aux protéines G muscarinique M_2 (CHRM2) humain (Bonner *et al.* 1987; 466 ac. am., référence DDBJ/EMBL/N° d'accession dans GenBank: NM_000739) et dopaminergique D_2 (DRD2) humain (Grandy *et al.* 1989; 443 ac. am., référence DDBJ/EMBL/N° d'accession dans GenBank: M29066) nous ont été respectivement fournis par le Dr D. Logothetis (Mount Sinai School of Medicine, New York, USA) et la société Origene (Rockville, USA). Les clones de MDR1 (ABCB1) humain (Juliano *et al.* 1976; 1280 ac. am., référence DDBJ/EMBL/N° d'accession dans GenBank: M14758) et YCF1 (YDR135C) de levure (Szczyepka *et al.* 1994; 1515 ac. am., référence DDBJ/EMBL/N° d'accession dans GenBank: L35237) nous ont été respectivement fournis par le Dr D. Clarke (University of Toronto, Canada) et le Dr D. Thiele (University of Michigan Medical School, Ann Arbor, USA).

Les ADNc de Kir6.2, SUR1, SUR2A, et MRP1 ont été sous-clonés, pour les deux premiers, dans le vecteur pGEMHE (fourni par le Dr D. Logothetis, Mount Sinai Hospital, New York), et pour les deux derniers dans le vecteur pGEMHE2 (créé au laboratoire par le Dr F. Pagès). Il s'agit de plasmides dérivés du vecteur d'expression commercial pGEM3Z Promega adapté à l'expression protéique dans l'ovocyte de Xénope (**Figure 47**).

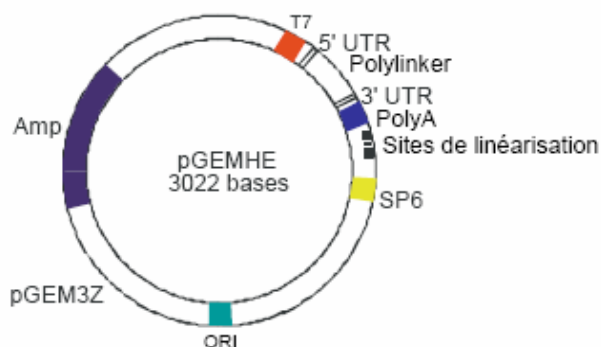


Figure 47 : Représentation schématique du vecteur d'expression protéique dans l'ovocyte de Xénope pGEMHE

ORI désigne l'origine de réplication d'un plasmide bactérien, permettant l'amplification dans des bactéries. Le promoteur T7 (SP6 en reverse) permet la transcription de l'ADN inséré au niveau du polylinker entre les séquences 3' et 5' du gène de la β -globine de *Xenopus laevis*, parties non traduites (*utr*, *untranslated*) qui induisent considérablement l'expression de protéines exogènes dans l'ovocyte de Xénope. Une queue poly-A précède un ensemble de sites de restriction permettant la linéarisation du plasmide avant transcription en ARN. La sélection des clones est possible grâce à la présence du gène *AmpR*, codant pour la β -lactamase, qui confère la résistance à l'ampicilline.

1.2 Construction des protéines chimériques

La stratégie mise en oeuvre pour identifier les régions du récepteur des sulphonylurées impliquées dans le couplage fonctionnel avec Kir6.2 a consisté à créer des chimères entre SUR2A et un membre proche de la famille des protéines ABC, MRP1 (ABCC1). MRP1 présente l'avantage d'être très homologue à SUR2A (48% d'homologie ; Moreau *et al.*, 2005) tout en exerçant des fonctions très différentes : impliquée dans les mécanismes d'efflux responsables de la résistance aux agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie, MRP1 est un transporteur peu spécifique de substrats hydrophobes n'ayant aucune interaction fonctionnelle décrite vis-à-vis de Kir6.2. A l'inverse, l'unique fonction connue de SUR2A consiste à réguler l'activité de Kir6.2 et aucune activité de transport ne lui a été attribuée à ce jour. Les méthodes de mutagenèse utilisées pour créer les chimères entre SUR2A et MRP1 sont décrites ci-dessous.

1.2.1 Mutagenèse dirigée

La méthode de mutagenèse QuickChange (**Figure 48**) permet de créer des mutations ponctuelles en modifiant la nature d'un acide aminé, d'insérer ou de déléter un ou plusieurs acides aminés. Au cours de cette étude, nous avons utilisé le kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). Cette méthode est basée sur la technique de PCR et utilise les performances de la PfuTurbo DNA Polymerase qui réplique avec une haute fidélité les deux brins d'un ADN plasmidique à partir de deux oligonucléotides synthétiques contenant la mutation à insérer. Ces deux oligonucléotides complémentaires s'hybrident sur chacun des brins du plasmide, puis sont allongés par la PfuTurbo DNA Polymerase qui génère ainsi un plasmide muté. Le produit PCR obtenu est ensuite digéré par l'enzyme DpnI afin de se débarrasser sélectivement de l'ADN parental méthylé ou hémi-méthylé, et de ne conserver que les plasmides mutants néo-synthétisés. A l'issue de cette digestion, les plasmides mutants sont introduits par transformation dans la bactérie *Epicurian Coli* pour amplification.

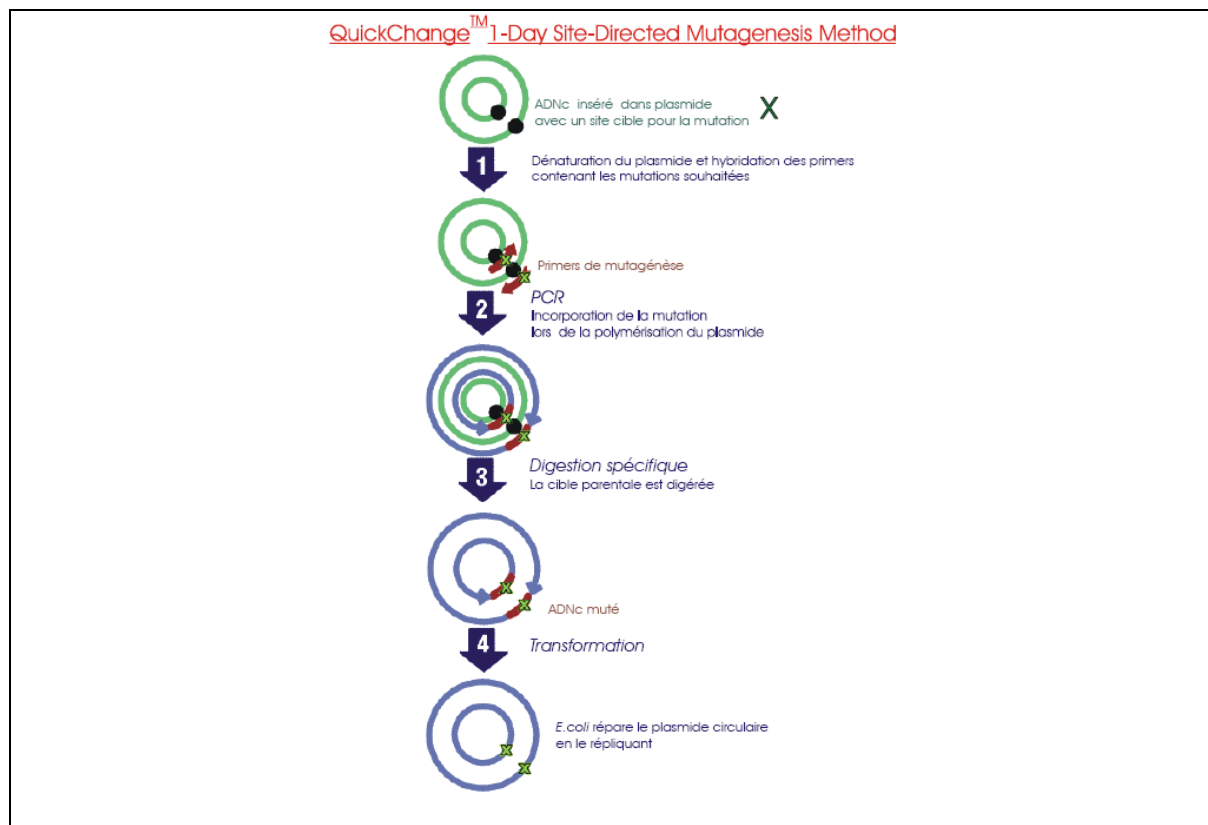


Figure 48 : Principe de la méthode de mutagenèse dirigée QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)

1.2.2 Insertion/Délétion de grands fragments

Pour la réalisation de constructions chimériques entre SUR2A et MRP1, nécessitant le remplacement de plusieurs dizaines de résidus, une méthodologie adaptée basée sur le protocole QuickChange a été développée, décrite ci-après (**Figure 49**).

Une première étape de PCR utilisant le vecteur MRP1-pGEMHE3 (violet) comme matrice, permet d'obtenir des oligonucléotides de grande taille (> 300 paires de bases) contenant la région de MRP1 à introduire encadrée par des extrémités 3' et 5' complémentaires de SUR2A dans la région d'intérêt. Cette réaction fait intervenir des oligonucléotides "hybrides" complémentaires de la région de MRP1 à amplifier en 3' (violet), et contenant des extrémités flottantes en 5' (bleu) complémentaires de la région de SUR2A ciblée pour l'insertion. Les produits de cette première PCR sont déposés sur gel d'électrophorèse pour contrôle, puis extraits à l'aide du Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) de manière à se débarrasser des réactifs de la première réaction de PCR (oligonucléotides).

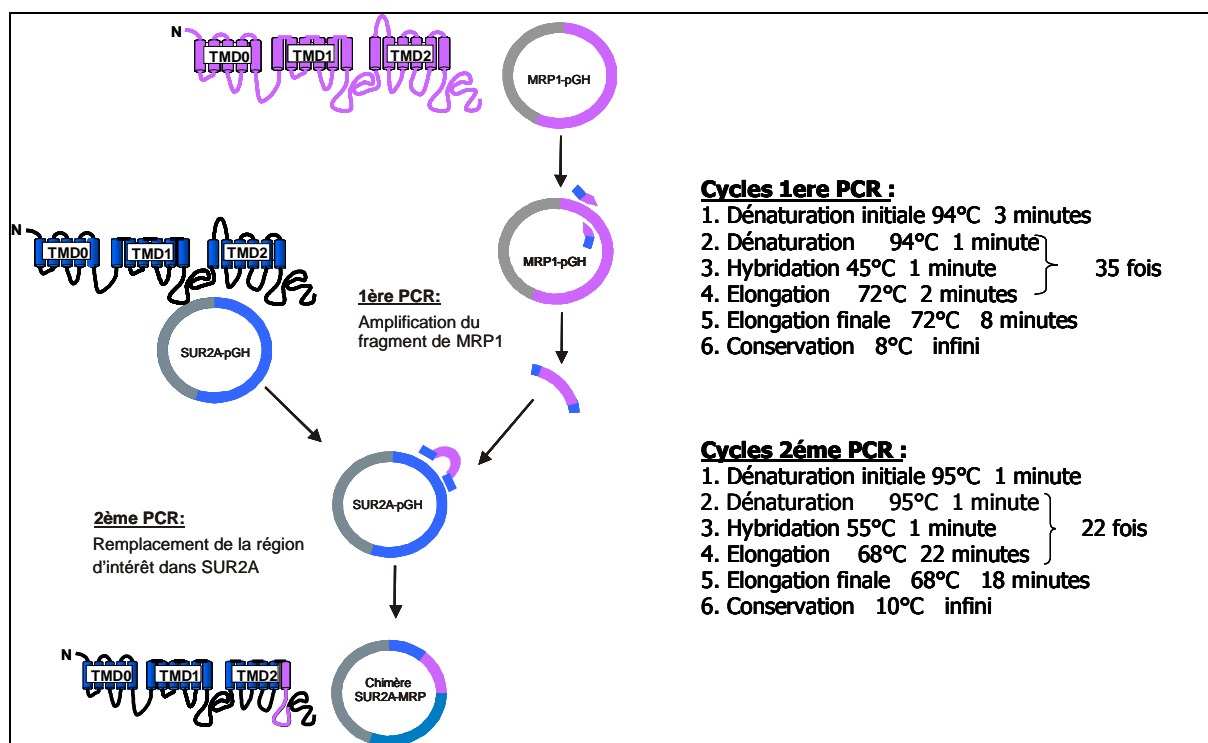


Figure 49 : Description schématique de la stratégie et des conditions de PCR utilisées pour la construction des chimères entre SUR2A et MRP1

Une deuxième étape de PCR, faisant intervenir le vecteur SUR2A-pGEMHE comme matrice et les produits de la première réaction de PCR comme oligonucléotides, permet ensuite l'insertion de la région de MRP1 amplifiée en lieu et place de son homologue chez SUR2A, donnant naissance à une chimère SUR2A-MRP1.

Le même protocole est appliqué pour la création de fusions GPCR-Kir6.2. Après une première PCR d'amplification du gène codant pour le GPCR d'intérêt, une deuxième PCR utilisant ce produit d'amplification comme oligonucléotide permet l'insertion du gène codant pour le GPCR en fusion avec le gène codant pour Kir6.2 murin dans le vecteur pGEMHE.

1.3 Amplification du matériel génétique

1.3.1 Transformation de bactéries compétentes

Il est possible de faire pénétrer de l'ADN étranger (plasmide, phage...) dans des bactéries en les rendant transitoirement « perméables », ou compétentes, par un traitement au CaCl_2 froid suivi d'un choc thermique à 42°C. Au cours de cette étude, nous avons eu recours à des

bactéries « ultra-compétentes » *Epicurian coli* XL-10 Gold (fournies par le kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis, Stratagene) pour les transformations après PCR, et à des bactéries compétentes *Escherichia coli* JM109 pour les transformations après sous-clonage. L'« ingestion » d'ADN est réalisée en appliquant un choc thermique de 45 secondes à 42°C. Les bactéries recombinantes sont ensuite sélectionnées sur la base de leur résistance à l'ampicilline : les plasmides recombinants étant porteurs d'un gène de résistance à l'ampicilline, seules les bactéries porteuses de ces plasmides sont capables de croître en présence de cet antibiotique.

1.3.2 Amplification et purification de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est extrait des bactéries par lyse alcaline par un protocole de miniprep standard et à l'aide des kits Midiprep Qiagen. Le principe de cette méthode repose sur une dénaturation différentielle de l'ADN génomique de structure relâchée et de l'ADN plasmidique super-enroulé. Lorsque de la soude est ajoutée au lysat cellulaire, seul l'ADN génomique est dénaturé de façon irréversible. L'addition d'acide et de sel permet la réassociation en réseau insoluble de l'ADN chromosomique alors que l'ADN plasmidique reprend sa forme native soluble. Une centrifugation permet ensuite l'élimination d'une grande partie des protéines, des ARN et de l'ADN chromosomique.

La méthode de Miniprep est utilisée pour la sélection des clones recombinants d'intérêt. Les clones bactériens à tester sont mis en culture dans 5 mL de milieu LB (Luria-Bertani) supplémenté en ampicilline à raison de 100 µg/mL.

En revanche, la méthode de Midiprep est utilisée pour l'obtention d'ADN plasmidique de plus grande pureté en vue d'applications ultérieures (transcription in vitro). Le principe reste identique, mais la quantité de matériel génétique est supérieure puisqu'on part de cultures bactériennes dans 50 mL de milieu LB supplémenté en ampicilline (100 µg/mL). La pureté est améliorée grâce à une étape de filtration permettant de se débarrasser des débris cellulaires, suivie d'un passage sur colonne d'affinité retenant sélectivement l'ADN plasmidique. Toutes les solutions nécessaires à l'extraction sont fournies dans le kit Qiagen Plasmid Purification.

L'ADN plasmidique extrait par Miniprep ou Midiprep est ensuite précipité à l'isopropanol et culotté par centrifugation à 14000g dix minutes à 4°C. Les culots sont lavés à l'éthanol 70%, puis séchés à l'air libre avant d'être solubilisés dans l'eau. La validité des constructions

est ensuite contrôlée par digestions enzymatiques à l'aide d'enzymes de restriction spécifiques, ainsi que par séquençage. Les concentrations d'ADN sont estimées par lecture de la densité optique à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

1.4 Séquençage

La technique de séquençage mise en œuvre est adaptée de la méthode de Sanger *et al.* (1977). Les séquençages sont effectués par la société Genome Express (Meylan, France) sur séquenceur automatique. Quatre réactions de PCR sont menées parallèlement en présence des quatre bases dont une est marquée par un fluorochrome spécifique, présent en très faible concentration, sous forme didésoxyribonucléotide triphosphate. La réaction est initiée par un primer spécifique de la zone à séquencer et s'arrête après l'incorporation d'un didésoxyribonucléotide.

La migration sur capillaires des produits de séquençages fluorescents ayant incorporé un didésoxyribonucléotide permet la séparation des divers intermédiaires réactionnels formés. Un système optique couplé à un logiciel d'analyse détecte le fluorophore présent à l'extrémité de chaque intermédiaire réactionnel. L'ordonnement de ces intermédiaires permet alors de reconstituer la séquence nucléotidique.

1.5 Transcription in vitro

Les mutants réalisés sont transcrits en ARNm afin d'être injectés dans les ovocytes de Xénope où ils seront exprimés. Au cours de cette étape, tout le matériel et les réactifs utilisés sont « RNase-free », le port de gants est vivement conseillé, et l'ensemble des manipulations est réalisée sous hotte aspirante afin de se garantir des contaminations extérieures. Ainsi, l'eau est traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) qui inactive les RNases. L'eau est incubée une nuit à température ambiante en présence de 0.05% de DEPC puis est autoclavée afin de dégrader le DEPC, toxique pour les ovocytes.

La transcription est réalisée par l'ARN polymérase T7 qui cible le promoteur T7 présent sur le plasmide d'expression dans l'ovocyte pGEMHE. Le vecteur cible est au préalable linéarisé en aval de la séquence *3'utr* par coupure enzymatique simple, et purifié par une étape d'extraction phénol/chloroforme/isoamyl-alcool afin d'éliminer tout résidu susceptible de perturber la transcription.

La transcription est alors réalisée sur 1 μ g d'ADN linéarisé et purifié à l'aide du kit mMessage mMachine Ambion (cf. protocole www.ambion.com). Ce kit permet la synthèse de grandes quantités d'ARNm coiffé en 5' d'une guanosine méthylée permettant l'initiation de la traduction et la protection de l'ARNm de la dégradation par les RNAses 5' \rightarrow 3'.

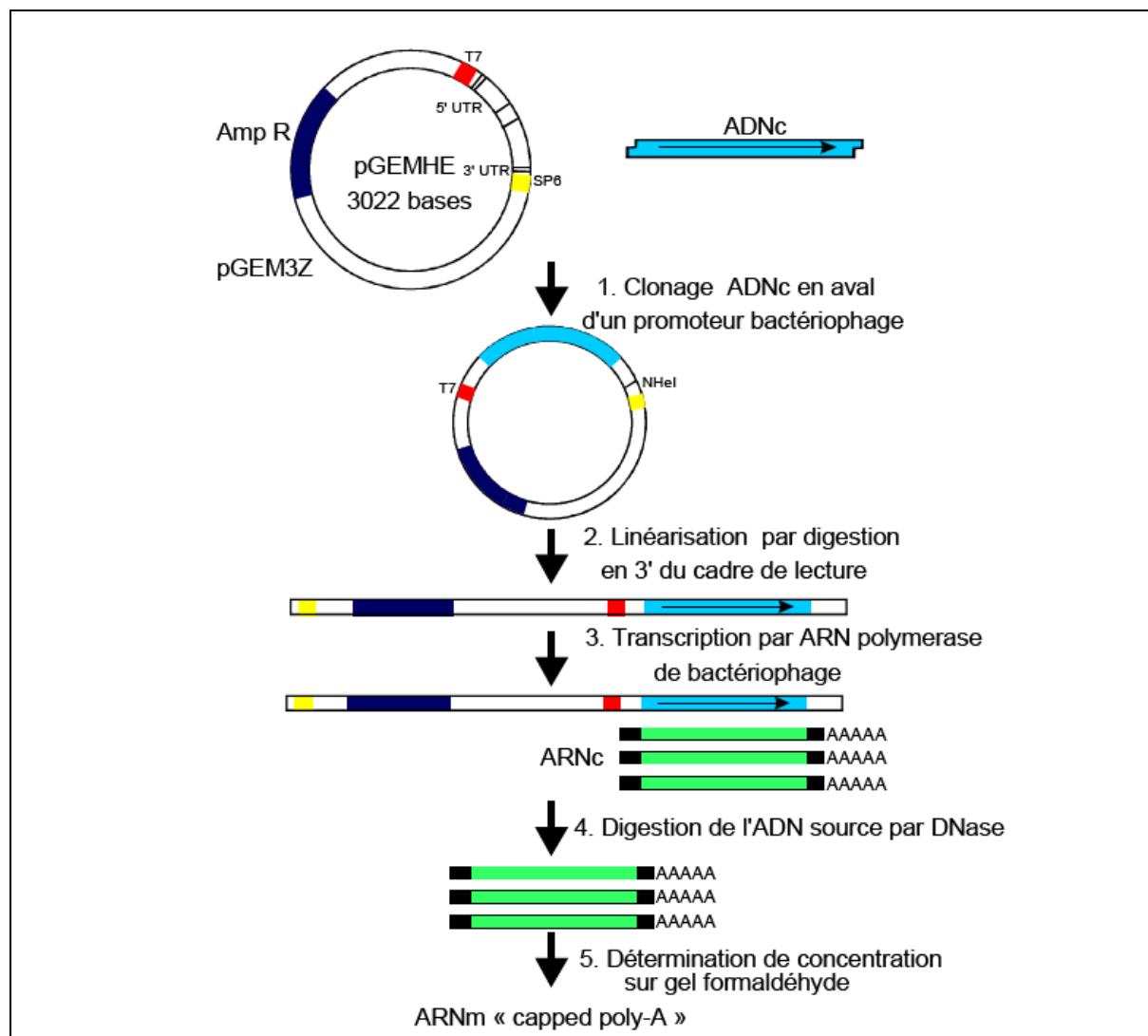


Figure 50 : Principe et étapes de la transcription *in vitro*

Après transcription, les ARNm sont purifiés par extraction phénol/chloroforme puis précipités à l'éthanol. La quantité d'ARNm est alors estimée par mesure de la densité optique à 260 nm et dépôt sur gel d'agarose dénaturant (formaldéhyde) avec un marqueur de concentration.

Les ARNm sont ensuite dilués à leur concentration d'injection (0.04 μ g/ μ L pour Kir6.2 et 0.12 μ g/ μ L pour SUR2A) et conservés à -80°C pour limiter leur dégradation.

2. Expression hétérologue dans l'ovocyte de Xénope

2.1 L'ovocyte de Xénope, outil pour l'expression fonctionnelle



L'ovocyte de Xénope (*Xenopus laevis*, grenouille d'Afrique du Sud) est une cellule sphérique de 1 à 1,3 millimètre de diamètre, suffisamment grosse pour être facilement manipulée et microinjectée. Son cytoplasme est rempli de réserves accumulées au cours de l'ovogenèse (enzymes, ribosomes, ARNt, protéines nécessaires à la traduction

et la maturation) qui permettent aisément la traduction protéique d'ARNm exogènes, ainsi que des modifications post-traductionnelles et un adressage correct. C'est donc un bon outil pour l'étude des canaux ioniques et récepteurs membranaires exogènes, et il est utilisé comme tel depuis de nombreuses années (Barnard *et al.*, 1982 ; revues de Dascal, 1987 ; Sigel, 1990 ; Shih *et al.*, 1998 ; Wagner *et al.*, 2000). Il convient néanmoins de noter que l'environnement de l'ovocyte diffère singulièrement de celui du tissu d'origine (composition en phospholipides, voies de régulation intracellulaires), et que certaines propriétés des canaux étudiés peuvent en être affectées.

L'ovocyte est caractérisé par l'existence de deux hémisphères de couleurs distinctes : un pôle animal foncé et un pôle végétatif clair (**Figure 51**). Cette polarité est maintenue dans l'ovocyte puisque le noyau est localisé dans le pôle animal, tandis que les ARNm sont répartis dans toute la cellule.

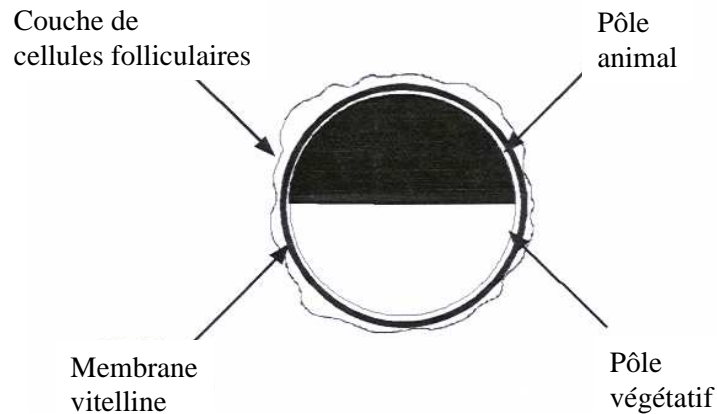


Figure 51 : Représentation schématique d'un ovocyte de Xénope au stade V/VI (Guide Axon)

L'ovocyte est entouré par :

- une membrane vitelline (matrice glycoprotéique donnant sa structure sphérique à l'ovocyte). Cette membrane est éliminée avant les expériences de patch-clamp pour accéder à la membrane plasmique. L'ovocyte dévitellinisé, très fragile, doit être manipulé avec précaution.

- une couche de cellules folliculaires entourant la membrane vitelline. Ces cellules, électriquement couplées les unes aux autres par des jonctions gap (Browne et al., 1979), possèdent des canaux potassiques endogènes et doivent donc être éliminées pour les mesures par un traitement à la collagénase.

Les ovocytes défolliculés ont un potentiel de membrane compris entre -40 et -60 mV et une résistance membranaire d'environ 1 à 3 M Ω . Les réserves accumulées dans le cytoplasme au cours de l'ovogenèse leur confèrent une grande autonomie vis-à-vis du milieu extérieur: ils expriment donc peu de transporteurs membranaires endogènes, généralement minoritaires par rapport aux protéines exprimées de manière exogène. La principale conductance ionique endogène est une conductance Cl⁻ régulée par Ca²⁺, maintenant le potentiel de membrane proche du potentiel d'inversion de l'ion Cl⁻, vers -40 mV. Cette conductance, notée I_{Cl(Ca)}, peut être supprimée en remplaçant les ions Ca²⁺ par les ions Mg²⁺ ou par l'ajout de bloqueurs spécifiques des canaux calciques (Mn²⁺, Co²⁺, La²⁺ ou encore Ni²⁺) ou de chélateurs des ions Ca²⁺ (EGTA).

Il existe également un courant potassique dépendant du potentiel, d'amplitude très faible (quelques dixièmes de nA), qui n'interfère pas avec les courants exogènes (sauf en cas de taux d'expression très faible). Des courants sensibles à la pression, ou mécanosensibles, peuvent

être enregistrés dans la membrane de l'ovocyte quand on applique dans la pipette de mesure des pressions positives ou négatives (≥ 5 mbar). Ces courants entrants I_{stretch} peuvent parfois apparaître spontanément. Pour de plus amples informations sur les courants ioniques de l'ovocyte de Xénope, se référer à la revue de Weber (1999).

2.2 Préparation des ovocytes

Les Xénopes utilisées proviennent du Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire de Montpellier (CNRS). Leurs conditions d'élevage sont simples : elles sont regroupées dans un aquarium où la température de l'eau (filtrée) est maintenue entre 16 et 18°C, dans une pièce isolée, avec un cycle d'éclairage 12h jour / 12h nuit.

Chaque semaine, les ovocytes sont prélevés sur une Xénope anesthésiée par 1 g/l de 3-aminobenzoïc acid ethyl ester (Sigma). L'animal est maintenu sur glace pendant toute la durée de l'opération afin de favoriser l'anesthésie. Une fois l'animal sédaté, une incision abdominale de la peau puis du muscle permet d'accéder aux lobes ovariens (mini-laparotomie). Quatre à cinq lobes sont prélevés à l'aide de pinces, puis le muscle et la peau sont suturés avec du fil résorbable (fil de suture résorbable 5-0, pointe 16 mm 3/8c, 45 cm, Ethicon VICRYL™). La Xénope est ensuite placée dans un bac de réveil contenant de l'eau, sur une pierre humidifiée afin de prévenir tout risque de noyade.

Un traitement de trois fois 30 minutes à la collagénase 20 mg/mL (Collagenase IA, Sigma) permet de digérer le tissu conjonctif et de séparer chaque ovocyte de son enveloppe de cellules folliculaires. Les ovocytes sont ensuite lavés par dix rinçages successifs dans une solution ionique dépourvue de calcium (Solution A : NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, Hepes 16 mM, MgSO₄ 0,82 mM, pH 7,4), triés et conservés dans une solution isotonique (Solution A+B : NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, Hepes 16 mM, MgSO₄ 0,82 mM, Ca(NO₃)₂ 0,3 mM, CaCl₂ 0,41 mM, pH 7,4) supplémentée en antibiotiques (pénicilline 1000 U/mL, streptomycine 10 mg/mL, gentamycine 0,1 mg/mL). Une étape de tri visuel permet ensuite de sélectionner les ovocytes au stade VI (deux pôles de couleurs distinctes) utilisés pour la microinjection.

2.3 Injection des ARNm

Les ovocytes sont immobilisés sur une grille dans une boîte de Pétri contenant de la

solution A+B supplémentée en antibiotiques. L'injection est réalisée à l'aide de microcapillaires de verre (3.5'' Drummond # 3-000-203-G/X) étirés (Etireuse horizontale Micropipette Puller P-97, Sutter Instruments Co) puis cassés pour une taille finale de $\sim 10 \mu\text{m}$ avant d'être remplis d'huile minérale incompressible (Sigma) maintenant l'étanchéité du système. On aspire dans un microcapillaire le mélange des ARNm codant pour les deux sous-unités du canal (ARNm codant pour SUR + ARNm codant pour Kir6.2, dans des proportions respectant la stoechiométrie des deux sous-unités), pour les fusions ABCC-Kir6.2 ou GPCR-Kir6.2, ou encore pour les GPCR seuls dans les conditions suivantes: 2 ng de Kir6.2 pour 6 ng de SUR; 2 ng de Kir6.2 Δ C36; 5 ng de GPCR-Kir6.2; 2 ng de Kir3.4 S143T; 1 ng de PTX-S1; 2 ng de M2; 2 ng de D2. L'ovocyte est alors empalé à l'aide du microcapillaire et l'ARN est injecté à l'intérieur (**Figure 52**), à raison de 50 nL par ovocyte. Le remplissage de la pipette et les microinjections sont réalisés à l'aide d'un injecteur à piston (Nanoject, Drummond).

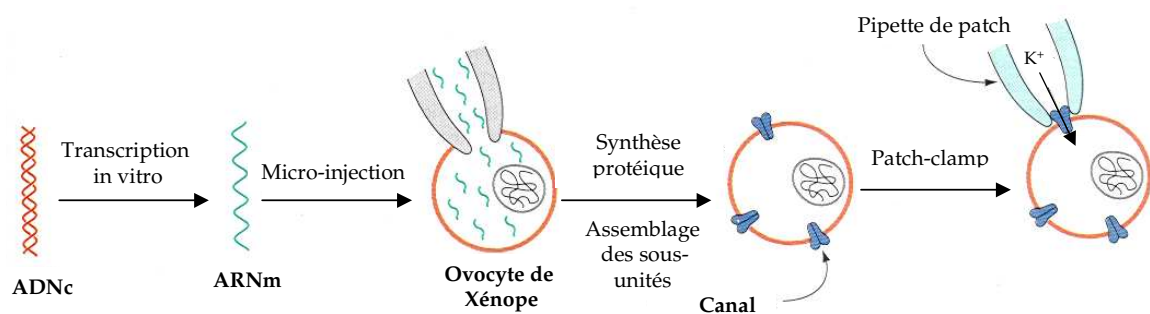


Figure 52 : Etapes de l'expression fonctionnelle dans l'ovocyte de xénope

Les ovocytes sont ensuite incubés individuellement (afin de prévenir toute contamination) sur plaques 96 puits entre 2 et 10 jours à 19°C dans la solution A+B supplémentée en antibiotiques, afin de permettre une bonne expression et un bon adressage protéiques à la membrane plasmique.

3. Caractérisation des protéines membranaires exprimées

3.1 Contrôle de la synthèse protéique

De manière à vérifier la bonne expression des protéines recombinantes, on procède à un Western Blot sur fractions membranaires. Huit ovocytes sont broyés dans 900 μL de tampon

de solubilisation (50 mM phosphate de sodium, 150 mM NaCl, 0,1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 8, d'après Tucker *et al.*, JBC 1996) supplémenté en inhibiteurs de protéases (1 tablette pour 50 mL, Roche) par 5 passages successifs dans une aiguille de 18 g, puis par 2 passages dans une aiguille de 27 g. Les lysats sont centrifugés 3 fois 10 minutes à 1000 g, puis le surnageant contenant les membranes totales est précipité par ultracentrifugation à 165000 g pendant 30 minutes. Le culot est repris par 15 μ L de solution RIPA (pour 500 mL : 200 mL H₂O, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % sodium deoxycholate, 0,1 % SDS, 1% Triton X-100, pH 8) contenant des inhibiteurs de protéases (pour 5 mL de RIPA : 10 μ L DMSO, 10 μ g leupeptine, 10 μ g pepstatine, 10 mg iodoacétamide, 50 μ L PMSF).

Les préparations membranaires sont ensuite solubilisées dans un tampon de charge dénaturant à raison d'un volume de protéine pour un volume de tampon (Tris-HCl pH 6.8 125 mM, SDS 4%, 2- β mercaptoéthanol 10 %, glycérol 20 %, bleu de bromophénol 0.02 %). Elles sont alors chargées dans les puits d'un gel de concentration à 5 % de Bis-acrylamide avant de passer dans un gel de migration à 10 % de Bis-acrylamide. Chargées négativement par le SDS, les protéines migrent suivant leur poids moléculaire apparent sous l'influence d'un courant de 50 mA.

L'électrophorèse s'effectue dans un tampon de migration (25 mM Tris, 250 mM glycine, 0,1 % SDS) pendant 1h. Le dépôt en parallèle de protéines standard colorées de poids moléculaires connus permet l'estimation de la taille des protéines déposées.

Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond ECL Amersham) à 100 mA sur la nuit en chambre froide.

La membrane est rincée rapidement dans du TBS 1X (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4), puis elle est saturée 1h dans une solution de blocage (TBS 1X, Blocking Reagent 1 %) afin d'éviter les fixations d'anticorps non spécifiques. L'incubation avec l'anticorps primaire (anticorps monoclonal de rat 3F10 anti-HA) à 100 ng/mL pendant 1h30 à température ambiante est suivie d'un rinçage rapide dans du TBS 1X, puis de 2 lavages de 10 et 30 minutes dans du tampon de lavage (TBS 1X, Blocking Reagent 1 %, Tween 0,1 %). La membrane est alors incubée pendant 1h30 à température ambiante avec l'anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-rat conjugué à la HRP) dilué au 1/20000^{ème} puis est rincée rapidement par du TBS 1X et lavée 4 fois 10 minutes (les 2 premières fois dans du tampon avec Blocking Reagent, les 2 autres fois dans du tampon sans Blocking Reagent).

La révélation est effectuée avec le kit ECL (Enhanced Chemiluminescence) Amersham :

en présence des réactifs ECL, la peroxydase catalyse la libération de lumière qui permet l'impression d'un film d'autoradiographie (Hyperfilm ECL, Amersham).

3.2 Contrôle de l'adressage membranaire

L'adressage à la membrane plasmique de l'ovocyte des constructions mises en œuvre est suivi par microscopie confocale. Les manipulations ont été réalisées sur la plateforme de microscopie confocale du CEA Grenoble avec l'aide de Didier Grunwald et Stéphane Vassilopoulos.

Seize ovocytes par construction sont fixés dans 4 % de Formalin pendant une nuit avant d'être déshydratés 2 à 3 heures dans 15 % de sucrose. Ils sont ensuite incorporés dans un sucre de tissu tek avant d'être découpés au cryomicrotome (coupes de 20 μ M). Les coupes sont déposées sur des lames polysines pour pouvoir être ensuite immunomarquées.

Les coupes sont réhydratées 10 minutes dans du TRIS 100 mM, puis elles sont saturées 30 minutes dans une solution de blocage (PBS 1X, BSA 5 %, sérum de chèvre 5 %, triton 0.25 %) afin d'éviter les fixations d'anticorps non spécifiques. L'incubation avec l'anticorps primaire (anticorps monoclonal de souris anti-HA) dilué au 1/1000^{ème} (dans du PBS 1X, BSA 5 %, sérum de chèvre 5 %, triton 0.1 %) pendant une nuit à 4°C est suivie de 3 lavages de 10 minutes dans du PBS 1X. Les coupes sont alors incubées pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-souris conjugué à la CY3) dilué au 1/500^{ème} (dans du PBS 1X, BSA 5 %, sérum de chèvre 5 %, triton 0.1 %) puis sont rincées 12 fois par du PBS 1X. Elles sont ensuite immergées dans un milieu conservateur, le DAPCO, avant d'être recouvertes par une lamelle fixée à l'aide de vernis à ongle. Les coupes sont alors prêtes pour l'observation microscopique.

3.3 Contrôle de la fonctionnalité des protéines

3.3.1 Technique du patch-clamp

3.3.1.a Principe du patch-clamp

Le passage d'ions à travers les membranes biologiques s'effectue au niveau de pores protéiques transmembranaires : les canaux ioniques. Bien que plusieurs états conformationnels soient possibles pour un même canal, on considère en général schématiquement uniquement les états "ouvert" et "fermé". Ces changements

conformationnels se traduisent par l'ouverture ou la fermeture des voies de passage des ions. Le sens et l'intensité de ces mouvements ioniques dépendent des forces de perméation, liées à la force de diffusion (qui tend vers l'équilibre des concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane) et à la force électromotrice dépendant de la valeur du potentiel de membrane. Ces flux d'ions à travers un canal entraînent l'apparition de courants mesurables expérimentalement.

La technique du patch-clamp permet la mesure et l'étude de ces variations de courant induites par les mouvements ioniques, ainsi que l'étude du mode de régulation des canaux. Inventée en 1976 par Neher et Sakmann (Neher et Sakmann, 1976; prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1992) puis perfectionnée (Hamill *et al.*, 1981), cette technique permet d'enregistrer l'activité de canaux unitaires ou de l'ensemble des canaux d'une cellule selon la configuration utilisée. On applique une micropipette de verre sur une membrane cellulaire, afin d'en isoler un petit morceau ("patch") pour étudier les canaux qu'il contient. Un potentiel est imposé à la membrane (voltage-clamp), entre le bain et l'intérieur de la pipette ou de la cellule, et on mesure le courant nécessaire pour maintenir ce potentiel à une valeur constante. Les courants mesurés sont de très faibles amplitudes, allant de quelques pico-ampères (pA) pour des courants unitaires à quelques nano-ampères (nA) pour les enregistrements sur cellule entière. Cette technique rend possible l'étude en temps réel de l'activité des canaux ioniques, et en particulier l'étude des variations de cette activité induites par l'application de substances régulatrices.

Les facteurs influant sur le passage des ions à travers les canaux (et donc sur la valeur du courant mesuré) sont:

- Le potentiel d'équilibre de l'ion considéré (E_{ion}), qui dépend de la concentration de part et d'autre de la membrane suivant l'équation de Nernst: $E = RT/zF \ln([ion]_e/[ion]_i)$
- Le potentiel membranaire (V_m)
- La conductance des canaux (G), qui traduit la facilité avec laquelle les ions franchissent les canaux (g quand on parle de la conductance d'un seul canal)

Le courant est donné par : $I = G(V_m - E_{ion})$ dérivé de la loi d'Ohm $U = RI$

avec $U = (V_m - E_{ion})$, et $G = 1/R$ dans le cas présent.

En patch-clamp, le potentiel de membrane V_m peut être fixé (conditions de voltage clamp),

de même que le potentiel d'équilibre de l'ion considéré E_{ion} (qui peut être ramené à une valeur nulle en se plaçant en concentrations équimolaires de part et d'autre de la membrane). La mesure de I nous renseigne donc directement sur la conductance G , propriété spécifique des canaux étudiés.

3.3.1.b Instrumentation mise en œuvre en patch-clamp

Le poste de patch-clamp utilisé au cours des expérimentations présentées ici est composé des éléments suivants :

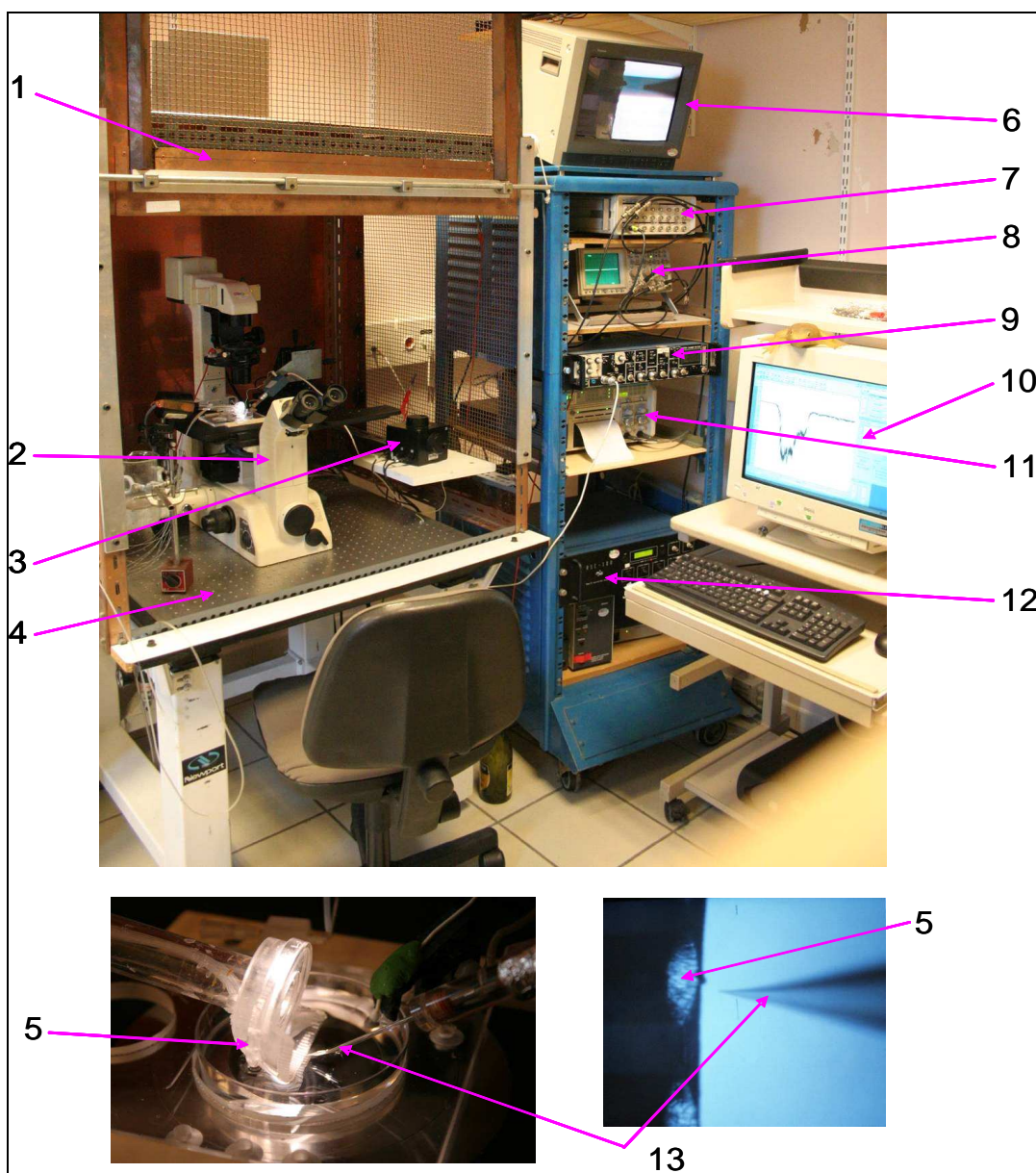


Figure 53 : Eléments composant le poste de patch-clamp

- 1- Cage de Faraday** assurant la protection de l'espace de manipulation vis-à-vis des perturbations électromagnétiques
- 2- Microscope inversé** (Olympus, ULWCD 0.30, oculaires X 4, X 10, X 40)
- 3- Micromanipulateur électrique 3 axes** permettant des déplacements fins de la micropipette dans les trois dimensions
- 4- Table anti-vibrations** permettant d'amortir les vibrations mécaniques, qui doivent être réduites au maximum avant toute mesure
- 5- Tête de perfusion rotative**, reliée aux corps de seringues contenant les solutions à tester
- 6- Moniteur vidéo**, relié au microscope inversé
- 7- Convertisseur signal analogique/numérique (Digidata 1322)** permettant le transfert bidirectionnel de signaux entre le poste de patch et l'ordinateur
- 8- Oscilloscope analogique-numérique (HM-407, Hameg)** permettant de visualiser les courants en temps réel
- 9- Amplificateur de patch-clamp RK-300 (Bio-Logic)** adapté à la mesure de courants de l'ordre du picoampère (pA) et permettant la conversion courant-tension (convertisseur de résistance 10 G Ω , gain de 10 mV/pA et 100 M Ω , gain de 0,1 mV/pA) et l'imposition d'un potentiel au "patch" de membrane par l'intermédiaire de la micropipette de patch
- 10- Ordinateur** prenant en charge la gestion de l'appareillage ainsi que la mesure des données expérimentales
- 11- Enregistreur papier (RS-3200, Gould)** permettant de conserver les enregistrements sur papier
- 12- Contrôleur système de perfusion, RSC-100 (Rapid-Solution-Changer, Bio-Logic)** permettant le changement rapide et automatique des solutions à tester (relié à la tête de perfusion rotative) sous le contrôle du logiciel Perf 2.10 développé par Michel Vivaudou.
- 13- Micropipette** de mesure en verre remplie d'une solution électrolytique dans laquelle plonge une électrode d'argent, à l'aide de laquelle est réalisé le "patch". La formation d'un "patch" consiste à approcher la micropipette de la membrane d'un ovocyte sur boîte de Petri jusqu'à réaliser par aspiration un scellement (seal) étanche entre la pipette et la membrane. Lorsque le seal est formé, la petite portion de membrane à l'intérieur de la pipette (patch) est isolée mécaniquement et électriquement (résistance de l'ordre du giga-Ohm). L'électrode d'argent plongeant dans la pipette, reliée au dispositif électronique de stimulation et de détection-amplification, permet alors d'imposer un potentiel (voltage clamp) sur la portion de membrane isolée, mais également de mesurer les courants (de l'ordre du pico-Ampère) induits

par le passage des ions au travers des canaux présents dans le patch.

