

# Complexes protéiques et perméabilité de la membrane cytoplasmique : exemple du canal TREK

Guillaume Sandoz<sup>1</sup>

Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, Valbonne

## Les canaux potassiques

Les cellules constituant tout organisme sont délimitées par une bicouche lipidique appelée membrane plasmique. Celle-ci isole l'intérieur de la cellule du milieu extracellulaire. Les molécules chargées telles que les ions ne peuvent traverser cette barrière hydrophobe que par l'intermédiaire de protéines. Des protéines enzymatiques intégrées à cette membrane utilisent l'énergie de l'ATP pour générer une distribution asymétrique (gradient de concentration) des ions de part et d'autre de cette membrane. La pompe Na/K ATPase, qui est responsable de la mise en place des gradients de Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>, est l'exemple le plus connu. L'énergie électrochimique produite par ces gradients est utilisée par la cellule pour transporter des molécules (de l'extérieur vers l'intérieur et inversement), et pour générer des signaux électriques. Ces derniers nécessitent des structures membranaires particulières que l'on appelle canaux ioniques, lesquels sont le plus souvent spécifiques d'un seul type d'ion. Par exemple, lors de l'ouverture de canaux sélectifs à l'ion K<sup>+</sup>, cet ion, plus concentré à l'intérieur qu'à l'extérieur, a tendance à sortir créant ainsi un déficit de charges positives à l'intérieur et un gain de charges positives à l'extérieur. Cette différence de charges produit un champ électrique qui maintient le gradient de K<sup>+</sup> dans un équilibre stable. La différence de potentiel générée par cet équilibre peut être calculée par l'équation de Nernst (figure 1, planche I). Dans une cellule non excitée, ou au repos, le potentiel de membrane est très proche du potentiel de Nernst de l'ion K<sup>+</sup> (E<sub>K</sub>). La raison en est que dans cet état, les canaux K<sup>+</sup> sont pratiquement les seuls ouverts. Par conséquent, ce sont eux qui imposent le potentiel de repos. C'est la raison pour laquelle l'intérieur de la cellule est polarisé négativement au repos. A l'inverse, l'ouverture des canaux sélectifs pour le Na<sup>+</sup> ou le Ca<sup>2+</sup> entraîne une entrée de ces deux ions dans la cellule, ce qui déplace le potentiel de membrane vers des valeurs plus positives, dépolarisant ainsi la cellule (elle devient positive à l'intérieur).

Les signaux électriques générés par ces gradients sont l'un des moyens mis en place par la cellule pour réguler son activité en réponse à différents types de stimuli.

La première fonction physiologique parfaitement décrite pour les canaux ioniques est la génération et la propagation des signaux électriques (potentiel d'action, PA) le long des axones. Dès le début des années cinquante, Hodgkin et Huxley expliquèrent la nature, les mécanismes de la genèse et de la propagation du potentiel d'action (PA). Par exemple, un PA cardiaque n'est possible que grâce à l'association de plusieurs conductances ioniques : sodiques, potassiques et calciques. A chacun de ces canaux est associée une phase du PA. La phase de dépolarisation est due à l'ouverture des canaux sodiques. Cette dépolarisation ouvre les canaux calciques dépendant du potentiel, responsables de la phase plateau. La phase de repolarisation est déclenchée par l'ouverture des canaux potassiques dépendant du potentiel et de certains canaux potassiques dépendant du calcium (figure 2).

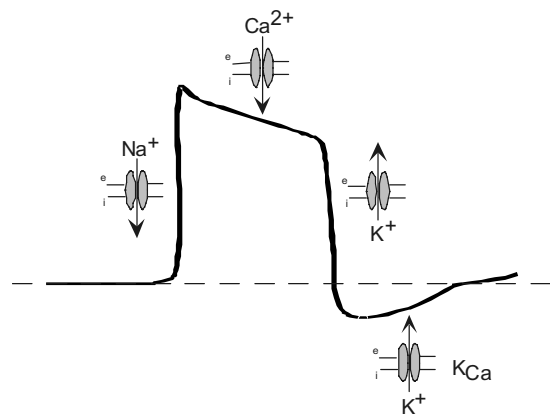


Fig. 2 : Les courants ioniques impliqués dans la genèse d'un potentiel d'action de type cardiaque.

<sup>1</sup> G. Sandoz a reçu, pour ses travaux sur la régulation des canaux potassiques TREK par leurs protéines associées, le prix AFAS «Jean-Louis Parrot» 2006-2007.

