AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

U.F.R. Sciences & Techniques de la Matière et des Procédés

Ecole Doctorale Lorraine de Chimie et Physique Moléculaires

Département de Chimie - Physique

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy - I

en Chimie Informatique et Théorique

par **Werner L. Treptow**

Canaux ioniques sensibles à la tension: contribution à l'étude de l'excitabilité cellulaire

Soutenance publique le 5 Avril de l'an 2004

✓ Membres du jury

Rapporteurs :

M. **Michael L. KLEIN** - Hepburn Professor, University of Pennsylvania, États-Unis

Mme. **Catherine ETCHEBEST** - Professeur, Université Denis Diderot, Paris, France

Examinateurs :

M. **Jean-Luc POPOT** - Directeur de recherche au CNRS, Paris, France

M. **Mounir TAREK** - Chercheur au CNRS, Université Henri Poincaré, Nancy, France

M. **Christophe CHIPOT** - Chercheur au CNRS, Université Henri Poincaré, Nancy, France

M. **Daniel CANET** - Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy, France

Unité **M**ixte de **R**echerche "**S**tructure et **R**éactivité des **S**ystèmes **M**oléculaires **C**omplexes"
Equipe de Dynamique des Assemblages Membranaires
Falcuté des Sciences & Techniques – 54500 Vandoeuvre lès nancy