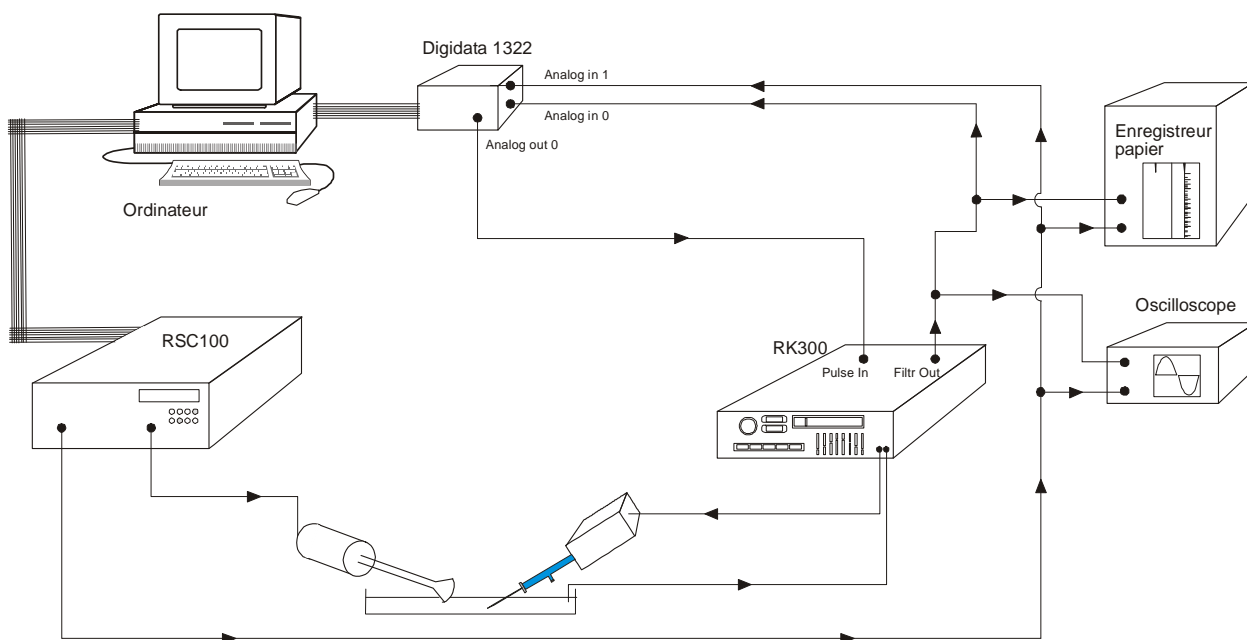


Figure 54 : Schéma des connexions entre les instruments composant le poste de patch-clamp

L'ensemble du dispositif de stimulation/détection/amplification est sous le contrôle de l'unité centrale (ordinateur) gérée par l'expérimentateur. Les différents appareillages sont interconnectés selon le schéma décrit ci-dessus (**Figure 54**).

3.3.1.c Configurations de travail en patch-clamp

L'application de la technique du patch-clamp peut se faire selon diverses configurations (**Figure 55**):

Configuration « cellule attachée » (*cell-attached*) : la pipette est appliquée sur la surface d'une cellule intacte. Des dépressions exercées dans la pipette par légères succions permettent la formation d'un contact étroit entre la pipette et la membrane cellulaire. On mesure alors le courant traversant les canaux présents dans le morceau de membrane isolé dans la pipette. La configuration du milieu intracellulaire n'est pas perturbée, mais ne peut pas être facilement modifiée. Cette approche est particulièrement utile pour l'étude des canaux ioniques en conditions physiologiques, par exemple lors des processus d'activation via des messagers intracellulaires tels que le calcium.

Configuration « cellule entière » (*whole-cell*) : à partir de la configuration *cell-attached*,

il est possible, par succion ou application d'un voltage élevé, de détruire le patch tout en conservant le scellement entre la membrane et la pipette. Dans cette configuration, dite *whole-cell*, la solution de remplissage de la pipette communique directement avec le milieu cytoplasmique, et l'ensemble des canaux présents dans la membrane plasmique cellulaire peut être interrogé (et plus seulement ceux présents dans le patch délimité par la pipette). Cette variante permet donc de mener des expériences de voltage imposé sur la cellule entière, ou encore d'injecter dans la cellule certaines substances (enzymes, nucléotides...) susceptibles de moduler l'activité électrique des canaux ioniques.

Configuration « excisée outside-out » : à partir de la configuration *whole-cell*, on peut obtenir par traction délicate un morceau isolé de membrane dont la surface externe est exposée à l'extérieur (*outside out*) et peut donc être soumise à divers composés. Cette variante est employée lorsqu'on souhaite étudier l'impact de variations de l'environnement de la face externe de la membrane sur l'activité des canaux (ligands extracellulaires).

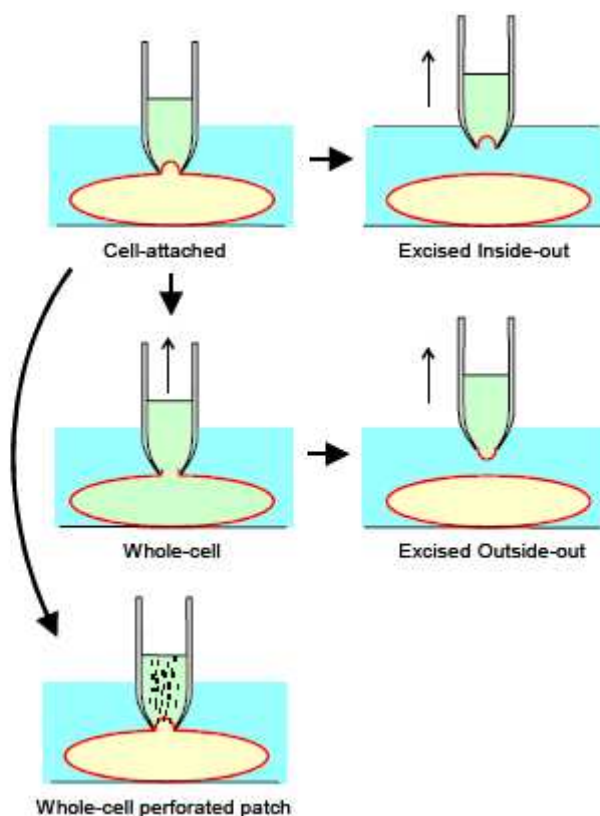


Figure 55 : Les différentes configurations du patch-clamp

La configuration « cell-attached » permet de préserver l'intégrité du cytoplasme. La configuration « whole-cell » permet la mesure de la totalité des courants de la cellule. Les configurations excisées « inside-out » et « outside-out » permettent d'accéder à des sites de régulation respectivement intra- et extracellulaires.

Configuration « excisée inside-out » : si on excise le patch membranaire isolé à partir de la configuration *cell-attached*, il est possible d'isoler ce patch et de faire varier l'environnement de sa face cytoplasmique. Cette configuration, qualifiée d'*inside-out*, est particulièrement recherchée pour l'étude des canaux ioniques activés par des agents intracellulaires. Notons également qu'il est possible de se rapprocher de la configuration *inside-out* en partant de la configuration *cell-attached* et en perméabilisant la cellule à l'aide d'agents ionophores afin d'obtenir la configuration *open cell-attached*.

3.3.1.d Conditions expérimentales de travail

Préparations des ovocytes

Après 48 à 72 heures d'incubation à 19°C, temps requis pour obtenir une bonne expression protéique à la membrane plasmique, les ovocytes sont débarrassés manuellement de leur membrane vitelline à l'aide de pinces. Cette étape délicate est réalisée sous une loupe binoculaire, en plaçant l'ovocyte dans une solution hyperosmotique (Shrinking solution = solution A + 100 mM NaCl) afin que l'ovocyte se rétracte et se désolidarise du vitellus qui l'entoure. L'opération n'est effectuée qu'au dernier moment précédant les mesures : en effet, dépourvu de sa membrane vitelline, l'ovocyte devient extrêmement fragile et sa durée de vie est très limitée (1 à 2 heures maximum).

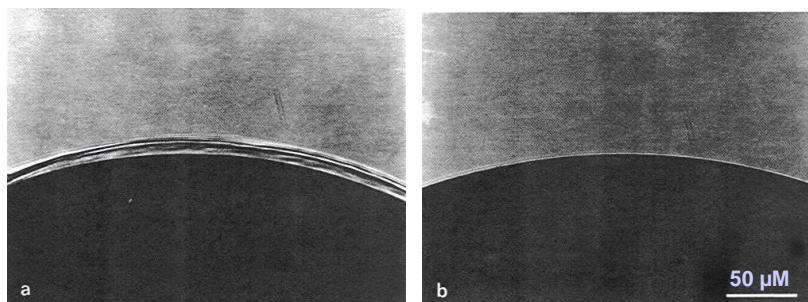


Figure 56 : Observation au microscope optique ($\times 16$) d'un même ovocyte avant (a) et après (b) élimination manuelle de la membrane vitelline (d'après Methfessel et al., 1986)

L'ovocyte est ensuite transféré dans le poste de patch-clamp pour être testé, sur boîte de Petri contenant une solution isotonique.

Microélectrodes de mesure et solutions

Les micropipettes utilisées pour le patch-clamp sont usinées à partir de capillaires de borosilicate (Kimax-51, Kimble products). Ceux-ci sont portés à haute température puis étirés sous l'effet d'une tension contrôlée à l'aide d'une étireuse horizontale (P97 Micropipette Puller, Sutter Instrument Co.) afin de produire des pipettes dont l'extrémité atteint un diamètre de l'ordre du micromètre. Les micropipettes ainsi obtenues sont remplies d'une solution isotonique au milieu intracellulaire et fixées sur l'électrode d'argent chloruré permettant les mesures.

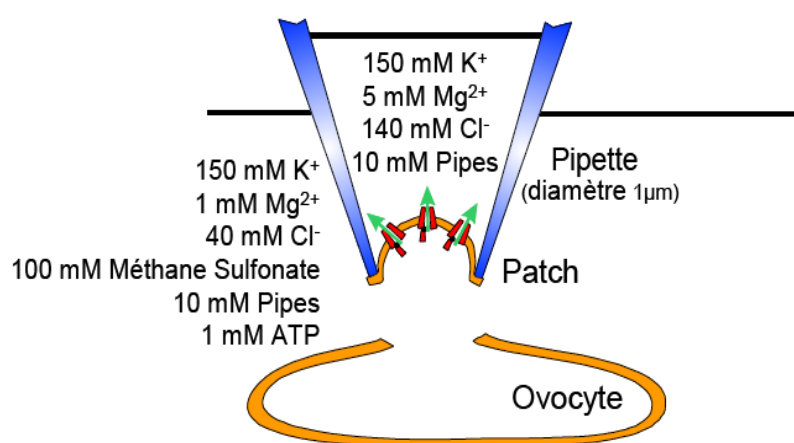
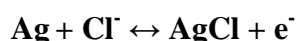


Figure 57 : dispositif expérimental et solutions mises en œuvre lors de la mesure de courants potassiques en patch-clamp. Les conditions sont optimisées de manière à n'observer que la contribution des canaux K_{ATP} et à avoir un potentiel d'inversion potassique (E_K) nul.

La concentration potassique dans la pipette est fixée (150 mM K^+) de manière à se placer en conditions équimolaires de part et d'autre du patch membranaire : de cette manière, le potentiel d'inversion du potassium (E_K) est pratiquement nul.

L'électrode d'argent chloruré permet la conversion des courants d'ions en solution en courant d'électrons suivant la réaction réversible suivante :



De cette manière, les courants ioniques convertis en courants électroniques peuvent être visualisés directement sur ordinateur.

Formation d'un patch et mesures de courants

La formation d'un patch membranaire passe par une première étape d'approche délicate de l'ovocyte avec la micropipette. Une légère surpression exercée dans la micropipette permet d'éviter l'entrée de poussières ou débris présents dans le bain. Une fois le contact établi, une légère dépression exercée par une aspiration continue permet d'aspirer une portion de membrane, ou « patch », et de la faire adhérer aux parois de la pipette de manière quasi-covalente jusqu'à avoir un scellement (« seal ») d'une résistance de l'ordre du gigaohm. Le patch de membrane est alors excisé par un retrait rapide de la micropipette et peut dès lors être interrogé librement. Pour ce faire, il est placé devant un système de perfusion relié à des tubes contenant les solutions à tester (**Figure 58**).

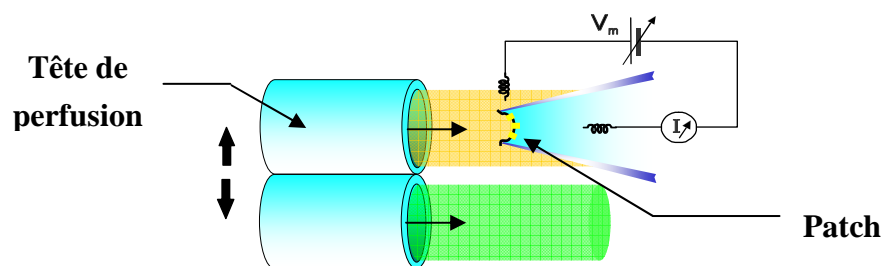


Figure 58 : Dispositif de perfusion mis en œuvre pour le patch-clamp. Les solutions utilisées ne contiennent pas d'autre cation perméant que le potassium (Na^+ ou Ca^{2+} exclus), de manière à n'observer que les courants potassiques. La tête de perfusion rotative permet de présenter successivement différentes solutions à tester devant le patch membranaire.

En l'absence de cations autres que K^+ , les principaux courants endogènes susceptibles d'être enregistrés sur l'ovocyte seraient ceux de canaux chlores activés par le calcium ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$). Ces courants sont inhibés par l'ajout d'un chélateur d'ions Ca^{2+} (EGTA) dans nos solutions. Les seuls courants enregistrables dans ces conditions expérimentales correspondent donc uniquement aux flux potassiques (I_{K}) de part et d'autre de la membrane.

Le courant I_{K} engendré par le flux de K^+ passant à travers les canaux ioniques présents dans le patch est égal à : $I_{\text{K}} = G_{\text{K}} (V_{\text{m}} - E_{\text{K}})$, transposition de la loi d'Ohm au gradient électrochimique ($V_{\text{m}} - E_{\text{K}}$), avec V_{m} le potentiel de membrane (imposé à $V_{\text{m}} = -50 \text{ mV}$), et E_{K} le potentiel d'inversion pour l'ion K^+ (dans les conditions équimolaires en potassium fixées, $E_{\text{K}} = 0$). I_{K} ne dépend donc que de G_{K} , la conductance transmembranaire pour l'ion K^+ , traduisant la facilité avec laquelle les ions K^+ passent à travers la membrane. Or la valeur de

G_K est donnée par $G_k = P_0 N g_k$ où :

P_0 - probabilité que les canaux soient dans un état conformationnel ouvert ou fermé

N - nombre des canaux présents dans le patch

g_k - conductance unitaire de chaque canal (constante d'environ 70 pS pour le canal K_{ATP})

La valeur du courant mesuré nous renseigne donc sur le nombre de canaux présents dans le patch et sur leur activité (leur ouverture/fermeture).

Dans ces conditions expérimentales ($V_m = -50$ mV, $E_K = 0$), le passage d'ions K^+ à travers les canaux se traduit par une déflexion vers le bas (courant « négatif » ou « entrant »). Ainsi, toute activation des canaux K_{ATP} par un agent pharmacologique ou des nucléotides entraîne une déflexion vers le bas du signal enregistré (*Figure 59*).

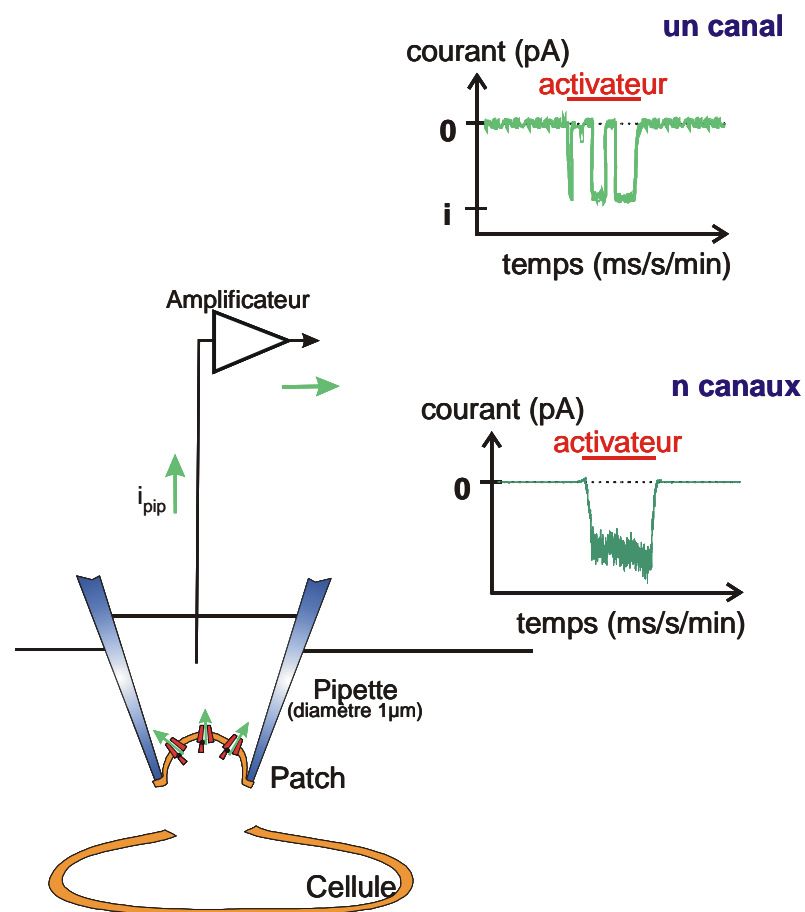


Figure 59 : Illustration de la mesure de l'activité des canaux K_{ATP} en réponse à l'application de substances activatrices par la technique de patch-clamp en configuration inside-out.

Les courants mesurés sont ensuite normalisés en utilisant comme références les courants enregistrés en absence d'ATP (courant maximal, canaux en configuration ouverte) et en présence de 2mM ATP (courant minimal, canaux en configuration fermée).

Traitement des signaux enregistrés

Les signaux analogues amplifiés par l'amplificateur RK-300 (Bio-Logic) sont numérisés et enregistrés sur l'ordinateur en même temps que les signaux correspondant aux changements de perfusion, puis échantillonnés à 1 kHz. Selon leur amplitude, ces signaux sont ensuite filtrés entre 10 et 300 Hz, puis analysés (ajustement des lignes de base). L'échantillonnage, le filtrage, l'analyse et la présentation des données se font à l'aide du logiciel Erwin 3.2, développé par Michel Vivaudou au laboratoire.

Les fittings de courbes sont réalisés à l'aide du logiciel Origin (OriginLab). Les équations de Hill standard suivantes ont été utilisées pour les ajustements (« fittings »):

- Pour l'activation par les ouvreurs:

$$f(|X|)=i_0 + i_{MAX}/ [1+(K_{1/2}/|X|)^h] \quad (1)$$

où $|X|$ représente la concentration d'activateur, i_0 le courant normalisé contrôle en absence d'activateur, i_{MAX} le courant maximal induit par l'activateur, $K_{1/2}$ la concentration de demi-activation maximale, et h le coefficient de Hill.

- Pour l'inhibition par l'ATP et le glibenclamide:

$$f(|X|)=i_0 / [1+(|X| / K_{1/2})^h] \quad (2)$$

où $|X|$ représente la concentration d'inhibiteur, i_0 le courant normalisé contrôle en absence d'inhibiteur, $K_{1/2}$ la concentration de demi-inhibition maximale, et h le coefficient de Hill.

- Pour l'activation et l'inhibition combinées par l'ADP:

$$f(|ADP|)=i_0 + i_{MAX}/ [1+(K_{a1/2}/|ADP|)^{h_a}] \cdot [1+(|ADP| / K_{i1/2})^{h_i}] \quad (3)$$

où i_0 représente le courant normalisé contrôle en absence d'ADP, i_{MAX} le courant maximal obtenu si il n'y avait pas d'inhibition, $K_{a1/2}$ la concentration de demi-activation maximale, h_a le coefficient de Hill pour l'activation, $K_{i1/2}$ la concentration de demi-inhibition maximale, h_i le coefficient de Hill pour l'inhibition.

Les résultats sont présentés comme des moyennes \pm s.e.m. Les barres d'erreurs sur les figures représentent les s.e.m. et ne sont pas indiquées si elles sont inférieures aux symboles.

3.3.2 Two Electrode Voltage-Clamp (TEVC)

3.3.2.a Principe du TEVC

La taille importante de l'ovocyte de Xénope (1,2 à 1,3 mm de diamètre) proscrit l'étude des courants macroscopiques en configuration cellule entière par la technique du patch-clamp. En effet, il est impossible dans cette configuration de maintenir un potentiel imposé à l'échelle d'une cellule aussi volumineuse (problème dit de « space clamp »). Ces courants peuvent néanmoins être étudiés par la technique de double électrode, ou Two Electrode Voltage Clamp, à l'aide d'un amplificateur GeneClamp 500 (Axon Instruments). Cette technique consiste à utiliser non plus une mais deux électrodes, la première étant assignée au maintien du potentiel de membrane (V_m) tandis que la seconde permet la mesure des courants observés en réponse sur l'ensemble de la membrane plasmique de l'ovocyte (et non plus un patch membranaire).

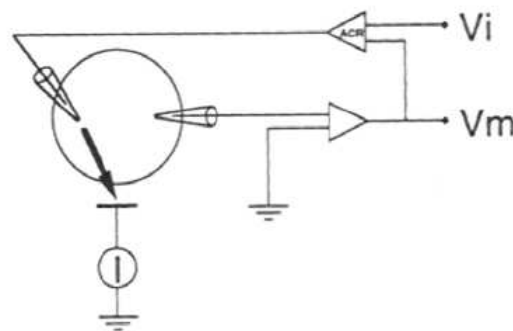


Figure 60 : Le potentiel imposé (« Voltage-Clamp ») consiste à maintenir le potentiel de membrane (V_m) à une valeur constante (V_i) fixée par l'expérimentateur. Pour cela, un amplificateur à contre-réaction (GeneClamp 500, Axon Instruments) délivre un courant égal et de sens opposé au courant ionique transmembranaire, tendant à annuler la différence ($V_i - V_m$). Les cellules de gros diamètre sont empalées par deux microélectrodes dont une impose le pas de potentiel de membrane et l'autre mesure l'intensité du courant résultant.

3.3.2.b Conditions expérimentales

Les ovocytes sont placés dans une cuve contenant une solution standard appelée « bain » (KCl 91 mM, HEPES 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, acide niflumique 0,3 mM, pH 7,4), devant un système de perfusion délivrant différentes solutions suivant les conditions à tester. De même que pour le patch-clamp, les microélectrodes utilisées sont réalisées en étirant des capillaires de borosilicate après chauffage sous l'effet d'une tension contrôlée (extrémités de l'ordre du dixième de micromètre, résistance de l'ordre de 0,5 MΩ). Celles-ci sont ensuite remplies d'une solution ionique conductrice (KCl 3 M) puis montées sur les électrodes de stimulation et de mesure. L'acquisition puis l'analyse des données sont réalisées à l'aide du logiciel pClamp (Axon Instruments). Le programme utilisé permet d'imposer successivement des pulses de voltage de 500 ms à -50, 0, et +50 mV à intervalles de 5 secondes. Différents effecteurs des canaux K_{ATP} sont alors appliqués par perfusion, et les courants potassiques résultants enregistrés.

Résultats

A

Etude du couplage fonctionnel entre les sous-unités SUR2A et Kir6.2 des canaux K_{ATP} cardiaques

1. Position du problème

Les interactions permettant l'association physique entre les sous-unités SUR et Kir6.x du canal K_{ATP} ont été assez largement étudiées et sont aujourd'hui bien documentées, comme décrit dans la partie introductive de ce travail. Néanmoins, les mécanismes liant fonctionnellement les deux sous-unités du canal K_{ATP} , et permettant la conversion de la fixation de nucléotides et d'effecteurs pharmacologiques en modulations des propriétés d'ouverture de Kir6.x, sont encore très largement méconnus. De fait, toutes les régions rapportées comme étant des zones d'interaction physique entre les deux sous-unités représentent des voies de transduction potentielles à explorer, et deux régions de SUR sont particulièrement intéressantes de ce point de vue (**Figure 61**):

- Le domaine N-terminal TMD0 et la boucle cytoplasmique L0, essentiels à l'ancrage de SUR à Kir6.2 (Babenko and Bryan, 2003; Chan *et al.*, 2003) et récemment décrits pour exercer une influence directe sur le gating de Kir6.2 (Fang *et al.*, 2006).
- Le linker cytoplasmique reliant les domaines TMD2 et NBD2 de SUR2A, connu pour être en interaction physique avec Kir6.2 (Rainbow *et al.*, 2004a; Rainbow *et al.*, 2004b).

A l'aide d'une approche chimérique consistant à remplacer les segments d'intérêts de l'isoforme cardiaque SUR2A par leurs segments homologues chez la Multidrug Resistance Protein MRP1, nous nous sommes attachés à examiner les rôles respectifs de ces régions d'intérêt dans le couplage physique et fonctionnel entre les sous-unités SUR2A et Kir6.2 du canal K_{ATP} cardiaque.

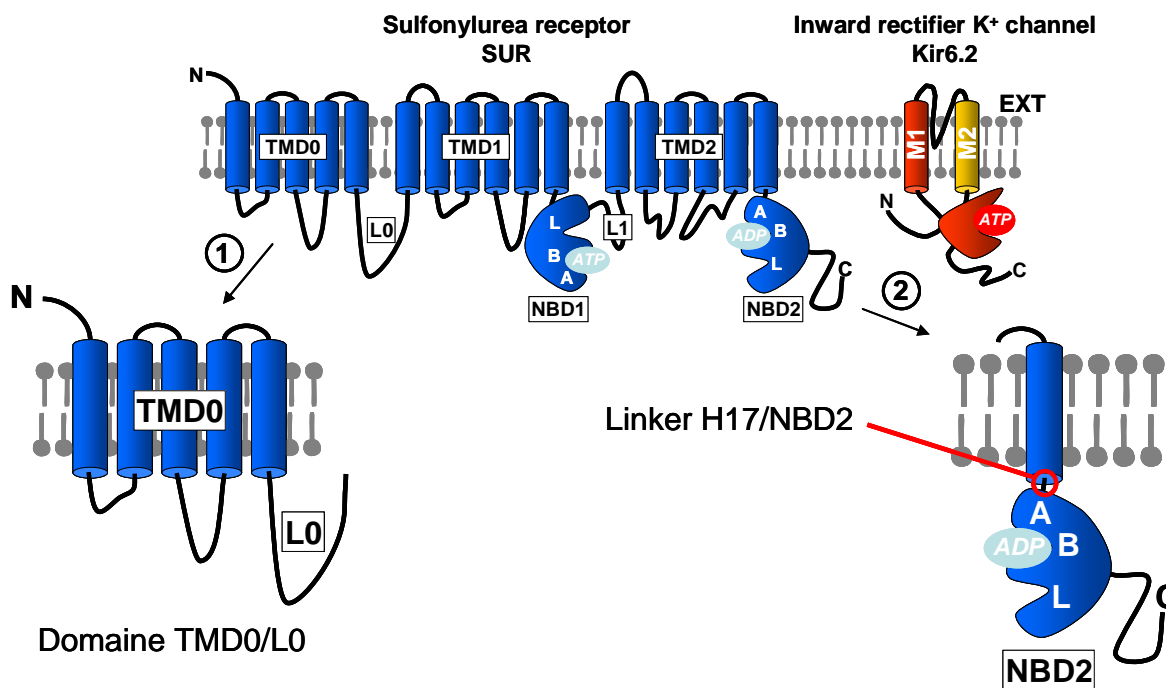


Figure 61 : Prédiction de la topologie de SUR et Kir6.2 et mise en exergue du domaine TMD0/L0 et du linker cytoplasmique TMD2/NBD2

2. Résultats

2.1 Etude du domaine N-terminal TMD0/L0 de SUR2A

De nombreux indices indiquent que les régions N-terminales TMD0 et L0 du récepteur des sulphonylurées jouent un rôle prépondérant à la fois dans l'association physique entre SUR et Kir6.x et dans la transduction d'information entre ces deux sous-unités (Babenko and Bryan, 2003; Chan *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2006). Les travaux portant sur ces domaines concluent à un rôle majeur dans le contrôle de la probabilité d'ouverture (P_o) de Kir6.2 mais aucun ne permet néanmoins d'attribuer au domaine TMD0/L0 un rôle essentiel dans la réponse aux effecteurs physiologiques et pharmacologiques du canal, exception faite de l'étude d'une mutation intervenant dans la deuxième boucle cytoplasmique (CL2) changeant la phénylalanine 132 en leucine et entraînant des changements de sensibilité à l'ATP et au tolbutamide (Proks *et al.*, 2006).

Nous avons donc choisi d'examiner le rôle fonctionnel joué par ce domaine en utilisant une approche basée sur la construction de chimères entre l'isoforme cardiaque SUR2A et la protéine MRP1, membre de la famille des ABCC présentant les avantages d'être très

homologue à SUR2A mais de n'exercer aucune influence physique ni fonctionnelle sur Kir6.2 (*Figure 62*).

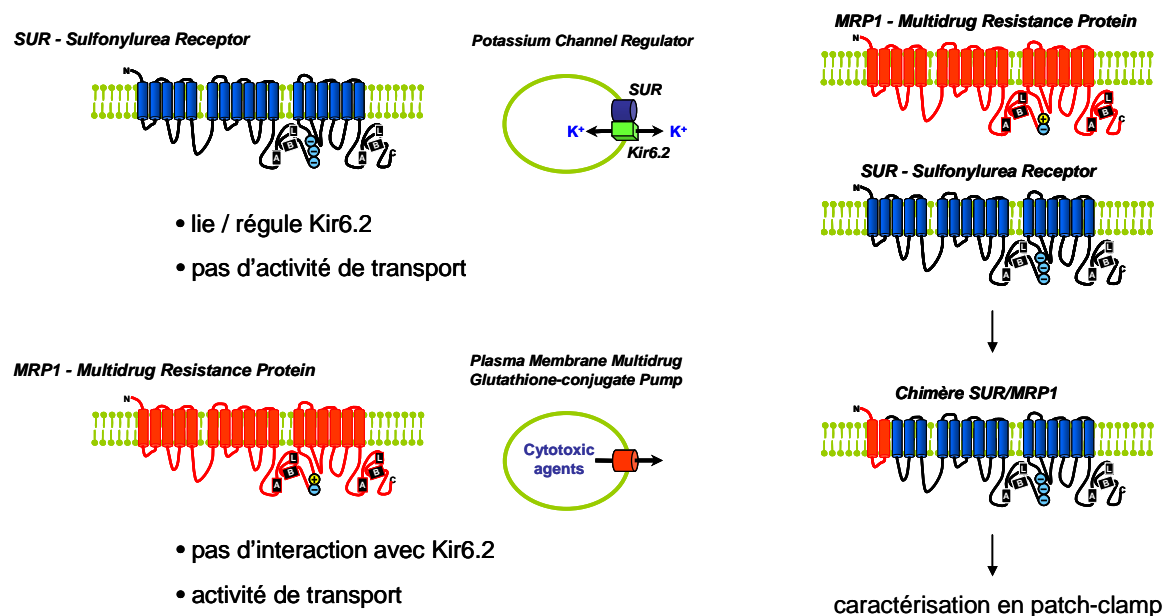


Figure 62 : Stratégie chimérique mise en œuvre entre SUR2A et MRP1 pour l'étude du couplage fonctionnel entre SUR2A et Kir6.2

Le principe de cette stratégie est le suivant: si une partie de SUR2A est essentielle à la fonctionnalité du canal, son remplacement par la région équivalente de MRP1 devrait provoquer une perte de fonction aisément identifiable en patch-clamp.

2.1.1 Suppression du domaine TMD0 de SUR2A

Une première étape dans l'étude du domaine TMD0, décrit pour permettre l'association physique entre SUR et Kir6.2, a consisté à étudier son caractère indispensable. Pour cela, deux constructions ont été générées où ce domaine a été supprimé: SUR2A(Δ TMD0), et SUR2A(Δ TMD0)-Kir6.2 où l'association en tandem entre SUR2A et Kir6.2 est forcée par une séquence de liaison composée de six glycines (*Figure 63*).



Figure 63 : Représentation schématique des constructions SUR2A(Δ TMD0) + Kir6.2 (A) et SUR2A(Δ TMD0)-Kir6.2 (B) mises en œuvre pour l'étude du TMD0 de SUR2A

La caractérisation en patch-clamp de ces deux constructions révèle l'absence totale de courants K_{ATP} , contrairement aux canaux sauvages Kir6.2/SUR2A. Aucun courant n'est donc mesurable en l'absence du domaine TMD0, bien que ces constructions s'expriment dans l'ovocyte de Xénope comme en témoignent les résultats de Western Blot (**Figure 64**). On note au passage la présence sur gel d'homomultimères lorsque Kir6.2 est présent. L'étude par microscopie confocale de l'adressage de ces constructions montre qu'aucune des deux n'est localisée à la membrane plasmique et qu'elles présentent donc un défaut de trafic. De plus, la coexpression de SUR2A(Δ TMD0)-Kir6.2 avec le domaine TMD0 de SUR1 donne des courants K_{ATP} mesurables, prouvant que l'apport du TMD0 suffit à restaurer l'adressage des canaux à la membrane.

Le domaine TMD0 est donc indispensable pour l'assemblage et l'adressage des canaux K_{ATP} à la membrane plasmique. Il pourrait jouer un rôle dans le masquage des signaux de rétention, indispensable à la sortie du réticulum endoplasmique, ainsi que dans le repliement du complexe protéique.

La délétion de ce domaine ayant des effets particulièrement drastiques, nous avons poursuivi son étude en optant plutôt pour une stratégie de substitution.

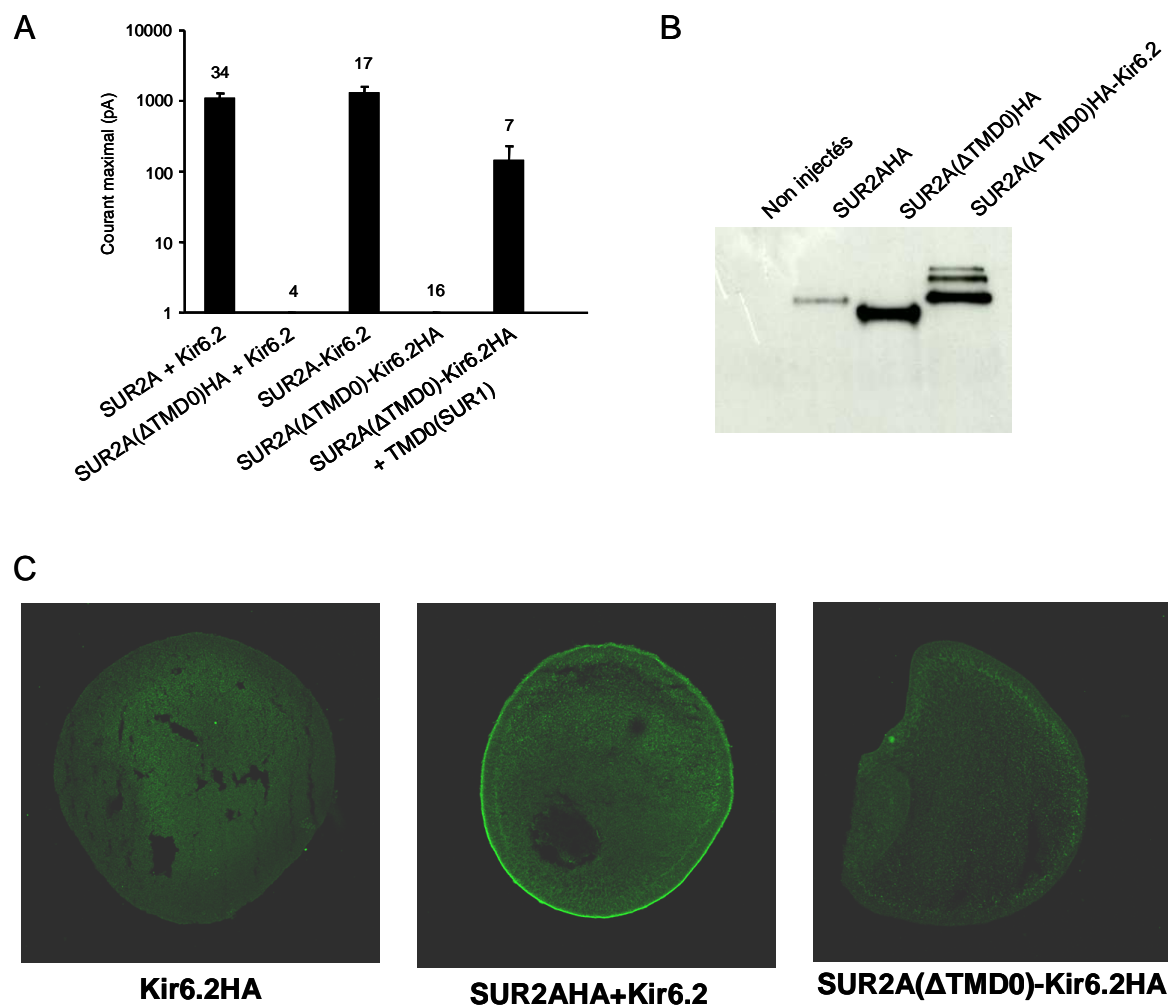


Figure 64 : Le domaine TMD0 est indispensable pour l'adressage à la membrane plasmique des canaux K_{ATP} . (A) Courants maximaux mesurés en patch-clamp en configuration inside-out en absence de nucléotides, reflet de la densité de canaux à la membrane. Les chiffres au-dessus des barres indiquent le nombre de patches pris en compte. (B) Contrôle de l'expression des protéines dans l'ovocyte de Xénope en Western Blot (C) Contrôle de l'adressage membranaire des protéines en microscopie confocale par immunofluorescence.

2.1.2 Remplacement du domaine TMD0 de SUR2A

Une deuxième étape a consisté à étudier l'impact du remplacement du domaine TMD0 par les domaines équivalents de protéines homologues. Deux protéines ont été utilisées à cet effet: MRP1, protéine homologue de la famille ABCC, et YCF1, protéine homologue de levure. Chez YCF1, ce domaine joue un rôle essentiel dans l'adressage à la vacuole des protéines. En revanche, il joue un rôle mineur chez MRP1 dans la dimérisation et l'activité de transport.

Une première construction en tandem a été créée, notée SUR2A(TMD0MRP1)-Kir6.2, où SUR2A et Kir6.2 sont liés et où le domaine TMD0 de SUR2A a été remplacé par celui de MRP1. L'étude de cette chimère en patch-clamp ne donne aucun résultat, aucun courant n'étant mesurable (**Figure 65**). En revanche, les résultats de Western Blot et de microscopie confocale révèlent que la construction est bien exprimée en ovocyte mais qu'elle ne s'adresse pas à la membrane plasmique.

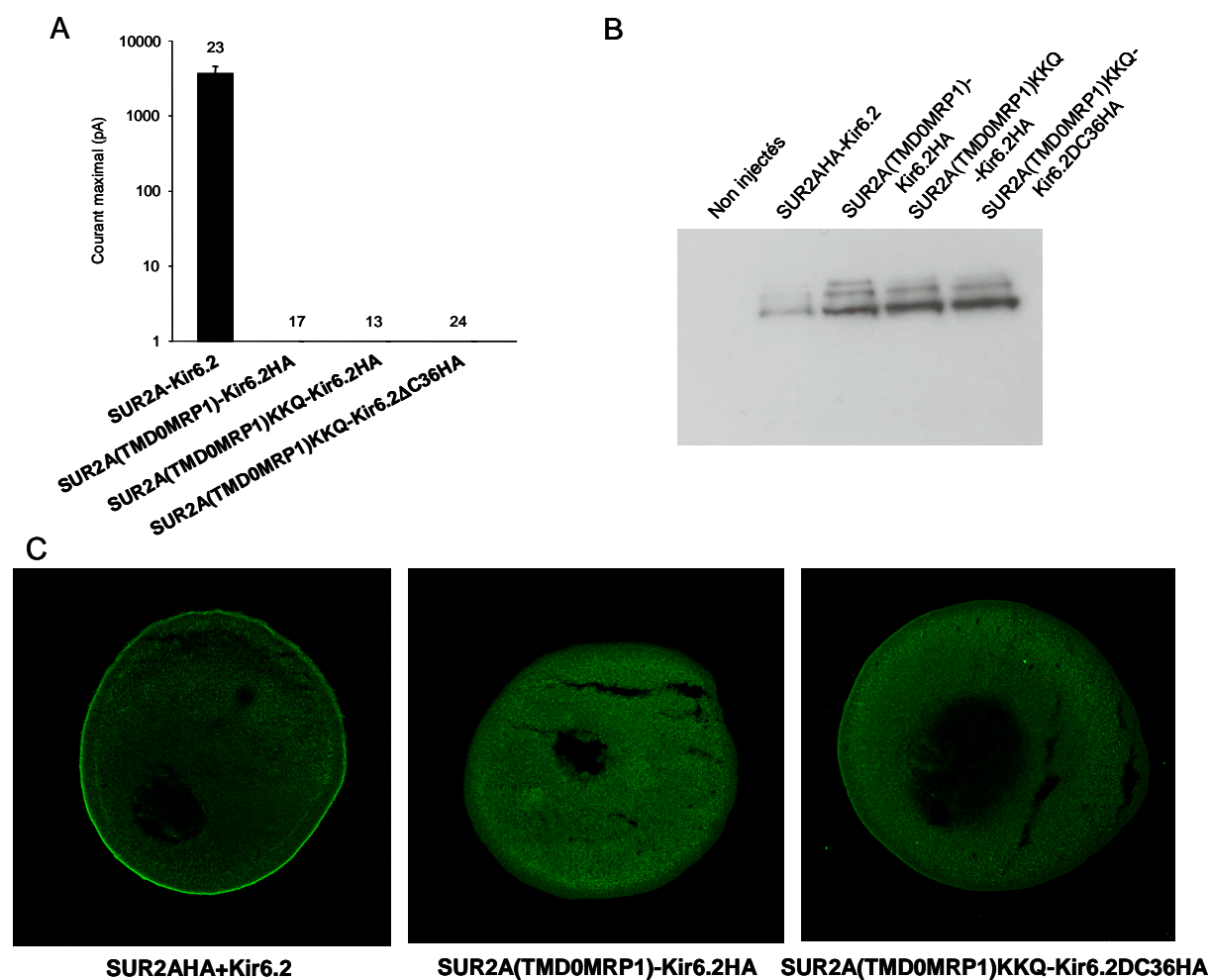


Figure 65 : Le domaine TMD0 est irremplaçable pour l'adressage à la membrane plasmique des canaux K_{ATP} . (A) Courants maximaux mesurés en patch-clamp en configuration inside-out en absence de nucléotides, reflet de la densité de canaux à la membrane. Les chiffres au-dessus des barres indiquent le nombre de patches pris en compte. (B) Contrôle de l'expression des protéines dans l'ovocyte de Xénope en Western Blot (C) Contrôle de l'adressage membranaire des protéines en microscopie confocale par immunofluorescence.

Afin de s'assurer que ce problème d'adressage n'est pas dû à un défaut de masquage des signaux de rétention, ceux-ci ont été tour à tour mutés ou supprimés. Les constructions SUR2A(TMD0MRP1)KKQ-Kir6.2, où le signal de rétention RKQ de SUR2A est muté en KKQ, et SUR2A(TMD0MRP1)KKQ-Kir6.2ΔC36, où le signal de rétention de Kir6.2 est également tronqué, ont été générées. Leur caractérisation en patch-clamp ne montre aucun courant mesurable malgré l'absence de signaux de rétention. Malgré une expression comparable aux canaux sauvages en Western Blot, ces constructions ne sont toujours pas adressées à la membrane plasmique.

Le domaine TMD0 de MRP1 ne permet donc pas de remplacer celui de SUR2A et de former des canaux K_{ATP} adressés à la membrane plasmique. De fait, le domaine TMD0 de SUR2A est donc indispensable et irremplaçable pour l'assemblage et l'adressage des canaux K_{ATP} .