Les canaux potassiques ne sont pas seulement impliqués dans la genèse d'un potentiel d'action, ils sont également à l'origine de nombreuses fonctions physiologiques. Les rôles physiologiques des canaux potassiques ont pu être mis en évidence grâce aux énormes progrès de la biologie moléculaire qui sont intervenus au cours de ces vingt dernières années. L'émergence des techniques de clonage a permis l'étude de la régulation et des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques de nombreux canaux ioniques. Les canaux potassiques sont régulés par une incroyable variété de stimuli chimiques (pH, osmolarité, oxygène, anesthésiques), physiques (activité électrique, pression, température, lumière) et biologiques (ATP, calcium, protéine G, acides gras, kinases, phosphatases). Dans les cellules excitables, l'activité de ces canaux joue un rôle important dans le contrôle de l'excitabilité et dans la génération et la fréquence des potentiels d'action. Ils sont impliqués dans divers processus physiologiques tels que la mémoire, la neuroprotection, le contrôle respiratoire, la contraction musculaire, la sécrétion d'hormones et de neurotransmetteurs, la régulation du rythme cardiaque. Certains de ces canaux sont la cible des anesthésiques généraux ou volatils. Dans les cellules non excitables, les canaux potassiques sont impliqués dans le contrôle du volume cellulaire, la prolifération et l'apoptose.

Afin d'assurer toutes ces fonctions, il existe une grande diversité moléculaire de canaux potassiques présentant des modes de régulation distincts. En effet, il existe chez l'homme 77 gènes qui codent pour ces canaux. Certains de ces canaux sont régulés par une dépolarisation cellulaire, d'autres par une déformation mécanique de la membrane, d'autres par une élévation de la concentration de calcium intracellulaire, etc. Des mutations des gènes codant pour ces canaux peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies, ce qui montre leur importance fonctionnelle. En effet, les mutations peuvent être à l'origine de pathologies telles que l'ataxie (incoordination des mouvements volontaires), le diabète, l'hyperinsulinémie, l'épilepsie, le syndrome du QT long (arythmie cardiaque) ou encore le syndrome de Bartter.

Au niveau structural, les canaux potassiques sont des complexes protéiques transmembranaires. Chaque sous-unité composant ces canaux possède un ou deux domaines P, et c'est l'assemblage de quatre domaines P qui permet de former un pore perméable aux ions. Le domaine P correspond à une séquence d'acides aminés entre deux hélices transmembranaires. Une partie de la boucle P traverse partiellement la membrane plasmique. Cette partie transmembranaire contient le filtre de sélectivité aux ions potassium. Chez le mammifère, les sous-unités composant ces canaux contiennent deux, quatre ou six/sept segments transmembranaires. Les membres des familles de canaux à deux ou six/sept segments transmembranaires se caractérisent par la présence d'une seule boucle P alors que les canaux à quatre segments transmembranaires contiennent deux domaines P (figure 3, planche I). Comme il faut

quatre boucles P pour former un canal fonctionnel, les canaux à un domaine P ( $K_{1P}$ , deux ou six/sept segments transmembranaires) se tétramérisent en homo- ou hétérotétramère alors que les canaux à deux domaines P ( $K_{2P}$ , quatre segments transmembranaires) se dimérisent.

## Les canaux à deux domaines P ( $K_{2P}$ )

Ces canaux sont à l'origine d'un courant dit de fond. Le rôle principal de ce courant est la mise en place et le maintien du potentiel de repos des cellules et ainsi le contrôle de l'excitabilité cellulaire. En effet, quand ces canaux sont ouverts, ils laissent passer des ions potassium du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, ce qui entraîne une perte de charge positive et donc une hyperpolarisation cellulaire (cellule peu excitable). A l'inverse, une fermeture de ces canaux entraîne une accumulation de potassium du côté intracellulaire et donc une dépolarisation de la cellule (cellule fortement excitable).

Il existe quinze gènes codant pour ces canaux  $K_{2P}$ . Les quinze membres de la famille partagent la même structure : quatre segments transmembranaires, deux boucles P et une extrémité carboxy- et aminoterminal intracellulaire. On peut classer ces quinze canaux en six grandes sous-familles en fonction des homologies de séquences et des propriétés fonctionnelles. La première sous-famille se compose des canaux TWIK1 (*Tandem of P domains in Weak Inwardly rectifying  $K^+$  channel*), TWIK2 et KCNK7 ; la deuxième se compose des canaux TREK1 (*TWIK RElated  $K^+$  channel*), TREK2 et TRAAK (*TWIK-Related Arachidonic Acid stimulated  $K^+$  channel*) ; la troisième, TASK3 (*TWIK-related Acid Sensing  $K^+$  channel*), TASK1 et TASK5 ; la quatrième, THIK1 (*TWIK-related Halothane Inhibited  $K^+$  channel*) et THIK2 ; la cinquième, TALK1 (*TWIK-related Alkaline-pH-Activated  $K^+$  channel*), TALK2 et TASK3 ; et la sixième sous-famille ne possède qu'un seul membre, le canal TRESK (*TWIK-Related Spinal cord  $K^+$  channel*). Ces différentes sous-familles de canaux se caractérisent par des propriétés fonctionnelles qui leurs sont propres (figure 4).