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

INDEX

I – RESUME 1

II – INTRODUCTION 3

II.1 – ASPECTS GENERAUX 3

II.2 – FONCTION ET PROPRIETES DES CANAUX IONIQUES SENSIBLES A LA TENSION 5

II.3 – BASE MOLECULAIRE DU FONCTIONNEMENT DES CANAUX IONIQUES SENSIBLES A LA TENSION 11

II.4 – UN MODELE POUR LES CANAUX IONIQUES SENSIBLES A LA TENSION 19

II.5 – REFERENCES 27

III – OBJECTIFS 33

III.1 – OBJECTIF GENERAL 33

III.2 – OBJECTIFS SPECIFIQUES 33

IV – METHODES 35

IV.1 – MODELISATION MOLECULAIRE: CONSIDERATIONS GENERALES 35

IV.2 – CONFIGURATION INITIALE 37

IV.2.1 – MODELISATION PAR HOMOLOGIE DE SEQUENCES 39

IV.2.2 – INTERACTION DE TYPE PROTEINE - PROTEINE ("DOCKING") 41

IV.3 – SIMULATIONS NUMERIQUES 43

IV.3.1 – MECANIQUE MOLECULAIRE 43

IV.3.2 – SIMULATION DE DINAMIQUE MOLECULAIRE 45

IV.3.2.1 – LES EQUATIONS DU MOUVEMENT 47

IV.3.2.2 – LES INTEGRATEURS DU MOUVEMENT 48

IV.3.2.3 – LES ENSEMBLES STATISTIQUES 51

IV.3.2.3.1 – SIMULATIONS A TEMPERATURE CONSTANTE 52

IV.3.2.3.2 – SIMULATIONS A PRESSION CONSTANTE 54

IV.3.2.4 – LA FONCTIONNELLE ENERGIE POTENTIELLE 56

IV.3.2.4.1 – LIAISONS CHIMIQUES, ANGLES DE VALENCE ET DIEDRES 60

IV.3.2.4.2 – POTENTIEL DE LENNARD – JONES ET CHARGES PARTIELLES 62

IV.3.2.4.3 – INTERACTIONS ELECTROSTATIQUES 64

IV.4 - REFERENCES 70

V – RESULTATS 75

V.1 – MODELISATION MOLECULAIRE DU CANAL POTASSIUM SENSIBLE A LA TENSION, *SHAKER* B 75

VI – DISCUSSION 135

VI.1 – ETAT D'ART 135

VI.2 – MODELISATION DES CANAUX IONIQUES SENSIBLES A LA TENSION 137

VI.3 – PHARMACOLOGIE DES CANAUX IONIQUES SENSIBLES A LA TENSION 139

VI.4 – REFERENCES 142

VII – CONCLUSIONS ET PERPECTIVES 147

VII.1– REFERENCES 148

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LÈS-NANCY

I - RESUME

L'excitabilité cellulaire est une propriété électrique de la membrane plasmique. Chez les humains, cette propriété est indispensable pour les processus physiologiques de signalisation nerveuse. Au niveau moléculaire, l'excitabilité est dérivée de la fonction des canaux ioniques sensible à la tension. Pour cette raison, plusieurs pathologies sont la conséquence directe d'un dysfonctionnement de ces systèmes moléculaires complexes qui correspondent également à des cibles pour l'association de toxines. Les canaux ioniques sensibles à la tension permettent le passage d'ions a travers la membrane en réponse à une variation du potentiel transmembranaire. La caractérisation fonctionnelle des canaux ioniques a été le principal objectif de plusieurs domaines de recherche scientifique. Pour cet objectif, la détermination de la structure moléculaire constitue un prérequis fondamental. Une structure cristallographique de haute résolution du canal potassium sensible à la tension, KvAP, a été déterminée récemment. Bien que l'élucidation de cette structure corresponde à une étape historique de la biophysique, les caractéristiques structurales de ce canal ne sont pas en accord avec plusieurs résultats expérimentaux accumulés au cours des dernières années. Ce modèle a été critiqué à la lumière d'expériences publiées durant les derniers mois, suggérant que la structure proposée du KvAP ne constitue pas à un canal fonctionnel. Dans ce contexte, un modèle tout-atome de la région transmembranaire du canal

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

potassium sensible à la tension, *Shaker* B, obtenu par modélisation moléculaire, est proposé ici en accord avec plusieurs résultats expérimentaux. Les propriétés moléculaires de cette structure ont été étudiées grâce à des simulations de la dynamique moléculaire sur architecture parallèle – i.e. le système macromoléculaire constitué du canal inséré dans une membrane lipidique hydratée a été simulée en présence d'une différence de potentiel électrique transmembranaire. L'originalité de ce travail réside dans l'étude inédite des propriétés microscopiques gouvernant le fonctionnement des canaux ioniques sensibles à la tension, par les méthodes numériques. La variation du potentiel transmembranaire induit des changements conformationels indicatifs d'un mécanisme d'activation conforme à la fonction observée des canaux. Au cours de l'expérience *in silico*, la structure interne du canal est hydratée et le degré d'hydratation augmente sous l'influence du potentiel transmembranaire. Ce résultat inattendu suggère que la structure d'hydratation peut correspondre à une propriété importante et nécessaire pour le mécanisme d'activation de tels canaux. Enfin, le modèle structural a été corroboré par l'exams approfondi de l'interaction du canal *Shaker* B et de toxines correspondantes qui affectent sa fonction. La vue microscopique mise en lumière ici fournit de nouvelles directions pour l'étude des canaux ioniques sensibles à la tension, et un modèle pour le développement scientifique dans d'autres secteurs de recherche, comme, la médicine et la pharmacologie.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES

II - INTRODUCTION

II.1 – ASPECTS GENERAUX

L'excitabilité cellulaire est une propriété électrique clef de la membrane plasmique participant à des processus physiologiques importants, tels que, la signalisation nerveuse. Au niveau microscopique, cette propriété dérive du fonctionnement des protéines de transport présentes dans la membrane, à savoir les canaux ioniques sensibles à la tension. Ces canaux sont responsables du flux d'ions entre les faces intra- et extracellulaires (voir figure 1). Face à l'importance de cette fonction dans les processus vitaux et les nombreuses pathologies associées, la compréhension de la relation structure/fonction de ces protéines constitue aujourd'hui l'un des principaux défis pour la biologie structurale moderne. Dans la mesure où ils sont ubiquitaires à tous les organismes, les canaux ioniques sensibles à la tension représentent également des cibles pour de nombreuses espèces agonistes et antagonistes. La mise au point de nouvelles molécules qui modifient la fonction des ces canaux est donc un des axes de recherche de la biochimie et de la pharmacologie actuellement en pleine effervescence. Dans ce contexte, l'étude de l'action de toxines sur les canaux ioniques s'avère être un outil indispensable non seulement pour la

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

caractérisation de la fonction de ces macromolécules, mais également pour le développement de nouveaux médicaments.