2.1.3 Insertion du domaine TMD0 de SUR2A dans d'autres ABCC

Ayant montré que le domaine TMD0 de SUR2A est indispensable et irremplaçable, nous avons cherché à savoir si son adjonction à d'autres protéines de la famille des ABCC était suffisante pour permettre l'association de ces dernières avec Kir6.2. De nouvelles constructions chimériques ont été réalisées où le TMD0 de SUR2A a été inséré dans MRP1 (construction MRP1(TMD0 SUR2A)), YCF1 (construction YCF1(TMD0 SUR2A)) et MDR1 (construction MDR1(TMD0 SUR2A)).

Comme attendu, aucun courant n'est mesuré quand on coexprime Kir6.2 avec MRP1, MDR1 ou YCF1 (**Figure 66**). Ces trois protéines ne sont donc pas capables de s'associer spontanément avec Kir6.2 et de masquer ses signaux de rétention pour former des canaux de type K_{ATP} . En revanche, lorsqu'on insère le TMD0 de SUR2A dans MDR1 ou qu'on remplace les TMD0 de MRP1 et YCF1 par celui de SUR2A, des courants potassiques importants sont mesurables.

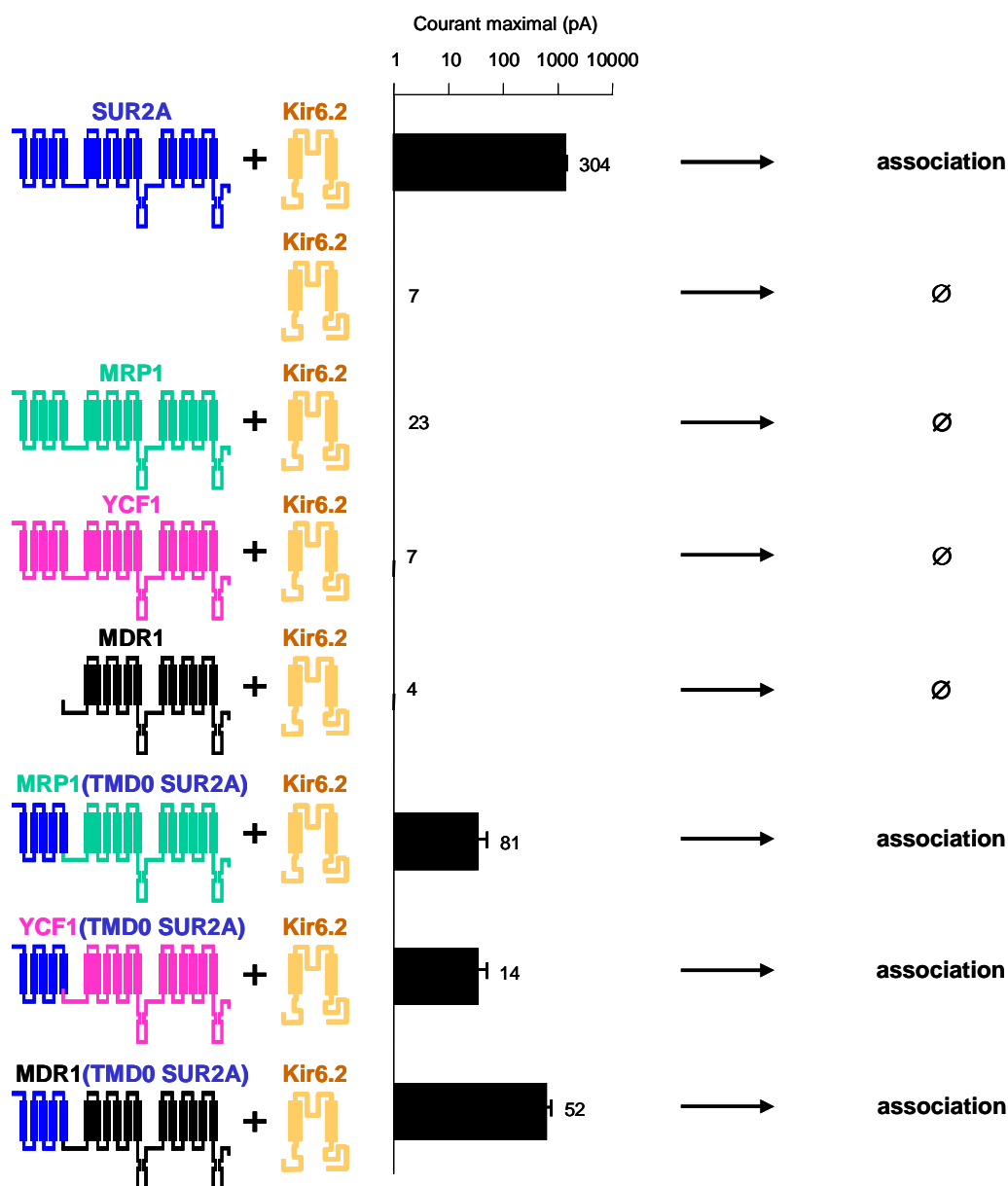


Figure 66 : L'adjonction du domaine TMD0 de SUR2A à d'autres protéines de la famille ABCC permet la formation de canaux K_{ATP} à la membrane plasmique. Courants maximaux mesurés en patch-clamp en configuration inside-out en absence de nucléotides, reflet de la densité de canaux à la membrane. Les chiffres au-dessus des barres indiquent le nombre de patches pris en compte.

Le domaine TMD0 seul ne masque pas les signaux de rétention de Kir6.2 et ne permet pas l'adressage à la membrane plasmique (Chan *et al.*, 2003). Les chimères de MRP1, YCF1 et MDR1 incorporant le TMD0 de SUR2A présentant un taux d'expression à la membrane plasmique important, il semble donc que MRP1, YCF1 et MDR1 soient capables de masquer

ces signaux de rétention. L'adjonction du domaine TMD0 de SUR2A suffit donc à permettre l'association d'autres protéines de la famille ABCC avec Kir6.2.

La question a donc ensuite été posée de savoir si ce domaine pouvait suffire à permettre le couplage fonctionnel entre Kir6.2 et des protéines de la famille ABCC comme MDR1. Les canaux MDR1(TMD0 SUR2A) précédemment décrits ont donc été caractérisés en patch-clamp en configuration inside-out. Différents substrats de MDR1 ont été testés: le P1075 (dérivé du pinacidil), la doxorubicine, la vinblastine et le glibenclamide (**Figure 67**). L'application de ces substrats n'entraîne aucune variation significative de l'activité des canaux Kir6.2/MDR1(TMD0 SUR2A).

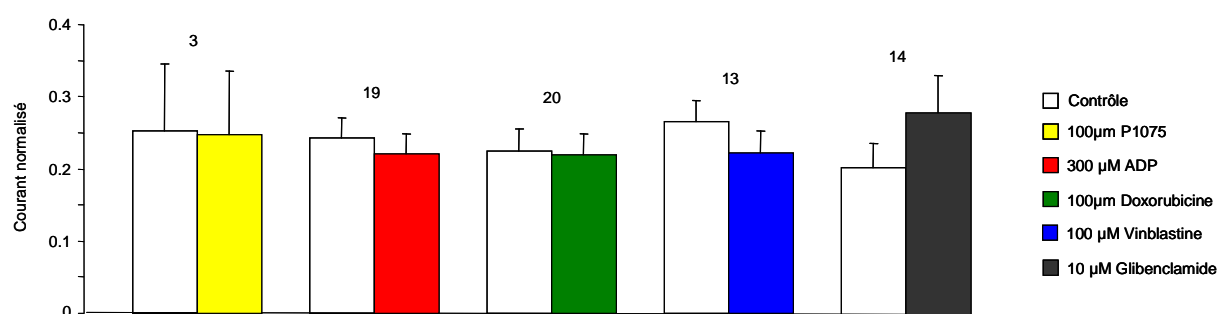


Figure 67 : Les substrats de MDR1 ne modulent pas l'activité des canaux Kir6.2/MDR1(TMD0 SUR2A). Les courants enregistrés sont normalisés par rapport au courant mesuré avant application des substrats. Les chiffres au-dessus des barres indiquent le nombre de patches pris en compte. Contrôle: 1 mM ATP.

Le TMD0 de SUR2A permet donc l'association de multiples ABCC avec Kir6.2, mais les résultats obtenus ne permettent pas de conclure à son implication dans la transduction du signal.

2.1.4 Chimères entre les domaines TMD0 de SUR2A et MRP1

Le domaine TMD0 de SUR2A ne pouvant être ni tronqué ni remplacé sous peine d'empêcher la formation de canaux K_{ATP} , une nouvelle approche chimérique a été envisagée entre les TMD0 très homologues (33 %) de SUR2A et MRP1 afin d'identifier la région de ce domaine permettant l'association à Kir6.2. Quatre chimères ont été réalisées, incorporant respectivement la partie N-terminale cytoplasmique (construction Chim1), la première hélice transmembranaire et la première boucle cytoplasmique (construction Chim2), les deuxième et

troisième hélices transmembranaires (construction Chim3), et les quatrième et cinquième hélices transmembranaires (construction Chim4) du domaine TMD0 de MRP1 dans SUR2A. Aucune de ces constructions ne donne de courant en patch-clamp (*Figure 68*).

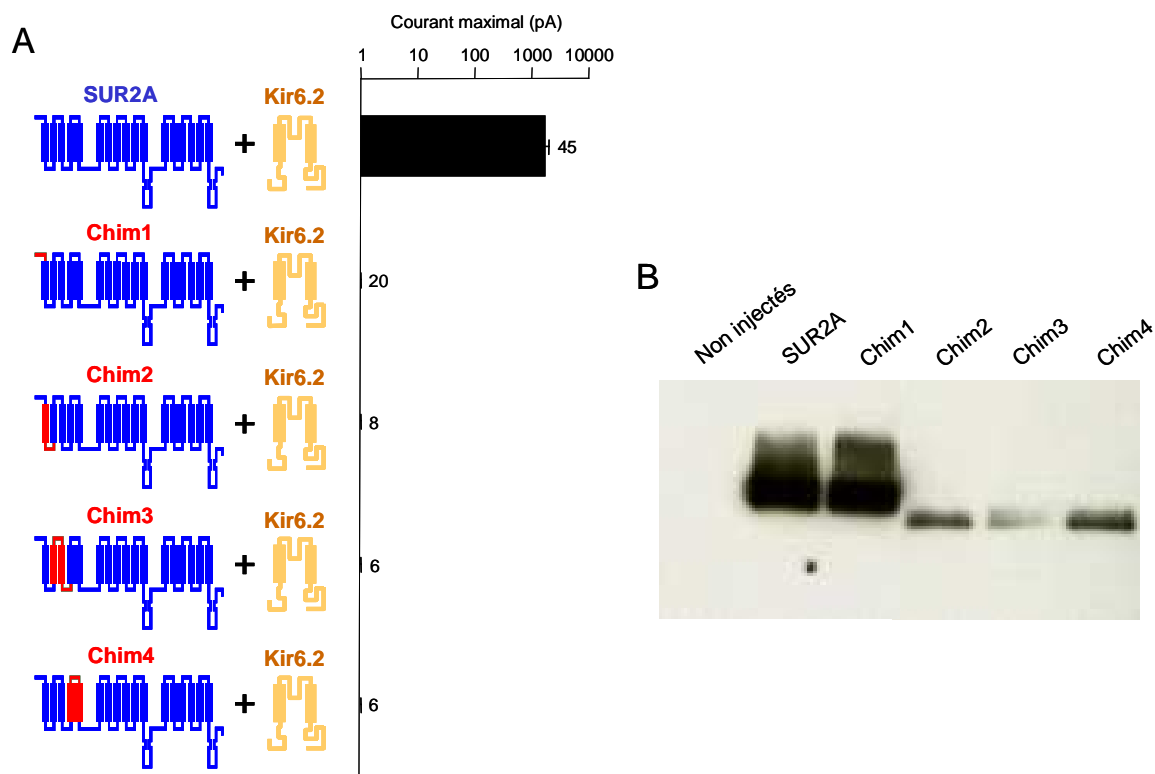


Figure 68 : Les chimères du domaine TMD0 s'expriment mais ne permettent pas la formation de canaux fonctionnels. (A) Courants maximaux mesurés en patch-clamp en configuration inside-out en absence de nucléotides, reflet de la densité de canaux à la membrane. Les chiffres au-dessus des barres indiquent le nombre de patches pris en compte. (B) Contrôle de l'expression des protéines dans l'ovocyte de Xénope en Western Blot.

Néanmoins, les résultats de Western Blot révèlent que toutes s'expriment dans l'ovocyte. Il faudra déterminer si un problème d'adressage à la membrane plasmique est à l'origine de cette absence de canaux, ou si ceux-ci sont présents à la membrane mais non fonctionnels.

2.2 Rôle essentiel d'un domaine C-terminal proximal cytoplasmique

Un autre domaine de l'isoforme cardiaque SUR2A du récepteur des sulfonylurées est connu pour être en interaction physique avec Kir6.2. Ce linker cytoplasmique de 65 résidus

(acides aminés 1293 à 1358), localisé entre le dernier domaine transmembranaire TMD2 et le deuxième domaine de liaison des nucléotides NBD2, est capable de co-immunoprécipiter avec Kir6.2, prouvant l'existence d'une interaction physique directe (Rainbow *et al.*, 2004a). De plus, sa co-expression avec les sous-unités sauvages SUR2A et Kir6.2 entraîne de sévères perturbations de l'expression des canaux K_{ATP} à la membrane plasmique des cellules (Rainbow *et al.*, 2004a; Rainbow *et al.*, 2004b) suggérant la disruption d'une interface critique entre les deux sous-unités incompatible avec la formation de canaux fonctionnels. Ces résultats soulèvent l'hypothèse que ce linker cytoplasmique C-terminal puisse jouer un rôle critique de connecteur à l'interface entre les sous-unités du canal K_{ATP} cardiaque. De ce fait, il pourrait représenter une voie potentielle de transduction du signal permettant de lier fonctionnellement la fixation d'effecteurs à SUR2A aux modulations d'ouverture de Kir6.2.

Nous avons donc examiné le rôle joué par ce domaine en utilisant là encore l'approche chimérique entre SUR2A et MRP1 décrite précédemment, afin de déterminer s'il pouvait être impliqué dans les processus de transmission allostérique entre SUR2A et Kir6.2.

2.2.1 Identification d'un défaut de couplage et d'adressage

Notre stratégie, décrite en **Figure 62**, a consisté à co-exprimer dans l'ovocyte de Xénope Kir6.2 sauvage avec SUR2A sauvage ou chimérique, puis à caractériser fonctionnellement les canaux K_{ATP} résultants en utilisant la technique du patch-clamp dans la configuration inside-out. De manière à vérifier leur intégrité, les canaux sauvages et chimériques ont été testés pour leur sensibilité à un certain nombre d'effecteurs physiologiques (ATP, ADP) et pharmacologiques (P1075, activateur analogue du pinacidil; SR47063, activateur analogue du cromakalim; glibenclamide, inhibiteur de la famille des sulphonylurées).

Une première chimère, notée S1M, a été créée par mutagenèse dirigée, où une version du fragment décrit par Rainbow et collaborateurs, étendue à 82 résidus de manière à couvrir l'intégralité du linker cytoplasmique reliant l'hélice transmembranaire H17 à l'extrémité N-terminale du NBD2 (acides aminés 1276 à 1358), a été remplacée dans SUR2A par la région équivalente de MRP1. Cette construction a ensuite été co-exprimée avec Kir6.2 dans l'ovocyte de Xénope puis testée en patch-clamp parallèlement au canal sauvage (Kir6.2/SUR2A) et à la co-expression Kir6.2/MRP1. Comme attendu, les canaux Kir6.2/SUR2A donnent lieu à des courants K_{ATP} d'amplitude de l'ordre du nA (1150 ± 90 pA), alors qu'aucun courant K_{ATP} n'est enregistrable pour Kir6.2/MRP1 dont on sait qu'ils ne s'associent pas spontanément (**Figure 69**). De plus, en présence de 100 μ M ATP (dose

permettant d'inhiber les canaux à 90%), l'application de 100 μ M P1075, activateur classique des canaux K_{ATP} , entraîne une activation nette des canaux Kir6.2/SUR2A (105 %), contrairement aux canaux Kir6.2/MRP1 pour lesquels aucune activité n'est visible. Dans les mêmes conditions, les canaux chimériques Kir6.2/S1M se révèlent très faiblement exprimés à la membrane plasmique, ne donnant lieu qu'à des courants de très faible amplitude (72 ± 20 pA), et ne sont que faiblement activés par l'application de 100 μ M P1075 (28 %) (**Figure 69**).

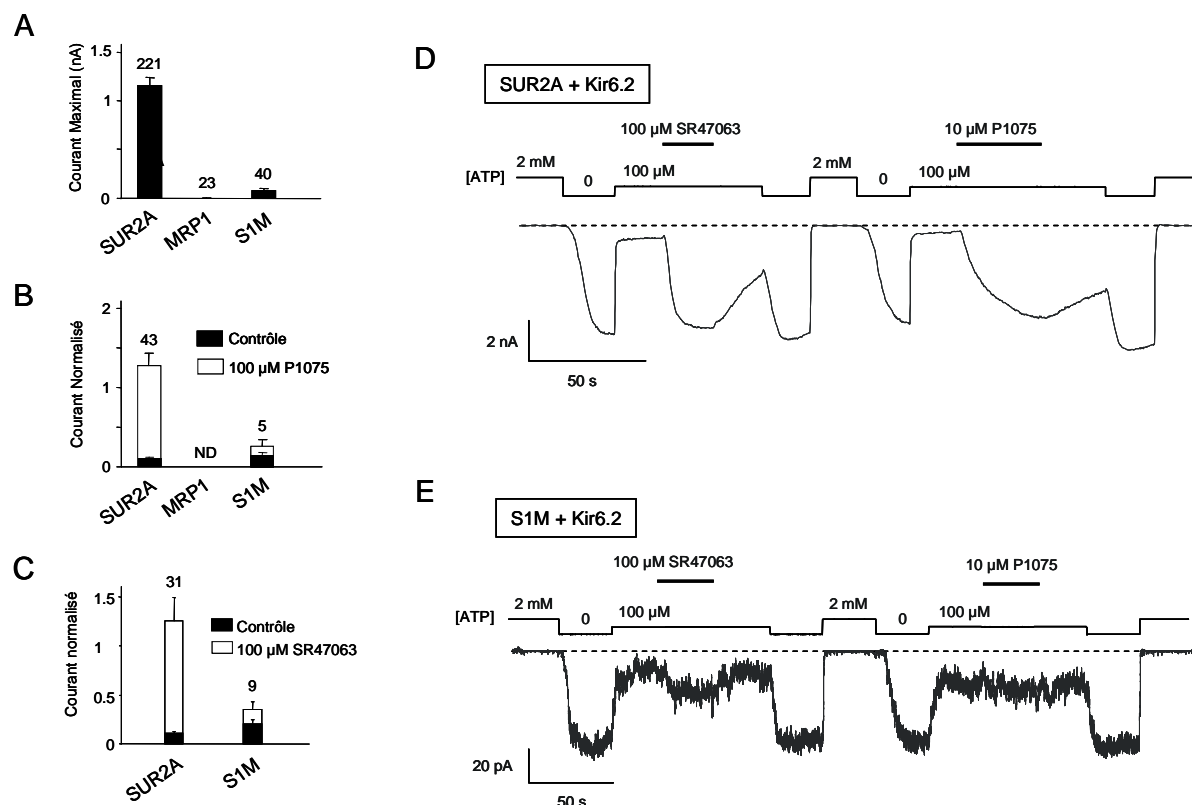


Figure 69 : La mutation du linker TMD2/NBD2 entraîne des défauts d'expression et de réponse aux ouvreurs pharmacologiques. (A) Courant maximaux enregistrés en absence de nucléotides en patch-clamp en configuration inside-out. Les numéros au-dessus des histogrammes indiquent le nombre de patchs inclus. (B) Réponse au P1075 et au SR47063 (C) des canaux Kir6.2/SUR2A et Kir6.2/S1M. Les concentrations 100 μ M P1075 et 100 μ M SR47063 sont appliquées en présence de 100 μ M ATP. L'application de 100 μ M ATP seul est utilisée comme contrôle (barres noires). Les courants enregistrés sont normalisés par rapport au courant mesuré en absence de nucléotides (avant application des ouvreurs). (D) Exemples d'enregistrements représentatifs en patch-clamp illustrant les réponses des canaux Kir6.2/SUR2A et Kir6.2/S1M aux ouvreurs pharmacologiques.

De plus, l'application d'un autre ouvreur pharmacologique spécifique, le SR47063, révèle une nouvelle différence entre les canaux sauvages et chimériques : là où les canaux Kir6.2/SUR2A sont fortement activés par 100 μ M de SR47063 (125 %), les canaux chimériques Kir6.2/S1M se révèlent peu sensibles (moins de 35 % d'activation, **Figure 69**). Ce phénotype déficient à la fois pour l'expression à la membrane et l'activation par les ouvreurs pharmacologiques, dit « phénotype MRP1 », est particulièrement intéressant. En effet, deux hypothèses permettent d'expliquer ces perturbations des fonctions de régulation du canal: soit le canal chimérique présente un assemblage déficient, soit SUR2A et Kir6.2 sont encore associés mais ne sont plus couplées fonctionnellement. Pour confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses, nous avons par la suite cherché à définir une région minimale responsable de l'établissement de ce phénotype déficient.

2.2.2 Trois résidus C-terminaux de SUR2A sont essentiels pour l'expression des canaux K_{ATP} et leur activation par le P1075

De manière à préciser la zone responsable du phénotype MRP1 observé pour la chimère S1M, des chimères de SUR2A incorporant dans le linker d'intérêt des fragments de MRP1 de taille inférieure ont été créées. La chimère S1M a tout d'abord été divisée en deux parties égales afin de générer les chimères S2M et S3M (**Figure 70**). Les canaux chimériques ont ensuite été testés en patch-clamp pour deux paramètres décrits auparavant: les courants K_{ATP} maximaux résultants, reflets de l'expression des canaux à la membrane plasmique, et la sensibilité à une dose saturante de 100 μ M P1075, reflet de la fonctionnalité des canaux exprimés. Ces deux paramètres se sont en effet révélés suffisants pour différencier les phénotypes sauvage et déficient.

La caractérisation des chimères S2M et S3M en patch-clamp révèle que S2M possède le même phénotype MRP1 que S1M (faibles courants et faible activation par le P1075) alors que S3M possède un phénotype sauvage identique aux canaux Kir6.2/SUR2A (courants de l'ordre du nA et forte sensibilité au P1075). La même procédure a donc ensuite été appliquée au segment S2M, divisé en quatre afin de générer les chimères S4M, S5M, S6M et S7M. Les chimères S4M, S5M et S6M possèdent un phénotype sauvage, alors que la chimère S7M est caractérisée par le même phénotype MRP1 déjà observé pour S1M et S2M.

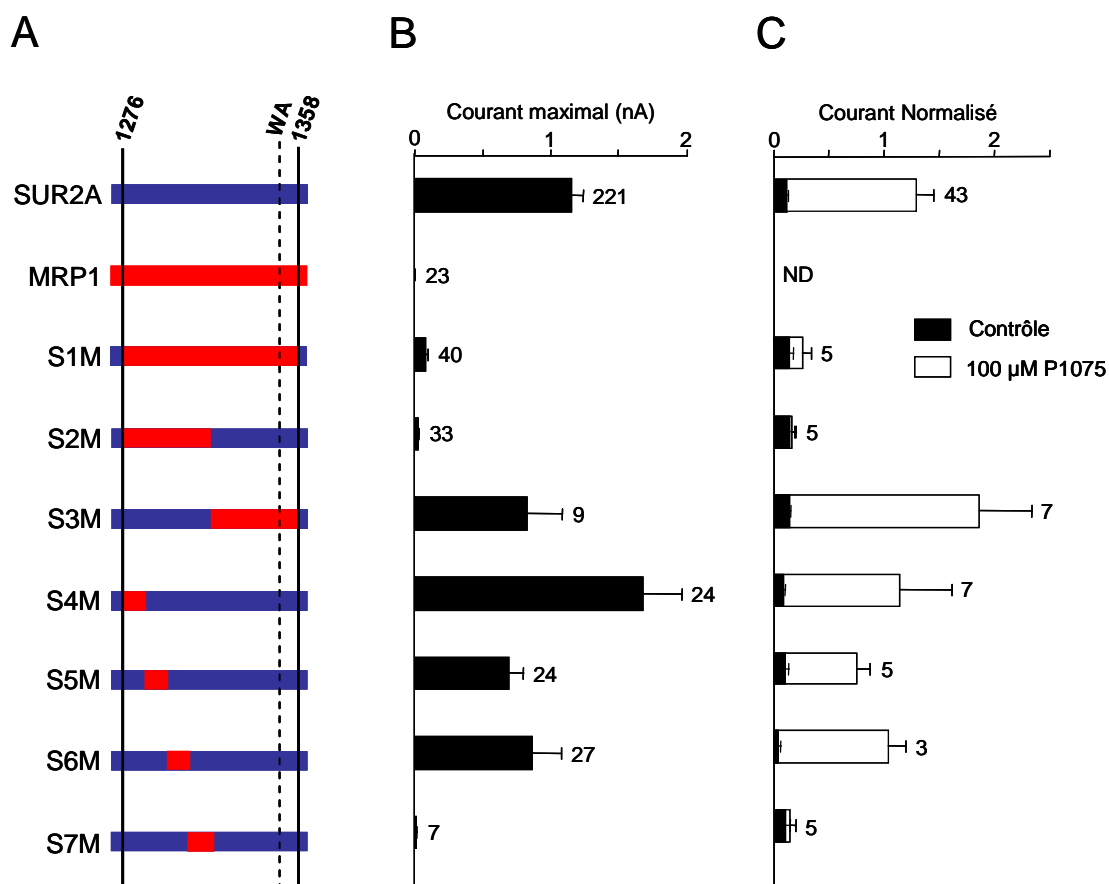


Figure 70 : Récapitulatif des chimères mises en œuvre et de leurs phénotypes respectifs. (A) Représentation schématique des chimères réalisées. Pour plus de clarté, seule la zone allant des résidus 1276 à 1358 a été représentée. Les parties correspondant à SUR2A sont représentées en bleu et celles correspondant à MRP1 en rouge. (B) Courant maximaux enregistrés en absence de nucléotides en patch-clamp en configuration inside-out. Les numéros au-dessus des histogrammes indiquent le nombre de patchs inclus. (C) Réponse au P1075. Une concentration de 100 μM P1075 est appliquée en présence de 100 μM ATP. L'application de 100 μM ATP seul est utilisée comme contrôle (barres noires). Les courants enregistrés sont normalisés par rapport au courant mesuré en absence de nucléotides (avant application des ouvreurs).

L'alignement des séquences primaires des isoformes SUR1 et SUR2A avec MRP1 sur une zone de 16 résidus comprenant le segment S7M révèle une région très conservée entre les ABC (**Figure 71**). Trois résidus dans ce segment sont similaires dans les isoformes SUR et diffèrent chez MRP1: E1305 (Q chez SUR1), I1310 et L1313 (numérotation SUR2A). De plus, l'alignement de SUR2A avec les séquences primaires des protéines de structures

cristallographiques résolues Sav1866 (Dawson et Locher, 2006) et MsbA (Ward *et al.*, 2007) situe ces résidus respectivement en amont (E1305) et dans le premier feuillet β du NBD2 (I1310 et L1313), comme indiqué sur la **Figure 71**. Ces trois résidus ont donc été remplacés dans SUR2A par ceux de MRP1 et le triple mutant obtenu, noté SUR2A(EIL/VFY), a été caractérisé en patch-clamp.

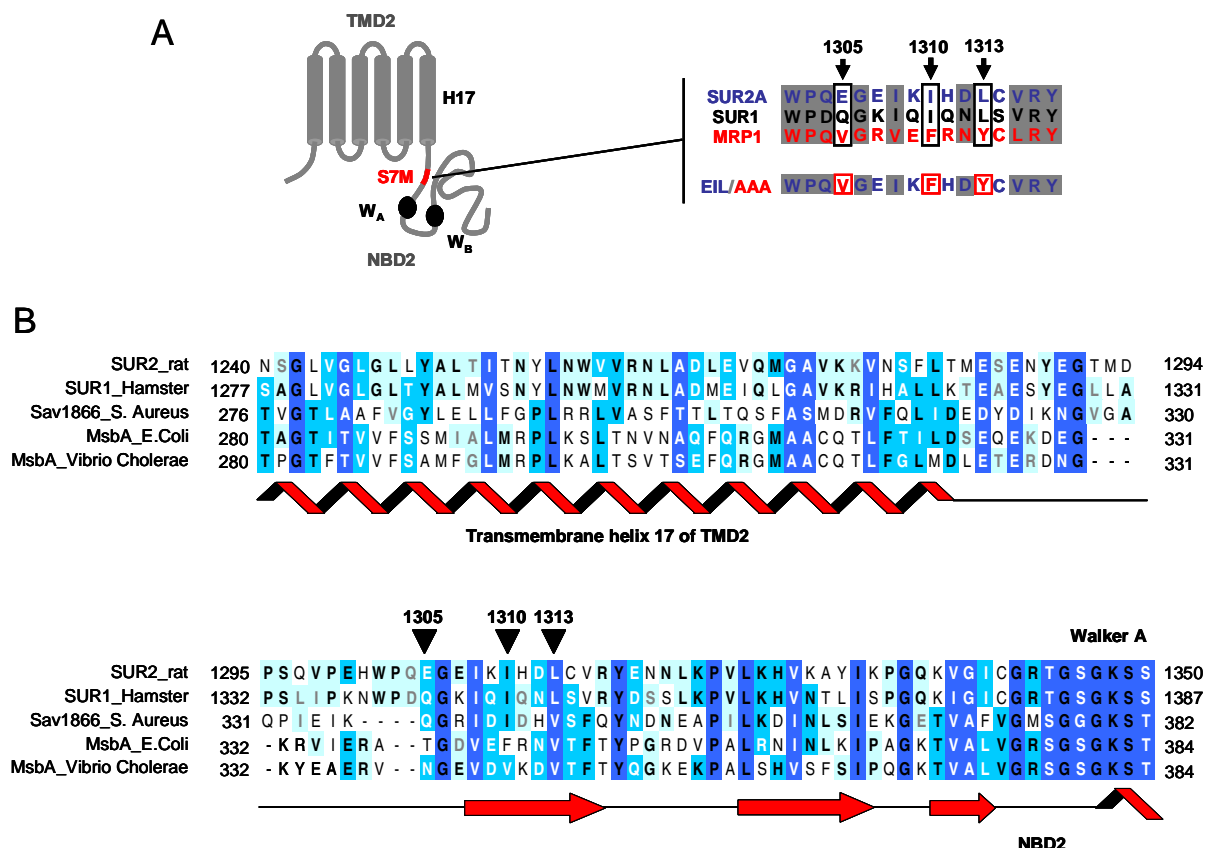


Figure 71 : Identification de trois résidus conservés dans le segment S7M. (A) Alignement des séquences primaires de SUR2A de rat, SUR1 humain et MRP1 humain. Les résidus E1305, I1310 et L1313 (numérotation SUR2A), conservés chez SUR et différents chez MRP1, sont encadrés. Ces résidus ont été remplacés dans SUR2A par ceux de MRP1 (V1290, F1295 et Y1298) pour générer le triple-mutant SUR2A(EIL/AAA). (B) Position des résidus E1305, I1310 et L1313 de SUR2A entre l'hélice transmembranaire H17 du TMD2 et le premier feuillet β du NBD2, basée sur l'hypothèse que SUR2A adopte une structure identique à Sav1866 (Dawson et Locher, 2006) et MsbA (Ward *et al.*, 2007) utilisées pour l'alignement en utilisant M-Coffee (Moretti *et al.*, 2007).

La caractérisation fonctionnelle du triple-mutant SUR2A(EIL/VFY) montre qu'il possède un phénotype déficient identique à celui de la chimère S7M, avec des courants d'amplitude faible (49 ± 11 pA) et une sensibilité au P1075 fortement réduite (**Figure 72**). Il semble donc que muter les résidus E1305, I1310 et L1313 suffise à conférer le phénotype MRP1. Pour confirmer cette hypothèse, les trois résidus sauvages ont été réintroduits dans la chimère S7M déficiente, générant la chimère S7M(VFY/EIL). Cette chimère donne lieu à des courants d'amplitude comparable à ceux du canal sauvage (1180 ± 230 pA). De plus, elle possède une sensibilité au P1075 similaire aux canaux sauvages, avec une activation par $100 \mu\text{M}$ P1075 de l'ordre de 110 %. Cette réversion du phénotype MRP1 prouve le rôle essentiel des résidus E1305, I1310 et L1313 dans l'expression à la membrane et la sensibilité au P1075 des canaux K_{ATP} Kir6.2/SUR2A. Nous avons par la suite essayé de restreindre encore le nombre de résidus en mutant uniquement les résidus I1310 et L1313 (double-mutant SUR2A(IL/FY)) mais il s'est avéré que muter moins de trois résidus conduit à l'obtention de phénotypes intermédiaires entre les phénotypes sauvage et déficient (**Figure 72**). De fait, muter les trois résidus simultanément est donc nécessaire à l'établissement du phénotype MRP1, et ces trois résidus sont donc essentiels pour l'expression et l'activation par le p1075 des canaux K_{ATP} .

Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer la sensibilité altérée au P1075. La première est que muter ces trois résidus suffirait à provoquer une dissociation physique entre les sous-unités SUR2A et Kir6.2, ce qui correspondrait aux résultats et conclusions apportées par Rainbow et collaborateurs (Rainbow *et al.*, 2004a; Rainbow *et al.*, 2004b), empêchant toute expression des canaux. Une deuxième hypothèse est que les résidus E1305, I1310 et L1313 pourraient se trouver à l'interface entre SUR2A et Kir6.2 et participer à la transmission du signal entre les deux, ce qui expliquerait que leur mutation entraîne des perturbations de la régulation par le P1075. De manière à étudier l'influence de la nature des résidus utilisés en remplacement de ceux de SUR2A, et afin de voir si la taille des chaînes latérales à ces positions pouvait jouer un rôle dans les perturbations d'association observées, les trois résidus ont ensuite été mutés en alanines, générant le triple-mutant SUR2A(EIL/AAA). Ce mutant donne lieu à des courants d'amplitude modérée en patch-clamp (420 ± 90 pA) mais singulièrement plus élevée que pour les canaux Kir6.2/SUR2A(EIL/VFY) (49 ± 11 pA). Néanmoins, les canaux Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) présentent toujours un défaut significatif d'activation par le P1075 comparativement aux canaux sauvages (**Figure 72**).

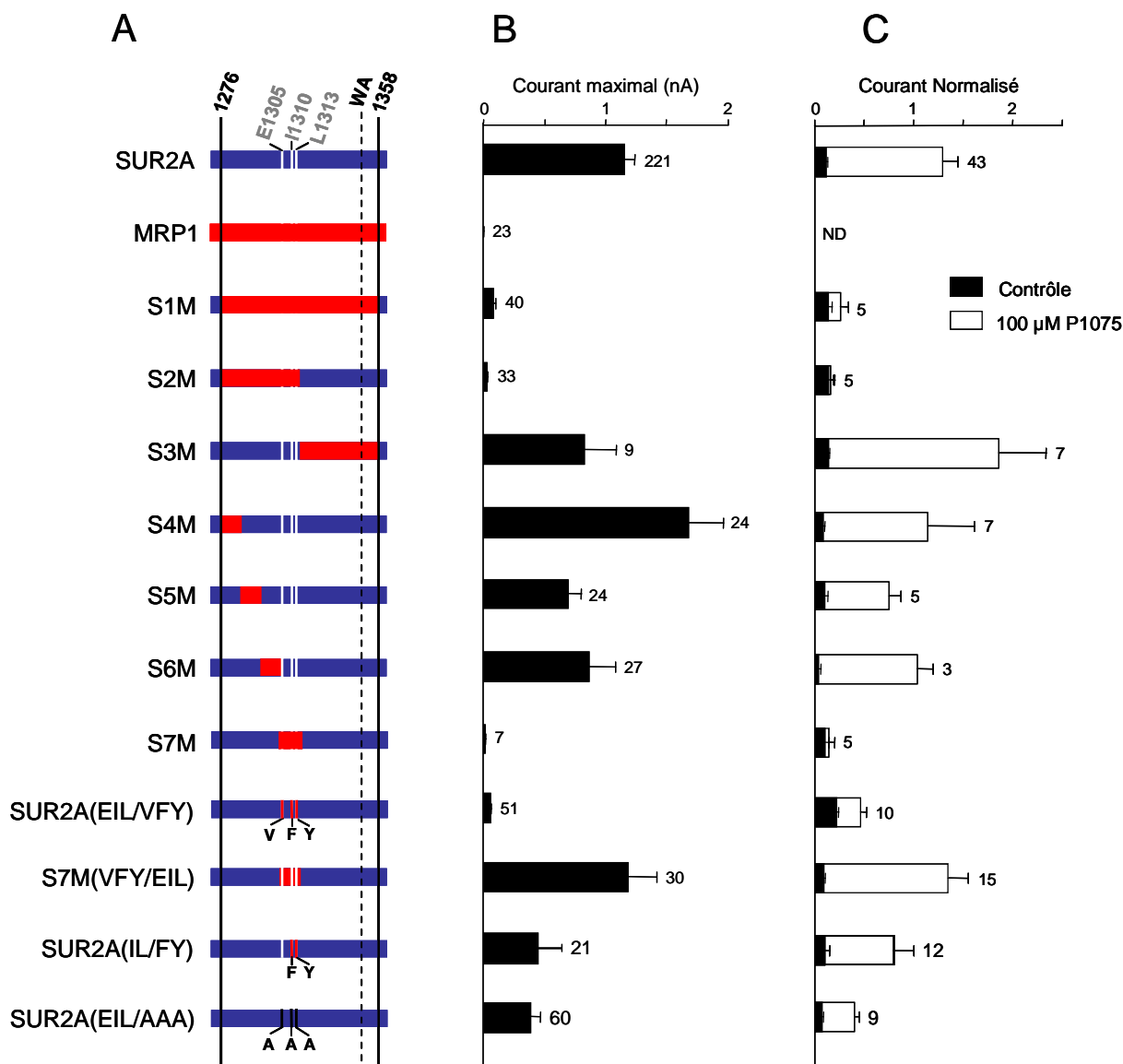


Figure 72 : Les résidus E1305, I1310 et L1313 de SUR2A sont essentiels pour l'expression des canaux K_{ATP} et leur activation par le P1075. (A) Représentation schématique des chimères réalisées. Pour plus de clarté, seule la zone allant des résidus 1276 à 1358 a été représentée, et les résidus E1305, I1310 et L1313 sont indiqués par des traits blancs. Les parties correspondant à SUR2A sont représentées en bleu et celles correspondant à MRP1 en rouge. (B) Courant maximaux enregistrés en absence de nucléotides en patch-clamp en configuration inside-out. Les numéros au-dessus des histogrammes indiquent le nombre de patches inclus. (C) Réponse au P1075. Une concentration de 100 μ M P1075 est appliquée en présence de 100 μ M ATP. L'application de 100 μ M ATP seul est utilisée comme contrôle (barres noires). Les courants enregistrés sont normalisés par rapport au courant mesuré en absence de nucléotides (avant application des ouvreurs).

2.2.3 Les canaux SUR2A(EIL/AAA) présentent un défaut d'activation par le P1075 sans changement d'affinité

Dans le cas du triple-mutant SUR2A(EIL/AAA), l'expression, et donc l'association physique entre SUR2A et Kir6.2, est partiellement rétablie. Cependant, le défaut d'activation par le P1075 persiste et prouve que la régulation du canal par cet ouvreur pharmacologique est affectée dès lors qu'on mute les résidus E1305, I1310 et L1313 et ce quelle que soit la nature des résidus introduits en remplacement. Cette perte de sensibilité au P1075 peut être expliquée soit par un défaut de fixation de l'ouvreur, soit par une altération des mécanismes entraînant l'activation du canal Kir6.2 suite à sa fixation à SUR2A.

De manière à déterminer si la mutagenèse entraîne une altération de l'affinité pour l'ouvreur ou des mécanismes de transduction du signal, les canaux sauvage (Kir6.2/SUR2A) et mutant (Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA)) ont été soumis à des concentrations croissantes de P1075 (**Figure 73**). La courbe dose-réponse au P1075 montre que les canaux sauvage et mutant ont des affinités apparentes pour l'ouvreur tout à fait comparables (Kir6.2/SUR2A: $K_{1/2} = 6,5 \mu\text{M}$; Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA): $K_{1/2} = 4 \mu\text{M}$; Kir6.2/SUR2A(EIL/VFY) : $K_{1/2} = 8 \mu\text{M}$, données nos montrées), indiquant que les mutations des résidus E1305, I1310 et L1313 n'altèrent pas l'affinité pour le P1075.

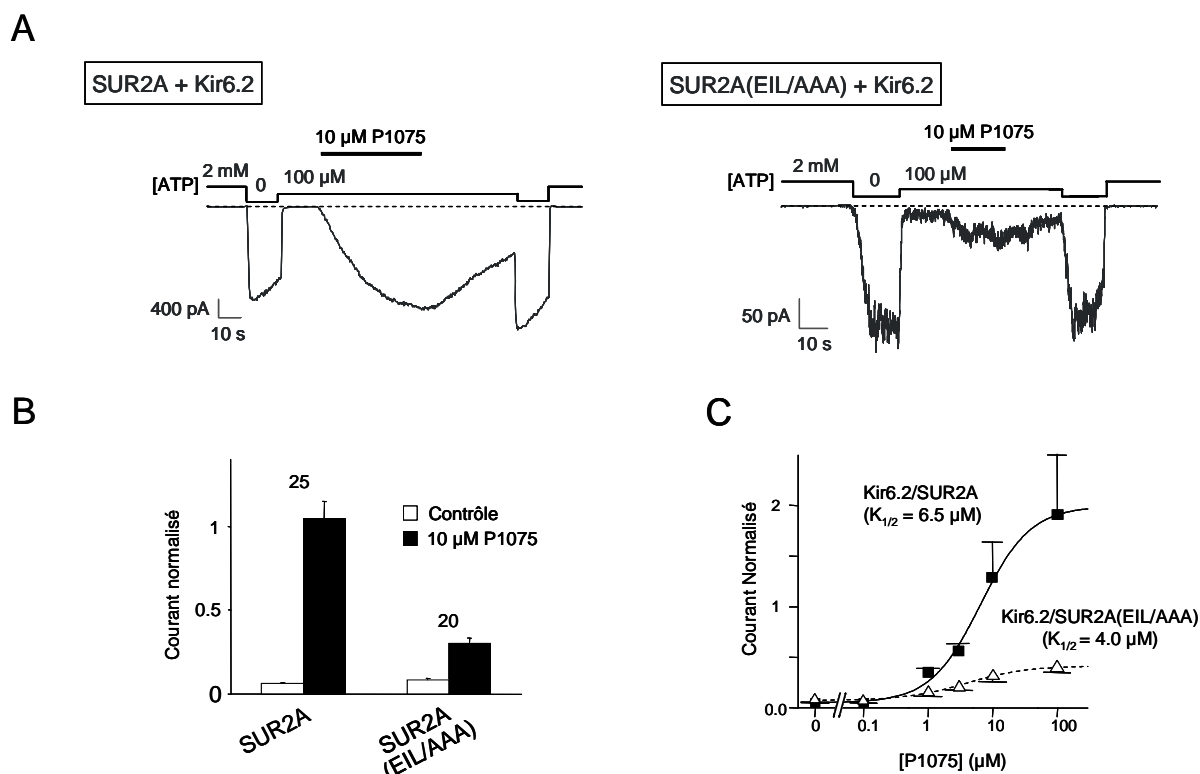


Figure 73 : Réponses des canaux K_{ATP} sauvage et mutant au P1075. (A) (B) Exemples d'enregistrements représentatifs en patch-clamp illustrant les réponses des canaux Kir6.2/SUR2A et Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) à 10 μM de P1075 en présence de 100 μM ATP. (B) Histogramme de courant moyen normalisé mesurés avant et après application du P1075. Les courants sont normalisés par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Les numéros au-dessus des barres indiquent le nombre de patches pris en compte dans chaque moyenne. (C) Courbes dose-réponse au P1075 pour les canaux sauvages (carrés) et mutants (triangles) en présence de 100 μM ATP. Les courants sont normalisés par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour 6 patches pour Kir6.2/SUR2A et 8 patches pour Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). L'ajustement des données utilisant l'équation (1) donne $K_{1/2} = 6,5 \pm 1,3 \mu\text{M}$ ($h = 1,1 \pm 0,2$) pour Kir6.2/SUR2A et $K_{1/2} = 4,0 \pm 1 \mu\text{M}$ ($h = 0,94 \pm 0,2$) pour Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA).

2.2.4 Les canaux SUR2A(EIL/AAA) présentent un défaut d'activation par le SR47063 sans changement d'affinité

La caractérisation fonctionnelle des canaux Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) a été poursuivie en testant leur capacité à être activés par un autre ouvreur pharmacologique de la famille des

benzopyranes, le SR47063. En présence de 100 μM ATP, l'application de 100 μM SR47063 entraîne l'activation d'un facteur 14 des canaux sauvages contre une activation d'un facteur 4 seulement pour les canaux Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) (**Figure 74**).