## Les protéines partenaires des canaux ioniques

Les canaux ioniques sont régulés par des interactions de type protéine-protéines. Ces interactions peuvent modifier les propriétés de ces canaux. Ces protéines peuvent agir sur l'activité des canaux soit directement, en modifiant l'activité du canal unitaire, soit en jouant un rôle de protéine chaperonne qui, par exemple, aide à l'adressage membranaire dans des domaines précis de la cellule. Le rôle de ces interactions n'est pas négligeable puisque, chez l'homme, des mutations de ces sous-unités auxiliaires peuvent aboutir à des phénotypes pathologiques simi-

TRESK (KCNK18)	canaux sensibles au calcium	<b>Implications</b>
<b>TASK5 (KCNK15)</b>	canaux sensibles à l'acidification	
TASK1 (KCNK3)	canaux sensibles à l'halothane	cancer apoptose anesthésie épilepsie  ischémie cérébrale neurodégénérescence anesthésie épilepsie mémoire dépression
TASK3 (KCNK9)		
<b>THIK2 (KCNK12)</b>	canaux sensibles à l'halothane	
THIK1 (KCNK13)		
TASK2 (KCNK5)	canaux activés par l'alcalinisation	
TALK1 (KCNK16)	canaux mécanosensibles activés par les acides gras polyinsaturés	
TALK2 (KCNK17)		
TRAAK (KCNK4)	canaux à rectification entrante	
TREK1 (KCNK2)		
TREK2 (KCNK10)		
<b>KCNK7</b>	canaux à rectification entrante	
TWIK1 (KCNK1)		
TWIK2 (KCNK6)		

Fig. 4 : Organisation des canaux  $K_{2p}$  en sous-groupes structuraux et fonctionnels. Les noms des gènes sont indiqués entre parenthèses. Les canaux TASK ont été impliqués dans la mort cellulaire programmée (apoptose) des cellules neuronales et la tumorigénèse. Les canaux TREK sont activés par une série de stimuli produits lors d'une ischémie cérébrale. Leur ouverture joue un rôle neuroprotecteur. Ils sont aussi activés par les anesthésiques volatils, comme les canaux TASK.

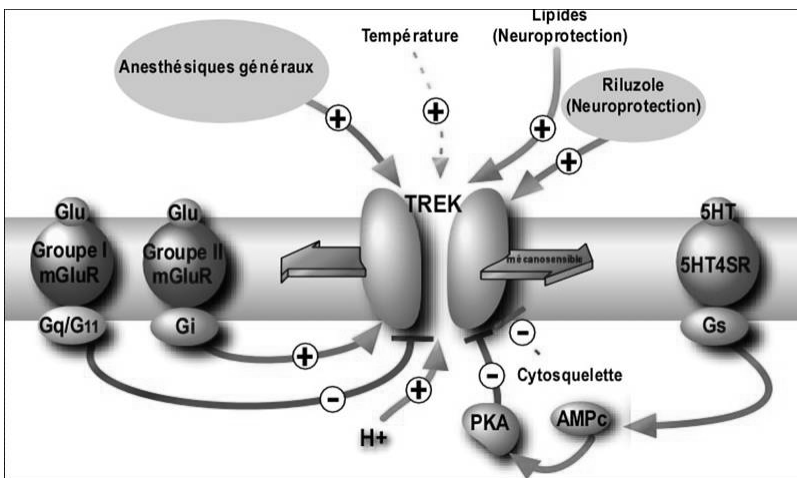


Fig. 5 : Représentation schématique des canaux  $K_{2p}$  de type TREK et de leurs régulations.

laire à ceux observés lorsque le canal lui-même est muté [2]. Il est donc nécessaire d'identifier de telles protéines afin de caractériser leurs effets.

### Le canal TREK1

Les canaux TREK produisent des courants de fond qui contrôlent l'excitabilité cellulaire. Ils sont fortement représentés dans le système nerveux central. Les TREK sont activés par les acides gras polyinsaturés, certains phospholipides, l'étirement membranaire, le pH, la température et les anesthésiques généraux volatils. Ils sont inhibés par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de type Gq et Gs (figure 5) [7, 8]. Les souris dont le gène TREK1 a été inactivé génétiquement (TREK1<sup>-/-</sup>) présentent des modifications de la perception de la douleur, une sensibilité réduite aux anesthésiques volatils et aux effets neuroprotecteurs des acides gras polyinsaturés lors d'ischémie [4, 5]. Il faut ajouter à cela que les souris TREK1<sup>-/-</sup> sont beaucoup moins sensibles à la dépression

que les souris sauvages et présentent un comportement similaire aux souris sauvages qui sont traitées aux antidépresseurs comme la fluoxétine (Prozac®) [6]. Ces canaux potassiques constituent donc une cible de premier choix pour les agents pharmacologiques (antidépresseurs, anesthésiques...). Il est donc important de connaître leur fonctionnement et les agents qui modulent leur activité. Nous avons travaillé sur la caractérisation et le rôle des protéines interagissant avec les canaux potassiques TREK.