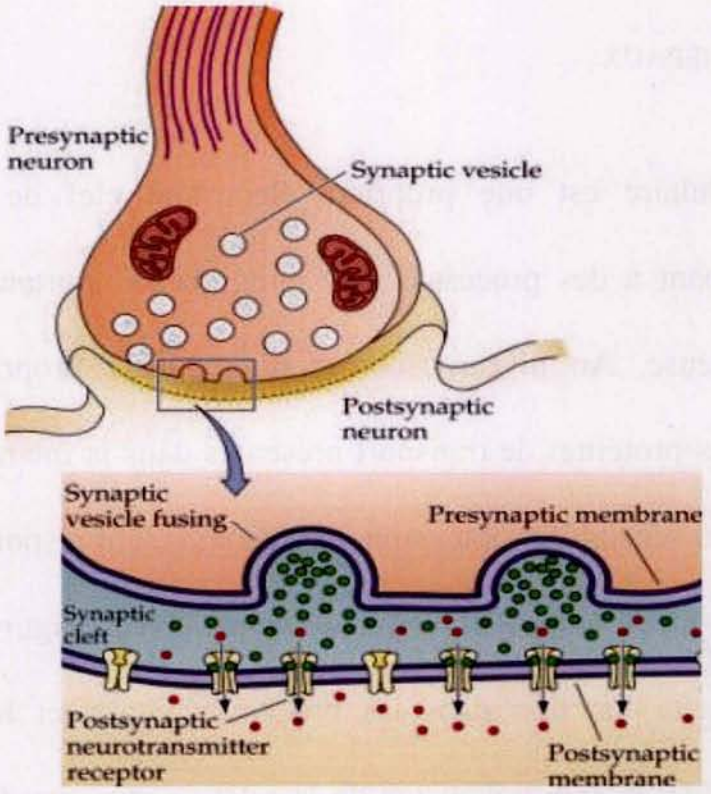

Figure 1 : Signalisation nerveuse. En haut, l'extrémité d'une cellule nerveuse est montrée dans la région de l'ouverture synaptique. Le détail en bas, montre l'existence de plusieurs protéines de transport responsables du flux d'ions à travers la membrane de la cellule nerveuse. Ce flux ionique est indispensable pour la génération et la propagation du signal nerveux.

II.2 – FONCTION ET PROPRIETES DES CANAUX IONIQUES SENSIBLES A LA TENSION

Les protéines responsables de la fonction de transport de matière à travers la membrane sont présentes dans tous les organismes vivants. Au sein de cette grande famille, le transport d'ions est effectué par un type spécial de protéines qui construisent le pore ou canal, *i.e.* les canaux ioniques (Deutsch, 2003). Ces canaux sont indispensables pour plusieurs fonctions vitales des organismes vivants. Un type particulier de canal ionique, les canaux ioniques sensible à la tension, sont nécessaires à l'excitabilité cellulaire. Chez les humains, ces protéines sont responsables de la contraction musculaire, la sécrétion cellulaire et la signalisation nerveuse, en particulier la régulation du potentiel d'action (Berne and Levy, 1998). En outre, elles correspondent à des cibles spécifiques chez un grand nombre de molécules offrant un potentiel pharmacologique (Catterall, 2002; Tan et al., 2003), tels que les anesthésiants et les toxines d'origine végétale ou animale, et plus spécifiquement celles de scorpion (Srinivasan et al., 2002; Gordon and Gurevitz, 2003; Massensini et al., 2003) et d'anémone de mer (Norton, 1991; Honma et al., 2003).

L'une des conséquences de ce haut niveau de spécialisation est que de nombreuses pathologies humaines résultent du désordre dans ces protéines. C'est le cas, par exemple, du syndrome du QT long, de l'hyperthermie maligne, de la paralysie périodique hyperkaliémique, de la paramyotonie congénitale et

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

de la myotonie permanente (Rudy, 1999; Kullmann and Hanna, 2002; Napolitano et al., 2003).