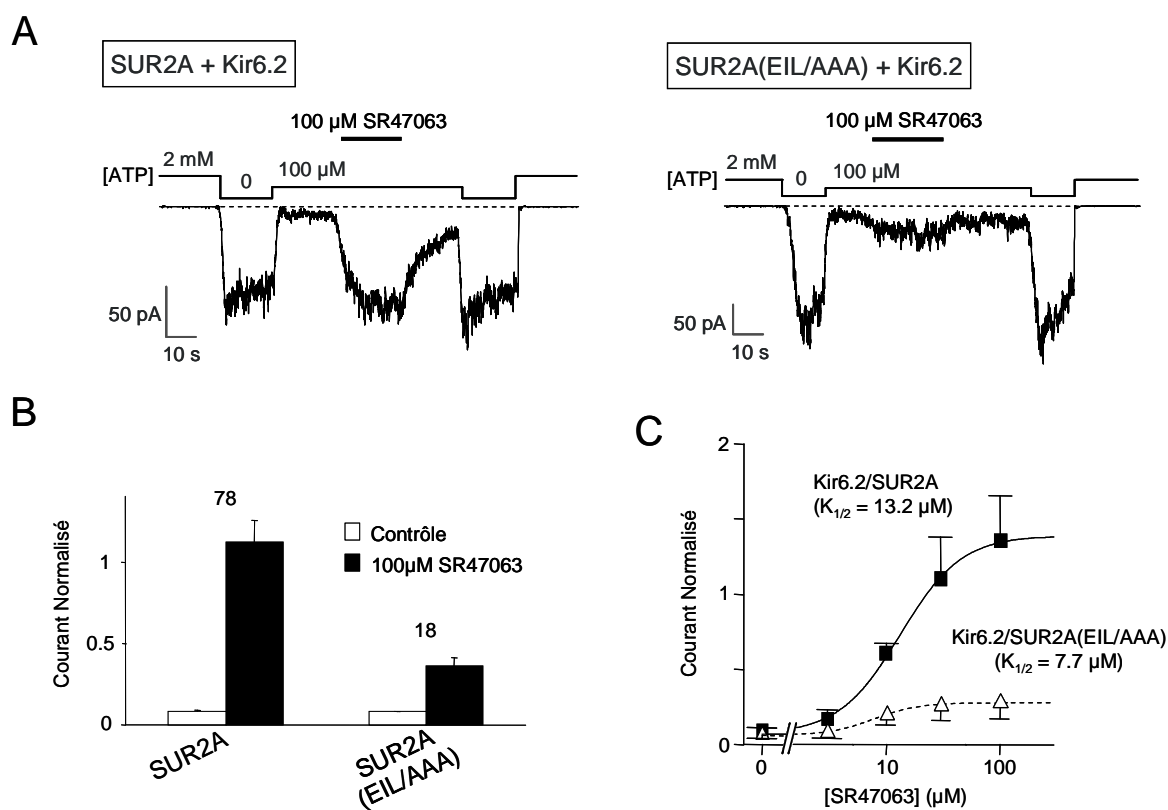


Figure 74 : Réponses des canaux K_{ATP} sauvage et mutant au SR47063. (A) (B) Exemples d'enregistrements représentatifs en patch-clamp illustrant les réponses des canaux Kir6.2/SUR2A et Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) à 100 μM de SR47063 en présence de 100 μM ATP. (B) Histogramme de courant moyen normalisé mesurés avant et après application du SR47063. Les courants sont normalisés par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Les numéros au-dessus des barres indiquent le nombre de patchs pris en compte dans chaque moyenne. (C) Courbes dose-réponse au SR47063 pour les canaux sauvages (carrés) et mutants (triangles) en présence de 100 μM ATP. Les courants sont normalisés par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour 3 patchs pour Kir6.2/SUR2A et 5 patchs pour Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). Le fitting des données utilisant l'équation (1) donne $K_{1/2} = 13,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ($h = 1,61 \pm 0,2$) pour Kir6.2/SUR2A et $K_{1/2} = 7,7 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ($h = 2,2 \pm 0,4$) pour Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA).

Là encore, comme pour le P1075, l'application de concentrations croissantes de SR47063 ne révèle aucune différence significative d'affinité apparente pour la drogue entre les canaux

sauvages ($K_{1/2} = 13,2 \mu\text{M}$) et mutant ($K_{1/2} = 7,7 \mu\text{M}$), suggérant que les mutations des résidus E1305, I1310 et L1313 n'altèrent pas la fixation de la drogue à SUR2A (**Figure 74**).

Il semble donc que cette perte de sensibilité au SR47063, et aux ouvreurs pharmacologiques de manière générale, résulte d'une incapacité des canaux Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) à entraîner l'activation de Kir6.2 suite à la fixation de la drogue.

2.2.5 La triple mutation E1305A/I1310A/L1313A dans SUR2A abolit l'activation par le MgADP

Dans l'environnement cellulaire, les canaux K_{ATP} sont physiologiquement activés par le MgADP. En effet, Kir6.2 et SUR2A possèdent tous deux des domaines de liaison des nucléotides cytoplasmiques: la fixation de MgADP à Kir6.2 a une action inhibitrice tandis que son interaction avec SUR2A entraîne l'activation des canaux. Aux concentrations submillimolaires de MgADP, la moyenne de ces deux effets résulte en une activation des canaux. De ce fait, un découplage des sous-unités SUR2A et Kir6.2 devrait abolir l'action activatrice de SUR2A et provoquer un changement de sensibilité au MgADP en faveur de l'inhibition. Les sensibilités respectives des canaux sauvage et mutant au MgADP ont donc été étudiées et comparées à la sensibilité de canaux Kir6.2 tronqués de leur 36 acides aminés C-terminaux (Kir6.2 Δ C36) formant des canaux K_{ATP} indépendamment de SUR2A (Tucker *et al.*, 1997). Comme attendu, les canaux Kir6.2/SUR2A sont fortement activés par l'application de 100 μM MgADP (**Figure 75**). En revanche, dans les mêmes conditions les canaux Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) sont inhibés et se comportent de manière similaire aux canaux Kir6.2 Δ C36. Sur une gamme plus large de concentrations, les canaux sauvages sont activés aux concentrations les plus faibles puis inhibés aux concentrations plus élevées, reflétant la combinaison de l'activation *via* SUR et de l'inhibition *via* Kir6.2.

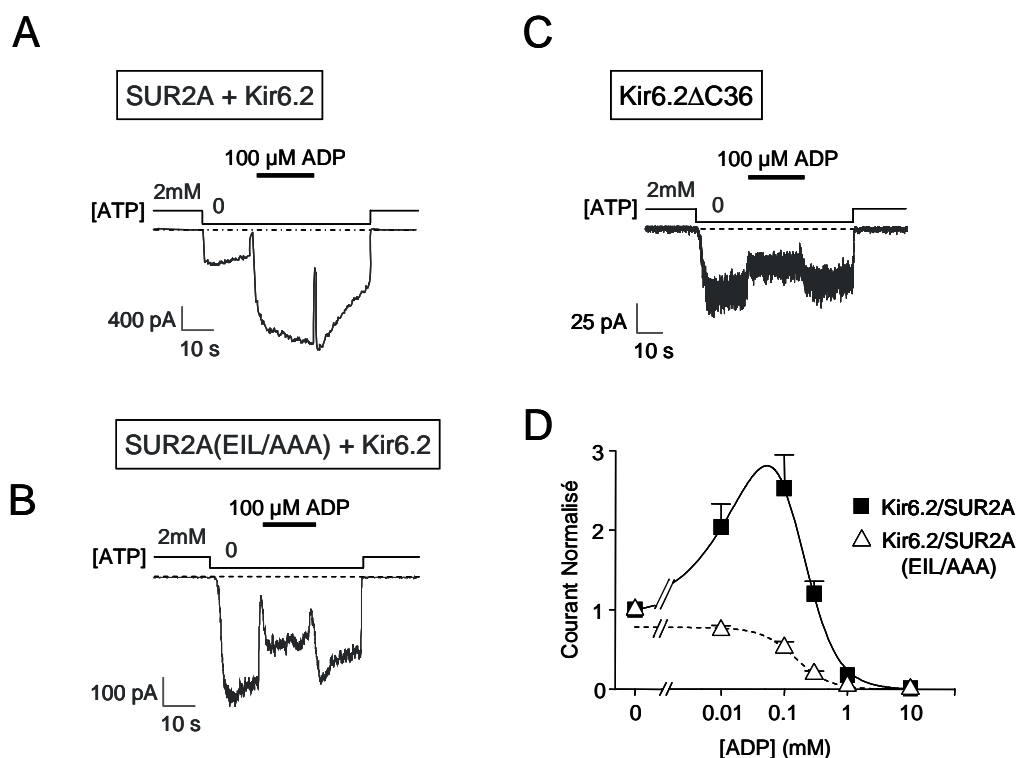


Figure 75 : Réponses des canaux K_{ATP} sauvage et mutant au MgADP. (A) (B) (C) Exemples d'enregistrements représentatifs en patch-clamp illustrant les réponses des canaux Kir6.2/SUR2A, Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) et Kir6.2ΔC36 à 100 μM de MgADP en présence de 100 μM ATP. (D) Courbes dose-réponse au MgADP pour les canaux sauvages (carrés) et mutants (triangles) en présence de 100 μM ATP. Les courants sont normalisés par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour 5-15 patchs pour Kir6.2/SUR2A et 5-14 patchs pour Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). L'ajustement des données Kir6.2/SUR2A utilisant l'équation (3) donne $K_{a1/2} = 124 \pm 9 \mu\text{M}$ ($h_a = 0,94 \pm 0,03$) et $K_{i1/2} = 230 \pm 6 \mu\text{M}$ ($h_i = 1,93 \pm 0,05$). L'ajustement des données Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) utilisant l'équation (2) donne $K_{1/2} = 152 \pm 16 \mu\text{M}$ ($h = 1,6 \pm 0,2$).

Les canaux mutants sont eux toujours inhibés quelle que soit la concentration appliquée, ce qui suggère que les canaux Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) se comportent vis-à-vis du MgADP comme si SUR2A était toujours physiquement présent mais pas en mesure de compenser l'action inhibitrice de Kir6.2 en exerçant son action activatrice.

2.2.6 Les mécanismes d'inhibition par l'ATP et le glibenclamide ne sont pas affectés chez le mutant SUR2A(EIL/AAA)

Les activateurs physiologique et pharmacologiques étant tous affectés par la mutation des résidus E1305, I1310 et L1313, les canaux mutants ont ensuite été testés pour leur sensibilité à un inhibiteur physiologique, l'ATP, et un inhibiteur pharmacologique de la classe des sulphonylurées, le glibenclamide. L'application de concentrations croissantes d'ATP sur les canaux Kir6.2/SUR2A et Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) révèle que les deux populations de canaux présentent des sensibilités très similaires: les canaux sauvages et mutants sont inhibés par l'ATP avec des K_i respectifs de 15 μ M et 12,1 μ M (**Figure 76**). De plus, l'application de 300 nM de glibenclamide, dose suffisante pour provoquer une inhibition de 90 % chez les canaux sauvages, induit chez les canaux Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) une cinétique d'inhibition comparable à celle des canaux Kir6.2/SUR2A, et les deux populations de canaux montrent des sensibilités au glibenclamide quasi-identiques ($K_i^{\text{sauvage}} = 16$ nM; $K_i^{\text{mutant}} = 8,2$ nM).

Les sensibilités inchangées pour l'ATP et le glibenclamide démontrent que les mécanismes d'inhibition ne sont pas affectés par les mutations des résidus E1305, I1310 et L1313.

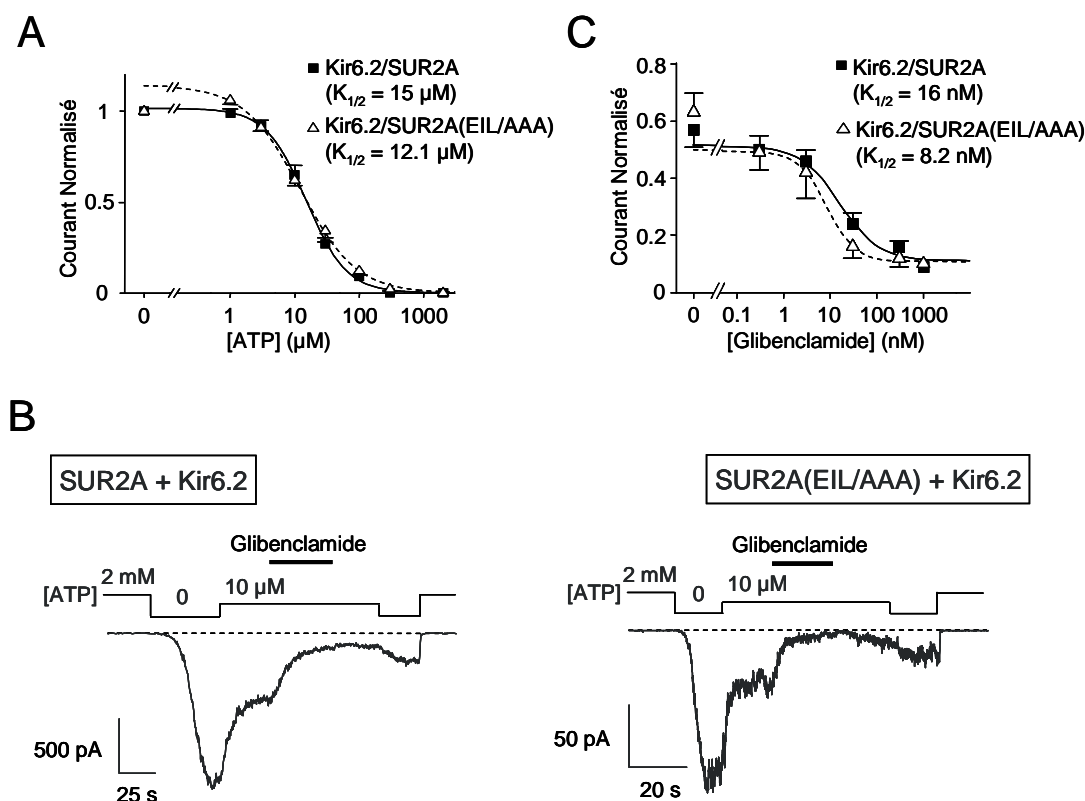


Figure 76 : Réponse des canaux K_{ATP} sauvage et mutant à l'ATP et au glibenclamide. (A) Courbes dose-réponse à l'ATP pour les canaux sauvages (carrés) et mutants (triangles). Les courants sont normalisés par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour 21-44 patchs pour Kir6.2/SUR2A et 8-28 patchs pour Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). Le fitting des données utilisant l'équation (2) donne $K_{1/2} = 15 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ($h = 1,39 \pm 0,07$) pour Kir6.2/SUR2A et $K_{1/2} = 12,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ($h = 1,01 \pm 0,05$) pour Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). (B) Exemples d'enregistrements représentatifs en patch-clamp illustrant les réponses des canaux Kir6.2/SUR2A et Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) à 300 nM de glibenclamide en présence de 10 μM ATP. (C) Courbes dose-réponse au glibenclamide pour les canaux sauvages (carrés) et mutants (triangles). Les courants sont normalisés par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour 5-12 patchs pour Kir6.2/SUR2A et 4-7 patchs pour Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). Le fitting des données utilisant l'équation (2) donne $K_{1/2} = 16 \pm 9,5 \mu\text{M}$ ($h = 1,04 \pm 0,6$) pour Kir6.2/SUR2A et $K_{1/2} = 8,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ($h = 1,43 \pm 0,19$) pour Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA).

3. Discussion

3.1 Le domaine TMD0: un élément essentiel pour l'association et les processus d'inhibition?

Peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation croisée des deux sous-unités des canaux K_{ATP} , et la manière dont la fixation de nucléotides ou d'effecteurs pharmacologiques à SUR entraîne des modulations des propriétés d'ouverture de Kir6.2 reste méconnue. Dans un souci d'identification des domaines de SUR impliqués dans cette régulation, nous nous sommes tout d'abord attachés à caractériser le rôle joué par le domaine N-ter TMD0, essentiel pour l'association entre les deux sous-unités (Chan *et al.*, 2003; Babenko et Bryan, 2003).

Les résultats présentés ici montrent que ce domaine est indispensable et irremplaçable pour permettre la formation de canaux à la membrane plasmique: en effet, son remplacement par le domaine équivalent de MRP1, présentant une homologie de 33 % et des prédictions de structures secondaires proches, ne permet pas l'adressage membranaire de canaux fonctionnels. A l'inverse, et de manière surprenante, l'adressage de MRP1 n'est pas perturbé par le remplacement de son TMD0 par celui de SUR2A, suggérant un rôle beaucoup plus critique pour ce domaine chez SUR que chez MRP1. Ce résultat est cohérent avec l'idée déjà évoquée que le domaine TMD0 n'est pas essentiel et joue un rôle mineur dans l'activité de transport chez MRP1 (Bakos *et al.*, 1998 et 2000). Toutefois, la construction MRP1(TMD0 SUR2A) n'a pas été testée fonctionnellement pour le transport, et il serait intéressant de déterminer si elle est toujours capable de prendre en charge les substrats de MRP1. De plus, il semble que la partie N-terminale de ce domaine adopte une structure flexible particulière (Chen *et al.*, 2002 et 2006; Binyamin *et al.*, 2005) qui le différencie peut-être du domaine équivalent de SUR: présentant deux topologies distinctes, ces domaines ne seraient en fait pas aisément interchangeables ce qui expliquerait que toute tentative d'approche chimérique entre les TMD0 de SUR et MRP1 se solde par l'absence de canaux donnant lieu à des courants enregistrables (constructions Chim1/2/3/4). Reste à déterminer si cette absence de courant résulte d'une absence de canaux à la membrane, et donc d'un problème de trafic, ou de la présence de canaux non fonctionnels.

Plusieurs arguments expérimentaux ainsi que des mutations retrouvées chez certains patients souffrant de diabète néonatal et d'hyperinsulinémie congénitale semblent indiquer

que le domaine TMD0 de SUR puisse être impliqué dans les mécanismes de régulation de l'activité de Kir6.2. En effet, coexprimé seul avec Kir6.2, le domaine TMD0 de SUR est capable de s'associer avec le canal et de modifier sa probabilité d'ouverture ainsi que sa sensibilité à l'ATP (Babenko et Bryan, 2003; Fang *et al.*, 2006). De plus, une mutation localisée dans la boucle cytoplasmique CL2 de l'isoforme SUR1, changeant une phénylalanine en leucine (F132L), a été identifiée comme étant associée à une forme de diabète néonatal (Proks *et al.*, 2006): la caractérisation électrophysiologique de ce mutant révèle une sensibilité décreue à l'inhibition par l'ATP (et au tolbutamide) permettant d'expliquer le défaut de sécrétion d'insuline et la pathologie. D'un point de vue mécanistique, l'hypothèse prévalent est que cette mutation entraînerait une perturbation de l'association entre le TMD0 de SUR1 et Kir6.2. D'autres mutations survenant dans le TMD0 de SUR1 associées avec des cas d'hyperinsulinémie ont d'ailleurs été rapportées comme affectant l'association entre SUR et Kir6.2 et viennent renforcer cette hypothèse, comme c'est le cas des mutations A116P et V187D (Chan *et al.*, 2003), ou encore le trafic du complexe à la membrane, comme c'est la cas pour les mutations G7R, N24K, F27S, R74W, et E128K (Yan *et al.*, 2007). Enfin, le fait que la sensibilité au tolbutamide du canal soit également affectée par la mutation F132L soulève la possibilité que le domaine TMD0 participe aux mécanismes d'inhibition que cette sulphonylurée initie, et intervienne donc dans les voies de régulation négatives de Kir6.2. Ceci est également illustré par le fait que ce domaine module l'inhibition du canal par la rhodamine 123 de manière nucléotides-dépendante (Hosy *et al.*, 2007).

Ainsi, en plus de son rôle associatif, le domaine TMD0 pourrait donc également avoir une fonction régulatrice au sein du canal K_{ATP} et être notamment impliqué dans les processus d'inhibition.

3.2 Implication d'un domaine C-terminal de SUR2A dans les processus d'activation

Le linker cytoplasmique reliant les domaines TMD2 et NBD2 de SUR2A contient un fragment de 65 résidus (acides aminés 1294 à 1358) décrit pour être en interaction avec Kir6.2 (Rainbow *et al.*, 2004a; Rainbow *et al.*, 2004b) mais dont le rôle dans la fonction du canal n'est pas connu. Au cours de cette étude, nous avons étudié à l'aide d'une stratégie chimérique l'implication potentielle de ce fragment dans les mécanismes moléculaires intervenant dans la régulation du canal K_{ATP} cardiaque. A l'intérieur de ce fragment, nous avons identifié trois résidus de SUR2A intimement impliqués dans l'activation des canaux K_{ATP} par les ouvreurs pharmacologiques (P1075, SR47063) et le MgADP: E1305, I1310 et

L1313. Ces trois résidus pourraient faire partie d'une voie de transduction couplant fonctionnellement les sous-unités SUR2A et Kir6.2 *via* le linker cytoplasmique reliant l'hélice transmembranaire 17 au domaine NBD2.

3.2.1 Les résidus E1305, I1310 et L1313 jouent un rôle critique dans l'association SUR2A-Kir6.2

Le rôle critique des résidus E1305, I1310 et L1313 a été découvert en appliquant une stratégie chimérique visant à étudier le rôle du linker TMD2-NBD2 dans l'expression et la régulation des canaux Kir6.2/SUR2A. La construction de chimères incorporant progressivement des fragments de plus en plus courts de ce linker de MRP1 dans SUR2A a mis en évidence que le remplacement de ces trois résidus est associé à une perte d'expression des canaux. Ce défaut d'expression va dans le sens des observations faites par Rainbow *et al.* (2004a, 2004b), où la co-expression du fragment entier avec SUR2A et Kir6.2 prévient l'association des deux sous-unités, et plaide en faveur de la localisation de ces résidus dans une région critique à l'interface avec Kir6.2. Néanmoins, nous avons observé que ce défaut d'expression pouvait être modulé en fonction de la nature des acides aminés introduits en remplacement de ces résidus. En effet, leur mutation en alanines a des conséquences moins drastiques sur le niveau d'expression que leur remplacement par les résidus correspondant chez MRP1 (V1290, F1295 et Y1298), comme en témoignent les amplitudes des courants enregistrés pour les canaux Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). Il est intéressant de noter que le même type d'observations a déjà été rapporté pour une mutation dans l'isoforme SUR1 au niveau du résidu L1350, correspondant dans SUR2A au résidu L1313. La mutation L1350Q dans SUR1, entraînant une diminution de l'expression à la membrane plasmique des canaux, est retrouvée chez des patients souffrant d'hyperinsulinémie congénitale et semble provoquer la pathologie en prévenant l'expression de surface des canaux K_{ATP} dans les cellules β du pancréas (Yan *et al.*, 2007). Ces résultats montrent que les résidus E1305, I1310 et L1313 ne sont pas absolument essentiels pour l'association physique entre SUR2A et Kir6.2, puisque leur mutation en alanines n'altère que partiellement l'expression des canaux à la membrane plasmique, mais ils suggèrent néanmoins que ces résidus sont susceptibles d'être localisés à l'interface entre les deux sous-unités. Cependant, l'absence de données structurales sur le canal K_{ATP} ne permet pas de conclure définitivement quant à leur localisation précise.

3.2.2 La partie C-terminale proximale de SUR2A est impliquée dans les processus d'activation couplant la fixation de ligands à SUR2A aux modifications des propriétés d'ouverture de Kir6.2

Toutes les régions de SUR décrites pour être en interaction avec Kir6.2 représentent des voies de transduction potentielles à étudier, comme le montre la récente description de l'implication du domaine TMD0/L0 dans le contrôle du gating de Kir6.2 (Fang *et al.*, 2006). Nous avons donc cherché à savoir si les trois résidus identifiés sont impliqués dans les mécanismes moléculaires de régulation du canal.

La caractérisation des canaux Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) montre des réponses fortement altérées à un certain nombre d'activateurs des canaux K_{ATP} comparativement aux canaux sauvages: activateurs pharmacologiques, comme le P1075 et le SR47063, ainsi qu'activateur physiologique comme le MgADP. Néanmoins, les expériences réalisées étant purement fonctionnelles, il est difficile d'affirmer si les déterminants identifiés interviennent au niveau de la fixation des ligands ou plutôt dans l'étape de transduction suivant cette fixation et permettant l'activation des canaux. La première hypothèse n'est pas improbable puisque les résidus E1305, I1310 et L1313 sont localisés à proximité des sites de liaison respectifs des ouvreurs pharmacologiques et de l'ADP, situés respectivement au niveau de l'hélice 17 (Moreau *et al.*, 2000) et du NBD2 (Matsuo *et al.*, 2005). Dans le cas des ouvreurs synthétiques, cette hypothèse est néanmoins invalidée par la preuve expérimentale que les affinités apparentes pour le P1075 et le SR47063 ne sont pas modifiées suite aux mutations. Dans le cas de l'ADP, l'activation étant totalement abolie chez le mutant SUR2A(EIL/AAA), il n'est pas possible de comparer les affinités respectives des canaux sauvages et mutants. Il est donc concevable que le défaut d'activation par l'ADP puisse résulter d'un défaut de fixation au niveau du NBD2. Néanmoins, le fait que les ouvreurs pharmacologiques et l'ADP soient affectés simultanément, bien qu'ils aient des sites de fixation à SUR2A distincts, plaide en faveur de la perturbation d'un seul et même mécanisme en aval de la fixation des ligands dans les processus d'activation. De ce fait, il semble que l'interprétation la plus appropriée de ces résultats soit que les résidus E1305, I1310 et L1313 participent aux mécanismes moléculaires de transduction du signal couplant la fixation de ligand à SUR2A et l'activation de Kir6.2.

On peut remarquer que contrairement à la chimère S7M, totalement insensible aux ouvreurs, la triple mutation n'entraîne pas l'abolition complète des réponses au P1075 et au SR47063, suggérant que d'autres déterminants encore non identifiés sont présents dans la

zone étudiée. Cependant, les activations résiduelles observées sont très faibles, ce qui permet de penser que ces déterminants sont d'une importance minime par rapport aux résidus E1305, I1310 et L1313. De plus, la réintroduction des trois résidus sauvages dans la chimère déficiente S7M suffit à restaurer le phénotype sauvage d'activation par les ouvreurs pharmacologiques et le MgADP. Bien que nous soyons conscients des risques que comporte la sur-interprétation de résultats de mutagenèse, la combinaison d'expériences montrant à la fois une perte de fonction des canaux Kir6.2/SUR2A et un gain de fonction des canaux Kir6.2/S7M constitue un ensemble solide d'indications impliquant un rôle des résidus E1305, I1310 et L1313 dans les processus d'activation du canal K_{ATP} dépendant des ouvreurs pharmacologiques et du MgADP.

3.2.3 Les processus d'inhibition et d'activation des canaux K_{ATP} reposent sur des voies de transduction différentes

Les processus d'activation et d'inhibition des canaux K_{ATP} sont encore méconnus. Il est notamment difficile de dire si ces processus relèvent d'une seule et même voie de transduction entre SUR2A et Kir6.2, ou s'ils reposent sur des mécanismes distincts. Un segment de SUR2A riche en aspartate et glutamate, localisé après le domaine NBD1 (résidus 948 à 962), a récemment été décrit pour être critique à la fois pour les processus d'activation (MgADP, ouvreurs pharmacologiques) et d'inhibition (glibenclamide) du canal (Karger *et al.*, 2008). Ce segment pourrait faire partie d'une voie commune de transduction en association avec le domaine TMD0 et/ou le segment C-terminal étudié dans ce travail, dont on sait qu'ils sont tous deux en interaction physique avec Kir6.2. Néanmoins, il est intéressant de noter que dans notre cas, la mutation d'un segment C-terminal de SUR2A entraîne l'altération de l'activation mais pas de l'inhibition des canaux K_{ATP} cardiaques. En effet, contrairement aux activateurs (MgADP, ouvreurs pharmacologiques), l'inhibition par l'ATP et le glibenclamide ne sont pas affectées par nos mutations. Cette observation invalide l'hypothèse d'une voie de transduction unique et argue en faveur de l'existence de plusieurs voies de transduction couplant fonctionnellement SUR2A et Kir6.2. Il est ainsi possible d'imaginer que les processus d'activation du canal reposent sur une voie de transduction empruntant le linker reliant les domaines TMD2 et NBD2, et qu'une voie différente dépendant du domaine TMD0 soit requise pour les processus d'inhibition (*Figure 77*).

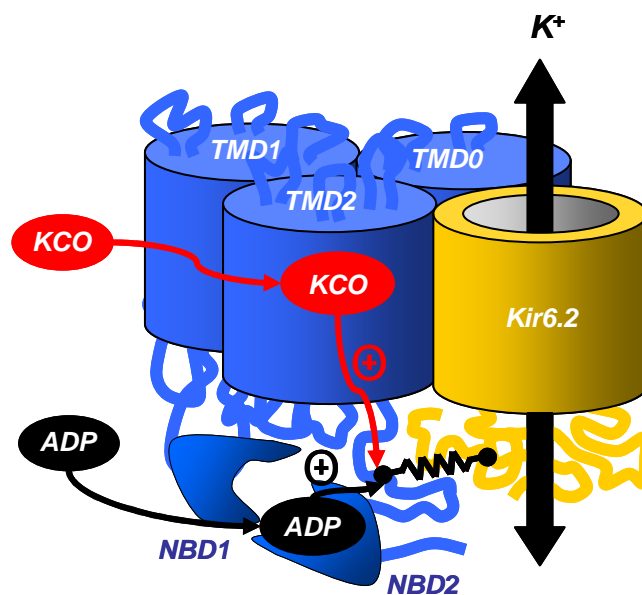


Figure 77 : Représentation schématique de la voie de transduction empruntée lors de l'activation par les ouvreurs pharmacologiques et l'ADP. La fixation des KCO au niveau de l'hélice 17 ou d'ADP au niveau du domaine NBD2 entraîne l'activation de Kir6.2 par une voie reliant la partie C-terminale cytoplasmique de SUR2A aux parties cytoplasmiques de Kir6.2.

Seul un panel représentatif d'effecteurs des canaux K_{ATP} a été testé au cours de cette étude, et il n'est pas exclu que d'autres mécanismes de régulation empruntent des voies de transduction encore inconnues. Néanmoins, ces résultats suggèrent qu'au sein du canal K_{ATP} , la partie C-terminale proximale de SUR2A est un lien critique entre la fixation de ligands à SUR2A et l'activation de Kir6.2.

B

Création de biocapteurs électriques par assemblage du canal potassique Kir6.2 avec des GPCR

1. Position du problème

Le développement de biocapteurs électriques intégrés sur puces électroniques représente un outil prometteur à la fois pour le diagnostic médical et le criblage à haut débit de molécules d'intérêt pharmacologique. En effet, la détection de signaux électriques permet de s'affranchir des systèmes de détection à base de réactifs marqués, de faire des mesures en temps réel et avec un rapport signal/bruit élevé, et d'intégrer le tout dans des systèmes microélectroniques. Néanmoins, le développement de tels outils suppose de parvenir à coupler un système de détection électrique avec l'élément récepteur fixant le composé à détecter.

Les canaux K_{ATP} constituent un modèle naturel parfait de récepteur (SUR) couplé à un système de détection électrique (canal potassique Kir6.x): la fixation de ligands à SUR module les propriétés d'ouverture de Kir6.x et entraîne la modulation de flux ioniques directement mesurables électriquement. Nous inspirant de ce modèle, nous avons essayé de créer des récepteurs couplés à un canal ionique artificiels, ou ICCR (Ion Channel Coupled Receptor), en remplaçant SUR par des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), postulant que l'application des ligands spécifiques de ces récepteurs pourrait générer des changements de conformation entraînant des modulations de l'activité de Kir6.x détectables électriquement.

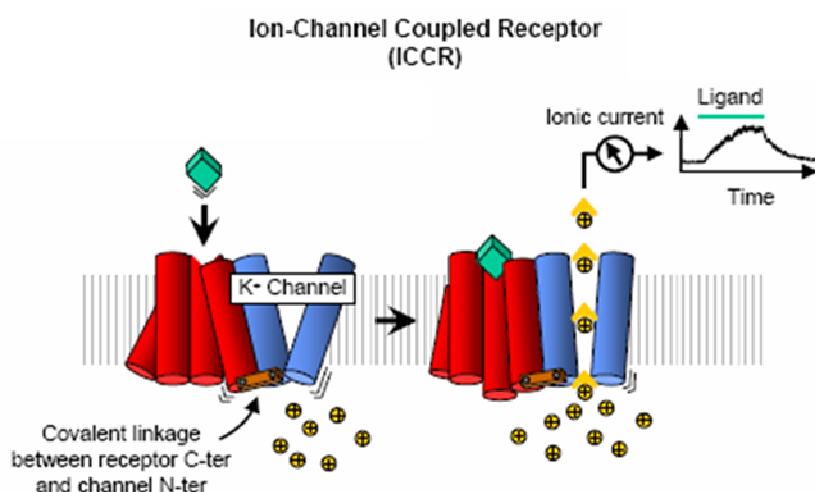


Figure 78 : Schéma du principe général de fonctionnement des biocapteurs artificiels GPCR-Kir6.x (ICCR). L'application du ligand du GPCR entraîne l'activation de Kir6.x, détectée électriquement.

Les GPCR sont des cibles pharmaceutiques majeures, cibles de 30 % des médicaments présents sur le marché mondial, et le développement de tels biocapteurs fournirait un premier outil unique pour le criblage de drogues ciblant ces récepteurs ou la détection de ligands spécifiques dans des échantillons biologiques, raison pour lesquelles ceux-ci ont été retenus comme récepteurs candidats pour le développement des ICCR.

2. Résultats

Nous avons tout d'abord tenté de créer une première génération d'ICCR en couplant mécaniquement le récepteur muscarinique humain M_2 avec le canal potassique rectifiant entrant Kir6.2.

2.1 Génération de biocapteurs hM_2 -Kir6.2

2.1.1 Construction et expression de fusions hM_2 -Kir6.2

S'il est bien connu que certains GPCR régulent l'activité de canaux, dont les canaux K_{ATP} , Kir6.2 et le récepteur hM_2 ne présentent pas de liens physiologiques et ne s'associent pas spontanément. De manière à forcer cette association et à permettre leur couplage fonctionnel, différentes fusions ont été créées par biologie moléculaire en reliant le C-ter cytoplasmique de hM_2 avec le N-ter de Kir6.2 soit à l'aide d'une extension de six glycines reliant les deux parties (constructions M_2 -K et M_2 -K Δ), soit en créant des délétions dans les parties C-ter de hM_2 et N-ter de Kir6.2 de manière à favoriser leur couplage (**Figure 79**).

Dans la construction M_2 -K Δ , les trente-six résidus C-ter de Kir6.2 ont été supprimés de manière à ôter le signal RKR de rétention dans le réticulum habituellement masqué par SUR. Néanmoins, l'enregistrement des courants en microélectrode après expression dans l'ovocyte de Xénope révèle que les constructions M_2 -K et M_2 -K Δ présentent des niveaux d'expression comparables, suggérant que les signaux de rétention sont masqués par M_2 . Toutes les constructions suivantes ont donc été créées à partir de Kir6.2 intact. Les délétions dans le N-ter de Kir6.2 ont été limitées à trente résidus, taille au-dessus de laquelle les canaux ne sont plus fonctionnels du fait d'une disruption possible des contacts entre N-ter et C-ter de Kir6.2. Comme observé sur la **Figure 79**, ces délétions n'affectent ni le niveau d'expression ni la sensibilité à l'ATP de Kir6.2. A l'inverse, il s'avère que plus les délétions du C-ter de hM_2 sont importantes et plus le niveau d'expression est faible.

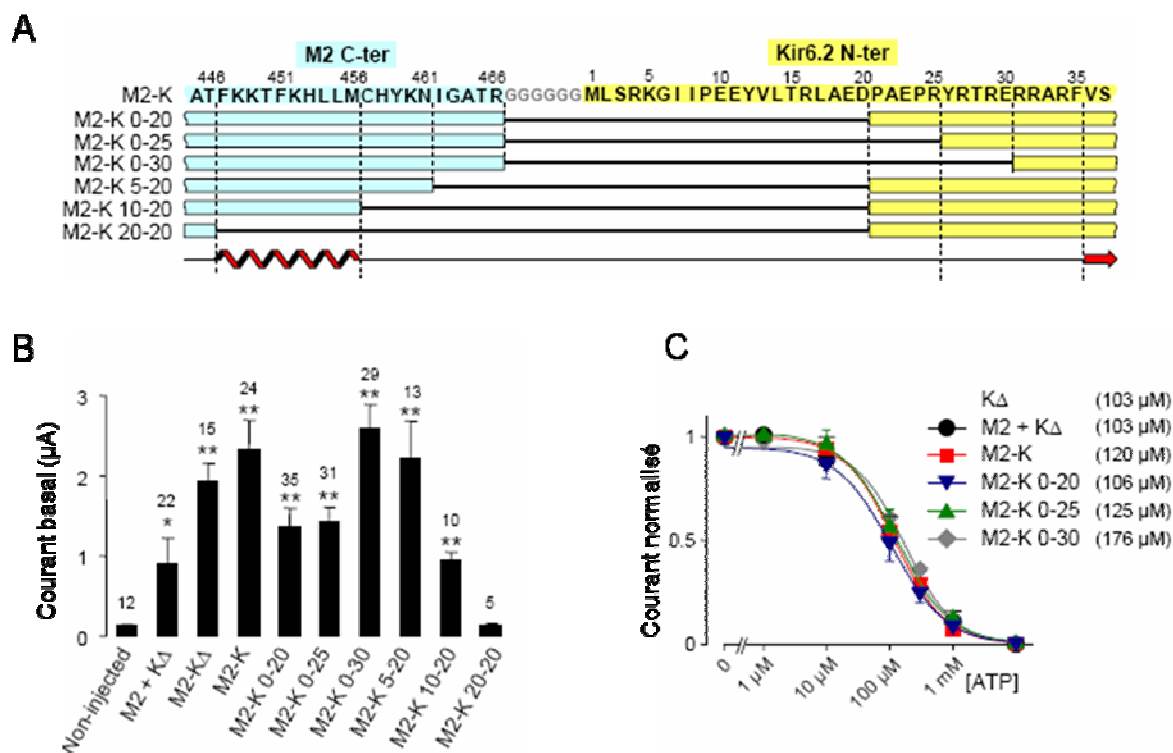


Figure 79 : Construction et caractérisation des fusions hM₂-Kir6.2. (A) Séquences des régions reliant le C-ter de hM₂ et le N-ter de Kir6.2 pour les différentes constructions mises en œuvre. Celles-ci sont notées M2-K x-y, x correspondant au nombre de résidus délétés dans le C-ter de hM₂ et y au nombre de résidus délétés dans le N-ter de Kir6.2. L'hélice α VIII de hM₂ et le premier feuillet β de Kir6.2 indiqués en rouges sont prédits à partir des structures respectives du récepteur β 2 adrénergique et de Kir3.1 (B) Courant basal dans la première minute d'enregistrement en microélectrode sur ovocytes exprimant les constructions indiquées. K Δ désigne Kir6.2 tronqué de ses 36 derniers résidus. Les différences significatives avec des ovocytes non injectés (non-injected) sont indiquées par les astérisques * ($P < 0,025$) et ** ($P < 0,0001$). (C) Courbes dose-réponse à l'ATP pour les différentes constructions. Les courants, mesurés en patch-clamp en configuration inside-out, sont normalisés par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Le fitting des données utilisant l'équation (2) donne des coefficients de Hill h allant de 0,95 à 1,08, et les $K_{1/2}$ sont donnés entre parenthèses.

2.1.2 Caractérisation fonctionnelle des ICCR hM₂-Kir6.2

Nous avons ensuite cherché à savoir si le récepteur hM₂ fusionné à Kir6.2 était capable de moduler l'activité du canal en appliquant sur ces différentes constructions de l'acétylcholine

(Ach), agoniste naturel de hM_2 . Suivant les ICCR, l'application d'acétylcholine entraîne des réponses de Kir6.2 variables (**Figure 80**): elle inhibe légèrement les courants obtenus en coexprimant séparément hM_2 et $K\Delta$, mais provoque l'activation des fusions. En outre, jusqu'à 25 résidus, plus les délétions dans le N-ter de Kir6.2 sont importantes et plus l'activation par l'Ach est élevée. Au-delà de 25 résidus, les délétions dans le N-ter de Kir6.2 entraînent la perte de l'activation (construction M_2 -K 0-30).

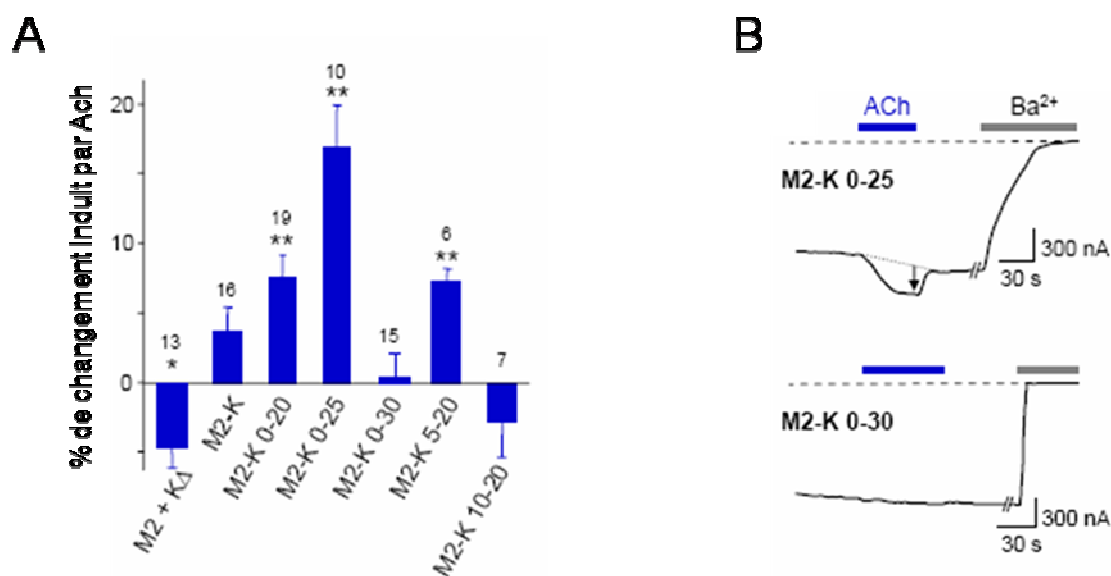


Figure 80 : Caractérisation fonctionnelle des ICCR hM_2 -Kir6.2. (A) Changements d'activité des fusions induits par l'application de 5 μ M Ach. Les différences significatives de 0 sont indiquées par les astérisques * ($P < 0,01$) et ** ($P < 0,0005$). (B) Exemples d'enregistrements représentatifs en microélectrode illustrant les réponses des fusions M_2 -K 0-25 et M_2 -K 0-30.

Des délétions progressives dans le C-ter de hM_2 n'apportent pas d'amélioration: la construction M_2 -K 5-20 présente le même phénotype que M_2 -K 0-20, et il en est de même pour la construction M_2 -K 10-20 et la coexpression $M_2 + K\Delta$.

A titre de contrôle, l'intégrité fonctionnelle du récepteur M_2 au sein de ces constructions a été testée en utilisant leur capacité naturelle à activer, *via* les protéines $G_{\beta\gamma}$ associées, les canaux potassiques rectifiant entrant Kir3.4 S143T (Kir3.4 ST). L'application d'Ach sur des ovocytes coexprimant les ICCR hM_2 -Kir6.2 non activables et Kir3.4 ST entraîne une augmentation des courants potassiques synonyme d'activation des canaux Kir3.4 ST (**Figure 81**). De ce fait, les récepteurs hM_2 fusionnés à Kir6.2 sont toujours capables de signalisation

via les protéines G, et hM₂ comme Kir6.2 sont fonctionnels au sein des fusions. Le seul impact des délétions opérées se situe donc au niveau de l'efficacité du couplage, modulant l'efficacité avec laquelle les changements de conformation de hM₂ induits par la fixation de son agoniste sont transmis à Kir6.2 pour permettre son activation, et la configuration optimale semble être la fusion avec délétion des 25 premiers résidus de Kir6.2.