### Evidence de l'existence de protéines partenaires des canaux $K_{2p}$

Les canaux  $K^+$  sont des complexes protéiques qui eux-mêmes interagissent avec des protéines régulatrices (par exemple des kinases), des éléments du cytosquelette et diverses protéines d'adressage ou d'échafaudage. Dans le cas des canaux  $K_{2p}$ , il y avait de nombreux indices que de telles protéines partenaires existaient. Par exemple, le canal TWIK1 produit des courants de très faible ampli-

tude, ce qui suggère qu'une protéine du complexe natif est absente dans les systèmes d'expression hétérologue. De même, le canal KCNK7 ne génère aucun courant dans les systèmes d'expression hétérologue et, de fait, ne peut pas être étudié et caractérisé. Les canaux TREK et TRAAK sont, quant à eux, activés par un étirement de la membrane, et cette «mécanosensibilité» est modifiée lors de l'application de composés qui perturbent le cytosquelette. Finalement le canal TREK2, comme TASK1, ne s'exprime que dans certains systèmes d'expression hétérologue. Dans le cas de TASK1, il a été montré au laboratoire et ailleurs que des protéines associées telles que p11 [3] ou 14-3-3 [10] sont nécessaires à son expression fonctionnelle à la surface cellulaire. Récemment, le rôle de la protéine EFA6 dans l'endocytose de TWIK1 a été mis en évidence [1].

*Technique d'identification.* La recherche de protéines associées aux canaux  $K_{2p}$  a commencé au laboratoire, il y a déjà plusieurs années, et a permis d'isoler des partenaires potentiels. Ils ont été identifiés par la technique classique du double-hybride dans la levure ou dans la bactérie. Ces techniques sont lourdes et présentent un certain nombre d'inconvénients, dont celui de générer un grand nombre de faux positifs. Une approche alternative et plus globale a donc été choisie pour ce projet de recherche : elle repose sur une analyse de type protéomique. Cette approche consiste à précipiter les protéines partenaires des canaux *via* une immunopurification des complexes canaux natifs (figure 6, planche I). Les complexes sont ensuite séparés par un gel SDS PAGE (électrophorèse), puis la nature des protéines qui les composent est déterminée par spectrométrie de masse (Maldi-Tof) à partir de leurs peptides tryptiques. L'immunopurification se fait simultanément à partir de souris sauvages et de souris qui n'expriment pas le canal TREK1 (souris «*Knock-Out*») afin de garantir la spécificité des interactions.

Cette technique a permis d'identifier une centaine de protéines différentes. La précipitation de beaucoup de ces protéines est due à leur fixation non spécifique sur les billes. En effet, la majorité des protéines identifiées sont également précipitées à partir du cerveau des souris KO TREK1<sup>-/-</sup> à l'exception de quatre d'entre elles. Parmi ces quatre protéines, nous avons étudié l'AKAP150 [11].

## L'interaction TREK1/AKAP150

L'AKAP150 est une protéine dite d'échafaudage. En effet, elle est connue pour organiser des complexes protéiques de signalisation dans les neurones. L'AKAP150 interagit notamment avec la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC), la protéine phosphatase 2B (PP2B), certains canaux ioniques et les protéines synaptiques PSD95 et SAP97 [9].

Nous avons, dans un premier temps, vérifié la réalité de cette interaction. Pour ce faire, nous avons exprimé,

dans un système d'expression hétérologue, les deux protéines. Les études de microscopie à fluorescence montrent que les deux protéines présentent une colocalisation parfaite (les deux protéines se localisent aux mêmes endroits dans la cellule) (figure 7A, planche II). Dans les neurones, l'AKAP150 et TREK se concentrent et colocalisent dans les synapses au niveau des densités post-synaptiques (figure 7C, planche II). D'autre part, nous coprécipitons très facilement les deux protéines à partir de cellules transfectées et du cerveau (mise en évidence d'une interaction physique entre les deux protéines) (figure 7B, planche II). D'un point de vue fonctionnel, la coexpression de l'AKAP150 avec TREK1 entraîne une augmentation d'un facteur 5 du courant basal (figure 7B, planche II). De plus, le courant TREK en présence d'AKAP perd la totalité de sa voltage-dépendance. L'AKAP150 interagit donc avec TREK1 et module fortement ses propriétés de base.

Pour vérifier la spécificité d'action de l'AKAP150, nous avons coexprimé l'AKAP150 avec d'autres canaux  $K_{2p}$  (figure 8, planche II). Seul TREK2, le plus proche voisin de TREK1, interagit et est régulé par l'AKAP150 (figure 4). TREK2 et TREK1 partagent une forte homologie de séquence dans leur extrémité carboxy-terminale. De plus l'extrémité carboxy-terminale des TREK est connue pour être un site de convergence de régulation du canal. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'AKAP se fixe sur cette extrémité. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons greffé au canal TASK1, qui est insensible à l'AKAP, l'extrémité carboxy-terminale de TREK1 (canal TASK1-CtTREK1). Cette greffe confère au canal TASK1 une sensibilité à l'AKAP150, ce qui confirme le rôle de l'extrémité dans la fixation et la régulation du canal par l'AKAP. Nous avons affiné la recherche du site de fixation de l'AKAP sur TREK et ainsi localisé un site de 12 résidus en aval du quatrième segment transmembranaire (domaine post-M4) responsable de l'interaction.