Les canaux ioniques sensibles à la tension contiennent un pore hydrophile central (voir figure 2), qui peut être ouvert ou fermé, en réponse à une variation du potentiel électrique transmembranaire, permettant ainsi la conduction d'ions spécifiques, par exemple, Na^+, K^+ et Ca^{2+}, à travers la membrane (Hodgkin and Huxley, 1952). Dans cette éventualité, le passage est bel et bien sélectif et correspond à un processus en fonction du potentiel électrochimique et indépendant de l'énergie.

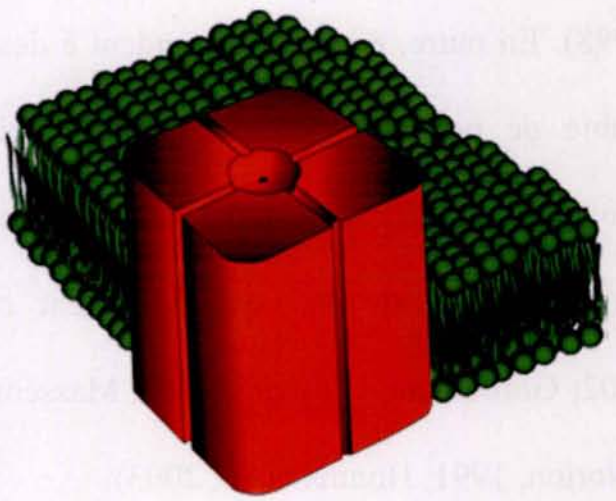

Figure 2 : Modèle minimaliste d'un canal ionique sensible à la tension. La formation d'un pore hydrophile central par le canal (en orange) permet le passage ionique à travers la membrane (en vert).

Dans ce contexte fonctionnel, les canaux ioniques sensible à la tension peuvent donc occuper trois états de conduction bien définis et dépendant du potentiel transmembranaire: les états au repos, activé et inactivé (Buzatu, 2003). Sous l'action d'un potentiel correspondant à l'état polarisé de la membrane, ces protéines occupent l'état au repos, dans lequel le pore de conduction, en l'absence de flux ionique, est fermé. *A contrario*, les états activé et inactivé sont observés sous l'action d'un potentiel correspondant à l'état dépolarisé de la membrane. Dans l'état activé, le pore est ouvert et permet une haute conduction ionique à travers la membrane. L'état inactivé, en revanche, n'autorise pas la conduction ionique ou l'autorise avec une conductance notoirement faible, alors que le pore est ouvert. En général, les transitions cinétiques entre ces états sont appelées *gating*, en correspondance avec les mécanismes d'activation, de désactivation, d'inactivation et de récupération. Dans la figure 3, ces propriétés sont illustrées pour les canaux de Na^+ dépendant de la tension.