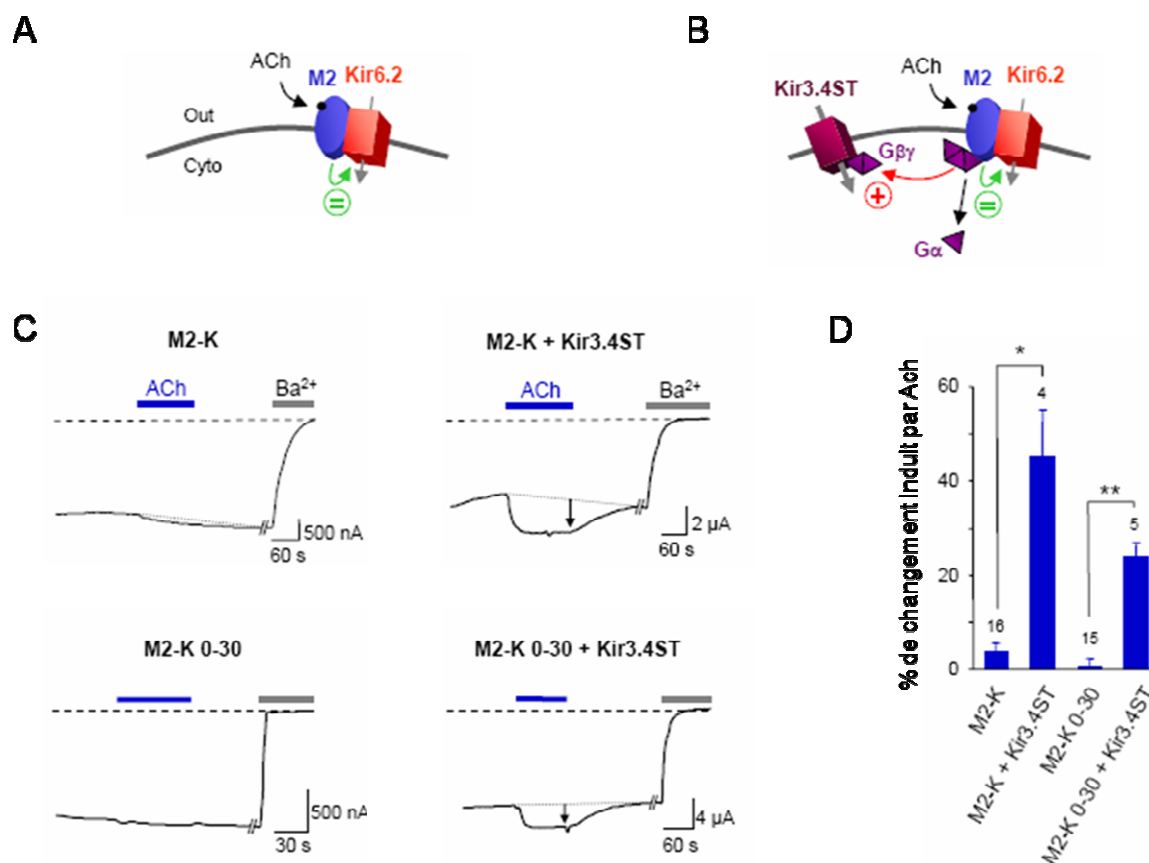


Figure 81 : Le récepteur hM₂ reste fonctionnel au sein des fusions hM₂-Kir6.2. (A) Schéma représentant une fusion inactive (M₂-K ou M₂-K 0-30): l'application d'Ach ne permet pas l'activation de Kir6.2. (B) Même schéma, mais où les fusions sont coexprimées avec Kir3.4 ST. Si hM₂ est toujours fonctionnel, l'application d'Ach devrait permettre l'activation de Kir3.4 ST via les protéines Gβγ associées au récepteur. (C) Exemples d'enregistrements représentatifs en microélectrode illustrant les réponses des fusions M₂-K et M₂-K 0-30, et des leurs coexpressions respectives avec Kir3.4 ST. (D) Changements d'activité des fusions induits par l'application de 5 μM Ach, en présence et en absence de Kir3.4 ST. Les résultats obtenus en présence de Kir3.4 ST sont significativement différents de ceux obtenus en son absence (*P<0,01 et ** P<0,001).

L'affinité des fusions hM₂-Kir6.2 pour le carbachol (Cch), autre agoniste stable de hM₂, a également été étudiée. Celui-ci active les fusions de manière dose-dépendante, avec des K_{1/2} de l'ordre du micromolaire (**Figure 82**), et confirme la fonctionnalité des ICCR hM₂-Kir6.2.

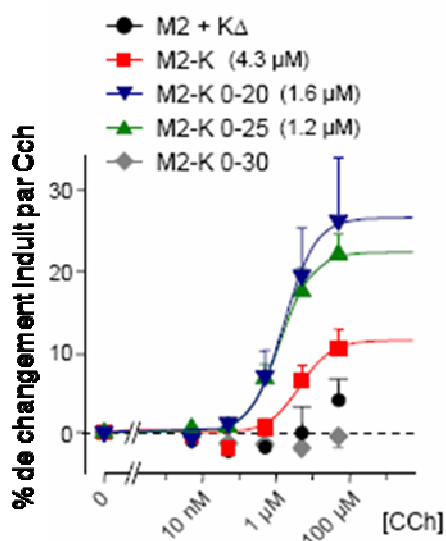


Figure 82 : Courbes dose-réponse au carbachol (Cch) pour les différentes constructions. Les courants, mesurés en microélectrode, sont traduits en pourcentage de changement d'activité induit par l'application de Cch. Le fitting des données est réalisé en utilisant l'équation (1) avec un coefficient de Hill h égal à 1. Les K_{1/2} sont donnés entre parenthèses.

Nous avons ensuite évalué la capacité d'un antagoniste de hM₂, l'atropine, à contrer l'action de l'Ach sur les fusions: l'application de cet antagoniste provoque la réversion de l'activation par l'Ach des fusions M₂-K 0-20 et M₂-K 0-25 (**Figure 83**).

De ce fait, le système est bien spécifique et fonctionnellement intègre, et on dispose d'une première génération d'ICCR hM₂-Kir6.2 où Kir6.2 constitue une sonde électrique fiable de l'activité du récepteur hM₂ capable de détecter les états activé et inactivé du récepteur.

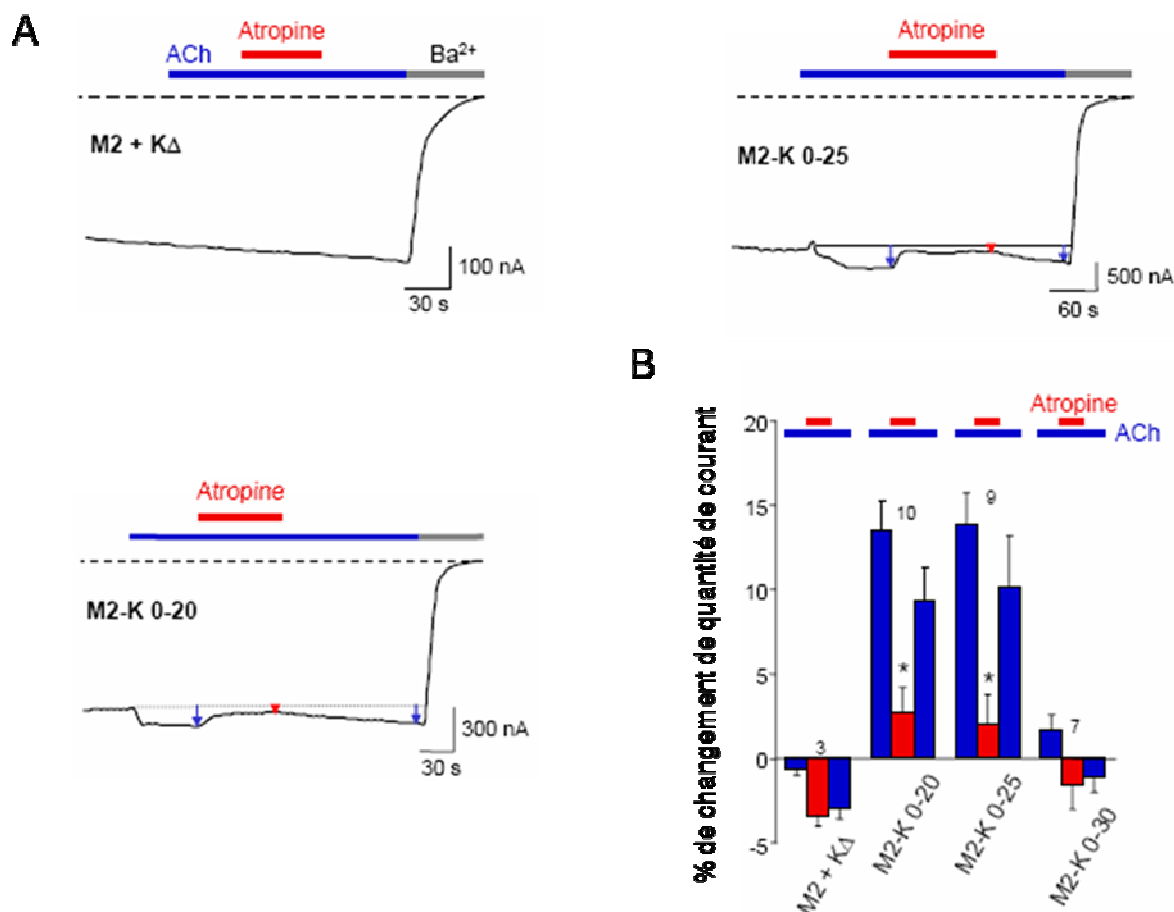


Figure 83 : Effet de l'atropine sur les fusions hM₂-Kir6.2. (A) Exemples d'enregistrements représentatifs en microélectrode illustrant les réponses à 1 μM atropine de la coexpression M₂ + KΔ (contrôle négatif) et des fusions M₂-K 0-20 et M₂-K 0-25. (B) Changements de quantité de courant des fusions en présence 5 μM Ach avant (bleu), pendant (rouge) et après l'application de 1 μM atropine. Les cas où les valeurs en présence d'atropine sont significativement inférieures à celles en absence d'atropine sont indiqués par des astérisques (P<0,001).

2.1.3 Contrôle du caractère direct du couplage fonctionnel

Sachant que le récepteur hM₂ est fonctionnel au sein des fusions hM₂-Kir6.2, la question se pose de savoir si la régulation qu'il exerce sur l'activité de Kir6.2 intervient de manière directe, par transmission d'un changement de conformation du récepteur, ou de manière indirecte, *via* l'activation des protéines G_{αi/o} auxquelles hM₂ est physiologiquement couplé. En effet, Kir6.2 peut être faiblement activé par des phosphorylations par les kinases PKA et PKC activées par des voies de signalisation dépendantes des protéines G. De manière à

estimer la contribution respective d'un éventuel couplage indirect *via* les protéines G, nous avons reproduit le même type d'expériences en utilisant le domaine catalytique de la toxine pertussique PTX-S1, connu pour inactiver les protéines $G_{\alpha i/o}$. Ainsi, les fusions M₂-K 0-20 et M₂-K 0-25 coexprimées avec PTX-S1 ont été testées pour leur capacité à être activés par l'Ach, et l'activation hM₂-dépendante *via* $G_{\beta\gamma}$ des canaux Kir3.4 ST a été utilisée comme contrôle. Les résultats obtenus montrent que si l'expression de PTX inhibe bien l'activation par l'Ach de Kir3.4 ST, elle n'a en revanche pas d'influence significative sur l'activation des constructions M₂-K 0-20 et M₂-K 0-25, même si on observe une légère réduction de cette activation potentiellement due à une inhibition des processus de phosphorylation de Kir6.2 protéine G-dépendant (**Figure 84**). De ce fait, l'activation des fusions se fait bien selon un mécanisme de couplage direct GPCR-Kir6.2 et ne fait pas intervenir les protéines $G_{\alpha i/o}$ associées au récepteur. Une autre preuve du caractère direct du couplage repose sur le fait que les ICCR non activables par l'Ach sont toujours capables d'activer Kir3.4 ST *via* les protéines $G_{\beta\gamma}$, mais que ces protéines G activées n'ont aucun effet sur Kir6.2 quand les ICCR sont exprimés seuls.

De manière à en apporter la preuve définitive et à montrer que ces fusions sont fonctionnelles en milieu acellulaire, les constructions ont été caractérisées en patch-clamp en configurations excisées « inside-out » et « outside-out » permettant de s'affranchir de la machinerie cellulaire et d'étudier les propriétés des ICCR isolément. L'application d'Ach sur la face extracellulaire de la membrane en configuration « outside-out » montre une activation spécifique et réversible de la fusion M₂-K 0-25, à la fois en présence et en absence de PTX. De plus, comme en microélectrode, cette activation est dose-dépendante ($K_{1/2}$ de l'ordre du micromolaire) et réversée par l'application d'atropine (**Figure 84**). Les protéines G n'interviennent donc pas dans l'activation des fusions par l'Ach et le couplage observé est bien direct et repose sur la transmission à Kir6.2 d'un changement de conformation du récepteur M₂.

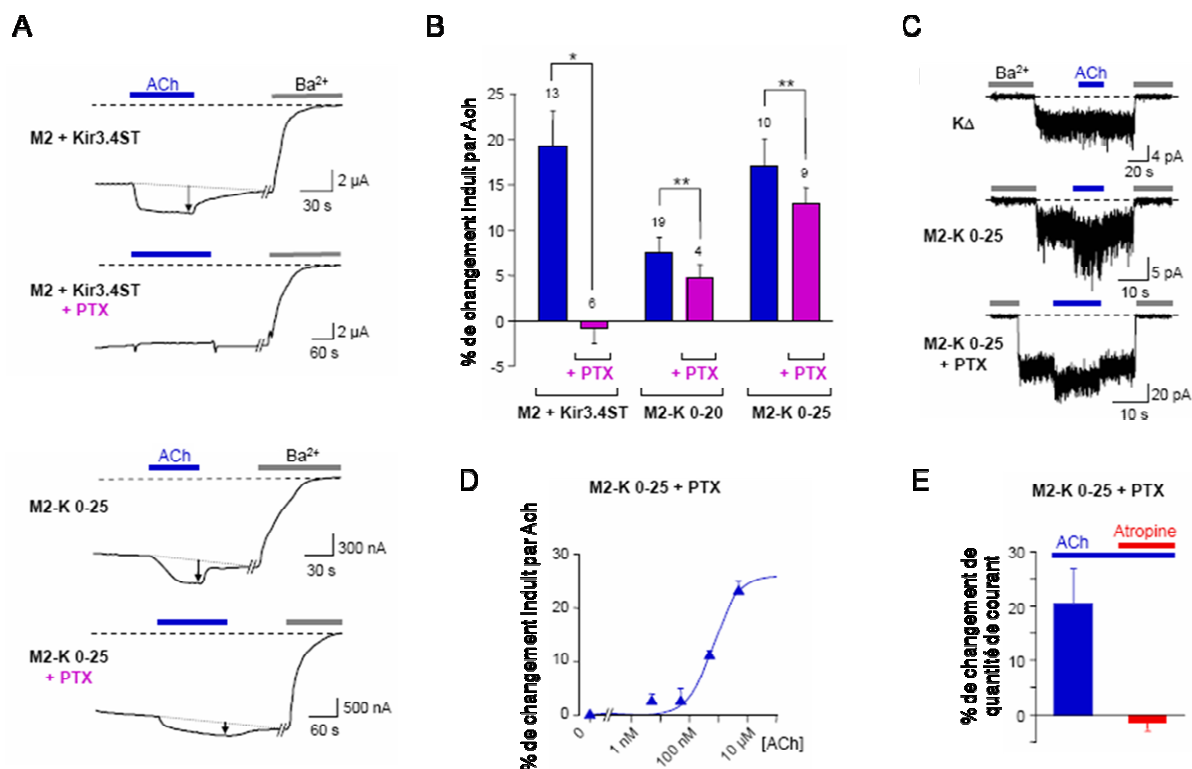


Figure 84 : Le couplage fonctionnel entre hM_2 et Kir6.2 au sein des fusions est direct. (A) Enregistrements représentatifs en microélectrode illustrant les réponses à $5 \mu M$ Ach de la coexpression $M_2 + Kir3.4 ST$ et de la fusion $M_2-K 0-25$, en absence et en présence de PTX. (B) Changements de quantité de courant en microélectrode sur ovocytes coexprimant $M_2 + Kir3.4 ST$ ou exprimant les fusions $M_2-K 0-20$ ou $M_2-K 0-25$ après application de $5 \mu M$ Ach, en absence (bleu) ou présence (magenta) de PTX. L'effet antagoniste de PTX est significatif pour $M_2 + Kir3.4 ST$ ($*P < 0,0005$) mais pas pour les fusions M_2-K ($**P > 0,2$). (C) Enregistrements représentatifs en patch-clamp en configuration outside-out illustrant les réponses à l'Ach de $K\Delta$ et de la fusion $M_2-K 0-25$ en présence et en absence de PTX. (D) Courbe dose-réponse à l'Ach pour la fusion $M_2-K 0-25$ coexprimée avec PTX. Les courants, mesurés en configuration outside-out, sont traduits en pourcentage de changement d'activité induit par l'application d'Ach. Le fitting des données est réalisé en utilisant l'équation (1), avec un coefficient de Hill h égal à 1, et donne un $K_{1/2}$ de $0,65 \mu M$. (E) Changements de quantité de courant de la fusion $M_2-K 0-25$ coexprimée avec PTX en présence $5 \mu M$ Ach avant (bleu) et pendant (rouge) l'application de $1 \mu M$ atropine. Les valeurs représentent la moyenne de 4 patchs en configuration outside-out.

2.2 Génération de biocapteurs hD₂-Kir6.2

Etant parvenus à générer une première génération d'ICCR fonctionnels à partir du récepteur muscarinique M₂ et de Kir6.2, nous avons ensuite essayé d'étendre ce concept en réalisant un deuxième biocapteur basé sur un autre GPCR, le récepteur dopaminergique humain hD₂. Notre choix s'est porté sur ce récepteur car il possède un domaine C-ter court homologue à celui de hM₂ (plus long de neuf résidus). Une première fusion notée D₂-K 0-25 a été créée, composée du récepteur D₂ entier fusionné à Kir6.2 amputé de ses 25 premiers résidus N-ter, en se basant sur la taille de linker optimale déterminée pour les fusions M₂-Kir6.2. Cette construction s'est révélée sensible à la dopamine mais pas à l'Ach, contrairement à la fusion M₂-K 0-25 qui est elle sensible à l'Ach mais pas la dopamine (**Figure 85**). Néanmoins, de manière surprenante, l'application de dopamine sur cette fusion entraîne non pas une activation, mais une inhibition réversible et dose-dépendante ($K_{1/2} = 17$ nM). Cette inhibition est également reproductible en utilisant un autre agoniste stable des récepteurs dopaminergiques, le quinpirole, et peut être contrée par l'application de sulpiride, antagoniste des récepteurs dopaminergiques.

Comme M₂ pour les ICCR M₂-Kir6.2, le récepteur D₂ au sein de la fusion D₂-K 0-25 s'avère fonctionnel et capable d'activer les voies de signalisation des protéines G qui lui sont associées: en effet, lorsqu'il est coexprimé avec Kir3.4 ST, l'application de dopamine entraîne l'activation de ces canaux. La construction D₂-K 0-25 représente donc un deuxième exemple de fusion GPCR-Kir6.2 où l'application d'agonistes et d'antagonistes spécifiques du récepteur entraîne de manière directe et spécifique des modifications de l'activité du canal, validant le concept de biocapteurs basés sur des GPCR.

Il est intéressant de noter que bien que les récepteurs M₂ et D₂ soient couplés aux mêmes protéines G ($G_{\alpha i/o}$), le récepteur M₂ activé provoque l'activation de Kir6.2 tandis que le récepteur D₂ activé entraîne l'inhibition du canal, impliquant qu'il existe des différences mécanistiques insoupçonnées dans les changements conformationnels de ces deux récepteurs après fixation de leurs agonistes respectifs. Kir6.2 et les GPCR ne communiquant pas lorsqu'ils sont coexprimés isolément, il est probable que le mécanisme de régulation des facultés d'ouverture de Kir6.2 par ces récepteurs observé pour les fusions repose sur le lien physique créé artificiellement entre les deux protéines. De plus, l'observation faite que l'activité des ICCR dépend de la taille du linker reliant les deux protéines conforte l'hypothèse selon laquelle la transduction du signal, couplant la fixation de ligand sur le GPCR à l'ouverture ou la fermeture du canal, s'opère de façon purement mécanique.

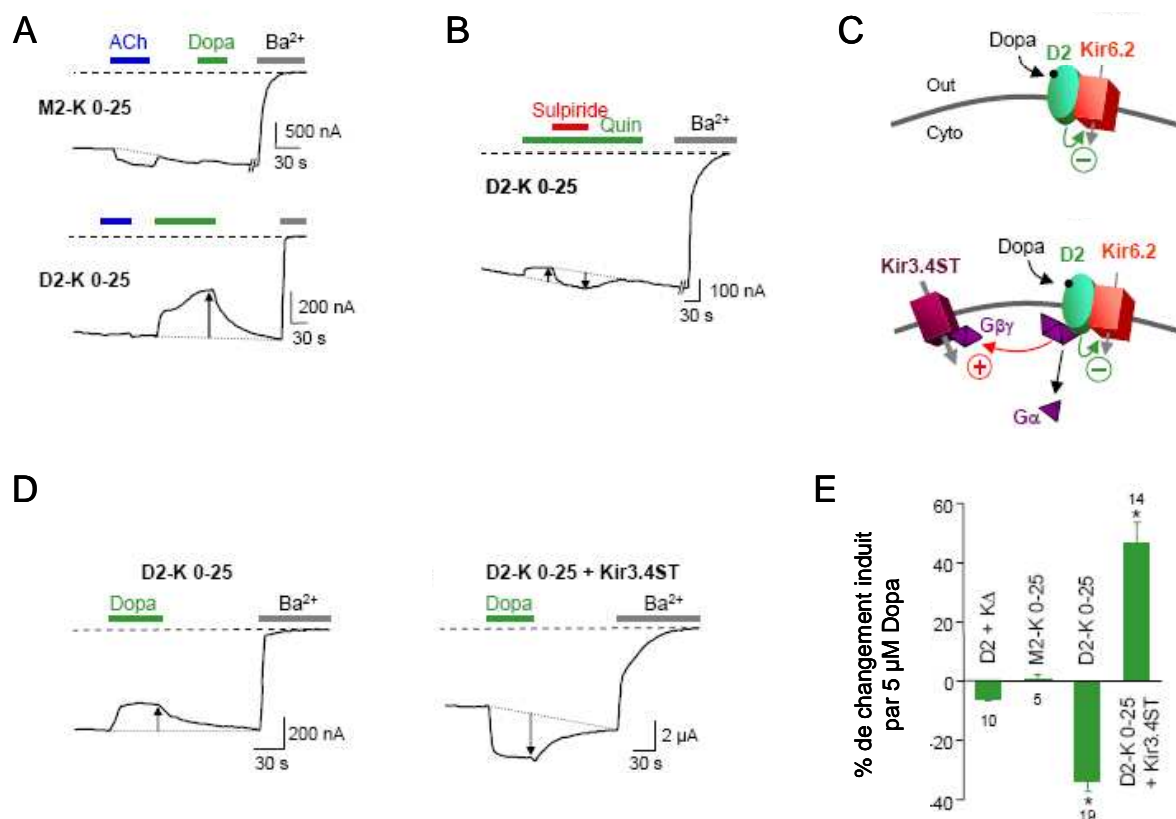


Figure 85 : Génération de biocapteurs hD_2 -Kir6.2. (A) Enregistrements représentatifs en microélectrode illustrant les réponses à 5 μ M Ach et 5 μ M dopamine (Dopa) des fusions M_2 -K 0-25 et D_2 -K 0-25. (B) Enregistrement représentatif en microélectrode illustrant les réponses à 5 μ M quinpirole (Quin) et 5 μ M sulpiride de la fusion D_2 -K 0-25. (C) Schémas représentant respectivement les configurations où la fusion D_2 -K 0-25 est exprimée seule (l'application de dopamine inhibe Kir6.2) et où elle est coexprimée avec le canal Kir3.4 ST (l'application de dopamine inhibe Kir6.2, mais entraîne l'activation de Kir3.4 ST via les protéines $G_{\beta\gamma}$ associées au récepteur hD_2). (D) Enregistrements représentatifs en microélectrode illustrant les réponses à 5 μ M dopamine (Dopa) de la fusion D_2 -K 0-25 en absence et en présence des canaux Kir3.4 ST. (E) Changements de quantité de courant en microélectrode après application de 5 μ M dopamine. Les valeurs pour D_2 -K 0-25 et D_2 -K 0-25 + Kir3.4 ST sont significativement différentes de celle relevée pour D2 + KΔ (* $P < 0,0005$).

3. Discussion

3.1 Les ICCR, un nouveau type de biocapteur électrique moléculaire

L'essor du criblage haut-débit de molécules pharmacologiques et le développement de systèmes de diagnostic intégrés au chevet du patient impliquent une miniaturisation des systèmes de détection d'échantillons biologiques, appelant à un affranchissement des systèmes cellulaires ainsi que des techniques basées sur la fluorescence ou la radioactivité classiquement employés. Le développement de capteurs électriques à l'échelle moléculaire pourrait permettre de s'affranchir de ces contraintes et d'intégrer sur puce électronique des détecteurs miniatures capables de convertir la fixation de ligands en signal électrique mesurable et quantifiable. Dans cette optique, nous avons essayé de développer un nouveau type de biocapteur, s'inspirant du modèle du canal K_{ATP} , basé sur le couplage fonctionnel entre un récepteur membranaire et un canal ionique. Ces Ion Channel Coupled Receptors, ou ICCR, représenteraient une alternative intéressante aux technologies actuelles: la fixation d'un ligand spécifique sur le récepteur entraînerait l'activation du canal et l'apparition de flux ioniques mesurables électriquement en temps réel *via* une interface électronique.

Les résultats présentés ici démontrent qu'il est possible de développer, par des méthodes d'ingénierie protéique simples, un système couplé où l'activité d'un canal ionique peut être directement régulée par la liaison de ligands à un GPCR. Deux prototypes d'ICCR ont été développés, impliquant les récepteurs hM_2 et hD_2 . Couplé physiquement de manière artificielle à ces récepteurs au sein des fusions hM_2 -Kir6.2 et hD_2 -Kir6.2, Kir6.2 joue le rôle de rapporteur de la fixation de leurs ligands spécifiques. Ces biocapteurs génèrent un signal électrique spécifique, réversible et d'intensité proportionnelle aux concentrations de ligands appliquées *in vivo* ou en conditions acellulaires. Ce sont donc des systèmes de détection sensibles et spécifiques, permettant de suivre en temps réel les interactions ligand-récepteur.

Six critères sont considérés comme déterminants pour le développement de systèmes de détection miniaturisés impliquant des GPCR (Milligan et Rees, 1999; Leifert *et al.*, 2005):

- pas d'affectation de la pharmacologie des GPCR par des modifications moléculaires
- coût de développement des sondes et de revient des réactifs faibles
- prédisposition à l'intégration dans des systèmes automatisés

- prédisposition à la miniaturisation
- robustesse statistique (rapport signal/bruit élevé, Z-factor)
- pas d'emploi de radioactivité

Nos observations démontrent qu'au sein des ICCR hM₂-Kir6.2 et hD₂-Kir6.2, les propriétés de signalisation des récepteurs ne sont pas affectées, ceux-ci étant capables d'activer les canaux Kir3.4 ST *via* les protéines G_{oi/o}. De plus, ceux-ci répondent toujours à la fois à leurs agonistes et antagonistes respectifs et ne présentent pas d'altérations de leurs propriétés pharmacologiques. Leur fonctionnement ne nécessite pas de réactifs coûteux (seule la présence d'ions K⁺ est nécessaire) ni l'emploi de la radioactivité, et leur sensibilité est maximale: l'activité d'un canal unique étant mesurable, ces biocapteurs peuvent être réduits à une seule molécule. Enfin, ce type de capteur moléculaire est tout à fait adapté à la miniaturisation, ainsi qu'à l'intégration dans des systèmes de détection électroniques automatisés: ce type d'approche nécessite néanmoins le développement de méthodes de production, purification, et insertion des fusions protéiques dans des bicouches artificielles de manière à procéder à leur incorporation sur puce électronique, ces aspects techniques étant pris en charge par nos partenaires au sein du projet européen Receptronics.

Il est possible d'imaginer, à partir de ce modèle, la création de banques de GPCR couplés à un canal ionique, intégrables au choix dans des lignées cellulaires ou directement dans des nanopores comportant des bicouches lipidiques et ouvrant la porte à des applications multiples dans les domaines du diagnostique, du criblage de drogues, ou des systèmes de détection en temps réel. Les ICCR pourraient ainsi proposer une alternative intéressante aux techniques de criblage haut-débit actuelles basées essentiellement sur des technologies faisant appel à la fluorescence et la résonance plasmonique de surface.

3.2 ICCR hM₂-Kir6.2 et hD₂-Kir6.2: implications mécanistiques

A ce stade, et malgré les résultats très encourageants obtenus avec les ICCR hM₂-Kir6.2 et hD₂-Kir6.2, nous ne sommes pas encore en mesure de proposer une description mécanistique du mode de fonctionnement des fusions GPCR-Kir6.2. Néanmoins, plusieurs constatations permettent d'ores et déjà d'affirmer que le couplage entre les deux sous-unités est direct: (i) Kir6.2 et les GPCR ne communiquent que lorsqu'ils sont fusionnés, (ii) cette communication est indépendante des protéines G hétérotrimériques, et (iii) la fonctionnalité des ICCR dépend de la taille du linker reliant les deux protéines. La transduction du signal, couplant la fixation

de ligand sur le GPCR à l'ouverture ou la fermeture du canal, semble donc s'opérer de façon purement mécanique, les changements de conformation du récepteur activé étant transmis à Kir6.2 par le biais du lien physique créé entre les deux protéines.

En marge de ces traits communs, il est intéressant de noter que les ICCR hM₂-Kir6.2 et hD₂-Kir6.2 présentent des divergences. Bien que les récepteurs hM₂ et hD₂ soient physiologiquement couplés aux mêmes protéines G_{αi/o}, ceux-ci entraînent des modulations différentes de l'activité de Kir6.2 au sein des fusions: la fixation d'agoniste sur hM₂ provoque l'activation de Kir6.2 tandis que la fixation d'agoniste sur hD₂ entraîne l'inhibition du canal. Ce résultat confirme encore une fois l'indépendance vis-à-vis des protéines G et le caractère direct du couplage, mais indique également qu'il existe des différences mécanistiques insoupçonnées entre ces deux récepteurs après fixation de leurs agonistes respectifs. Deux hypothèses permettraient d'expliquer cette observation: soit les deux récepteurs sont sujets à des changements de conformation différents suite à la fixation de leurs agonistes, soit ces changements sont identiques mais sont transmis de manière différente à Kir6.2. Une explication possible réside peut-être dans les divergences de tailles et/ou de structuration entre les extrémités C-terminales de hM₂ et hD₂. En effet, le C-ter de hM₂ est plus long de neuf résidus. Sachant que les deux récepteurs sont liés au N-ter de Kir6.2 par cette extrémité cytoplasmique, il est tout à fait concevable qu'une telle différence modifie les modalités de transmission du changement conformationnel du récepteur vers Kir6.2.

Quoi qu'il en soit, la détermination du mécanisme de couplage des fusions demande des études supplémentaires et nécessitera l'obtention de données structurales *via* la modélisation *in silico* des ICCR. Afin de généraliser ce type d'approche et de valider définitivement le concept et les techniques employées, il sera également nécessaire de construire de nouveaux biocapteurs impliquant d'autres GPCR: dans cette optique, une troisième génération de fusions GPCR-Kir6.2 impliquant le récepteur adrénergique β₂ est en cours de développement au laboratoire.

Conclusions et Perspectives

Les canaux K_{ATP} présentent la propriété unique d'être les produits de l'association physique et fonctionnelle d'un récepteur membranaire, SUR, et d'un canal ionique, Kir6.2: la fixation de ligands à SUR entraîne des changements conformationnels du récepteur transmis au canal et modifiant ses propriétés d'ouverture. En ce sens, ces canaux constituent un exemple de biocapteur naturel où Kir6.2 rapporte électriquement la fixation de ligands à SUR. Les travaux présentés dans cette étude avaient pour but d'identifier les déterminants moléculaires de SUR impliqués dans le couplage fonctionnel à Kir6.2, et d'utiliser cette connaissance du modèle du canal K_{ATP} pour essayer de créer des systèmes couplés artificiels où d'autres récepteurs seraient associés physiquement et fonctionnellement au canal.

La première partie de ce travail a été consacrée à l'étude du couplage fonctionnel qui s'opère entre les deux sous unités composant le canal K_{ATP} . Les résultats présentés apportent des précisions quant aux rôles respectifs de deux domaines du récepteur des sulphonylurées dans les interactions entre SUR et Kir6.2: le domaine N-terminal TMD0, essentiel à l'association avec Kir6.2 mais dont le rôle dans le couplage fonctionnel reste à préciser, et un domaine C-terminal cytoplasmique impliqué spécifiquement dans les mécanismes d'activation du canal. Si il ressort de ce travail que la régulation de l'ouverture de Kir6.2 par SUR semble en partie reposer sur des interactions entre domaines cytoplasmiques (du moins lors des processus d'activation), plusieurs interrogations majeures subsistent néanmoins. Quel est le rôle exact joué par le domaine TMD0 dans le couplage fonctionnel? Quels sont les déterminants de SUR impliqués dans le couplage à Kir6.2 lors des processus d'inhibition? Quels sont les domaines de Kir6.2 participant au couplage? Existe-t-il des spécificités propres à chaque isoforme de SUR, ou les mécanismes de couplage SUR-Kir6.2 sont-ils généralisables? Autant de questions nécessitant des études supplémentaires, et pour lesquelles l'utilisation de stratégies chimériques telles que celle exposée ici pourrait se révéler appropriée. Enfin, l'apport de données structurales à haute résolution serait d'une aide précieuse pour identifier les zones de contact SUR-Kir6.2 et préciser notre compréhension de ce système complexe.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la possibilité de substituer SUR par des récepteurs couplés aux protéines G, afin de générer des complexes octamériques artificiels. Initialement, ce projet devait être basé sur les connaissances acquises au cours de l'étude menée sur le couplage fonctionnel entre SUR2A et Kir6.2 au sein du canal K_{ATP} . Dans les faits, et pour des raisons chronologiques, nous n'avons pas eu l'occasion d'utiliser directement ces résultats pour la création des biocapteurs présentés ici, pour lesquels nous avons développé avec succès une approche mimétique en couplant physiquement le C-ter des

GPCR hM₂ et hD₂ au N-ter de Kir6.2. Néanmoins, ces résultats pourraient être exploités dans le futur pour l'optimisation des premiers systèmes couplés présentés ici.

Quoi qu'il en soit, nous sommes parvenus par cette approche mimétique à coupler fonctionnellement les récepteurs muscarinique hM₂ et dopaminergique hD₂ avec Kir6.2, obtenant ainsi deux prototypes d'un nouveau type de biocapteurs, les Ion Channel Coupled Receptors ou ICCR, où le canal ionique Kir6.2 rapporte électriquement en temps réel la présence de ligands fixés aux GPCR. Si les mécanismes exacts par lequel ce couplage artificiel procède restent pour l'heure indéterminés, nous savons néanmoins que celui-ci est direct et implique des changements de conformation des récepteurs transmis mécaniquement à Kir6.2. Des zones d'ombres restent cependant à éclaircir, notamment au regard des différences observées entre les réponses des fusions hM₂-Kir6.2 et hD₂-Kir6.2 à leurs agonistes respectifs: là où hM₂-Kir6.2 est activée par l'acétylcholine, hD₂-Kir6.2 est inhibée par la dopamine, suggérant l'existence de différences mécanistiques insoupçonnées entre les deux récepteurs qu'il sera nécessaire d'étudier. Là encore, l'apport de données structurales obtenues par modélisation *in silico* pourrait nous apporter des informations essentielles et faciliter notre compréhension du système.

Ces résultats démontrent qu'il est possible de créer des biocapteurs électriques à l'échelle moléculaire en couplant artificiellement un récepteur à un canal ionique. Ceux-ci ouvrent la voie à de multiples applications: la détection de signaux électriques permettant de s'affranchir des systèmes à base de réactifs marqués, le développement de tels biocapteurs électriques intégrés dans des dispositifs électroniques représente un outil prometteur à la fois pour le diagnostic médical et le criblage à haut débit de molécules d'intérêt pharmacologique.

Références Bibliographiques

A

- Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, Kay G, Laties A, Nathanson NM, Pasricha PJ, Wein AJ (2006) Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol.* **148**:565-78
- Aguilar-Bryan L, Clement JP, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J (1998) Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol Rev.* **78**:227-45
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, Gonzalez G, Herrerasosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA (1995) Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion. *Science.* **268**:423-6
- Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, Peiffer A, Zabriskie NA, Li Y, Hutchinson A, Dean M, Lupski JR, Leppert M (1997) Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science.* **277**:1805-7
- Ammala C, Moorhouse A, Gribble F, Ashfield R, Proks P, Smith PA, Sakura H, Coles B, Ashcroft SJ, Ashcroft FM (1996) Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature.* **379**:545-8
- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ (1991) Demonstration That CFTR Is a Chloride Channel by Alteration of Its Anion Selectivity. *Science.* **253**:202-5
- Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MS, Ashcroft FM (2005) Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the K_{ATP} channel Kir6.2 subunit. *EMBO J.* **24**:229-39
- Ashcroft FM (2000a) Inwardly rectifying K⁺ channels (In: Ion channels and disease) (in press)
- Ashcroft FM (2000b) How ion channels work. In: Ion channels and disease (in press)
- Ashcroft FM (2005) ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J Clin Invest.* **115**:2047-58
- Ashcroft FM, Gribble FM (1998) Correlating structure and function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Neurosci.* **21**:288-94
- Ashcroft FM, Gribble FM (1999) ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia.* **42**:903-19
- Ashcroft SJ, Ashcroft FM (1990) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal.* **2**:197-214
- Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJ, Ashcroft FM (1999) Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K_{ATP} channel. *Diabetes.* **48**:1341-7

Atwal KS, Grover GJ, Lodge NJ, Normandin DE, Traeger SC, Sleph PG, Cohen RB, Bryson CC, Dickinson KE (1998) Binding of ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) openers to cardiac membranes: Correlation of binding affinities with cardioprotective and smooth muscle relaxing potencies. *J Med Chem.* **41**:271-5

Audet N, Gales C, Archer-Lahlou E, Vallieres M, Schiller PW, Bouvier M, Pineyro G (2008) Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assays Reveal Ligand-specific Conformational Changes within Preformed Signaling Complexes Containing delta-Opioid Receptors and Heterotrimeric G Proteins. *J Biol Chem.* **283**:15078-88

B

Babenko AP, Bryan J (2002) SUR-dependent modulation of K_{ATP} channels by an N-terminal Kir6.2 peptide - Defining intersubunit gating interactions. *J Biol Chem.* **277**:43997-4004

Babenko AP, Bryan J (2003) SUR domains that associate with and gate K_{ATP} pores define a novel gatekeeper. *J Biol Chem.* **278**:41577-80

Babenko AP, Gonzalez G, Bryan J (1999) The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to K_{ATP} channel closure. *FEBS Lett.* **459**:367-76

Babenko AP, Gonzalez G, Bryan J (2000) Pharmacology of sulfonylurea receptors - Separate domains of the regulatory subunits of K_{ATP} channel isoforms are required for selective interaction with K^+ channel openers. *J Biol Chem.* **275**:717-20

Babenko AP, Polak M, Cave H, Busiah K, Czernichow P, Scharfmann R, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Vaxillaire M, Froguel P (2006) Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *N Engl J Med.* **355**:456-66

Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD, Paucek P (2001) Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem.* **276**:33369-74

Bakos E, Evers R, Calenda G, Tusnady GE, Szakacs G, Varadi A, Sarkadi B (2000) Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci.* **113**:4451-61

Bakos E, Evers R, Szakacs G, Tusnady GE, Welker E, Szabo K, de Haas M, van Deemter L, Borst P, Varadi A, Sarkadi B (1998) Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem.* **273**:32167-75

Baldwin JM, Schertler GF, Unger VM (1997) An α -carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J Mol Biol.* **272**:144-64

Bancila V, Cens T, Monnier D, Chanson F, Faure C, Dunant Y, Bloc A (2005) Two SUR1-specific histidine residues mandatory for zinc-induced activation of the rat K_{ATP} channel. *J Biol Chem.* **280**:8793-9

- Barnard EA, Miledi R, Sumikawa K (1982) Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **215**:241-6
- Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP, Fakler B (1998) PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science.* **282**:1141-4
- Baukrowitz T, Tucker SJ, Schulte U, Benndorf K, Ruppersberg JP, Fakler B (1999) Inward rectification in K_{ATP} channels: a pH switch in the pore. *EMBO J.* **18**:847-53
- Bayley H, Cremer PS (2001) Stochastic sensors inspired by biology. *Nature.* **413**:226-30
- Becq F (1996) Ionic channel rundown in excised membrane patches. *Bba-Rev Biomembranes.* **1286**:53-63
- Beech DJ, Zhang H, Nakao K, Bolton TB (1993) K-channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* **110**:573-82
- Beguín P, Nagashima K, Nishimura M, Gonoï T, Seino S (1999) PKA-mediated phosphorylation of the human K_{ATP} channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J.* **18**:4722-32
- Bienengraeber M, Alekseev AE, Abraham MR, Carrasco A, Moreau C, Vivaudou M, Dzeja PP, Terzic A (2000) Intrinsic ATPase activity: A novel property of cardiac K_{ATP} channels. *Eur Biophys J.* **29**:343
- Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O'Coilain F, Gao F, Karger AB, Ballew JD, Hodgson DM, Zingman LV, Pang YP, Alekseev AE, Terzic A (2004) ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic K_{ATP} channel gating. *Nat Genet.* **36**:382-7
- Binyamin L, Assaraf YG, Reiter Y (2005) Probing ATP-dependent conformational changes in the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) in live tumor cells with a novel recombinant single-chain Fv antibody targeted to the extracellular N-terminus. *Int J Cancer.* **116**:703-9
- Bloc A, Cens T, Cruz H, Dunant Y (2000) Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic β -cells: activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *J Physiol.* **529**:723-34
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**:1723-9
- Bodzioch M, Orso E, Klucken T, Langmann T, Bottcher L, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* **22**:347-51
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science.* **237**:527-32

Braha O, Walker B, Cheley S, Kasianowicz JJ, Song LZ, Gouaux JE, Bayley H (1997) Designed protein pores as components for biosensors. *Chem Biol.* **4**:497-505

Branstrom R, Leibiger IB, Leibiger B, Corkey BE, Berggren PO, Larsson O (1998) Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel. *J Biol Chem.* **273**:31395-400

Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* **22**:336-45

Browne CL, Wiley HS, Dumont JN (1979) Oocyte-follicle cell gap junctions in *Xenopus laevis* and the effects of gonadotropin on their permeability. *Science.* **203**:182-3

Bryan J, Vila-Carriles WH, Zhao GL, Babenko AP, Aguilar-Bryan L (2004) Toward linking structure with function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Diabetes.* **53**:S104-12

Brzostowski JA, Kimmel AR (2001) Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci.* **26**:291-7

Bulenger S, Marullo S, Bouvier M (2005) Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci.* **26**:131-7

C

Chan KW, Zhang H, Logothetis DE (2003) N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *EMBO J.* **22**:3833-43

Chen Q, Yang YY, Li L, Zhang JT (2006) The amino terminus of the human multidrug resistance transporter ABCC1 has a U-shaped folding with a gating function. *J Biol Chem.* **281**:31152-63

Chen Q, Yang YY, Liu Y, Han BG, Zhang JT (2002) Cytoplasmic retraction of the amino terminus of human multidrug resistance protein 1. *Biochemistry.* **41**:9052-62

Chutkow WA, Pu JL, Wheeler MT, Wada T, Makielski JC, Burant CF, McNally EM (2002) Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K_{ATP} channels. *J Clin Invest.* **110**:203-8

Chutkow WA, Simon MC, LeBeau MM, Burant CF (1996) Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular K_{ATP} channels. *Diabetes.* **45**:1439-45

Civelli O (2005) GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters. *Trends Pharmacol Sci.* **26**:15-9

Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and β -arrestin proteins. *Prog Neurobiol.* **66**:61-79

Clapham DE, Neer EJ (1997) G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **37**:167-203

Clement JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J (1997) Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron.* **18**:827-38

Coghlan MJ, Carroll WA, Gopalakrishnan M (2001) Recent developments in the biology and medicinal chemistry of potassium channel modulators: Update from a decade of progress. *J Med Chem.* **44**:1627-53

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* **258**:1650-4

Couty JP, Gershengorn MC (2004) Insights into the viral G protein-coupled receptor encoded by human herpesvirus type 8 (HHV-8). *Biol Cell.* **96**:349-54

Crane A, Aguilar-Bryan L (2004) Assembly, maturation, and turnover of K_{ATP} channel subunits. *J Biol Chem.* **279**:9080-90

Cui Y, Tinker A, Clapp LH (2003) Different molecular sites of action for the K_{ATP} channel inhibitors, PNU-99963 and PNU-37883A. *Br J Pharmacol.* **139**:122-8

D

Dabrowski M, Ashcroft FM, Ashfield R, Lebrun P, Pirotte B, Egebjerg J, Hansen JB, Wahl P (2002) The novel diazoxide analog 3-isopropylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide is a selective Kir6.2/SUR1 channel opener. *Diabetes.* **51**:1896-906

Dabrowski M, Larsen T, Ashcroft FM, Hansen JB, Wahl P (2003) Potent and selective activation of the pancreatic β -cell type K_{ATP} channel by two novel diazoxide analogues. *Diabetologia.* **46**:1375-82

Dabrowski M, Tarasov A, Ashcroft FM (2004) Mapping the architecture of the ATP-binding site of the K_{ATP} channel subunit Kir6.2. *J Physiol.* **557**:347-54

Dascal N (1987) The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem.* **22**:317-87

Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW (2001) A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca^{2+} channel Cav1.2. *Science.* **293**:98-101

Dawson RJ, Locher KP (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature.* **443**:180-5