Le domaine de fixation identifié sur TREK1 correspond à un domaine crucial dans la régulation positive du canal par les stimuli physiques tels que l'étirement membranaire, le pH, l'acide arachidonique, mais également dans la régulation négative du canal par les neurotransmetteurs *via* leur action sur les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de type Gs ou Gq. Nous avons testé la capacité du canal à être régulé par ces différents stimuli en présence d'AKAP150. Il apparaît que le courant TREK1/AKAP150 est insensible à l'étirement membranaire, le pH et l'acide arachidonique. En ce qui concerne les neurotransmetteurs, seuls ceux agissant sur les RCPG de type Gs sont encore capables d'inhiber le courant TREK1/AKAP150 alors que les RCPG de type Gq ont perdu leur capacité à réguler TREK1. Donc l'AKAP150 supprime d'une part les régulations par les stimuli physiques et d'autre part la régulation Gq du canal. Nous avons montré que cette perte de régulation Gq est due à une perte de la capacité de la PKC à réguler TREK1 en présence d'AKAP.

L'AKAP150 étant une protéine d'échafaudage capable de former des microdomaines de régulation, nous avons testé la capacité de l'AKAP à localiser le canal TREK1 à proximité d'un récepteur couplé à Gs. Le récepteur adrénergique  $\beta_2$  ( $\beta_2$ AR) est un récepteur couplé à la protéine Gs capable d'interagir avec l'AKAP150. Lorsque TREK1 et  $\beta_2$ AR sont exprimés dans un système hétérologue, ils ne colocalisent absolument pas (il ne sont pas ensemble dans la cellule). A l'inverse, en présence d'AKAP, le récepteur  $\beta_2$ AR et l'AKAP colocalisent (sont ensemble dans la cellule) et donc interagissent par l'intermédiaire de l'AKAP. Nous avons confirmé ce résultat par des expériences de co-immunoprécipitation à partir de lysat de cerveau. De plus, les expériences d'électrophysiologie indiquent que la régulation du canal par  $\beta_2$ AR est facilitée par l'AKAP (figure 9, planche II).

Nous avons donc montré que l'AKAP150 transforme le canal TREK, qui a une faible activité de base et qui est hautement régulé, en un canal présentant une forte activité basale et qui n'est régulé que par les récepteurs couplés à la protéine Gs (figure 10). D'autre part l'AKAP150 permet au canal TREK de se localiser dans des microdomaines de régulation adrénergiques post-synaptiques.

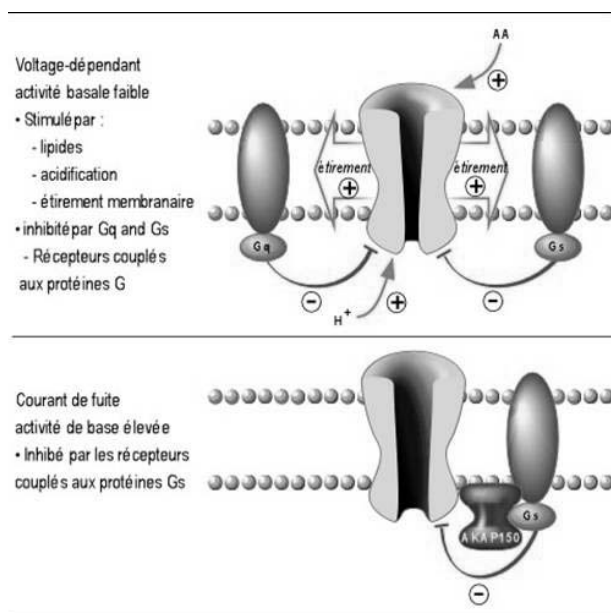


Fig. 10 : Modification des propriétés fonctionnelles de TREK1

Ainsi, la localisation subcellulaire de TREK1, et surtout son interaction avec l'AKAP150, permettent de modifier son mode de fonctionnement, c'est-à-dire qu'un même canal peut avoir deux modes de fonctionnement en fonction de sa localisation. Ces modes alternatifs de fonctionnement sont probablement impliqués différemment dans le contrôle de l'excitabilité neuronale et le codage de l'information.

Le rôle différentiel de ces différentes interactions *in vivo* sera étudié. Pour ce faire, nous développons actuellement *in vitro* une protéine de fusion contenant la partie carboxy-terminale de TREK1 qui est impliquée dans l'interaction avec l'AKAP150 et un peptide TAT. Le peptide TAT permet à la protéine qui est fusionnée de pénétrer à l'intérieur des cellules [12]. Cette technique permet d'inhiber l'interaction entre les protéines TREK1 et AKAP150 dans la cellule et ainsi d'étudier le rôle de l'interaction AKAP150/TREK1 chez l'animal. De tels outils moléculaires serviront pour comprendre les rôles de ces interactions dans les phénotypes obtenus avec les souris TREK1<sup>-/-</sup> (neuroprotection, douleur, dépression...). A terme, la mise en relation phénotype/interaction permettra l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées, notamment pour les problèmes de dépression ou de neuroprotection.