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**:1156-66

- Derst C, Konrad M, Kockerling A, Karolyi L, Deschenes G, Daut J, Karschin A, Seyberth HW (1997) Mutations in the ROMK gene in antenatal Bartter syndrome are associated with impaired K⁺ channel function. *Biochem Biophys Res Commun.* **230**:641-5
- D'hahan N, Jacquet H, Moreau C, Catty P, Vivaudou M (1999a) A transmembrane domain of the sulfonyleurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K⁺ channels by K⁺ channel openers. *Mol Pharmacol.* **56**:308-15
- D'hahan N, Moreau C, Prost AL, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A, Vivaudou M (1999b) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:12162-7
- Dickinson KE, Bryson CC, Cohen RB, Rogers L, Green DW, Atwal KS (1997) Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel opener binding to skeletal muscle membranes. *Mol Pharmacol.* **52**:473-81
- Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ, Strader CD (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature.* **321**:75-9
- Dong K, Tang LQ, MacGregor GG, Leng Q, Hebert SC (2005) Novel nucleotide-binding sites in ATP-sensitive potassium channels formed at gating interfaces. *EMBO J.* **24**:1318-29
- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol.* **5**:268-77
- Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.* **280**:69-77
- Doyle ME, Egan JM (2003) Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev.* **55**:105-31
- Drain P, Li LH, Wang J (1998) K_{ATP} channel inhibition by ATP requires distinct functional domains of the cytoplasmic C terminus of the pore-forming subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:13953-8
- Dunne MJ, Cosgrove KE, Shepherd RM, Aynsley-Green A, Lindley KJ (2004) Hyperinsulinism in infancy: From basic science to clinical disease. *Physiol Rev.* **84**:239-75

E

- Enkvetchakul D, Jeliaskova I, Nichols CG (2005) Direct modulation of Kir channel gating by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem.* **280**:35785-8
- Enkvetchakul D, Nichols CG (2003) Gating mechanism of K_{ATP} channels: Function fits form. *J Gen Physiol.* **122**:471-80

Escande D, Thuringer D, Leguern S, Cavero I (1988) The potassium channel opener cromakalim (BRL 34915) activates ATP-dependent K⁺ channels in isolated cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **154**:620-5

F

Fan Z, Makielski JC (1997) Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem.* **272**:5388-95

Fan Z, Makielski JC (1999) Phosphoinositides decrease ATP sensitivity of the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel - A molecular probe of the mechanism of ATP-sensitive inhibition. *J Gen Physiol.* **114**:251-69

Fang K, Csanady L, Chan KW (2006) The N-terminal transmembrane domain (TMD0) and a cytosolic linker (L0) of sulphonylurea receptor define the unique intrinsic gating of K_{ATP} channels. *J Physiol.* **576**:379-89

Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR (1992) Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein βγ subunits. *Nature.* **356**:159-61

Feng X, Castracane J, Tokranova N, Gracias A, Lnenicka G, Szaro BG (2007) A living cell-based biosensor utilizing G-protein coupled receptors: principles and detection methods. *Biosens Bioelectron.* **22**:3230-7

Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* **53**:1-24

Fernandez SB, Hollo Z, Kern A, Bakos E, Fischer PA, Borst P, Evers R (2002) Role of the N-terminal transmembrane region of the multidrug resistance protein MRP2 in routing to the apical membrane in MDCKII cells. *J Biol Chem.* **277**:31048-55

Fielding CJ, Fielding PE (2000) Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim Biophys Acta.* **1529**:210-22

Foster DB, Rucker JJ, Marban E (2008) Is Kir6.1 a subunit of mitoK_{ATP}? *Biochem Biophys Res Commun.* **366**:649-56

Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev.* **57**:279-88

Fox JE, Kanji HD, French RJ, Light PE (2002) Cardiospecificity of the sulphonylurea HMR 1098: studies on native and recombinant cardiac and pancreatic K_{ATP} channels. *Br J Pharmacol.* **135**:480-8

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* **63**:1256-72

Frelet A, Klein M (2006) Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Lett.* **580**:1064-84

Furukawa T, Yamane T, Terai T, Katayama Y, Hiraoka M (1996) Functional linkage of the cardiac ATP sensitive K⁺ channel to the actin cytoskeleton. *Pflügers Arch-Eur J Physiol.* **431**:504-12

G

Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prezeau L, Pin JP (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J.* **20**:2152-9

Gao JL, Murphy PM (1994) Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional β chemokine receptor. *J Biol Chem.* **269**:28539-42

Garlid KD, Paucek P, Yarovyarovoy V, Sun XC, Schindler PA (1996) The mitochondrial K_{ATP} channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem.* **271**:8796-9

Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* **21**:90-113

Giblin JP, Leaney JL, Tinker A (1999) The molecular assembly of ATP-sensitive potassium channels - Determinants on the pore forming subunit. *J Biol Chem.* **274**:22652-9

Girault JA, Greengard P (2004) The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol.* **61**:641-4

Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JM, Molnes J, Edghill EL, Frayling TM, Temple IK, Mackay D, Shield JP, Sumnik Z, van-Rhijn A, Wales JK, Clark P, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Nj (2004) Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med.* **350**:1838-49

Gloyn AL, Siddiqui J, Ellard S (2006) Mutations in the genes encoding the pancreatic β -cell K_{ATP} channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum Mutat.* **27**:220-31

Golstein PE, Boom A, van, Geffel J, Jacobs P, Masereel B, Beauwens R (1999) P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflügers Arch-Eur J Physiol.* **437**:652-60

Göpel SO, Kanno T, Barg S, Rorsman P (2000a) Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting-cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol.* **528**:497-507

Göpel SO, Kanno T, Barg S, Weng XG, Gromada J, Rorsman P (2000b) Regulation of glucagon release in mouse α -cells by K_{ATP} channels and inactivation of TTX-sensitive Na⁺ channels. *J Physiol.* **528**:509-20

- Grandy DK, Marchionni MA, Makam H, Stofko RE, Alfano M, Frothingham L, Fischer JB, Burke-Howie KJ, Bunzow JR, Server AC, et al (1989) Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**:9762-6
- Greengard P (2001) The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science*. **294**:1024-30
- Gribble FM, Davis TM, Higham CE, Clark A, Ashcroft FM (2000) The antimalarial agent mefloquine inhibits ATP-sensitive K-channels. *Br J Pharmacol*. **131**:756-60
- Gribble FM, Proks P, Corkey BE, Ashcroft FM (1998a) Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *J Biol Chem*. **273**:26383-7
- Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM (1997a) The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K_{ATP} channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J*. **16**:1145-52
- Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM (1997b) The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K⁺ channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol*. **504**:35-45
- Gribble FM, Tucker SJ, Seino S, Ashcroft FM (1998b) Tissue specificity of sulfonylureas: Studies on cloned cardiac and β -cell K_{ATP} channels. *Diabetes*. **47**:1412-8
- Griffon N, Jeanneteau F, Prieur F, Diaz J, Sokoloff P (2003) CLIC6, a member of the intracellular chloride channel family, interacts with dopamine D2-like receptors. *Brain Res Mol Brain Res*. **117**:47-57
- Gudermann T, Kalkbrenner F, Dippel E, Laugwitz KL, Schultz G (1997) Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. **31**:253-62
- Gulbis JM, Doyle DA (2004) Potassium channel structures: do they conform? *Curr Opin Struct Biol*. **14**:440-6
- Gumina RJ, O'Coilain DF, Kurtz CE, Bast P, Pucar D, Mishra P, Miki T, Seino S, Macura S, Terzic A (2007) K_{ATP} channel knockout worsens myocardial calcium stress load in vivo and impairs recovery in stunned heart. *Am J Physiol*. **292**:H1706-13
- Gumina RJ, Pucar D, Bast P, Hodgson DM, Kurtz CE, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Terzic A (2003) Knockout of Kir6.2 negates ischemic preconditioning-induced protection of myocardial energetics. *Am J Physiol*. **284**:H2106-13

H

- Haider S, Tarasov AI, Craig TJ, Sansom MS, Ashcroft FM (2007) Identification of the PIP2-binding site on Kir6.2 by molecular modelling and functional analysis. *EMBO J*. **26**:3749-59
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch-Eur J Physiol*. **391**:85-100

- Hanley PJ, Daut J (2005) K_{ATP} channels and preconditioning: A re-examination of the role of mitochondrial K_{ATP} channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* **39**:17-50
- Hayabuchi Y, Davies NW, Standen NB (2001) Angiotensin II inhibits rat arterial K_{ATP} channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase C. *J Physiol.* **530**:193-205
- Healy K (2007) Nanopore-based single-molecule DNA analysis. *Nanomed.* **2**:459-81
- HernandezSanchez C, Basile AS, Fedorova I, Arima H, Stannard B, Fernandez AM, Ito Y, Leroith D (2001) Mice transgenically overexpressing sulfonylurea receptor 1 in forebrain resist seizure induction and excitotoxic neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:3549-54
- Heusser K, Yuan H, Neagoe I, Tarasov AI, Ashcroft FM, Schwappach B (2006) Scavenging of 14-3-3 proteins reveals their involvement in the cell-surface transport of ATP-sensitive K^+ channels. *J Cell Sci.* **119**:4353-63
- Hilgemann DW, Ball R (1996) Regulation of cardiac Na^+, Ca^{2+} exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP2. *Science.* **273**:956-9
- Hille B (2001) Ionic channels of excitable membranes, 3rd edition, Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Hollenstein K, Dawson RJ, Locher KP (2007a) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol.* **17**:412-8
- Hollenstein K, Frei DC, Locher KP (2007b) Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature.* **446**:213-6
- Hopkins AL, Groom CR (2002) The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov.* **1**:727-30
- Hosy E, Derand R, Revilloud J, Vivaudou M (2007) Remodelling of the SUR-Kir6.2 interface of the K_{ATP} channel upon ATP binding revealed by the conformational blocker rhodamine 123. *J Physiol.* **582**:27-39
- Hou Y, Azpiazu I, Smrcka A, Gautam N (2000) Selective role of G protein γ subunits in receptor interaction. *J Biol Chem.* **275**:38961-4
- Hu H, Sato T, Seharaseyon J, Liu YG, Johns DC, O'Rourke B, Marban E (1999) Pharmacological and histochemical distinctions between molecularly defined sarcolemmal K_{ATP} channels and native cardiac mitochondrial K_{ATP} channels. *Mol Pharmacol.* **55**:1000-5
- Huang CL (2007) Complex roles of PIP2 in the regulation of ion channels and transporters. *Am J Physiol.* **293**:F1761-5
- Huang CL, Feng SY, Hilgemann DW (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by G $\beta\gamma$. *Nature.* **391**:803-6

Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN, Jan LY (1995) Evidence that direct binding of G $\beta\gamma$ to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron*. **15**:1133-43

I

Ikeda SR (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature*. **380**:255-8

Im DS (2002) Orphan G protein-coupled receptors and beyond. *Jpn J Pharmacol*. **90**:101-6

Inagaki N, Gono T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J (1995a) Reconstitution of I-KATP: An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*. **270**:1166-70

Inagaki N, Gono T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron*. **16**:1011-7

Inagaki N, Gono T, Seino S (1997) Subunit stoichiometry of the pancreatic β -cell ATP-sensitive K⁺ channel. *FEBS Lett*. **409**:232-6

Inagaki N, Inazawa J, Seino S (1995b) cDNA sequence, gene structure, and chromosomal localization of the human ATP-sensitive potassium channel, uK_{ATP}-1, gene (KCNJ8). *Genomics*. **30**:102-4

Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gono T, Horie M, Seino Y, Mizuta M, Seino S (1995c) Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem*. **270**:5691-4

Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*. **352**:244-7

Isegawa Y, Ping Z, Nakano K, Sugimoto N, Yamanishi K (1998) Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional β -chemokine receptor. *J Virol*. **72**:6104-12

Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y (1996) A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J Biol Chem*. **271**:24321-4

Ito KI, Olsen SL, Qiu W, Deeley RG, Cole SP (2001) Mutation of a single conserved tryptophan in multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) results in loss of drug resistance and selective loss of organic anion transport. *J Biol Chem*. **276**:15616-24

J

Jahangir A, Terzic A (2005) K_{ATP} channel therapeutics at the bedside. *J Mol Cell Cardiol*. **39**:99-112

Janbon M, Chapal J, Vedel A, Schaap J (1942) Accidents hypoglycémiques graves par un sulfamidothiodiazol (le VK 57 ou 2254 RP). *Montpellier med.* **441**:21-2

Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature.* **417**:515-22

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

Jordan BA, Devi LA (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature.* **399**:697-700

Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* **455**:152-62

K

Karger AB, Park S, Reyes S, Bienengraeber M, Dyer RB, Terzic A, Alekseev AE (2008) Role for SUR2A ED domain in allosteric coupling within the K_{ATP} channel complex. *J Gen Physiol.* **131**:185-96

Karschin C, Ecke C, Ashcroft FM, Karschin A (1997) Overlapping distribution of K_{ATP} channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in rodent brain. *FEBS Lett.* **401**:59-64

Katz A, Wu D, Simon MI (1992) Subunits βγ of heterotrimeric G protein activate β2 isoform of phospholipase C. *Nature.* **360**:686-9

Kenakin T (2004) Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* **25**:186-92

Kim D, Lewis DL, Graziadei L, Neer EJ, Bar-Sagi D, Clapham DE (1989) G-protein βγ-subunits activate the cardiac muscarinic K⁺-channel via phospholipase A2. *Nature.* **337**:557-60

Kirkham M, Parton RG (2005) Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta.* **1745**:273-86

Kisilevsky AE, Mulligan SJ, Altier C, Iftinca MC, Varela D, Tai C, Chen L, Hameed S, Hamid J, MacVicar BA, Zamponi GW (2008) D1 Receptors Physically Interact with N-Type Calcium Channels to Regulate Channel Distribution and Dendritic Calcium Entry. *Neuron.* **58**:557-70

Kobayashi T, Ikeda K (2006) G protein-activated inwardly rectifying potassium channels as potential therapeutic targets. *Curr Pharm Des.* **12**:4513-23

Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K (2004) Modulators of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels: potentially therapeutic agents for addictive drug users. *Ann N Y Acad Sci.* **1025**:590-4

Koster JC, Remedi MS, Dao C, Nichols CG (2005) ATP and sulfonyleurea sensitivity of mutant ATP-sensitive K⁺ channels in neonatal diabetes - Implications for pharmacogenomic therapy. *Diabetes*. **54**:2645-54

Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE (1995) The G-protein-gated atrial K⁺ channel I-KACh is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺-channel proteins. *Nature*. **374**:135-41

Kruh GD, Zeng H, Rea PA, Liu G, Chen ZS, Lee K, Belinsky MG (2001) MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. *J Bioenerg Biomembr*. **33**:493-501

Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*. **407**:971-7

Kuo AL, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science*. **300**:1922-6

Kutzleb C, Busmann A, Wendland M, Maronde E (2005) Discovery of novel regulatory peptides by reverse pharmacology: spotlight on chemerin and the RF-amide peptides metastatin and QRFP. *Curr Protein Pept Sci*. **6**:265-78

L

Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature*. **379**:311-9

Laporte SA, Miller WE, Kim KM, Caron MG (2002) β-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a β-arrestin binding site in β2-adaptin. *J Biol Chem*. **277**:9247-54

Lattin J, Zidar DA, Schroder K, Kellie S, Hume DA, Sweet MJ (2007) G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *J Leukoc Biol*. **82**:16-32

Lavine N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hebert TE, Van Tol HH (2002) G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. **277**:46010-9

Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*. **111**:219-30

Lee JK, John SA, Weiss JN (1999a) Novel gating mechanism of polyamine block in the strong inward rectifier K channel Kir2.1. *J Gen Physiol*. **113**:555-64

Lee K, Dixon AK, Richardson PJ, Pinnock RD (1999b) Glucose-receptive neurones in the rat ventromedial hypothalamus express K_{ATP} channels composed of Kir6.1 and SUR1 subunits. *J Physiol*. **515**:439-52

- Leff P (1995) The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci.* **16**:89-97
- Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem.* **273**:18677-80
- Lei Q, Jones MB, Talley EM, Garrison JC, Bayliss DA (2003) Molecular mechanisms mediating inhibition of G protein-coupled inwardly-rectifying K^+ channels. *Mol Cells.* **15**:1-9
- Leifert WR, Aloia AL, Bucco O, Glatz RV, McMurchie EJ (2005) G-protein-coupled receptors in drug discovery: nanosizing using cell-free technologies and molecular biology approaches. *J Biomol Screen.* **10**:765-79
- Lesage F, Fink M, Barhanin J, Lazdunski M, Mattei MG (1995) Assignment of human G-protein-coupled inward rectifier K^+ channel homolog GIRK3 gene to chromosome 1q21-q23. *Genomics.* **29**:808-9
- Light PE, Bladen C, Winkfein RJ, Walsh MP, French RJ (2000) Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:9058-63
- Lin YF, Jan YN, Jan LY (2000) Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells. *EMBO J.* **19**:942-55
- Linton KJ (2007) Structure and function of ABC transporters. *Physiology.* **22**:122-30
- Linton KJ, Higgins CF (1998) The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol.* **28**:5-13
- Liss B, Bruns R, Roeper J (1999) Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K_{ATP} channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J.* **18**:833-46
- Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB (2000) Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and γ -aminobutyric acid A receptors. *Nature.* **403**:274-80
- Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E (1998) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation.* **97**:2463-9
- Liu YG, Ren GF, O'Rourke B, Marban E, Seharaseyon J (2001) Pharmacological comparison of native mitochondrial K_{ATP} channels with molecularly defined surface K_{ATP} channels. *Mol Pharmacol.* **59**:225-30
- Locher KP, Lee AT, Rees DC (2002) The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science.* **296**:1091-8
- Lodowski DT, Pitcher JA, Capel WD, Lefkowitz RJ, Tesmer JJ (2003) Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and $G\beta\gamma$. *Science.* **300**:1256-62
- Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K^+ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature.* **450**:376-82

Loo TW, Clarke DM (2001) Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J Biol Chem.* **276**:14972-9

Lorenz E, Terzic A (1999) Physical association between recombinant cardiac ATP-sensitive K⁺ channel subunits Kir6.2 and SUR2A. *J Mol Cell Cardiol.* **31**:425-34

Loussouarn G, Demolombe S, Mohammad-Panah R, Escande D, Baro I (1996) Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *Am J Physiol.* **271**:C1565-73

Loussouarn G, Phillips LR, Masia R, Rose T, Nichols CG (2001) Flexibility of the Kir6.2 inward rectifier K⁺ channel pore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:4227-32

Lu M, Leng Q, Egan ME, Caplan MJ, Boulpaep EL, Giebisch GH, Hebert SC (2006) CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J Clin Invest.* **116**:797-807

Luttrell LM, Daaka Y, Della Rocca GJ, Lefkowitz RJ (1997) G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. *J Biol Chem.* **272**:31648-56

M

Mannhold R (2004) K_{ATP} channel openers: Structure-activity relationships and therapeutic potential. *Med Res Rev.* **24**:213-66

Markworth E, Schwanstecher C, Schwanstecher M (2000) ATP(4-) mediates closure of pancreatic β -cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. *Diabetes.* **49**:1413-8

Martin C, Higgins CF, Callaghan R (2001) The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry.* **40**:15733-42

Martin CR, Siwy ZS (2007) Learning Nature's Way: Biosensing with Synthetic Nanopores. *Science.* **317**:331-2

Mason DL, Michaelis S (2002) Requirement of the N-terminal extension for vacuolar trafficking and transport activity of yeast Ycf1p, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Biol Cell.* **13**:4443-55

Matsuo M, Kimura Y, Ueda K (2005) K_{ATP} channel interaction with adenine nucleotides. *J Mol Cell Cardiol.* **38**:907-16

Matsuoka T, Matsushita K, Katayama Y, Fujita A, Inageda K, Tanemoto M, Inanobe A, Yamashita S, Matsuzawa Y, Kurachi Y (2000) C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Circ Res.* **87**:873-80

- McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci.* **62**:551-77
- Medina I, Krapivinsky G, Arnold S, Kovoov P, Krapivinsky L, Clapham DE (2000) A switch mechanism for G $\beta\gamma$ activation of I(KACh). *J Biol Chem.* **275**:29709-16
- Mikhailov MV, Campbell JD, de Wet H, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, Sansom MS, Ford RC, Ashcroft FM (2005) 3-D structural and functional characterization of the purified K_{ATP} channel complex Kir6.2-SUR1. *EMBO J.* **24**:4166-75
- Mikhailov MV, Mikhailova EA, Ashcroft SJ (2001) Molecular structure of the glibenclamide binding site of the β -cell K_{ATP} channel. *FEBS Lett.* **499**:154-60
- Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y, Horiuchi M, Ashcroft F, Minokoshi Y, Roeper J, Seino S (2001) ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci.* **4**:507-12
- Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, Koseki H, Iwanaga T, Nakaya H, Seino S (2002) Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med.* **8**:466-72
- Miller C (2001) See potassium run. *Nature.* **414**:23-4
- Milligan G, Rees S (1999) Chimaeric G alpha proteins: their potential use in drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* **20**:118-24
- Milligan G, White JH (2001) Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* **22**:513-8
- Mlynarski W, Tarasov AI, Gach A, Girard CA, Pietrzak I, Zubcevic L, Kusmierek J, Klupa T, Malecki MT, Ashcroft FM (2007) Sulfonylurea improves CNS function in a case of intermediate DEND syndrome caused by a mutation in KCNJ11. *Nat Clin Pract Neurol.* **3**:640-5
- Morais-Cabral JH, Zhou YF, Mackinnon R (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature.* **414**:37-42
- Moreau C, Gally F, Jacquet-Bouix H, Vivaudou M (2005a) The size of a single residue of the sulfonylurea receptor dictates the effectiveness of K_{ATP} channel openers. *Mol Pharmacol.* **67**:1026-33
- Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'Hahan N, Vivaudou M (2000) The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *EMBO J.* **19**:6644-51
- Moreau C, Prost AL, Derand R, Vivaudou M (2005b) SUR, ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers. *J Mol Cell Cardiol.* **38**:951-63
- Moretti S, Armougom F, Wallace IM, Higgins DG, Jongeneel CV, Notredame C (2007) The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic Acids Res.* **35**:W645-8

Mukai E, Ishida H, Horie M, Noma A, Seino Y, Takano M (1998) The antiarrhythmic agent cibenzoline inhibits K_{ATP} channels by binding to Kir6.2. *Biochem Biophys Res Commun.* **251**:477-81

Murata M, Nakayama M, Irie H, Yakabe K, Fukuma K, Katayama Y, Maeda M (2001) Novel biosensor for the rapid measurement of estrogen based on a ligand-receptor interaction. *Anal Sci.* **17**:387-90

N

Nathans J, Hogness DS (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell.* **34**:807-14

Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature.* **260**:799-802

Nichols CG (2006) K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature.* **440**:470-6

Nichols CG, Lederer WJ (1990) The regulation of ATP-sensitive K^+ channel activity in intact and permeabilized rat ventricular myocytes. *J Physiol.* **423**:91-110

Nichols CG, Lopatin AN (1997) Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol.* **59**:171-91

Nichols CG, Shyng SL, Nestorowicz A, Glaser B, Clement JP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Permutt MA, Bryan J (1996) Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science.* **272**:1785-7

Nishida M, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2007) Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *EMBO J.* **26**:4005-15

Nishida M, Mackinnon R (2002) Structural basis of inward rectification: Cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 angstrom resolution. *Cell.* **111**:957-65

O

Okamoto Y, Ninomiya H, Miwa S, Masaki T (2000) Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* **275**:6439-46

Oldham ML, Khare D, Quioco FA, Davidson AL, Chen J (2007) Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature.* **450**:515-21

Oldham WM, Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**:60-71

Olson TM, Alekseev AE, Moreau C, Liu XK, Zingman LV, Miki T, Seino S, Asirvatham SJ, Jahangir A, Terzic A (2007) K_{ATP} channel mutation confers risk for vein of Marshall adrenergic atrial fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* **4**:110-6

P

- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. **289**:739-45
- Parnot C, Kobilka B (2004) Toward understanding GPCR dimers. *Nat Struct Mol Biol*. **11**:691-2
- Parnot C, Miserey-Lenkei S, Bardin S, Corvol P, Clauser E (2002) Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab*. **13**:336-43
- Partiseti M, Collura V, Agnel M, Culouscou JM, Graham D (1998) Cloning and characterization of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine. *FEBS Lett*. **434**:171-6
- Pascal G, Milligan G (2005) Functional complementation and the analysis of opioid receptor homodimerization. *Mol Pharmacol*. **68**:905-15
- Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude El (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science*. **271**:1126-8
- Payen L, Delugin L, Courtois A, Trinquart Y, Guillouzo A, Fardel O (2001) The sulphonylurea glibenclamide inhibits multidrug resistance protein (MRP1) activity in human lung cancer cells. *Br J Pharmacol*. **132**:778-84
- Peat AJ, Townsend C, McKay MC, Garrido D, Terry CM, Wilson JL, Thomson SA (2004) 3-trifluoromethyl-4-nitro-5-arylpyrazoles are novel K_{ATP} channel agonists. *Bioorg Med Chem Lett*. **14**:813-6
- Perez DM, Karnik SS (2005) Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev*. **57**:147-61
- Pinkett HW, Lee AT, Lum P, Locher KP, Rees DC (2007) An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science*. **315**:373-7
- Plant TD, Henquin JC (1990) Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive K^+ channels in mouse pancreatic β -cells. *Br J Pharmacol*. **101**:115-20
- Prinster SC, Hague C, Hall RA (2005) Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev*. **57**:289-98
- Proks P, Arnold AL, Bruining J, Girard C, Flanagan SE, Larkin B, Colclough K, Hattersley AT, Ashcroft FM, Ellard S (2006) A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes. *Hum Mol Genet*. **15**:1793-800
- Proks P, Ashcroft FM (1997) Phentolamine block of K_{ATP} channels is mediated by Kir6.2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**:11716-20

- Proks P, Treinies I, Mest HR, Trapp S (2002) Inhibition of recombinant K_{ATP} channels by the antidiabetic agents midaglizole, LY397364 and LY389382. *Eur J Pharmacol.* **452**:11-9
- Prost AL, Bloc A, Hussy N, Derand R, Vivaudou M (2004) Zinc is both an intracellular and extracellular regulator of K_{ATP} channel function. *J Physiol.* **559**:157-67

Q

- Quast U (1996) ATP-sensitive K⁺ channels in the kidney. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **354**:213-25
- Quast U, Guillon JM, Cavero I (1994) Cellular pharmacology of potassium channel openers in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res.* **28**:805-10
- Quayle JM, Nelson MT, Standen NB (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev.* **77**:1165-232
- Quesada I, Rovira JM, Martin F, Roche E, Nadal A, Soria B (2002) Nuclear K_{ATP} channels trigger nuclear Ca²⁺ transients that modulate nuclear function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:9544-9
- Quinn KV, Cui Y, Giblin JP, Clapp LH, Tinker A (2003) Do anionic phospholipids serve as cofactors or second messengers for the regulation of activity of cloned ATP-sensitive K⁺ channels? *Circ Res.* **93**:646-55
- Quinn KV, Giblin JP, Tinker A (2004) Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channel. *Circ Res.* **94**:1359-66

R

- Raab-Graham KF, Cirilo LJ, Boettcher AA, Radeke CM, Vandenberg CA (1999) Membrane topology of the amino-terminal region of the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem.* **274**:29122-9
- Raab-Graham KF, Radeke CM, Vandenberg CA (1994) Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *Neuroreport.* **5**:2501-5
- Rainbow RD, James M, Hudman D, Al-Johi M, Singh H, Watson PJ, Ashmole I, Davies NW, Lodwick D, Norman RI (2004a) Proximal C-terminal domain of sulphonylurea receptor 2A interacts with pore-forming Kir6 subunits in K_{ATP} channels. *Biochem J.* **379**:173-81
- Rainbow RD, Lodwick D, Hudman D, Davies NW, Norman RI, Standen NB (2004b) SUR2A C-terminal fragments reduce K_{ATP} currents and ischaemic tolerance of rat cardiac myocytes. *J Physiol.* **557**:785-94
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human β 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* **450**:383-7
- Reimann F, Ashcroft FM (1999) Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol.* **11**:503-8

- Reimann F, Huopio H, Dabrowski M, Proks P, Gribble FM, Laakso M, Otonkoski T, Ashcroft FM (2003) Characterisation of new K_{ATP} -channel mutations associated with congenital hyperinsulinism in the Finnish population. *Diabetologia*. **46**:241-9
- Ribalet B, John SA, Weiss JN (2003) Molecular basis for Kir6.2 channel inhibition by adenine nucleotides. *Biophys J*. **84**:266-76
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. **245**:1066-73
- Robelek R, Lemker ES, Wiltschi B, Kirste V, Naumann R, Oesterhelt D, Sinner EK (2007) Incorporation of In Vitro Synthesized GPCR into a Tethered Artificial Lipid Membrane System. *Angew Chem Int Ed Engl*. **46**:605-8
- Robishaw JD, Berlot CH (2004) Translating G protein subunit diversity into functional specificity. *Curr Opin Cell Biol*. **16**:206-9
- Rodrigo GC, Standen NB (2005) ATP-sensitive potassium channels. *Curr Pharm Des*. **11**:1915-40
- Rosen BP (1999) Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol*. **7**:207-12
- Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem*. **272**:10685-94
- Rosenberg MF, Mao QC, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG, Cole SP (2001) The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) - Crystallization and single-particle analysis. *J Biol Chem*. **276**:16076-82
- Rosenkilde MM, Waldhoer M, Luttichau HR, Schwartz TW (2001) Virally encoded 7TM receptors. *Oncogene*. **20**:1582-93
- Russ U, Lange U, Löffler-Walz C, Hambrock A, Quast U (2001) Interaction of the sulfonylthiourea HMR 1833 with sulfonylurea receptors and recombinant ATP-sensitive K^+ channels: Comparison with glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther*. **299**:1049-55
- Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*. **22**:352-5

S

- Sadja R, Alagem N, Reuveny E (2003) Gating of GIRK channels: Details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron*. **39**:9-12

- Sakura H, Bond C, Warrenperry M, Horsley S, Kearney L, Tucker S, Adelman J, Turner R, Ashcroft FM (1995a) Characterization and variation of a human inwardly-rectifying K-channel gene (KCNJ6): A putative ATP-sensitive K-channel subunit. *FEBS Lett.* **367**:193-7
- Sakura H, mmälä C, Smith PA, Gribble FM, Ashcroft FM (1995b) Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic β -cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett.* **377**:338-44
- Salter MW (2003) D1 and NMDA receptors hook up: expanding on an emerging theme. *Trends Neurosci.* **26**:235-7
- Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ (1993) A mutation-induced activated state of the β 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem.* **268**:4625-36
- Sanchez JA, Gonoï T, Inagaki N, Katada T, Seino S (1998) Modulation of reconstituted ATP-sensitive K^+ -channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *J Physiol.* **507**:315-24
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**:5463-7
- Satoh E, Yamada M, Kondo C, Repunte VP, Horio Y, Iijima T, Kurachi Y (1998) Intracellular nucleotide-mediated gating of SUR/Kir6.0 complex potassium channels expressed in a mammalian cell line and its modification by pinacidil. *J Physiol.* **511**:663-74
- Sauna ZE, Ambudkar SV (2000) Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:2515-20
- Schoneberg T, Schulz A, Biebermann H, Hermsdorf T, Rompler H, Sangkuhl K (2004) Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther.* **104**:173-206
- Schwanstecher M, Sieverding C, Dorschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C, Bryan J (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J.* **17**:5529-35
- Schwappach B, Zerangue N, Jan YN, Jan LY (2000) Molecular basis for K_{ATP} assembly: transmembrane interactions mediate association of a K^+ channel with an ABC transporter. *Neuron.* **26**:155-67
- Seifert R, Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **366**:381-416
- Shi Y, Cui NR, Shi WW, Jiang C (2008) A short motif in Kir6.1 consisting of four phosphorylation repeats underlies the vascular K_{ATP} channel inhibition by protein kinase C. *J Biol Chem.* **283**:2488-94
- Shih TM, Smith RD, Toro L, Goldin AL (1998) High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* **293**:529-56

- Shumilina E, Klocker N, Korniychuk G, Rapedius M, Lang F, Baukrowitz T (2006) Cytoplasmic accumulation of long-chain coenzyme A esters activates K_{ATP} and inhibits Kir2.1 channels. *J Physiol.* **575**:433-42
- Shyng SL, Cukras CA, Harwood J, Nichols CG (2000) Structural determinants of PIP₂ regulation of inward rectifier K_{ATP} channels. *J Gen Physiol.* **116**:599-607
- Shyng SL, Nichols CG (1997) Octameric stoichiometry of the K_{ATP} channel complex. *J Gen Physiol.* **110**:655-64
- Shyng SL, Nichols CG (1998) Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP} channels. *Science.* **282**:1138-41
- Sigel E (1990) Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membr Biol.* **117**:201-21
- Signorini S, Liao YJ, Duncan SA, Jan LY, Stoffel M (1997) Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K^+ channel GIRK2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:923-7
- Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB (1996) Crystal structure of a G α protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1Å resolution. *Nature.* **379**:369-74
- Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR (1985) Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature.* **316**:736-8
- Stoffel M, Espinosa R 3r, Powell KL, Philipson LH, Le Beau MM, Bell GI (1994) Human G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channel (GIRK1) gene (KCNJ3): localization to chromosome 2 and identification of a simple tandem repeat polymorphism. *Genomics.* **21**:254-6
- Sturgess NC, Ashford ML, Cook DL, Hales CN (1985) The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet.* **2**:474-5
- Sui JL, Chan K, Langan MN, Vivaudou M, Logothetis DE (1999) G protein gated potassium channels. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* **33**:179-201
- Sui JL, PetitJacques J, Logothetis DE (1998) Activation of the atrial K-ACh channel by the $\beta\gamma$ subunits of G proteins or intracellular Na^+ ions depends on the presence of phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:1307-12
- Sun Y, McGarrigle D, Huang XY (2007) When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Mol Biosyst.* **3**:849-54
- Sunahara RK, Tesmer JJ, Gilman AG, Sprang SR (1997) Crystal structure of the adenylyl cyclase activator G α . *Science.* **278**:1943-7
- Suzuki M, Fujikura K, Inagaki N, Seino S, Takata K (1997a) Localization of the ATP-sensitive K^+ channel subunit Kir6.2 in mouse pancreas. *Diabetes.* **46**:1440-4

Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S, Takata K (1997b) Kir6.1: A possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* **241**:693-7

Suzuki M, Li RA, Miki T, Uemura H, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Ogura T, Seino S, Marban E, Nakaya H (2001) Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res.* **88**:570-7

Szczycka MS, Wemmie JA, Moye-Rowley WS, Thiele DJ (1994) A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem.* **269**:22853-7

T

Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett.* **520**:97-101

Tammaro P, Ashcroft FM (2007a) The Kir6.2-F333I mutation differentially modulates K_{ATP} channels composed of SUR1 or SUR2 subunits. *J Physiol.* **581**:1259-69

Tammaro P, Ashcroft FM (2007b) A mutation in the ATP-binding site of the Kir6.2 subunit of the K_{ATP} channel alters coupling with the SUR2A subunit. *J Physiol.* **584**:743-53

Tammaro P, Girard C, Molnes J, Njolstad PR, Ashcroft FM (2005) Kir6.2 mutations causing neonatal diabetes provide new insights into Kir6.2-SUR1 interactions. *EMBO J.* **24**:2318-30

Tammaro P, Proks P, Ashcroft FM (2006) Functional effects of naturally occurring KCNJ11 mutations causing neonatal diabetes on cloned cardiac K_{ATP} channels. *J Physiol.* **571**:3-14

Teramoto N (2006) Pharmacological profile of U-37883A, a channel blocker of smooth muscle-type ATP-sensitive K channels. *Cardiovasc Drug Rev.* **24**:25-32

Terzic A, Tung RT, Inanobe A, Katada T, Kurachi Y (1994) G proteins activate ATP-sensitive K⁺ channels by antagonizing ATP-dependent gating. *Neuron.* **12**:885-93

Terzic A, Vivaudou M, Moreau C, Olson TM, Jahangir A, Zingman LV, Alekseev AE (2008) Channelopathies of cardiac inwardly rectifying potassium channels. In (eds, I Gussak, C Antzelevitch, AAM Wilde, PA Friedman, MJ Ackerman and WK Shen): *Electrical diseases of the heart: Genetics, mechanisms, treatment, prevention.* Springer. pp.328

Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, Tesmer JJ (2005) Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Gαq-GRK2-Gβγ complex. *Science.* **310**:1686-90

Thorneloe KS, Maruyama Y, Malcolm AT, Light PE, Walsh MP, Cole WC (2002) Protein kinase C modulation of recombinant ATP-sensitive K⁺ channels composed of Kir6.1 and/or Kir6.2 expressed with SUR2B. *J Physiol.* **541**:65-80

Trapp S, Haider S, Jones P, Sansom MS, Ashcroft FM (2003) Identification of residues contributing to the ATP binding site of Kir6.2. *EMBO J.* **22**:2903-12

Trapp S, Tucker SJ, Ashcroft FM (1997) Activation and inhibition of K_{ATP} currents by guanine nucleotides is mediated by different channel subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**:8872-7

Trube G, Rorsman P, Ohno-Shosaku T (1986) Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K^+ channel in mouse pancreatic β -cells. *Pflügers Arch-Eur J Physiol*. **407**:493-9

Tsao P, Cao T, von Zastrow M (2001) Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. **22**:91-6

Tucker SJ, Bond CT, Herson P, Pessia M, Adelman JP (1996) Inhibitory interactions between two inward rectifier K^+ channel subunits mediated by the transmembrane domains. *J Biol Chem*. **271**:5866-70

Tucker SJ, Gribble FM, Proks P, Trapp S, Ryder TJ, Haug T, Reimann F, Ashcroft FM (1998) Molecular determinants of K_{ATP} channel inhibition by ATP. *EMBO J*. **17**:3290-6

Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM (1997) Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K^+ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature*. **387**:179-83
Tucker SJ, James MR, Adelman JP (1995) Assignment of K_{ATP} -1, the cardiac ATP-sensitive potassium channel gene (KCNJ5), to human chromosome 11q24. *Genomics*. **28**:127-8

Tusnady GE, Sarkadi B, Simon I, Varadi A (2006) Membrane topology of human ABC proteins. *FEBS Lett*. **580**:1017-22

U

Ueda K, Inagaki N, Seino S (1997) MgADP antagonism to Mg^{2+} -independent ATP binding of the sulphonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem*. **272**:22983-6

Uhde I, Toman A, Gross I, Schwanstecher C, Schwanstecher M (1999) Identification of the potassium channel opener site on sulphonylurea receptors. *J Biol Chem*. **274**:28079-82

V

Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**:4903-8

Velarde G, Ford RC, Rosenberg MF, Powis SJ (2001) Three-dimensional structure of transporter associated with antigen processing (TAP) obtained by single particle image analysis. *J Biol Chem*. **276**:46054-63

Vila-Carriles WH, Zhao GL, Bryan J (2007) Defining a binding pocket for sulphonylureas in ATP-sensitive potassium channels. *FASEB J*. **21**:18-25

W

Wada Y, Yamashita T, Imai K, Miura R, Takao K, Nishi M, Takeshima H, Asano T, Morishita R, Nishizawa K, Kokubun S, Nukada T (2000) A region of the sulfonylurea receptor critical for a modulation of ATP-sensitive K⁺ channels by G-protein βγ-subunits. *EMBO J.* **19**:4915-25

Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S (2000) The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem.* **10**:1-12

Wang D, Sun X, Bohn LM, Sadee W (2005) Opioid receptor homo- and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol.* **67**:2173-84

Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB, Chang G (2007) Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**:19005-10

Weber WM (1999) Endogenous ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*: Recent developments. *J Membr Biol.* **170**:1-12

Wess J (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* **11**:346-54

Wolfe BL, Trejo J (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic.* **8**:462-70

Wu J, Xu H, Yang Z, Wang Y, Mao J, Jiang C (2002) Protons activate homomeric Kir6.2 channels by selective suppression of the long and intermediate closures. *J Membr Biol.* **190**:105-16

X

Xu HX, Cui NR, Yang ZJ, Wu JP, Giwa LR, Abdulkadir L, Sharma P, Jiang C (2001a) Direct activation of cloned K_{ATP} channels by intracellular acidosis. *J Biol Chem.* **276**:12898-902

Xu HX, Wu JP, Cui NR, Abdulkadir L, Wang RP, Mao JZ, Giwa LR, Chanchevalap S, Jiang C (2001b) Distinct histidine residues control the acid-induced activation and inhibition of the cloned K_{ATP} channel. *J Biol Chem.* **276**:38690-6

Y

Yamada K, Ji JJ, Yuan HJ, Miki T, Sato S, Horimoto N, Shimizu T, Seino S, Inagaki N (2001) Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science.* **292**:1543-6

Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y (1998) G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev.* **50**:723-60

Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, Kurachi Y (1997) Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *J Physiol*. **499**:715-20

Yan FF, Lin CW, Weisiger E, Cartier EA, Taschenberger G, Shyng SL (2004) Sulfonylureas correct trafficking defects of ATP-sensitive potassium channels caused by mutations in the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem*. **279**:11096-105

Yan FF, Lin YW, MacMullen C, Ganguly A, Stanley CA, Shyng SL (2007) Congenital hyperinsulinism associated ABCC8 mutations that cause defective trafficking of ATP-sensitive K⁺ channels: identification and rescue. *Diabetes*. **56**:2339-48

Yang K, Fang K, Fromondi L, Chan KW (2005) Low temperature completely rescues the function of two misfolded K ATP channel disease-mutants. *FEBS Lett*. **579**:4113-8

Yang YY, Liu Y, Dong ZZ, Xu JK, Peng H, Liu ZQ, Zhang JT (2007) Regulation of function by dimerization through the amino-terminal membrane-spanning domain of human ABCC1/MRP1. *J Biol Chem*. **282**:8821-30

Yano H, Philipson LH, Kugler JL, Tokuyama Y, Davis EM, Le Beau MM, Nelson DJ, Bell GI, Takeda J (1994) Alternative splicing of human inwardly rectifying K⁺ channel ROMK1 mRNA. *Mol Pharmacol*. **45**:854-60

Yuan H, Michelsen K, Schwappach B (2003) 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol*. **13**:638-46

Yunoki T, Teramoto N, Naito S, Ito Y (2001) The effects of flecainide on ATP-sensitive K⁺ channels in pig urethral myocytes. *Br J Pharmacol*. **133**:730-8

Z

Zaman GJ (2004) Cell-based screening. *Drug Discov Today*. **9**:828-30

Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels. *Neuron*. **22**:537-48

Zhang CL, Miki T, Shibasaki T, Yokokura M, Saraya A, Seino S (2006) Identification and characterization of a novel member of the ATP-sensitive K⁺ channel subunit family, Kir6.3, in zebrafish. *Physiol Genomics*. **24**:290-7

Zhou YF, Morais-Cabral JH, Kaufman A, Mackinnon R (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 angstrom resolution. *Nature*. **414**:43-8

Zingman LV, Alekseev AE, Bienengraeber M, Hodgson D, Karger AB, Dzeja PP, Terzic A (2001) Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K⁺ conductance. *Neuron*. **31**:233-45

Zünkler BJ, Kuhne S, Rustenbeck I, Ott T, Hildebrandt AG (2000) Disopyramide block of K_{ATP} channels is mediated by the pore-forming subunit. *Life Sci*. **66**:PL245-52

Publications

Three C-terminal residues from the sulphonylurea receptor contribute to the functional coupling between the K_{ATP} channel subunits SUR2A and Kir6.2

Julien P. Dupuis, Jean Revilloud, Christophe J. Moreau and Michel Vivaudou

Institut de Biologie Structurale, UMR5075 CEA-CNRS-University J. Fourier, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France

Cardiac ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels are metabolic sensors formed by the association of the inward rectifier potassium channel Kir6.2 and the sulphonylurea receptor SUR2A. SUR2A adjusts channel gating as a function of intracellular ATP and ADP and is the target of pharmaceutical openers and blockers which, respectively, up- and down-regulate Kir6.2. In an effort to understand how effector binding to SUR2A translates into Kir6.2 gating modulation, we examined the role of a 65-residue SUR2A fragment linking transmembrane domain TMD2 and nucleotide-binding domain NBD2 that has been shown to interact with Kir6.2. This fragment of SUR2A was replaced by the equivalent residues of its close homologue, the multidrug resistance protein MRP1. The chimeric construct was expressed in *Xenopus* oocytes and characterized using the patch-clamp technique. We found that activation by MgADP and synthetic openers was greatly attenuated although apparent affinities were unchanged. Further chimeragenetic and mutagenetic studies showed that mutation of three residues, E1305, I1310 and L1313 (rat numbering), was sufficient to confer this defective phenotype. The same mutations had no effects on channel block by the sulphonylurea glibenclamide or by ATP, suggesting a role for these residues in activatory – but not inhibitory – transduction processes. These results indicate that, within the K_{ATP} channel complex, the proximal C-terminal of SUR2A is a critical link between ligand binding to SUR2A and Kir6.2 up-regulation.

(Received 18 February 2008; accepted after revision 30 April 2008; first published online 1 May 2008)

Corresponding author M. Vivaudou: IBS/LPM, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France.

Email: vivaudou@cea.fr

ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) are potassium-selective channels widely distributed among most types of excitable cells, where their primary function is to couple membrane excitability to intracellular metabolic levels (Seino & Miki, 2003; Nichols, 2006) by sensing the balance between cytoplasmic ATP, which inhibits them, and MgADP which activates them (Tarasov *et al.* 2004; Alekseev *et al.* 2005). This metabolic sensing role is involved in major physiological processes: it plays a role in the cascade linking insulin secretion to glycaemia in the pancreatic β -cell, and participates in ischaemic pre-conditioning and thereby cardio-protection during heart failure (Ashcroft *et al.* 1984; Jahangir & Terzic, 2005; Yamada *et al.* 2006). K_{ATP} channels possess an unusual architecture made of two subunits: the inward-rectifier potassium channel Kir6.2 (Inagaki *et al.* 1995) and the sulphonylurea receptor SUR (Aguilar-Bryan *et al.* 1995)

of the ATP-binding cassette (ABC) protein family. Four Kir6.2 subunits assemble to form the K^+ -selective pore of the channel, inhibited by nucleotides, and four SUR subunits surround this pore and regulate its gating, activating it in the presence of MgADP or K_{ATP} channel openers and inhibiting it in the presence of sulphonylureas (Clement *et al.* 1997; Moreau *et al.* 2005*b*). Stoichiometry control is ensured by the presence on both Kir6.2 and SUR of Arginine-based endoplasmic reticulum (ER) retention signals, allowing only correctly assembled octameric channels to reach the plasma membrane (Zerangue *et al.* 1999).