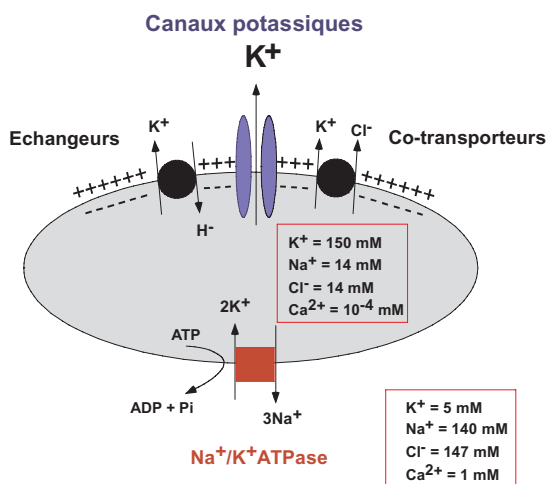
## Références

- 1 DECRESSAC S., FRANCO M., BENDAHOU S., WARTH R., KNAUER S., BARHANIN J., LAZDUNSKI M., LESAGE F. (2004). ARF6-dependent interaction of the TWIK1 K<sup>+</sup> channel with EFA6, a GDP/GTP exchange factor for ARF6. *EMBO Rep*, 5, 1171-1175.
- 2 ESCAYG A., DE WAARD M., LEE D.D., BICHET D., WOLF P., MAYER T., JOHNSTON J., BALOH R., SANDER T., MEISLER M.H. (2000). Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet*, 66:1531-1539.
- 3 GIRARD C., TINEL N., TERRENOIRE C., ROMÉY G., LAZDUNSKI M., BORSOTTO M. (2002). p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K<sup>+</sup> channel, TASK-1. *Embo J*, 21, 4439-4448.
- 4 HEURTEAUX C., GUY N., LAIGLE C., BLONDEAU N., DUPRAT F., MAZZUCA M., LANG-LAZDUNSKI L., WIDMANN C., ZANZOURI M., ROMÉY G., LAZDUNSKI M. (2004). TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *Embo J*, 23, 2684-2695.
- 5 HEURTEAUX C., LAIGLE C., BLONDEAU N., JARRETOU G., LAZDUNSKI M. (2006a). Alpha-linolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia. *Neuroscience*, 137, 241-251.
- 6 HEURTEAUX C., LUCAS G., GUY N., EL YACOUBI M., THUMMLER S., PENG X.D., NOBLE F., BLONDEAU N., WIDMANN C., BORSOTTO M. *et al.* (2006b). Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci*, 9, 1134-1141.
- 7 HONORE E. (2007). The neuronal background K<sup>2P</sup> channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci*, 8, 251-261.
- 8 LESAGE F., LAZDUNSKI M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279, F793-801.
- 9 MICHEL J.J., SCOTT J.D. (2002). AKAP mediated signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 235-257.
- 10 RAJAN S., PREISIG-MULLER R., WISCHMEYER E., NEHRING R., HANLEY P.J., RENIGUNTA V., MUSSET B., SCHLICHTHORN G., DERST, C., KARSCHIN A., DAUT J. (2002). Interaction with

- 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J Physiol*, 545, 13-26.
- 11 SANDOZ G., THUMMLER S., DUPRAT F., FELICIANGELI S., VINH J., ESCOUBAS P., GUY N., LAZDUNSKI M., LESAGE F. (2006). AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. *Embo J*, 25, 5864-5872.
- 12 SCHWARZE S.R., HO A., VOCERO-AKBANI A., DOWDY S.F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, 285, 1569-1572.

**Guillaume Sandoz**

Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne  
sandoz@ipmc.cnrs.fr



Le potentiel de Nernst pour le potassium  
=  $RT/zF \ln ([K^+]_{ext}/[K^+]_{int})$

R = constante des gaz parfaits  
T = température en degré Kelvin  
z = charge de l'ion  
F = constante de Faraday

Fig. 1 : Transport de l'ion potassium. La pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase transporte l'ion K<sup>+</sup> à l'intérieur de la cellule contre son gradient électrochimique et est ainsi responsable de sa forte concentration intracellulaire. L'ion potassium sort de la cellule par l'intermédiaire des canaux ioniques mais également par les échangeurs et les co-transporteurs.