SUR has strong homologies with other members of subfamily C of ABC proteins. SUR possesses the core domain of ABC proteins (Fig. 1A), composed of two transmembrane domains TMD1 and TMD2 and two cytoplasmic nucleotide binding domains NBD1 and NBD2 (Moreau *et al.* 2005*b*). In addition, it has a supplementary N-terminal transmembrane domain TMD0 composed of five transmembrane helices which is linked to the core ABC domain by a cytosolic loop L0. This domain is found in

J. P. Dupuis and J. Revilloud contributed equally to this work.

This paper has online supplemental material.

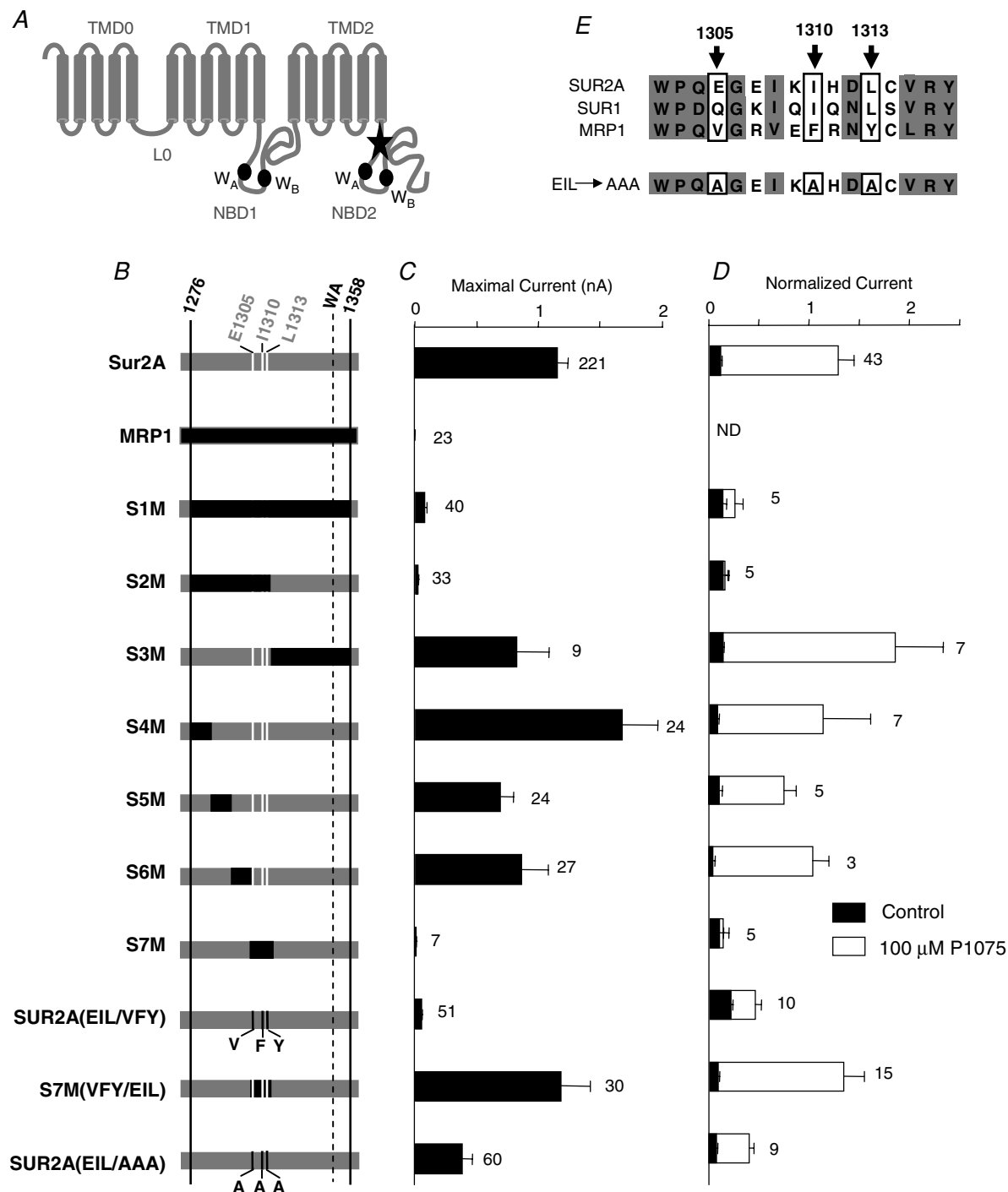


Figure 1. Three C-terminal cytoplasmic residues of SUR2A are essential for K_{ATP} channels proper expression and activation by P1075

A, putative membrane topology of SUR2A (NBD, nucleotide binding domain; W_A , Walker A motif; W_B , Walker B motif). The star indicates the region identified by Rainbow *et al.* (2004a) and mutated to obtain the S1M chimera. **B**, schematic representation of the chimeras. SUR2A and MRP1 elements are drawn in grey and black, respectively. For clarity, residues E1305, I1310 and L1313 are indicated by white stripes. **C**, maximal current amplitudes in absence of nucleotides, and **D**, P1075 responses were measured in inside-out patches excised from oocytes co-expressing Kir6.2 and wild-type or chimeric SURs or MRP1 as indicated. P1075 (100 μ M) was applied in the presence of 100 μ M ATP, and currents were normalized to the current measured in the absence of nucleotides immediately before opener application. Application of 100 μ M ATP alone (black bars) was used as a control. Numbers at right of bars indicate the number of patches included in each average. **E**, alignment of the amino acid sequences of human SUR1, rat SUR2A and human MRP1. Three residues (boxed) are conserved in SURs and not in MRP1: E1305, I1310 and L1313. These residues were replaced in SUR2A by alanines to generate chimera SUR2A(EIL/AAA) at bottom.

other ABC proteins like the multidrug resistance protein MRP1, where both TMD0 and L0 have been reported to play a non-essential role in transport activity (Bakos *et al.* 1998, 2000; Westlake *et al.* 2003) trafficking (Westlake *et al.* 2005) and dimerization (Yang *et al.* 2007). For SUR, TMD0 is indispensable as it is involved in attachment to Kir6.2 (Babenko & Bryan, 2003; Chan *et al.* 2003). Other domains of SUR have also been shown to interact with Kir6.2: the transmembrane domains, which interact with Kir6.2 transmembrane helix M1 and N-terminus (Schwappach *et al.* 2000), TMD2–NBD2 which co-immunoprecipitates with Kir6.2 (Chan *et al.* 2003), and a cytoplasmic region at the TMD2–NBD2 junction (Rainbow *et al.* 2004a).

If SUR/Kir6.2 physical interactions are well documented, little information is available to date on the mechanisms linking both subunits of the K_{ATP} channel, and it remains unclear how nucleotide or drug binding to SUR is converted into Kir6.2 gating modulations. All SUR/Kir6.2 interacting regions identified represent potential transduction pathways to be explored. Solid evidence has already been provided that TMD0 domain and L0 exert a direct influence on Kir6.2 gating (Babenko & Bryan, 2003; Chan *et al.* 2003; Fang *et al.* 2006). However, most of these works concluded that there was a major role of TMD0 in the control of the Kir6.2 open probability (P_o) but none of them defined it as essential in pharmacological responsiveness of the channel, except for the report of a heterozygous mutation in cytoplasmic loop 2, F132L, responsible for changes in ATP and tolbutamide sensitivity (Proks *et al.* 2006). Regions other than TMD0 could therefore be essential in transduction processes. A potential candidate is the 65-residue segment described by Rainbow *et al.* (2004a), located between the last transmembrane helix 17 and NBD2. Indeed, it was described to make a physical interaction with Kir6.2, and co-expression of this fragment with wild-type SUR2A and Kir6.2 prevented proper membrane expression of the channels, suggesting a critical interface disruption in this case (Rainbow *et al.* 2004a,b). These results raise the hypothesis that this C-terminal cytoplasmic segment of SUR2A may be of crucial importance in connecting functionally the two subunits of K_{ATP} channels, and may thereby be a signal transmission pathway linking ligand binding to SUR2A to Kir6.2 gating modulation.

In this study, a chimeric approach between SUR2A and MRP1 was adopted to assess the functional role of an extended 82-residue version of this fragment. We found that responses to K_{ATP} channel openers and MgADP were greatly attenuated. Further studies showed that this phenotype could be conferred by only three residues located near the N-terminus of NBD2. Moreover, mutating these residues did not change channel sensitivity to blockers, suggesting a role for these residues in activation – but not inhibition – transduction processes between SUR2A and Kir6.2.

Parts of this work have been published in abstract form (Dupuis *et al.* 2008).

Methods

Molecular biology

Experimental conditions were essentially as previously described (Moreau *et al.* 2005a). All constructs were derived from mouse Kir6.2 (GenBank accession no. D50581), rat SUR2A (GenBank accession no. D83598) and human MRP1 (GenBank accession no. L05628) and subcloned in *Xenopus* oocyte expression vectors derived from pGEMHE (Liman *et al.* 1992). Mutations were introduced by PCR using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and the coding sequence of each construct was entirely verified by sequencing. The exact amino acid composition of SUR2A–MRP1 chimeric constructs and mutants were: S1M, SUR2A(M1-V1275) + MRP1(E1262-R1342) + SUR2A(M1358-K1545); S2M, SUR2A(M1-V1275) + MRP1(E1262-L1300) + SUR2A(R1316-K1545); S3M, SUR2A(M1-V1315) + MRP1(R1301-R1342) + SUR2A(M1358-K1545); S4M, SUR2A(M1-V1275) + MRP1(E1262-E1271) + SUR2A(S1286-K1545); S5M, SUR2A(M1-E1285) + MRP1(K1272-P1283) + SUR2A(P1299-K1545); S6M, SUR2A(M1-V1298) + MRP1(P1284-G1291) + SUR2A(E1307-K1545); S7M, SUR2A(M1-Q1304) + MRP1(V1290-L1300) + SUR2A(R1316-K1545); SUR2A(EIL/VFY), SUR2A with mutations E1305V, I1310F and L1313Y; S7M(VFY/EIL), S7M with mutations V1305E, F1310I and Y1313L; SUR2A(EIL/AAA), SUR2A with mutations E1305A, I1310A and L1313A.

After amplification and linearization, plasmid DNAs were transcribed *in vitro* using the T7 mMessage mMachine Kit (Ambion) to produce cRNAs for subsequent *Xenopus* oocyte microinjection.

Oocyte preparation and microinjection

Female *Xenopus laevis* were anaesthetized with 3-aminobenzoic acid ethyl ester (1 g l^{-1}) for ~20 min. A mini-laparotomy was then performed: a small incision was cut on the side of the abdomen and several ovarian sacs were removed. The incision was then sutured and the animal was allowed to recover. Each animal was used three times and then killed by decapitation. Animal handling and experiments fully conformed to French regulations and were approved by local governmental veterinary services (authorization no. 28-03-15 from the Ministère de l'Agriculture, Direction des Services Vétérinaires to Michel Vivaudou). Stage V or VI *Xenopus laevis* oocytes were defolliculated by a 60 min incubation at 19°C in a 2 mg ml^{-1} type A collagenase solution (Sigma-Aldrich). Selected oocytes were injected the next

day with cRNAs encoding wild-type Kir6.2 (2 ng) and wild-type or chimeric SURs (6 ng). Injected oocytes were then stored at 19°C in Barth's solution (KCl 1 mM, MgSO₄ 0.82 mM, NaCl 88 mM, NaHCO₃ 2.4 mM, CaCl₂ 0.41 mM, Ca(NO₃)₂ 0.3 mM, Hepes 16 mM, pH 7.4) supplemented with 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin and 100 µg ml⁻¹ gentamycin.

Electrophysiology

Three to five days after injection, oocytes were manually devitellinized and channels were characterized by the patch-clamp technique in the excised inside-out configuration at room temperature using a RK300 amplifier (BioLogic) and a Digidata 1322A acquisition system with Axoscope 9 software (Axon Instruments). Patch pipettes contained: 154 mM K⁺, 146 mM Cl⁻, 5 mM Mg²⁺ and 10 mM Pipes-KOH (pH 7.1). The cytoplasmic face of the patch was bathed in solutions containing 174 mM K⁺, 40 mM Cl⁻, 1 mM EGTA, 1 mM Mg²⁺, 10 mM Pipes-KOH (pH 7.1) and methanesulphonate as the remaining anion. ATP, ADP, SR47063, P1075 and glibenclamide were added as specified. Membrane potential was held at -50 mV during all experiments. Application of various solutions to the patch was performed using a RSC-100 automated sewer pipes system (Bio-Logic; Vivaudou & Forestier, 1995). Pipe switching time was set at 250 ms. Data acquisition and analysis were performed using in-house software. Baseline fluctuations were removed by interactive fitting with a spline curve and subtraction of this fit with the signal. Non-linear curve fittings were performed with Origin software (OriginLab). The following standard Hill equations were used for fitting.

For activation by openers:

$$f(|X|) = i_0 + i_{\max}/[1 + (K_{1/2}/|X|)^h] \quad (1)$$

where $|X|$ is the concentration of activator, i_0 is the control normalized current in absence of activator, i_{\max} is the maximal activator-induced current, $K_{1/2}$ the concentration for half-maximal activation and h the Hill coefficient.

For inhibition by nucleotides and glibenclamide:

$$f(|X|) = i_0/[1 + (|X|/K_{1/2})^h] \quad (2)$$

where $|X|$ is the concentration of inhibitor, i_0 is the control normalized current in absence of inhibitor, $K_{1/2}$ the concentration for half-maximal inhibition and h the Hill coefficient.

For combined activation and inhibition by ADP:

$$f(|ADP|) = i_0 + i_{\max}/[1 + (K_{a1/2}/|ADP|)^{h_a}] \times [1 + (|ADP|/K_{i1/2})^{h_i}] \quad (3)$$

where i_0 is the control normalized current in the absence of ADP, i_{\max} is the current that would be obtained if inhibition was absent, $K_{a1/2}$ the concentration for half-maximal

activation, h_a the Hill coefficient for activation, $K_{1/2}$ the concentration for half-maximal inhibition, and h_i the Hill coefficient for inhibition.

Results are displayed as mean ± s.e.m. Error bars in figures represent s.e.m. and are only shown if greater than symbols.

Results

Implication of three C-terminal residues of SUR2A in K_{ATP} channel expression and activation by P1075

The aim of this work was to assess whether the proximal C-terminal Kir6.2-interacting segment of SUR2A (Fig. 1A), described by Rainbow *et al.* (2004a) as responsible for disrupting association between K_{ATP} channel subunits SUR2A and Kir6.2, could be implicated in the allosteric transmission processes linking effectors binding on SUR2A to Kir6.2 gating. In order to address this question, we pursued an approach based on the construction of chimeras between the cardiac muscle isoform SUR2A and its close homologue the multidrug resistance protein 1 (MRP1). MRP1 was the ideal candidate for the development of this kind of strategy because it is very homologous to SUR isoforms but exerts neither physical nor functional influence on Kir6.2. In contrast, SUR2A is exclusively expressed in association with Kir6.2 and is dedicated to its regulation.

Our strategy, illustrated in Fig. 1B, consisted of co-expressing wild-type or chimeric SUR2A with wild-type Kir6.2 in *Xenopus* oocytes. Using the patch-clamp technique in the inside-out configuration, the resulting K_{ATP} channels were monitored both for maximal currents (Fig. 1C) and change in activity produced by a saturating dose (100 µM) of the pinacidil analogue P1075 (Fig. 1D), as reporters of channel surface expression and functionality, respectively. As demonstrated in the following, these two parameters proved appropriate to discriminate between SUR2A and mutant phenotypes since nearly all of our constructs gave clear responses to both assays. As expected, whereas Kir6.2/SUR2A channels were characterized by nanoamp-amplitude currents (1150 ± 90 pA), no Kir6.2/MRP1 currents could be recorded (Fig. 1C). Moreover, in the presence of 100 µM ATP (sufficient to produce 90% channel inhibition in most cases) a concentration of 100 µM P1075 strongly activated the Kir6.2/SUR2A channels (Fig. 1C). P1075 response was not tested on Kir6.2/MRP1 channels since no currents were recordable. In the same conditions, we next tested the S1M chimera, consisting SUR2A with an 82-residue TMD2-NBD2 region replaced by the homologous part of MRP1. This first chimera was poorly expressed since only very small currents could be recorded (72 ± 20 pA). It was also weakly activated by 100 µM P1075 (Fig. 1C),

and therefore displayed what we designate as a MRP1-like phenotype.

We then replaced progressively shorter regions of SUR2A with their corresponding segments in MRP1. The S1M segment was split into two equal parts to generate chimeras S2M and S3M, as illustrated in Fig. 1B. Chimera S2M displayed the same small currents and weak P1075 activation phenotype, whereas the S3M chimera was found to produce nanoamp-size currents and to retain full sensitivity to P1075. The same splitting procedure was applied to the S2M segment to obtain four chimeras: S4M, S5M, S6M and S7M, respectively. Chimeras S4M, S5M and S6M showed a Kir6.2/SUR2A phenotype. This was not the case for chimera S7M which showed the same MRP1-like defective phenotype as observed for chimeras S1M and S2M.

Primary sequence alignments of SUR isoforms and MRP1 within a 16-residue region encompassing the S7M segment revealed a high conservation as shown in Fig. 1E. Three residues within this segment were found to be similar in SURs but different in MRP1: E1305, I1310 and L1313 of SUR2A. Alignment of SUR2A with Sav1866 (Dawson & Locher, 2006) and MsbA (Ward *et al.* 2007) reveals that the three residues stand before (E1305) and within the first β -sheet in the N-terminus of NBD2 (I1310 and L1313), respectively (see online Supplemental Fig. 1). These three residues were swapped between SUR2A and MRP1 to generate construct SUR2A(EIL/VFY). Figure 1C and D shows that this construct resembled chimera S7M, with low currents (49 ± 11 pA) and weak activation by P1075, leading to the conclusion that mutating these residues is sufficient to confer a MRP1-like deficient phenotype. To confirm this hypothesis, we reintroduced the initial SUR2A residues in the S7M chimera, generating S7M(VFY/EIL). This construct proved to be fully responsive to P1075 and displayed wild-type-like amplitude currents. This phenotype reversion validated the essential role of residues E1305, I1310 and L1313 in current levels and P1075 sensitivity of Kir6.2/SUR2A K_{ATP} channels. Mutating fewer residues proved not to be successful since all constructs mutated for less than three residues (for example SUR2A(IL/FY), data not shown) proved to display intermediate phenotypes.

Two main hypotheses can explain altered P1075 sensitivity. The first one is that mutating these three amino acids is sufficient to instigate a disruption in the physical association between SUR2A and Kir6.2 subunits, which would be in good accordance with previous work by Rainbow *et al.* (2004a). The second possibility is that these three residues stand at the SUR2A–Kir6.2 interface and mediate signal transduction. In order to see whether side-chain sizes could be of importance in physical association – in which case reducing their sizes might restore association and channel activity – we mutated

residues E1305, I1310 and L1313 to alanines, generating construct SUR2A(EIL/AAA). This construct yielded much larger currents than Kir6.2/SUR2A(EIL/VFY) (420 ± 90 pA *versus* 49 ± 11 pA, respectively) but was significantly less activated by P1075 than wild-type channels (Student's *t* test; $P < 0.00001$) (Figs 1C, and 2A

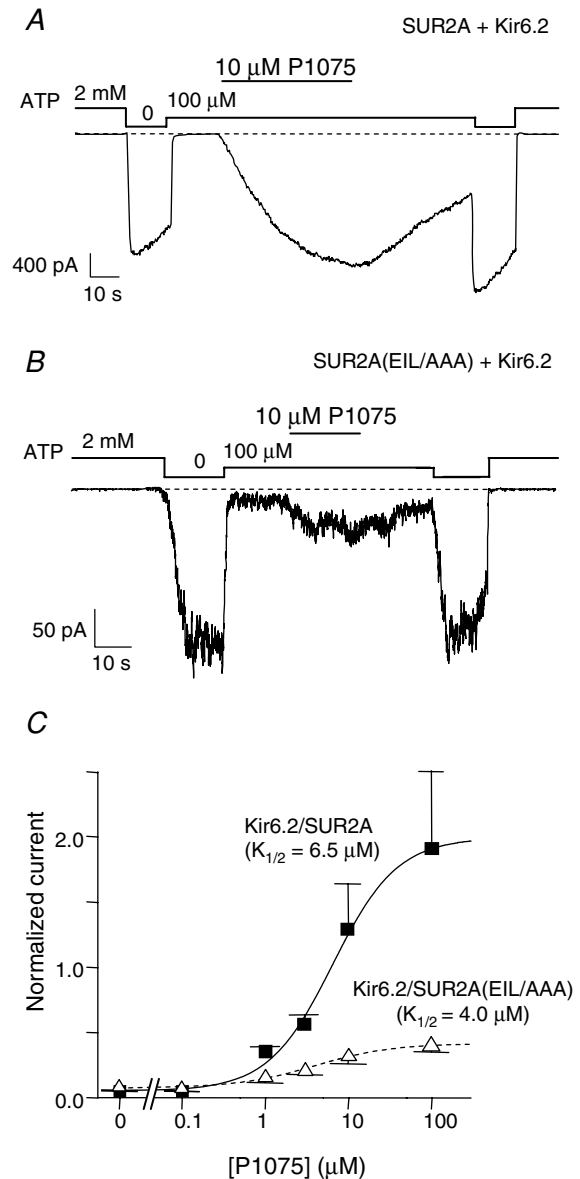


Figure 2. Mutation to alanines of residues E1305, I1310 and L1313 in SUR2A reduces drastically the extent of activation by P1075 without changing affinity

A and B, representative patch-clamp recordings illustrating the responses of wild-type (A) and SUR2A(EIL/AAA) (B) channels to 10 μM P1075 in the presence of 100 μM ATP. C, mean P1075 dose–response relationships for Kir6.2/SUR2A (■) and Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) (△) in the presence of 100 μM ATP. Currents were normalized to the current measured in 0 ATP before application of ATP and opener. Each point represents data from 6 patches for Kir6.2/SUR2A and 8 patches for Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). Fitting using eqn (1) yielded $K_{1/2} = 6.5 \pm 1.3$ μM ($h = 1.1 \pm 0.2$) for Kir6.2/SUR2A and $K_{1/2} = 4.0 \pm 1$ μM ($h = 0.94 \pm 0.2$) for Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA).

and B). This result suggests that physical association is near normal in the SUR2A(EIL/AAA) construct, but that P1075 binding or functional coupling is altered by the triple mutation.

To examine whether mutagenesis altered drug binding, we submitted wild-type and mutant channels

to increasing P1075 concentrations to evaluate affinity (Fig. 2C). P1075 apparent affinities appeared to be very similar for Kir6.2/SUR2A ($K_{1/2} = 6.5 \mu\text{M}$), Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) ($K_{1/2} = 4.0 \mu\text{M}$), and Kir6.2/SUR2A(EIL/VFY) ($K_{1/2} = 8.0 \mu\text{M}$, data not shown) channels suggesting that mutations did not alter P1075 binding to SUR2A.

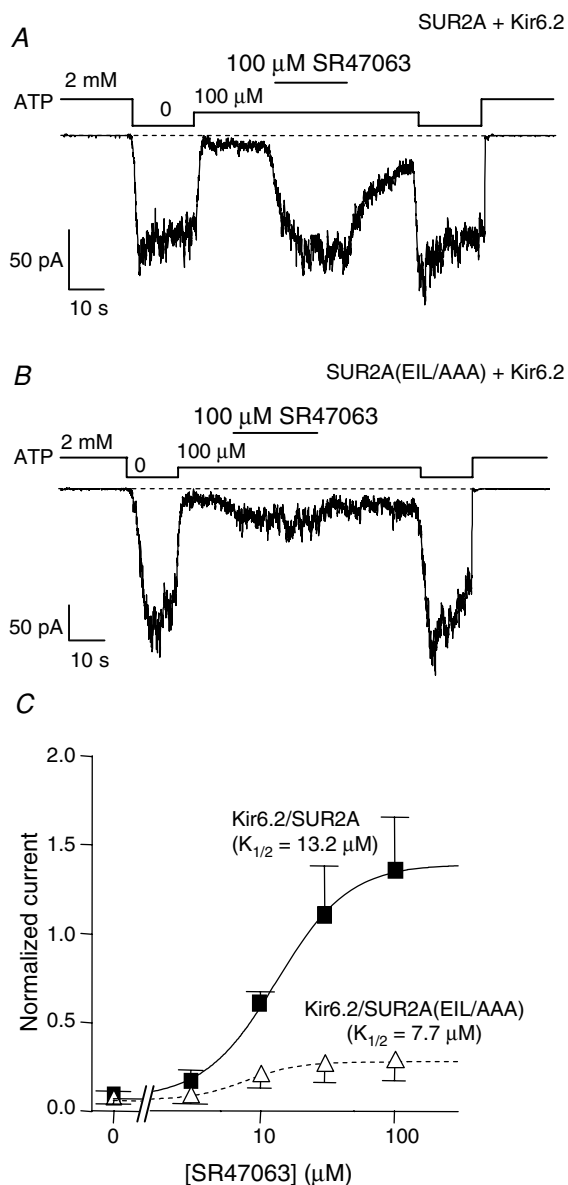


Figure 3. SUR2A(EIL/AAA) channels show severe SR47063 activation defects without change in affinity

A and B, representative patch-clamp recordings illustrating the responses of wild-type and SUR2A(EIL/AAA) channels to $100 \mu\text{M}$ SR47063 in the presence of $100 \mu\text{M}$ ATP. C, mean SR47063 dose–response relationships for Kir6.2/SUR2A (■) and Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) (△) in the presence of $100 \mu\text{M}$ ATP. Currents were normalized to the current measured in 0 ATP before application of ATP and opener. Each point represents data from 3 patches for Kir6.2/SUR2A and 5 patches for Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). Fitting using eqn (1) yielded $K_{1/2} = 13.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$ ($h = 1.61 \pm 0.2$) for Kir6.2/SUR2A and $K_{1/2} = 7.7 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ($h = 2.2 \pm 0.4$) for Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA).

SUR2A(EIL/AAA) channels show severe SR47063 activation defects without change in drug affinity

We also tested the ability of the SUR2A(EIL/AAA) mutant to respond to SR47063, another K_{ATP} channel opener from the benzopyran family. In the presence of $100 \mu\text{M}$ ATP, $100 \mu\text{M}$ SR47063 robustly activated the Kir6.2/SUR2A channels but activated Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) channels to a much lesser extent (14.3 ± 1.3 - versus 4.7 ± 0.6 -fold activation, respectively, $P < 0.000001$, data not shown) as illustrated in Fig. 3A and B. Both mutant and wild-type channels were submitted to increasing concentrations of SR47063, and dose–response curves indicated little difference in SR47063 apparent affinity between Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) ($K_{1/2} = 7.7 \mu\text{M}$), Kir6.2/SUR2A(EIL/VFY) ($K_{1/2} = 7 \mu\text{M}$, data not shown) and Kir6.2/SUR2A ($K_{1/2} = 13.2 \mu\text{M}$), suggesting that mutations did not alter SR47063 binding to SUR2A. Therefore, it seems as if Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) channels are no longer able to convert SR47063 binding at SUR2A into Kir6.2 activation.

E1305, I1310 and L1313 triple mutations in SUR2A abolish MgADP activation

In the cell environment, K_{ATP} channels are physiologically activated by MgADP. Both Kir6.2 and SUR2A possess cytoplasmic nucleotide-binding domains that are inhibitory and activatory, respectively. For submillimolar MgADP, the balance of the two effects leans toward activation. Subunit uncoupling should shift the effect of MgADP toward inhibition. The MgADP response of Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) channels was therefore tested and compared to that of wild-type channels and of Kir6.2 channels truncated of their 36 C-terminal residues (Kir6.2 Δ C36) that form SUR-less channels (Tucker *et al.* 1997). As shown in Fig. 4, wild-type channels were strongly activated by $100 \mu\text{M}$ MgADP whereas SUR2A(EIL/AAA) channels were clearly inhibited, much like Kir6.2 alone. Over the full range of ADP, wild-type channels are activated at the lower concentrations and inhibited at the higher concentrations reflecting the combination of SUR-mediated activation and Kir6.2-mediated inhibition. For SUR2A(EIL/AAA) channels, activation is abolished and ADP only retains its inhibitory effect. Therefore, our results suggest that SUR2A(EIL/AAA) channels behave

towards MgADP as if SUR2A was still physically present but unable to balance MgADP inhibitory action on Kir6.2 by exerting its activating influence anymore.

Inhibitory mechanisms are not affected by E1305/I1310/L1313 triple mutations

Having tested a range of channel activators, which were all inefficient at activating Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) channels, we examined their sensitivities to the inhibitory actions of ATP and glibenclamide. As illustrated in Fig. 5A, patches were first exposed to increasing concentrations of ATP. Kir6.2/SUR2A channels were blocked by ATP with a K_i of $15 \mu\text{M}$, and Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) channels proved to have a very similar K_i of $12.1 \mu\text{M}$, showing no real difference in ATP inhibition sensitivity between both channel populations. Moreover, application of 300 nM glibenclamide, a dose sufficient to produce 90% inhibition of Kir6.2/SUR2A channels (Fig. 5B), induced a clear wild-type-like inhibition of Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) channels both in the absence

(data not shown) and the presence of ATP ($10 \mu\text{M}$). As illustrated in Fig. 5C, glibenclamide sensitivity was similar for both Kir6.2/SUR2A ($K_i = 16 \text{ nM}$) and Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) ($K_i = 8.2 \text{ nM}$) channels. Unchanged sensitivities both for ATP and glibenclamide raise the conclusion that inhibitory mechanisms are probably unaffected by mutations E1305/I1310/L1313 to alanines.

Discussion

Within the K_{ATP} channel complex, little information is available on the molecular mechanisms involved in cross-regulation of both subunits, and it remains unclear how nucleotide or drug binding to SUR is converted into Kir6.2 gating modulations. In this study, we identified three SUR2A residues, E1305 I1310 and L1313, that are intimately involved in K_{ATP} channel activation both by K^+ channel openers (P1075, SR47063) and MgADP. These residues could possibly form part of a transduction pathway functionally coupling SUR2A and Kir6.2 subunits

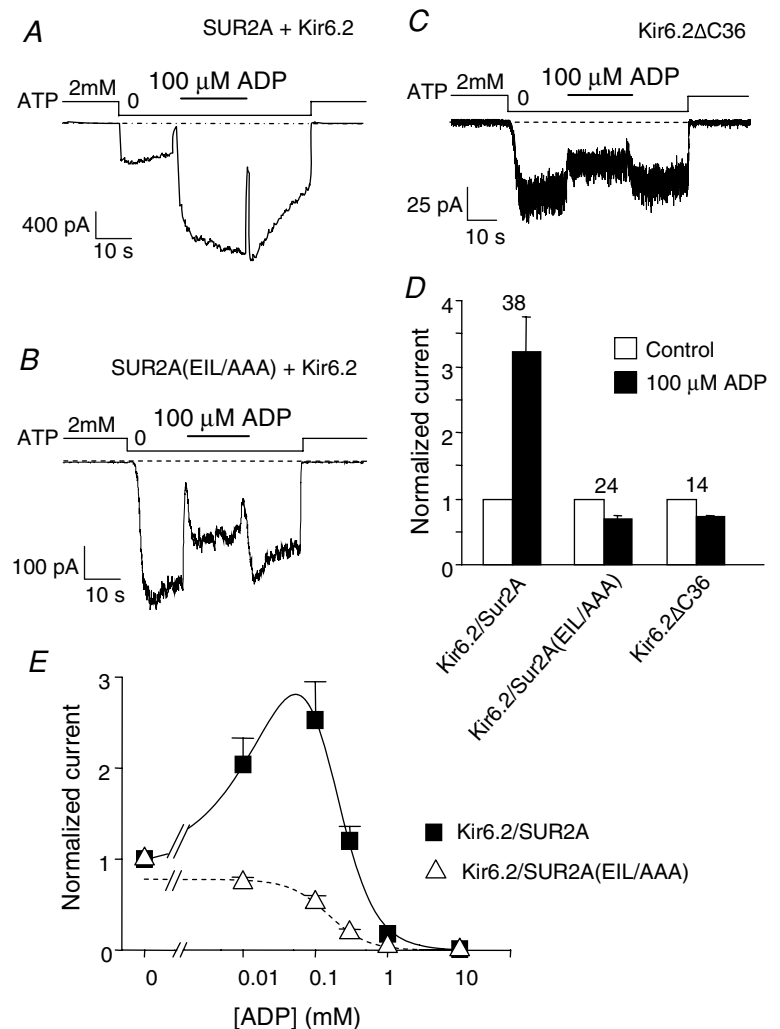


Figure 4. E1305, I1310 and L1313 triple mutations in SUR2A abolish MgADP activation

A–C, representative currents recorded in inside-out patches from *Xenopus* oocytes expressing either Kir6.2/SUR2A (A), Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) (B) or Kir6.2 Δ C36 (C). MgADP ($100 \mu\text{M}$) was applied in the absence of ATP. D, average normalized currents for Kir6.2/SUR2A, Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) and Kir6.2 Δ C36 measured before (open bars) and after (filled bars) application of $100 \mu\text{M}$ MgADP in the absence of nucleotides. Numbers above bars indicate the number of patches included in the averages. E, MgADP dose–response relationships for Kir6.2/SUR2A (\blacksquare) and Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) (\triangle) in the absence of ATP. Currents were normalized to the current measured in 0 ATP. Each point represents data from 5 to 15 patches for Kir6.2/SUR2A and 5–14 patches for Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). Fitting of eqn (3) to the Kir6.2/SUR2A data yielded $K_{a1/2} = 124 \pm 9 \mu\text{M}$ ($h_a = 0.94 \pm 0.03$) and $K_{i1/2} = 230 \pm 6 \mu\text{M}$ ($h_i = 1.93 \pm 0.05$). Fitting of eqn (2) to the Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) data yielded $K_{1/2} = 152 \pm 16 \mu\text{M}$ ($h = 1.6 \pm 0.2$).

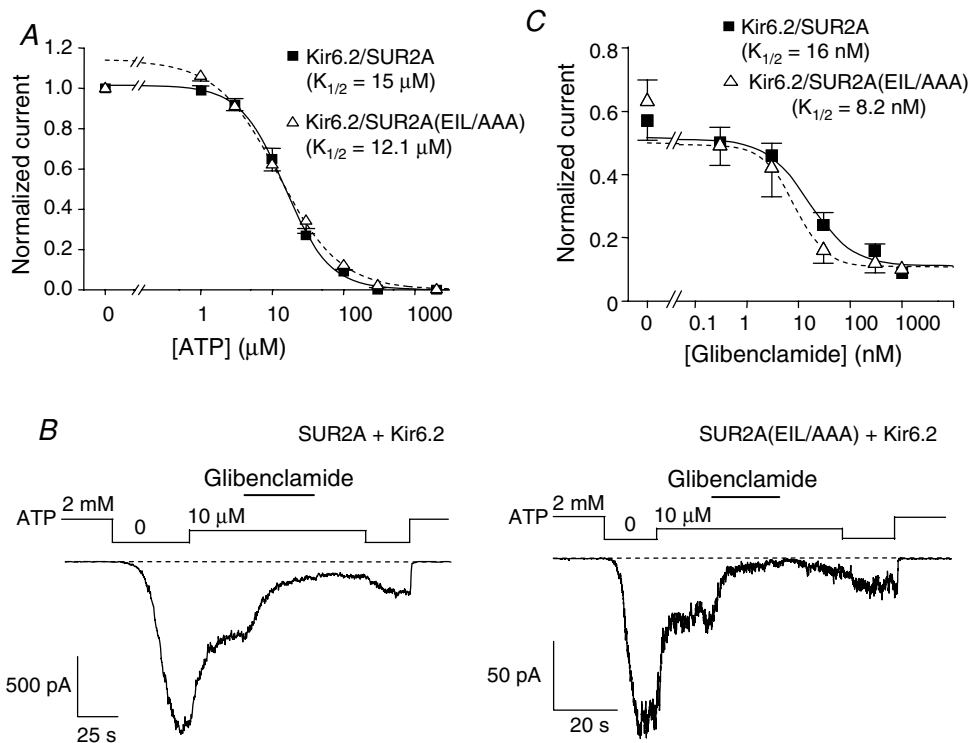


Figure 5. SUR2A(EIL/AAA) channels respond like wild-type to ATP and glibenclamide

A, ATP dose–response relationships for Kir6.2/SUR2A (■) and Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) (△). Currents were normalized to the current measured in 0 ATP. Each point represents data from 21–44 patches for Kir6.2/SUR2A and 8–28 patches for Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). Fitting of eqn (2) yielded $K_{1/2} = 15 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ($h = 1.39 \pm 0.07$) for Kir6.2/SUR2A and $K_{1/2} = 12.1 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ($h = 1.01 \pm 0.05$) for Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). B, representative currents recorded in inside-out patches from *Xenopus* oocytes expressing either Kir6.2/SUR2A or Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). Glibenclamide (300 nM) was applied in the presence of 10 μM ATP. C, glibenclamide dose–response relationships for Kir6.2/SUR2A (■) and Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) (△) in the presence of 10 μM ATP. Currents were normalized to the current measured in 0 ATP. Each point represents data from 5–12 patches for Kir6.2/SUR2A and 4–7 patches for Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA). Fitting of eqn (2) yielded $K_{1/2} = 16 \pm 9.5 \mu\text{M}$ ($h = 1.04 \pm 0.6$) for Kir6.2/SUR2A and $K_{1/2} = 8.2 \pm 1.4 \mu\text{M}$ ($h = 1.43 \pm 0.19$) for Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA).

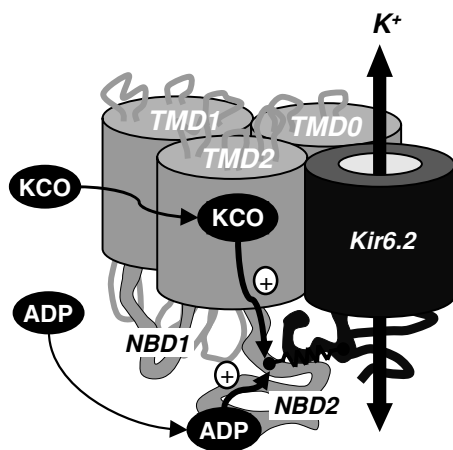


Figure 6. TMD2–NBD2 linker as a common pathway for activator between SUR2A and Kir6.2

In this highly schematic model of the Kir6.2–SUR2A complex, both TMD0 and TMD2 interact with Kir6.2 and contribute to signal transmission. Binding of KCOs (P1075, SR47063) at transmembrane helix 17 of TMD2 or MgADP at NBD2 triggers Kir6.2 activation through a cytoplasmic link between SUR2A C-terminus and Kir6.2 cytosolic regions.

through the cytosolic segment of SUR2A interconnecting transmembrane helix 17 to NBD2.

Residues E1305, I1310 and L1313 are critical for SUR2A–Kir6.2 association

The critical role of residues E1305, I1310 and L1313 was discovered by following a systematic chimeric strategy designed to address the question whether a TMD2–NBD2 interconnecting fragment of SUR2A previously described to be in interaction with Kir6.2 could play a role in channel expression and regulation. Chimeras incorporating progressively shorter fragments of MRP1 in a SUR2A background led to the finding that these three residues are associated with a reduction in channel expression. This expression defect agrees with the observations of Rainbow *et al.* (2004a) and argues in favour of these residues being part of a critical Kir6.2-interacting region. Nevertheless, we observed that replacing E1305, I1310 and L1313 by AAA rather than VFY had less drastic consequences on surface expression as shown by the larger

SUR2A(EIL/AAA) currents. It is noteworthy that mutation of SUR1 I1350 – cognate to SUR2A L1313 highlighted here – to a glutamine (L1350Q) is found in patients suffering from congenital hyperinsulinism and seems to induce the disease by preventing surface expression of K_{ATP} channels in pancreatic β -cells (Yan *et al.* 2007). Taken together, these results show that residues E1305, I1310 and L1313 are not absolutely essential for physical association, since mutating them to alanines only partly alters surface expression, but suggest that they are likely to stand at the interface between SUR2A and Kir6.2.

Proximal C-terminus of SUR2A is involved in the activation processes linking ligand binding to SUR2A and Kir6.2 gating modifications

Since all SUR–Kir6.2 interfacing regions represent potential transduction pathways to be explored, as illustrated by the involvement of Kir6.2-interacting TMD0/L0 in channel gating (Fang *et al.* 2006), the question arose of the role of the three previously identified residues in channel regulation. Characterization of Kir6.2/SUR2A(EIL/AAA) channels revealed that responses to the pinacidil analogue P1075, to the cromakalim analogue SR47063 and to the physiological K_{ATP} channel activator MgADP were drastically reduced compared to wild-type. Since the experiments performed were purely functional, we asked whether these residues act at the binding step or at the transducing step between binding and channel activation. The former hypothesis is not improbable since the mutated residues lie in proximity to the presumed K_{ATP} channel openers (KCOs) and ADP binding sites, located at transmembrane helix 17 (Moreau *et al.* 2000) and NBD2 (Matsuo *et al.* 2005), respectively. For synthetic openers, this hypothesis is contradicted by the experimental evidence showing that triple mutations induced no significant changes in affinity. For ADP, activation being abolished, it is not possible to compare affinities and it is conceivable that ADP unresponsiveness could arise from an altered interaction with the NBDs. However, the fact that both KCOs and MgADP were similarly affected by the triple mutations even though they probably bind to distinct sites on SUR argues in favour of a perturbation of a common pathway downstream of the binding sites. We therefore feel that the most appropriate interpretation of our results is that residues E1305, I1310 and L1313 are part of the transducing machinery linking effectors binding to SUR and Kir6.2 activation.

One may point out that, if the S7M chimera remained weakly responsive to KCOs (Fig. 1D), mutation of these three residues did not completely abolish the responses to P1075 and SR47063, suggesting that other unknown determinants exist in the proximal region investigated. Anyhow, the residual effects were very weak,

implying that these other determinants are of minor importance compared with residues E1305, I1310 and L1313. Conversely, restoration of these residues in the S7M MRP1-like phenotype chimera was sufficient to reverse the unresponsiveness to activators and restored both KCOs and MgADP activation as shown for P1075 (data not shown for SR47063 and MgADP). While we are aware of the pitfalls of overinterpreting mutagenesis results, the combination of experiments showing both loss-of-function in the SUR2A context and gain-of-function in the S7M chimera context argues strongly in favour of the implication of residues E1305, I1310 and L1313 in the activation processes instigated by KCOs and MgADP.

K_{ATP} channel activation and inhibition processes may rely on distinct transduction pathways

To date, K_{ATP} channel activation and inhibition processes are poorly understood, and it is hard to define whether they rely on a single or multiple pathways linking SUR2A and Kir6.2. Recently, an aspartate/glutamate-rich stretch located after NBD1 in SUR2A (residues 948–962) was described as critical both for activation (MgADP, KCOs) and inhibition (glibenclamide) processes (Karger *et al.* 2008). This stretch could form part of a common transduction pathway in association with either the TMD0 domain or/and the C-terminal region investigated in our work, which were both reported to interact with Kir6.2. However, we surprisingly observed that mutating the proximal C-terminus of SUR2A resulted in impaired K_{ATP} channel activation but not inhibition. Indeed, contrary to activators (MgADP, KCOs), both ATP and glibenclamide inhibition were unaffected by our mutations. These observations definitely invalidate a single-pathway model and are much more in accordance with the idea that multiple transduction pathways functionally linking SUR2A to Kir6.2 may exist: one for activation processes, which we believe act through the SUR2A TMD2–NBD2 linker (Fig. 6), and distinct pathways for inhibition processes which could implicate the TMD0 domain. Only a representative sample of effectors was tested here, and whether other functional processes act through yet unknown pathways remains to be determined and will require further investigations. However, these results suggest that, within the K_{ATP} channel complex, the proximal C-terminus of SUR2A is a critical link between ligand binding to SUR and Kir6.2 up-regulation.

References

- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, Gonzalez G *et al.* (1995). Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423–426.