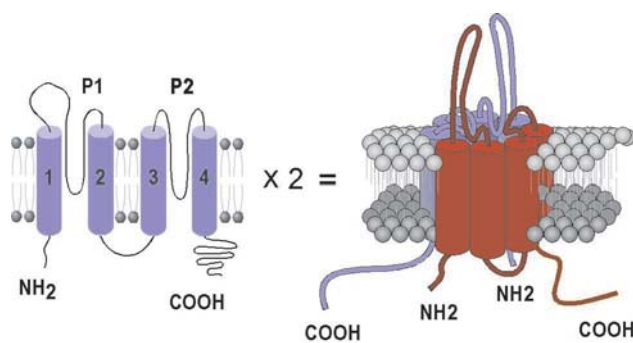


Fig. 3 : Topologie membranaire des canaux K<sub>2P</sub>

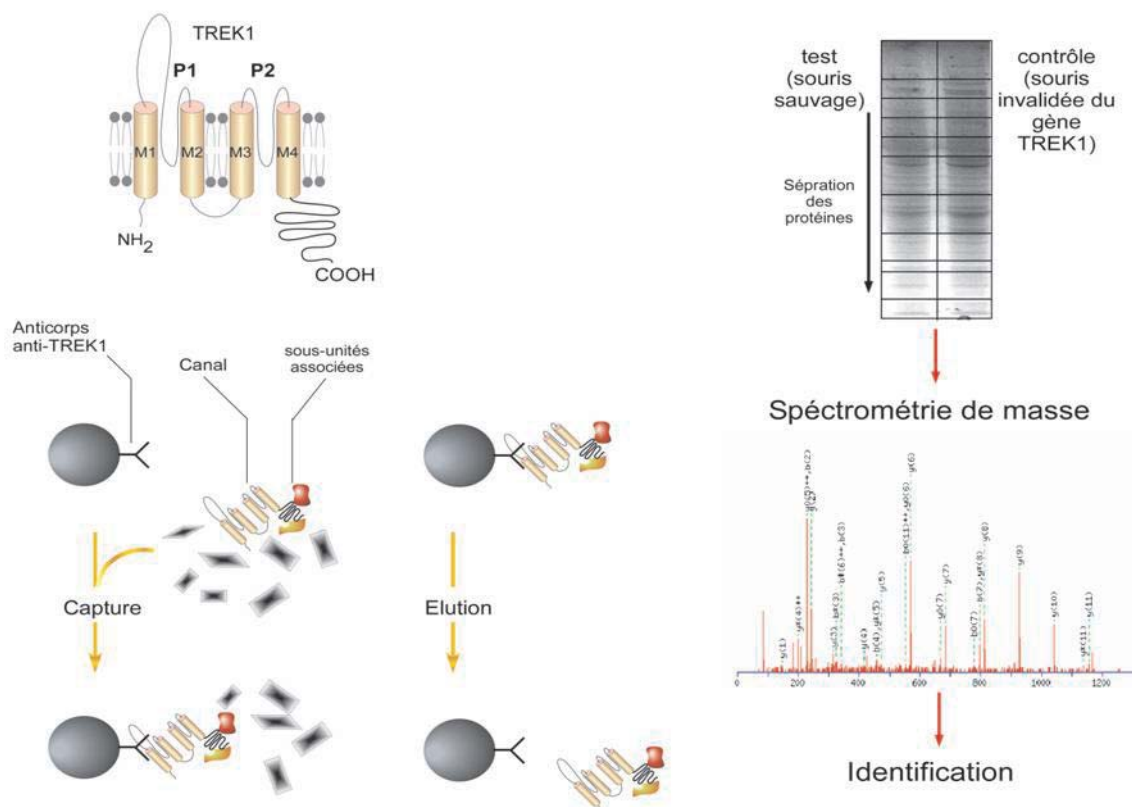


Fig. 6 : Principe de l'immunopurification : A) l'anticorps anti-canal (préalablement fixé sur des billes) est incubé avec un lysat de cerveau. Le canal et ses protéines associées se fixent sur la colonne via l'anticorps anti-canal. La colonne est lavée, les protéines non liées sont éliminées puis les protéines interagissant avec le canal sont éluées. Ces protéines sont ensuite analysées sur un gel PAGE (séparation en fonction du poids moléculaire) et leur nature est révélée par analyse de la masse de leurs fragments tryptiques en spectrométrie de masse (LC-MS/MS).