- Alekseev AE, Hodgson DM, Karger AB, Park S, Zingman LV & Terzic A (2005). ATP-sensitive K⁺ channel channel/enzyme multimer: metabolic gating in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **38**, 895–905.
- Ashcroft FM, Harrison DE & Ashcroft SJ (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. *Nature* **312**, 446–448.
- Babenko AP & Bryan J (2003). SUR domains that associate with and gate K_{ATP} pores define a novel gatekeeper. *J Biol Chem* **278**, 41577–41580.
- Bakos E, Evers R, Calenda G, Tusnady GE, Szakacs G, Varadi A *et al.* (2000). Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci* **113**, 4451–4461.
- Bakos E, Evers R, Szakacs G, Tusnady GE, Welker E, Szabo K *et al.* (1998). Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem* **273**, 32167–32175.
- Chan KW, Zhang H & Logothetis DE (2003). N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *EMBO J* **22**, 3833–3843.
- Clement JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L *et al.* (1997). Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron* **18**, 827–838.
- Dawson RJ & Locher KP (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**, 180–185.
- Dupuis J, Revilloud J, Moreau C & Vivaudou M (2008). Three C-terminal residues from the sulphonylurea receptor contribute to the functional coupling between the K_{ATP} channel subunits SUR2A and Kir6.2. *Biophysical J* **94**, 435a.
- Fang K, Csanady L & Chan KW (2006). The N-terminal transmembrane domain (TMD0) and a cytosolic linker (L0) of sulphonylurea receptor define the unique intrinsic gating of K_{ATP} channels. *J Physiol* **576**, 379–389.
- Inagaki N, Gono T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G *et al.* (1995). Reconstitution of I-KATP: an inward rectifier subunit plus the sulphonylurea receptor. *Science* **270**, 1166–1170.
- Jahangir A & Terzic A (2005). K_{ATP} channel therapeutics at the bedside. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 99–112.
- Karger AB, Park S, Reyes S, Bienengraeber M, Dyer RB, Terzic A *et al.* (2008). Role for SUR2A ED domain in allosteric coupling within the K_{ATP} channel complex. *J Gen Physiol* **131**, 185–196.
- Liman ER, Tytgat J & Hess P (1992). Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**, 861–871.
- Matsuo M, Kimura Y & Ueda K (2005). K_{ATP} channel interaction with adenine nucleotides. *J Mol Cell Cardiol* **38**, 907–916.
- Moreau C, Gally F, Jacquet-Bouix H & Vivaudou M (2005a). The size of a single residue of the sulphonylurea receptor dictates the effectiveness of K_{ATP} channel openers. *Mol Pharmacol* **67**, 1026–1033.
- Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'Hahan N & Vivaudou M (2000). The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *EMBO J* **19**, 6644–6651.
- Moreau C, Prost AL, Derand R & Vivaudou M (2005b). SUR, ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers. *J Mol Cell Cardiol* **38**, 951–963.
- Nichols CG (2006). K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* **440**, 470–476.
- Proks P, Arnold AL, Bruining J, Girard C, Flanagan SE, Larkin B *et al.* (2006). A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes. *Hum Mol Genet* **15**, 1793–1800.
- Rainbow RD, James M, Hudman D, Al-Johi M, Singh H, Watson PJ *et al.* (2004a). Proximal C-terminal domain of sulphonylurea receptor 2A interacts with pore-forming Kir6 subunits in K_{ATP} channels. *Biochem J* **379**, 173–181.
- Rainbow RD, Lodwick D, Hudman D, Davies NW, Norman RI & Standen NB (2004b). SUR2A C-terminal fragments reduce K_{ATP} currents and ischaemic tolerance of rat cardiac myocytes. *J Physiol* **557**, 785–794.
- Schwappach B, Zerangue N, Jan YN & Jan LY (2000). Molecular basis for K_{ATP} assembly: transmembrane interactions mediate association of a K⁺ channel with an ABC transporter. *Neuron* **26**, 155–167.
- Seino S & Miki T (2003). Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol* **81**, 133–176.
- Tarasov A, Dusonchet J & Ashcroft F (2004). Metabolic regulation of the pancreatic β -cell ATP-sensitive K⁺ channel – a pas de deux. *Diabetes* **53**, S113–S122.
- Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S & Ashcroft FM (1997). Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* **387**, 179–183.
- Vivaudou M & Forestier C (1995). Modification by protons of frog skeletal muscle K_{ATP} channels: effects on ion conduction and nucleotide inhibition. *J Physiol* **486**, 629–645.
- Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB & Chang G (2007). Flexibility in the ABC transporter MsbA: alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19005–19010.
- Westlake CJ, Cole SP & Deeley RG (2005). Role of the NH₂-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. *Mol Biol Cell* **16**, 2483–2492.
- Westlake CJ, Qian YM, Gao M, Vasa M, Cole SP & Deeley RG (2003). Identification of the structural and functional boundaries of the multidrug resistance protein 1 cytoplasmic loop 3. *Biochemistry* **42**, 14099–14113.
- Yamada S, Kane GC, Behfar A, Liu XK, Dyer RB, Faustino RS *et al.* (2006). Protection conferred by myocardial ATP-sensitive K⁺ channels in pressure overload-induced congestive heart failure revealed in KCNJ11 Kir6.2-null mutant. *J Physiol* **577**, 1053–1065.
- Yang YY, Liu Y, Dong ZZ, Xu JK, Peng H, Liu ZQ *et al.* (2007). Regulation of function by dimerization through the amino-terminal membrane-spanning domain of human ABCC1/MRP1. *J Biol Chem* **282**, 8821–8830.
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN & Jan LY (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels. *Neuron* **22**, 537–548.

Coupling ion channels to receptors for biomolecule sensing

CHRISTOPHE J. MOREAU^{1*}, JULIEN P. DUPUIS¹, JEAN REVILLOUD¹, KARTHIK ARUMUGAM²
AND MICHEL VIVAUDOU^{1*}

¹Laboratoire des Protéines Membranaires, Institut de Biologie Structurale (CEA, CNRS, UJF), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France

²Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA/Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38041 Grenoble, France

*e-mail: vivaudou@cea.fr; christophe.moreau@ibs.fr

Published online: 7 September 2008; doi:10.1038/nnano.2008.242

Nanoscale electrical biosensors are promising tools for diagnostics and high-throughput screening systems. The electrical signal allows label-free assays with a high signal-to-noise ratio and fast real-time measurements. The challenge in developing such biosensors lies in functionally connecting a molecule detector to an electrical switch. Advances in this field have relied on synthetic ion-conducting pores¹ and modified ion channels^{2–4} that are not yet suitable for biomolecule screening. Here we report the design and characterization of a novel bioelectric-sensing platform engineered by coupling an ion channel, which serves as the electrical probe, to G-protein-coupled receptors (GPCRs), a family of receptors that detect molecules outside the cell. These ion-channel-coupled receptors may potentially detect a wide range of ligands recognized by natural or altered GPCRs^{5,6}, which are known to be major pharmaceutical targets⁷. This could form a unique platform for label-free drug screening⁸.

A natural sensor of cell metabolism is the adenosine triphosphate (ATP)-sensitive potassium channel (K_{ATP}), which is made up of two structurally unrelated membrane proteins: the inward-rectifier K^+ channel, Kir6.2, and the sulfonylurea receptor (SUR)⁹. In the K_{ATP} channel, Kir6.2 and SUR are functionally coupled so that binding of metabolites or pharmacological agents to SUR modulates the opening and closing of Kir6.2^{10,11}. Inspired by this rather unique design, we postulated that, if SUR could be replaced by another receptor such as a G-protein-coupled receptor (GPCR), an ion channel sensitive to GPCR ligands could be created and utilized to convert chemical information into an electrical signal (Fig. 1a and b).

The first ion-channel-coupled receptors (ICCRs) were created between a well-studied GPCR known as the muscarinic M2 receptor, which, in the heart, acts to slow down the heart rate after stimulation, and Kir6.2 (ref. 12). In addition to being a part of the K_{ATP} channel, Kir6.2 is a relatively simple, well-studied K^+ channel that has the unique signature of being inhibited by intracellular ATP (ref. 13). This convenient feature provides a straightforward way to identify the channel and control its open probability. To coerce M2 and Kir6.2 into a dialogue, we created fusion proteins by attaching the cytosolic carboxy-terminus (C-ter) of the receptor to the amino-terminus (N-ter) of the ion channel. The linkage was engineered either by the addition of hexaglycines or by short terminal deletions (Fig. 2a) that we

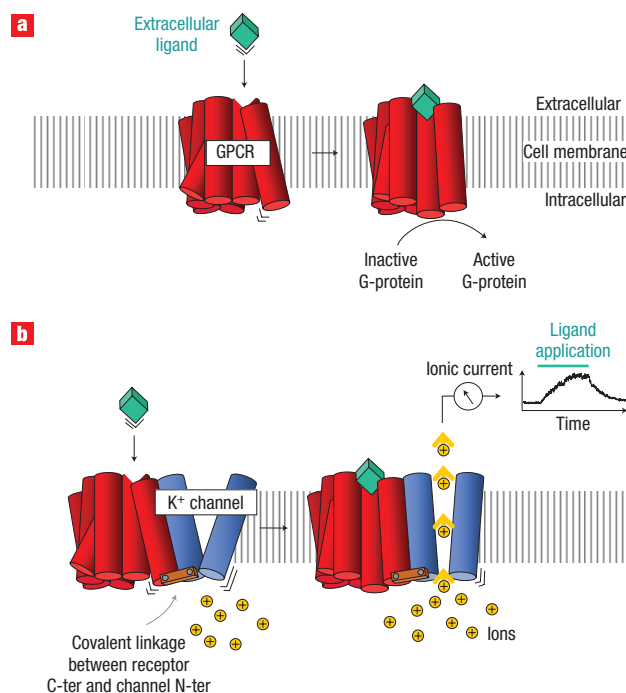


Figure 1 Principle of ion-channel-coupled receptors (ICCRs). **a**, Upon binding of its ligand at an extracellular site, a transmembrane G-protein-coupled receptor (GPCR) adopts a new conformation that triggers activation of intracellular G-proteins. **b**, In an ICCR, the GPCR is attached to an ion channel in such a way that both proteins are mechanically coupled. When the GPCR binds a ligand and changes conformation, this change is directly transmitted to the channel and results in a change in gating and in the ionic current through the channel (see Supplementary Information).

reasoned might favour physical cross-talk. Initially, we used Kir6.2 with its last 36 residues¹⁴ deleted (designated $K\Delta$) to eliminate an endoplasmic reticulum retention signal that prevents expression of Kir6.2 at the cell surface when it is not associated with its natural partner, SUR¹⁵. Unexpectedly, whole-cell current

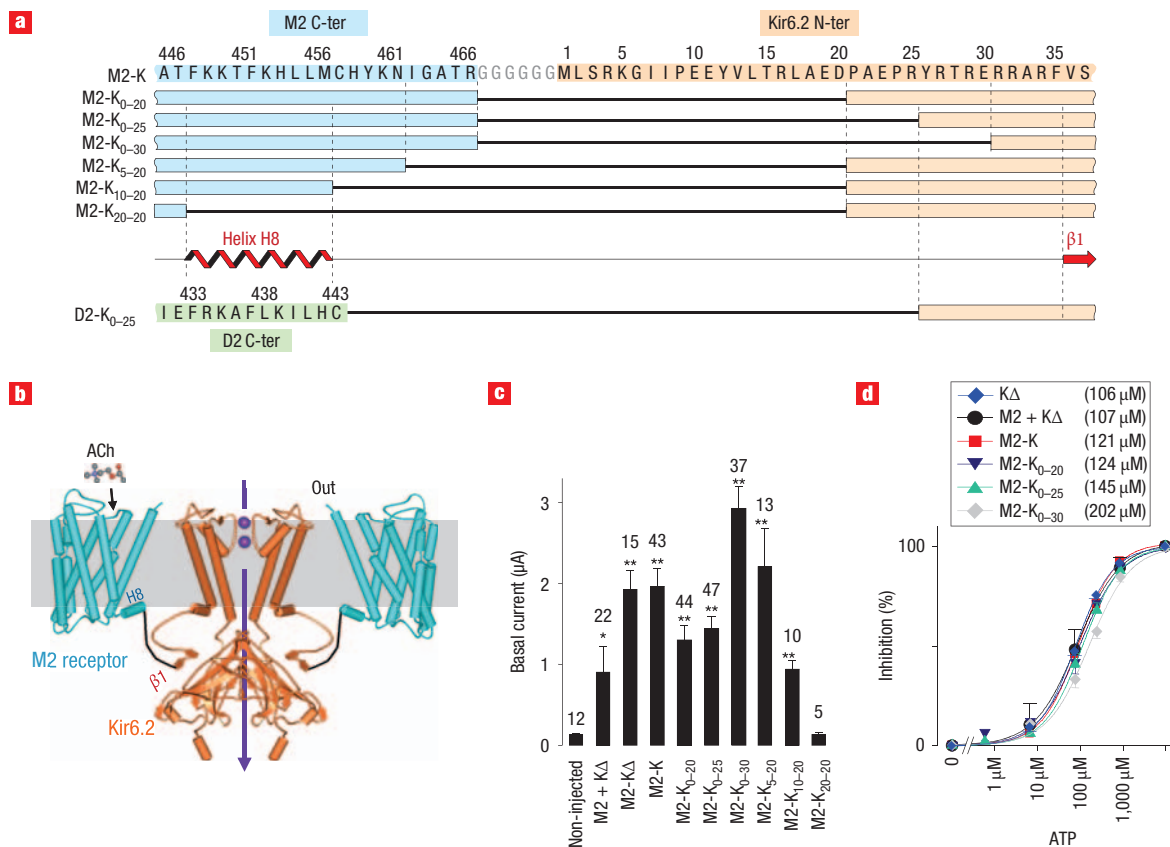


Figure 2 Design and expression of fusion proteins. **a**, Sequences of the region linking GPCRs and Kir6.2 for each construct. α -helix H8 and β -bridge β 1 are predicted from the structures of the β 2 receptor and Kir3.1. **b**, Transmembrane view of a molecular model of the M2–Kir6.2 tetramer with front and back monomers removed. **c**, Basal currents in the first minute of TEVC recordings from oocytes expressing the indicated proteins. * $P < 0.025$ and ** $P < 0.0001$ represent significant differences with non-injected oocytes. **d**, Inside-out patch current versus cytoplasmic ATP. Lines are Hill equation fits (h ranged from 0.93 to 1.09; EC₅₀ in parentheses).

recordings (Fig. 2c) indicated that fusion proteins with (M2-K) or without (M2-K Δ) retention signals had comparable surface expression levels. Consequently, all fusion proteins were created with an intact Kir6.2 C-ter, and N-ter deletions were limited to 30 amino acids because larger deletions abolish channel function^{16,17}, possibly through structural contacts between the N- and C-ter of Kir6.2. These deletions did not affect the surface expression and ATP sensitivity of Kir6.2 in the cells (Fig. 2c and d). In contrast, further deletions in the M2 C-ter (M2-K₅₋₂₀, M2-K₁₀₋₂₀ and M2-K₂₀₋₂₀) progressively impaired surface expression.

Is the attached receptor able to modulate Kir6.2 activity? Application of the M2 endogenous ligand, acetylcholine (ACh), to ICCRs induced different Kir6.2 responses as shown in Fig. 3. Although ACh weakly inhibited current when both the channel and the receptor were expressed separately (M2 + K Δ), it progressively activated ICCRs with increasing N-ter deletions up to 25 residues. Activation was lost when the linker was further shortened by 30 residues (Fig. 3a–c). Deletions in M2 C-ter were not advantageous: M2-K₅₋₂₀ responded like M2-K₀₋₂₀ and M2-K₁₀₋₂₀ resembled M2 + K Δ (Fig. 3a). Because the M2 integrity could be compromised in the fusion constructs (especially in the unresponsive constructs), we verified that the fused M2 could still bind ACh and activate G-proteins. This was assayed using an additional channel, the Kir3.4* (a Kir3.4 with mutation S143T¹⁸), that can be stimulated by receptor-generated

activated G-proteins (see Supplementary Information, Fig. S1), as a probe. Like Kir6.2, M2 retains its function in the fusion constructs, and the shortening of the linker only dictates how efficiently the ligand-induced conformational changes of M2 are transmitted to the Kir6.2 gate. An optimal efficiency was achieved with 25 residues deleted from the Kir6.2 N-ter.

For the various M2-K constructs, we determined the concentration-dependent activation by carbachol (CCh), a muscarinic agonist. CCh activated the ACh-sensitive M2-K fusion proteins (Fig. 3c) with half-maximal effective concentration EC₅₀ \sim 2 μ M. Similar values have been measured in functional¹⁹ and binding assays (<http://www.gpcr.org/7tm/ligand/Seeman/allmusc.html>) although comparison with published values is problematic because these are dispersed over several orders of magnitude. We next tested the effect of atropine, a muscarinic antagonist that prevents the receptor activation, and found that it reversibly suppressed the ACh activation of M2-K₀₋₂₀ and M2-K₀₋₂₅ (see Supplementary Information, Fig. S2). Thus, Kir6.2 constitutes a reliable electrical probe of M2 receptor activity as it is capable of detecting both the activated and inactivated states of the GPCR.

Is the ligand regulation of the ICCR gating due to a direct conformational coupling between the GPCR and the channel? The M2 receptor is predominantly coupled to the pertussis toxin (PTX)-sensitive G-proteins G_{i/o}. Kir6.2 was previously reported to be weakly activated by G-protein pathways involving phosphorylation by protein kinases A²⁰ and C²¹. To estimate the

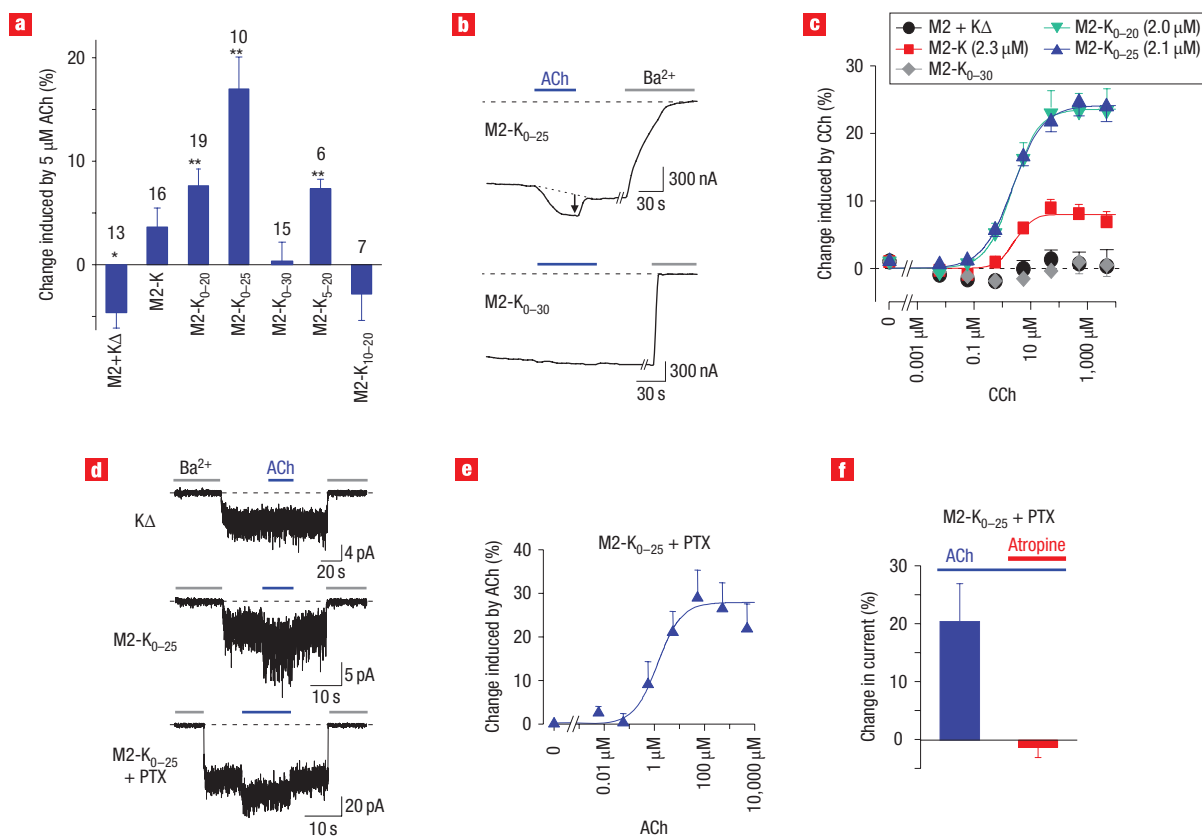


Figure 3 Receptor–channel coupling in M2-based ICCRs. **a**, Changes in whole-cell current evoked by ACh (5 μM). * $P < 0.01$ and ** $P < 0.0005$ represent significant differences from 0. **b**, TEVC recordings of M2-K₀₋₂₅ and M2-K₀₋₃₀. **c**, Whole-cell current change versus CCh. Lines are Hill equation fits with EC_{50} in parentheses and $h = 1.5, 0.9$ and 0.8 for M2-K, M2-K₀₋₂₀ and M2-K₀₋₂₅, respectively. **d**, Outside-out patch recordings. ATP (100 μM for M2-K₀₋₂₅ + PTX, 300 μM otherwise) was added to the pipette solution. **e**, Increase in outside-out current versus ACh for M2-K₀₋₂₅ + PTX. Hill equation fit (line) yielded $EC_{50} = 1.25$ μM and $h = 0.91$. **f**, Change in outside-out current induced by 5 μM ACh before and during application of 1 μM atropine for M2-K₀₋₂₅ + PTX.

potential contribution of these pathways to the effects of ACh on M2-K₀₋₂₀ and M2-K₀₋₂₅, we inactivated G-proteins by co-expressing the catalytic domain of PTX¹⁸. Although PTX abrogated the G-protein-dependent activation by ACh of Kir3.4*, it did not significantly affect the ACh activation of M2-K₀₋₂₀ and M2-K₀₋₂₅ (see Supplementary Information, Fig. S3). Thus, activation of M2-K fusion proteins appears largely independent of the activation and release of receptor-associated G-proteins or any subsequent enzymatic signals. Another evidence of the direct communication between M2 and Kir6.2 in functional ICCRs appears in Supplementary Information, Fig. S1. Indeed, this experiment demonstrates that ACh-insensitive ICCRs possess a functional receptor that is able to upregulate Kir3.4* through the release of G-proteins, but these activated G-proteins have no effects on the embedded Kir6.2 when ICCRs are expressed alone (see Supplementary Information, Fig. S1a and b). As further evidence, we characterized ICCRs in cell-free conditions using excised patch clamp techniques. These techniques extract a piece of plasma membrane and, depending on membrane orientation, expose cytosolic (inside-out) or extracellular (outside-out) binding sites. Outside-out experiments are suitable for application of extracellular ligands, and results shown in Fig. 3d reveal the specific ACh activation of M2-K₀₋₂₅ both in the presence and absence of co-expressed PTX. As observed in two-electrode voltage clamp (TEVC) recordings, the ACh activation in cell-free conditions was dose-dependent, with EC_{50} in the

micromolar range (Fig. 3e), and was reversed by atropine (Fig. 3f). The evidence therefore rules out an involvement of G-protein signalling in ICCR responses and suggests that the ligand-dependent modulation of ICCRs involves a direct link between the receptor and the channel.

Can the ICCR concept be extended to other GPCRs? Having engineered functional ICCRs with M2 and Kir6.2, we proceeded to build ICCRs using the dopaminergic D2 receptor. This receptor was chosen for its short (9-residue shorter) C-ter domain homologous to the human M2 C-ter. We used the optimum linker length determined for M2-K and directly created the D2-K₀₋₂₅ fusion protein (Fig. 2a). As expected, switching GPCRs in fusion proteins induced a change in the ligand selectivity of ICCR responses as shown in Fig. 4a. M2-K₀₋₂₅ is sensitive to ACh and insensitive to dopamine, whereas D2-K₀₋₂₅ is insensitive to ACh but is sensitive to dopamine, its endogenous agonist. Surprisingly, dopamine did not induce activation but caused a robust, reversible inhibition (Fig. 4). This inhibition of D2-K₀₋₂₅ was concentration-dependent, was reproduced with quinpirole, a stable dopaminergic agonist, and could be prevented by the antagonist sulpiride (Fig. 4c–e). Like M2, the fused D2 receptor retained the capacity to activate G-proteins as reported by Kir3.4* stimulation upon dopamine application (Figs 4b and 5). Therefore, D2-K₀₋₂₅ appears as another GPCR–Kir6.2 fusion protein sensitive to agonists and antagonists, further validating the concept of GPCR-based

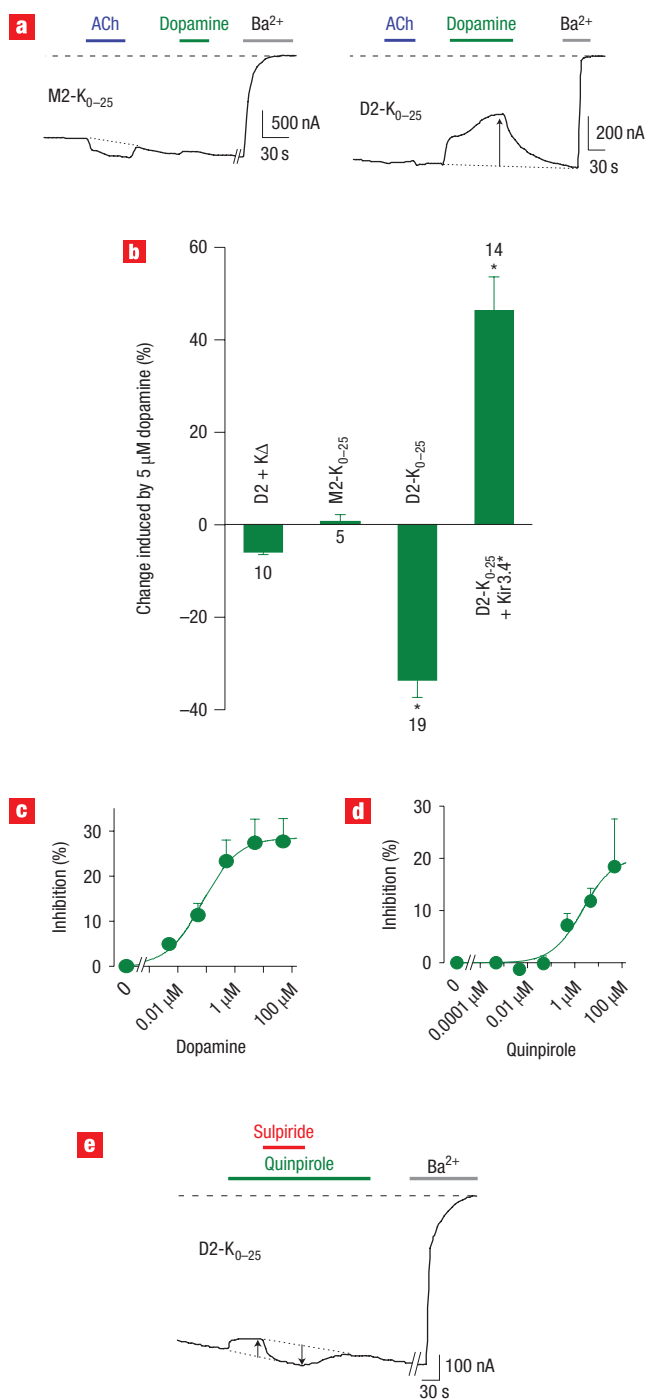


Figure 4 D2-based ion-channel-coupled receptors. **a**, Whole-cell current responses of M2-K₀₋₂₅ (upper panel) or D2-K₀₋₂₅ (lower panel) to 5 μM ACh and dopamine. **b**, Dopamine-evoked change in whole-cell currents for the specified proteins. D2-K₀₋₂₅ and D2-K₀₋₂₅ + Kir3.4* values were significantly different from D2 + KΔ and 0, respectively (**P* < 0.00005). **c**, Concentration-dependent inhibition by dopamine of D2-K₀₋₂₅ after correction for KΔ block (see Supplementary Information). Hill equation fit (line) yielded EC₅₀ = 73 nM and *h* = 0.7. **d**, *Idem* for quinpirole (EC₅₀ = 2.3 μM; *h* = 0.7). **e**, Effects of the D2 agonist quinpirole (5 μM) and antagonist sulpiride (5 μM) on D2-K₀₋₂₅ whole-cell currents.

biosensors. Interestingly, although both receptors couple to the same G_{T/o} proteins, the consequences of their activation on Kir6.2 are opposite, suggesting differences in agonist-induced conformational

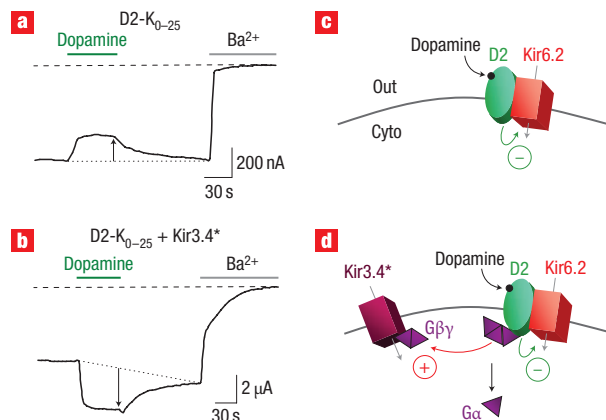


Figure 5 The fused D2 receptor remains functional. **a**, Inhibition by 5 μM dopamine of D2-K₀₋₂₅ whole-cell currents. **b**, *Idem* with co-expressed Kir3.4*. Note the different scales in panels (**a**) and (**b**). **c**, Interpretation of panel **a**: dopamine binding to D2 induces Kir6.2 inhibition through direct interaction. **d**, Interpretation of panel **b**: dopamine binding to D2-K₀₋₂₅ causes the G-protein activation and opening of Kir3.4* by the released Gβγ subunits. Because Kir3.4* currents were typically >5-fold larger than D2-K₀₋₂₅ currents, any decrease in the latter was masked by activation of the former.

changes, at least in the channel-attached C-ter region which is not a critical determinant of G-protein selectivity²². Because isolated Kir6.2 and GPCR proteins do not communicate in co-expression experiments, the mechanism of the Kir6.2 gating control by the GPCRs must arise from the physical linkage between the two proteins. A possible scenario could be that extracellular ligand binding allosterically displaces GPCR intracellular helix H8^{5,23}. This movement propagates to the Kir6.2 N-ter through the engineered link between the two proteins, and to the Kir6.2 cytoplasmic helix, known to move in concert with the channel gate²⁴, or to the C-ter cytoplasmic pore via contacts between N-ter and C-ter²⁵ (Fig. 2b). These interactions tilt the open/close conformation energy barrier, hence altering open probability. Such a mechanism is reminiscent of that proposed for voltage-dependent K⁺ channels²⁶ where the pore, topologically similar to Kir6.2, is connected to the voltage-sensing region by a loop, like the GPCR in ICCRs, and where voltage-induced motion of the voltage sensor causes a tilt of the cytoplasmic helix that opens the pore.

In conclusion, we have established that gating of an ion channel can be tied to the binding of a ligand to an attached GPCR using relatively simple protein engineering. The resulting ICCRs generate a proportionate, specific and reversible electrical signal upon application of various GPCR ligands in whole-cell as well as cell-free conditions. Following this strategy, we may envision the creation of a library of ion-channel-coupled GPCRs that could be suitable for integration in cell lines or lipid-coated nanopores with applications in multiplex diagnostics, drug screening or real-time detection systems. ICCRs would constitute a complementary alternative to currently developed cell-free GPCR screening assays²⁷ that generally utilize fluorescence, surface plasmon resonance and other spectroscopic measurements. With a theoretical resolution of a single binding event, an inexpensive operation with commonplace reagents such as ionic salts and nucleotides, and the ability to directly transduce chemical information into an electrical signal, ICCRs exemplify the potential of biomimetic nanotechnologies.

METHODS

PROTEIN ENGINEERING

We used mouse Kir6.2, human Kir3.4, human muscarinic M2 receptor and human long dopaminergic D2 receptor. GPCR–Kir6.2 fusion proteins were created by insertion of the GPCR coding sequence at the 5' end of the Kir6.2 gene cloned in a *Xenopus* oocyte expression vector derived from pGEMHE²⁸. In a first PCR reaction, the GPCR gene was amplified with hybrid primers complementary to the GPCR sequence at one extremity and the sites of insertion in pGH2–Kir6.2 at the other. The products of this reaction were gel-purified and served as primers for a second PCR with pGH2–Kir6.2 as a template, yielding pGH2–GPCR–Kir6.2. Using this construct as a template, other constructs with shortened GPCR–Kir6.2 linkers were obtained by deletion of the appropriate codons with a single PCR reaction with hybrid primers flanking the deletion²⁹. Reagents and conditions are from the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Valid clones were identified by restriction enzyme profiling and verified by sequencing of the full open reading frame. cRNAs were produced *in vitro* with the T7 mMessage mMachine Kit (Ambion), purified by standard phenol:chloroform extraction and quantified by agarose-gel electrophoresis and spectrophotometry.

HETEROLOGOUS EXPRESSION

Expression of the engineered proteins in *Xenopus* oocytes has been described elsewhere^{11,28}. Briefly, oocytes defolliculated by collagenase treatment were microinjected with 50 nl of water containing one or a mixture of the following quantities of cRNA: GPCR–Kir6.2, 5 ng; Kir3.4*, 2 ng; Kir6.2ΔC36, 2 ng; PTX–S1, 1 ng; M2, 2 ng; D2, 2 ng. Oocytes were incubated in individual wells in Barth's solution for at least 48 h at 19 °C before characterization. Because of the inherent variability of the oocyte expression system, related experiments (for example, with and without PTX) were alternated and performed on the same days with the same batches of oocytes.

CHEMICALS

All chemicals were from Sigma-Aldrich. Solvent and concentration of stock solutions were: ACh (chloride salt), water, 0.5 and 250 mM; atropine, ethanol, 1 mM; CCh (chloride salt), water, 5 and 250 mM; dopamine (dopamine hydrochloride), water, 5 and 250 mM; niflumic acid, dimethyl sulphoxide (DMSO), 300 mM; quinpirole ((–)-quinpirole hydrochloride), water, 5 and 25 mM; sulpiride ((S)-(–)-sulpiride), DMSO, 5 mM.

ELECTROPHYSIOLOGICAL RECORDINGS

Excised inside-out patch-clamp recordings were performed with symmetrical 150 mM K⁺ as previously described^{11,28}. In the outside-out configuration, solutions were identical except that bath and pipette solutions were swapped and the pipette was supplemented with 1 mM MgCl₂ and ATP as specified to induce a partial block of Kir6.2 channel activity. Whole-cell currents were measured using TEVC recordings. Microelectrodes were filled with 3 M KCl, and oocytes were bathed in a solution having 91 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES (pH 7.4) and 0.3 mM niflumic acid to block endogenous chloride currents. Unless otherwise specified, the concentration of GPCR ligands was 5 μM, except for atropine which was 1 μM. Ba²⁺ (BaCl₂) concentration was always 3 mM, a concentration sufficient to fully block Kir6.2 and Kir3.4* currents. The TEVC bath perfusion system was upgraded during the project to allow faster solution exchange, explaining timescale differences in some figures. Nonetheless, solution exchange required several seconds and largely dominates the kinetics of the observed responses. The TEVC voltage protocol consisted of 500-ms steps to –50, 0 and +50 mV—during which current was measured—repeated every 5 s and the holding potential was 0 mV. Only the values measured at –50 mV are shown in the figures. Average values are presented as mean ± s.e.m. Statistical significance was established with unpaired two-tailed Student's *t*-tests. The experimental data points obtained at various concentrations of activating or inhibiting ligands were normalized to those values obtained in the absence of a ligand. Nonlinear least-square curve-fitting was then carried out using a standard Hill equation:

$$f(x) = \frac{\text{Max}}{[1 + (\text{EC}_{50}/x)^h]}$$

where *x* is the concentration of a ligand, Max the asymptotical maximal effect, EC₅₀ the concentration for half-maximal effect and *h* the Hill coefficient.

Ba²⁺ was used as a generic K⁺ channel blocker. Per cent changes in current were calculated with respect to the baseline extrapolated from the measurements of Ba²⁺-sensitive currents before and after agonist application. This method emphasizes reversibility and provides an underestimate of the true effects. For dose–response data, which were acquired by applying sequentially increasing concentrations of modulator to the same patch or oocyte, changes in current could only be measured with respect to the current before application, yielding somewhat larger values.

MOLECULAR MODELLING

Procedures are detailed in the Supplementary Information.

Received 10 March 2008; accepted 24 July 2008; published 7 September 2008.

References

1. Bayley, H. & Jayasinghe, L. Functional engineered channels and pores. *Mol. Membr. Biol.* **21**, 209–220 (2004).
2. Bouzat, C. *et al.* Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature* **430**, 896–900 (2004).
3. Grutter, T. *et al.* A chimera encoding the fusion of an acetylcholine-binding protein to an ion channel is stabilized in a state close to the desensitized form of ligand-gated ion channels. *CR Biol.* **328**, 223–234 (2005).
4. Ohndorf, U. M. & MacKinnon, R. Construction of a cyclic nucleotide-gated KcsA K⁺ channel. *J. Mol. Biol.* **350**, 857–865 (2005).
5. Kristiansen, K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol. Ther.* **103**, 21–80 (2004).
6. Armbruster, B. N., Li, X., Pausch, M. H., Herlitz, S. & Roth, B. L. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 5163–5168 (2007).
7. Schlyer, S. & Horuk, R. I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development. *Drug Discov. Today* **11**, 481–493 (2006).
8. Thomsen, W., Frazer, J. & Unnett, D. Functional assays for screening GPCR targets. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 655–665 (2005).
9. Moreau, C. J., Prost, A. L., Derand, R. & Vivaudou, M. SUR, ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**, 951–963 (2005).
10. Moreau, C. J., Jacquet, H., Prost, A. L., D'Hahan, N. & Vivaudou, M. The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *EMBO J.* **19**, 6644–6651 (2000).
11. Dupuis, J. P., Revilloud, J., Moreau, C. J. & Vivaudou, M. Three C-terminal residues from the sulphonylurea receptor contribute to the functional coupling between the K_{ATP} channel subunits SUR2A and Kir6.2. *J. Physiol.* **586**, 3075–3085 (2008).
12. Haider, S., Antcliff, J. E., Proks, P., Sansom, M. S. & Ashcroft, F. M. Focus on Kir6.2: a key component of the ATP-sensitive potassium channel. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**, 927–936 (2005).
13. Nichols, C. G. K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* **440**, 470–476 (2006).
14. Tucker, S. J., Gribble, F. M., Zhao, C., Trapp, S. & Ashcroft, F. M. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* **387**, 179–183 (1997).
15. Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels. *Neuron* **22**, 537–548 (1999).
16. Koster, J. C., Sha, Q., Shyng, S. L. & Nichols, C. G. ATP inhibition of K_{ATP} channels: control of nucleotide sensitivity by the N-terminal domain of the Kir6.2 subunit. *J. Physiol.* **515**, 19–30 (1999).
17. Tucker, S. J. & Ashcroft, F. M. Mapping of the physical interaction between the intracellular domains of an inwardly rectifying potassium channel, Kir6.2. *J. Biol. Chem.* **274**, 33393–33397 (1999).
18. Vivaudou, M. *et al.* Probing the G-protein regulation of GIRK1 and GIRK4, the two subunits of the K-ACh channel, using functional homomeric mutants. *J. Biol. Chem.* **272**, 31553–31560 (1997).
19. McKinney, M., Miller, J. H., Gibson, V. A., Nickelson, L. & Aksoy, S. Interactions of agonists with M2 and M4 muscarinic receptor subtypes mediating cyclic AMP inhibition. *Mol. Pharmacol.* **40**, 1014–1022 (1991).
20. Beguni, P., Nagashima, K., Nishimura, M., Gono, T. & Seino, S. PKA-mediated phosphorylation of the human K_{ATP} channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J.* **18**, 4722–4732 (1999).
21. Light, P. E., Bladen, C., Winkfein, R. J., Walsh, M. P. & French, R. J. Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 9058–9063 (2000).
22. Wess, J. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* **11**, 346–354 (1997).
23. Li, J. H. *et al.* Distinct structural changes in a G protein-coupled receptor caused by different classes of agonist ligands. *J. Biol. Chem.* **282**, 26284–26293 (2007).
24. Kuo, A. L., Domene, C., Johnson, L. N., Doyle, D. A. & Venien-Bryan, C. Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography. *Structure* **13**, 1463–1472 (2005).
25. Nishida, M., Cadene, M., Chait, B. T. & MacKinnon, R. Crystal structure of a Kir3.1–prokaryotic Kir channel chimera. *EMBO J.* **26**, 4005–4015 (2007).
26. Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* **450**, 376–382 (2007).
27. Leifer, W. R., Aloia, A. L., Bucco, O., Glatz, R. V. & McMurchie, E. J. G-protein-coupled receptors in drug discovery: nanosizing using cell-free technologies and molecular biology approaches. *J. Biomol. Screen.* **10**, 765–779 (2005).
28. Hossy, E., Derand, R., Revilloud, J. & Vivaudou, M. Remodelling of the SUR–Kir6.2 interface of the K_{ATP} channel upon ATP binding revealed by the conformational blocker rhodamine 123. *J. Physiol.* **582**, 27–39 (2007).
29. Makarova, O., Kamberov, E. & Margolis, B. Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step. *Biotechniques* **29**, 970–972 (2000).

Supplementary Information accompanies this paper at www.nature.com/naturenanotechnology.

Acknowledgements

We are grateful to E. Reuveny for PTX-S1, S. Seino for Kir6.2, D. Logothetis for M2, B. Kobilka and R. Stevens for prepublication $\beta 2$ pdb files, and A. Dupuis, F. Fieschi and N. Hussy for useful discussions. A.-L. Prost and R. Derand with J.R. performed exploratory experiments on non-GPCR fusion proteins that helped guide our research strategy. S. Crouzy and S. Redon helped with molecular dynamics. This project, part of the European project Receptronics coordinated by M. Tartagni, and a postdoctoral fellowship to C.M. were funded by the Sixth Framework Program of the European Union (STREP NMP4-CT-2005-017114). Additional funds were provided by CEA (Commissariat à l'Energie Atomique; Programme Toxicologie Nucléaire Environnementale), CNRS and Université Joseph Fourier. J.D. was supported by a CEA doctoral studentship.

Author contributions

C.J.M. and M.V. established the concepts of this study, analysed data and wrote the manuscript. C.J.M. performed the experiments with help from J.P.D. (TEVC) and J.R. (molecular biology, TEVC, outside-out recordings). K.A. helped with molecular modelling. M.V. supervised the project.

Author information

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.J.M. and M.V.

Acknowledgements

We are grateful to Dr S. Seino (Chiba, Japan) for mouse Kir6.2 and rat SUR2A, and Dr S. P. Cole (Kingston, ON, Canada) for human MRP1. J.P.D. was supported by a PhD studentship from C.E.A. (Commissariat à l’Energie Atomique).

Supplemental material

Online supplemental material for this paper can be accessed at: <http://jp.physoc.org/cgi/content/full/jphysiol.2008.152744/DC1> and <http://www.blackwell-synergy.com/doi/suppl/10.1113/jphysiol.2008.152744>

Titre

Couplage fonctionnel entre un récepteur et un canal ionique: étude du canal K_{ATP} et application pour la création de biocapteurs

Résumé

Les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) jouent un rôle primordial dans la sécrétion pancréatique d'insuline et participent au contrôle du tonus vasculaire ainsi que de l'excitabilité des cellules musculaires cardiaques et neuronales. Constitués de l'assemblage unique d'un récepteur membranaire de la famille des transporteurs ABC, le récepteur des sulphonylurées SUR, et d'un canal potassique rectifiant entrant, Kir6.2, ces canaux couplent le métabolisme cellulaire au potentiel membranaire et constituent en ce sens un modèle naturel de biocapteur.

Le caractère unique de cet assemblage tient au fait que SUR est capable de réguler l'activité de Kir6.2 suite à la fixation de ligands: nucléotides, activateurs ou inhibiteurs pharmacologiques. Nous nous sommes intéressés aux déterminants moléculaires intervenant dans le couplage fonctionnel de SUR au canal Kir6.2. Utilisant une stratégie chimérique, nous avons identifié une région C-terminale de l'isoforme SUR2A essentielle aux mécanismes d'activation du canal, assurant le lien entre la fixation de ligands à SUR et l'ouverture de Kir6.2.

Nous avons également utilisé notre connaissance du modèle du canal K_{ATP} pour développer un nouveau type de biocapteur électrique, les Ion Channel Coupled Receptors (ICCR), fondé sur le couplage fonctionnel artificiel entre Kir6.2 et des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Par ingénierie protéique, nous avons créé deux modèles d'ICCR impliquant respectivement les récepteurs muscarinique M_2 et dopaminergique D_2 : la fixation d'agonistes ou antagonistes spécifiques sur ces récepteurs entraîne une activation ou une inhibition du canal mesurables électriquement en temps réel, jetant les bases prometteuses d'une nouvelle génération de biocapteurs acellulaires.

Title

Functional coupling between a receptor and an ion channel: study of the K_{ATP} channel and application for biosensor design

Abstract

ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) play a critical role in pancreatic insulin secretion and participate in the vascular tone control as well as cardiac myocyte and neuron excitability. Formed by the unique association of a membrane receptor of the ABC transporters family, the sulfonylurea receptor SUR, and an inward rectifier potassium channel, Kir6.2, they couple the membrane potential to the cell metabolism. Therefore, they can be considered as a natural example of biosensor.

The unique property of this complex is that SUR adjusts Kir6.2 gating as a function of physiological and pharmacological ligands (nucleotides, synthetic activators and inhibitors). We addressed the question of identifying the molecular elements underlying functional coupling between SUR and Kir6.2. Following a chimerical strategy, we identified an essential C-terminal region of isoform SUR2A which functionally links ligand binding to SUR to Kir6.2 upregulation.

Using our knowledge of the K_{ATP} model, we also developed a new type of electrical biosensor, Ion Channel Coupled Receptors (ICCRs), based on the artificial functional coupling of Kir6.2 with G-protein coupled receptors (GPCRs). Using protein engineering, we created two prototypes of ICCRs based on the muscarinic M_2 and dopaminergic D_2 receptors: agonist or antagonist binding to these receptors leads to real-time electrically measurable channel activations or inhibitions. ICCRs constitute the promising premises of a new generation of cell-free biosensors.

Discipline

Physiologie-Physiopathologies-Pharmacologie

Mots Clés

Transporteurs ABC, GPCR, biocapteurs, électrophysiologie (patch-clamp), ingénierie moléculaire

Laboratoire d'accueil

Laboratoire des Protéines Membranaires, Institut de Biologie Structurale (UMR 5075)
41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1