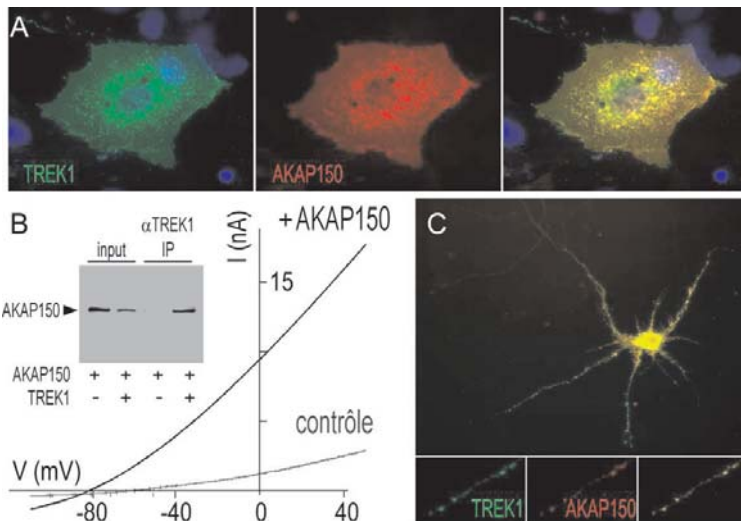


Fig. 7 : L'AKAP150 interagit avec TREK1 et le régule : A) Le canal TREK1 (vert) et l'AKAP150 (rouge) colocalisent (jaune) dans les cellules transfectées MDCK. B) L'amplitude du courant TREK1 est fortement augmentée par la coexpression de l'AKAP150. Insert : l'anticorps dirigé contre TREK1 précipite l'AKAP150 spécifiquement. C) TREK1 et l'AKAP150 colocalisent dans les neurones d'hippocampe au niveau post-synaptique (grossissement en dessous).

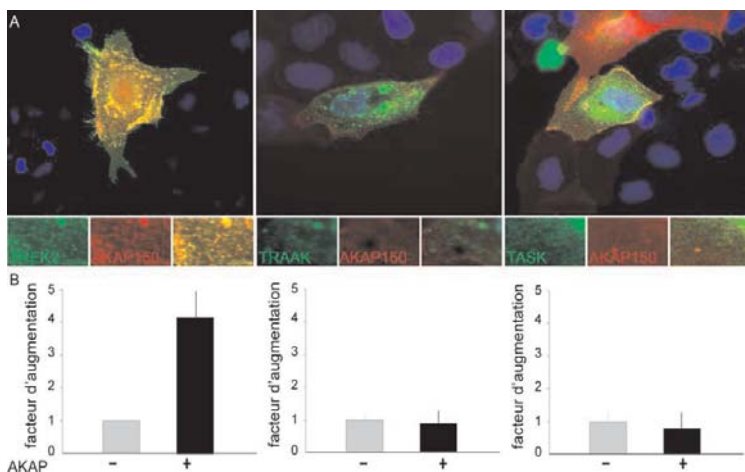


Fig. 8 : L'AKAP150 interagit spécifiquement avec les canaux TREK. A) Coexpression des canaux TREK2, TRAAK et TASK (vert) avec l'AKAP150 (rouge) dans les cellules MDCK. Seul TREK2 colocalise (jaune) avec l'AKAP150. B) Effet de la surexpression d'AKAP150 sur les courants TREK2, TRAAK et TASK. Seul TREK2 voit son amplitude augmentée par la surexpression de l'AKAP150.

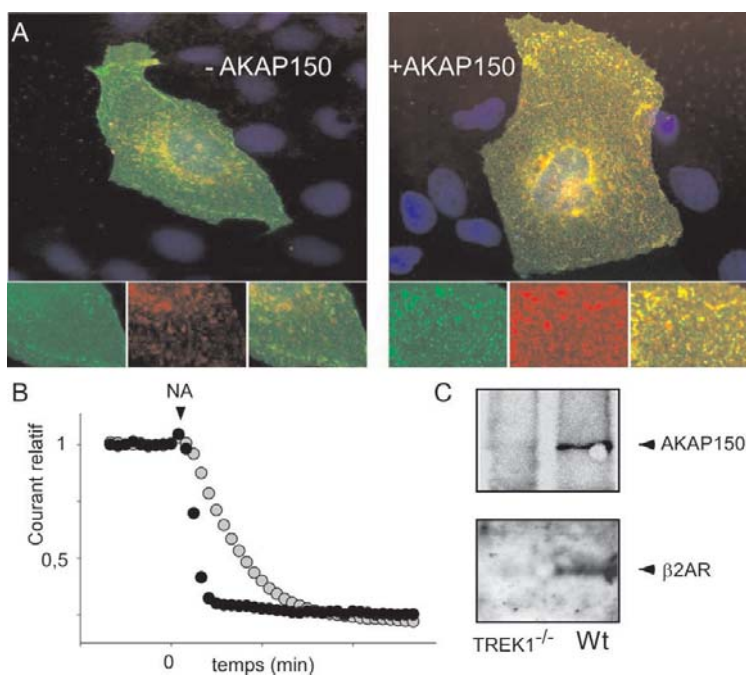


Fig. 9 : L'AKAP150 permet à TREK de se localiser dans un microdomaine de régulation. A) Coexpression du canal TREK1 (vert) avec le récepteur beta2adrénergique ( $\beta$ 2AR) (rouge). Le canal et le récepteur  $\beta$ 2AR ne colocalisent (jaune) qu'en présence de l'AKAP150 mais pas en son absence. B) La coexpression de l'AKAP150 accélère la cinétique d'inhibition du courant TREK par l'activation du récepteur  $\beta$ 2AR suite à l'application de noradrénaline (NA). C) L'anticorps dirigé contre TREK1 est capable de précipiter l'AKAP150 et le  $\beta$ 2AR du lysat de cerveau des souris sauvages (Wt) mais pas des souris KO ( $TREK1^{-/-}$ ) qui constituent le contrôle.