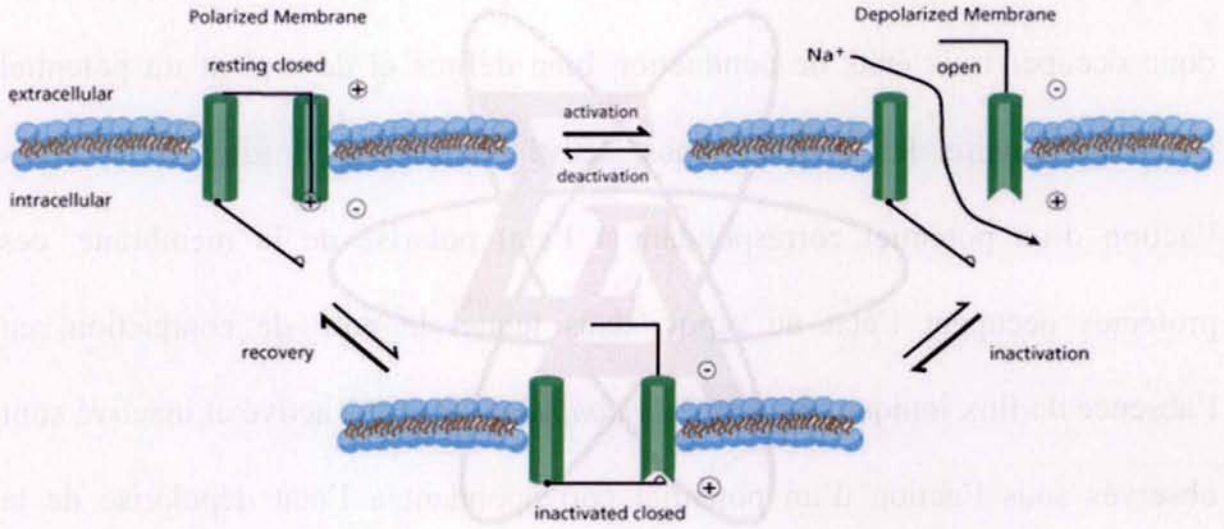

Figure 3 : Fonctionnement d'un canal sodium sensible à la tension. Trois états macroscopiques bien définis sont observés en fonction du potentiel électrique transmembranaire : les états au repos, activé et inactivé. Dans l'état polarisé de la membrane, le canal est au repos avec le pore de conduction fermé, incapable de conduire (en haut, à gauche). En revanche, l'état d'activation se produit en fonction de la dépolarisation de la membrane et correspond au pore de conduction ouvert, capable de conduire (en haut à droite). De façon similaire, l'état d'inactivation se caractérise également par une dépolarisation de la membrane. Toutefois, dans ce cas, le pore est incapable de conduire, bien qu'il soit ouvert (en bas). Les transitions cinétiques entre ces états résultent de différents mécanismes d'activation, de désactivation, d'inactivation et de récupération.

Une mesure directe du fonctionnement de ces canaux peut être obtenue à partir du potentiel d'action (voir figure 4). Les propriétés d'ouverture ou de fermeture du pore contrôlées par la tension et la haute sélectivité ionique des canaux ioniques sensibles à la tension (Hille, 1992) sont nécessaires à la génération, la propagation et la repolarisation du potentiel d'action. En particulier, les canaux sodium et potassium participent au potentiel d'action dans les cellules excitables

comme les neurones, les cellules du muscle squelettique et cardiaque. Le potentiel d'action (Rojas et al., 1970) est caractérisé par deux états différents de la membrane plasmique – l'état polarisé et l'état dépolarisé. La dépolarisation de la membrane active initialement les canaux sodium et induit des courantes ioniques à travers la membrane, dans la direction intracellulaire, lesquels génèrent et propagent le potentiel d'action. De manière concomitante à la dépolarisation, les canaux potassium sont activés (Schoppa and Sigworth, 1998) et permettent le passage ionique dans la direction extracellulaire, et, par conséquent, la repolarisation de la membrane pour un nouveau potentiel d'action.

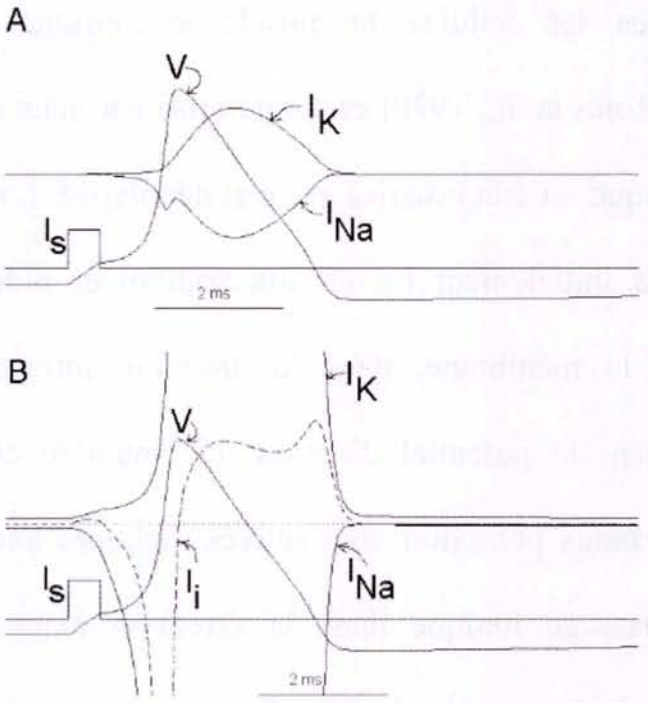

Figure 4 : Potentiel d'action. A) Génération et propagation du potentiel d'action à la suite d'une dépolarisation de la membrane par un courant stimulant [I_s ($\mu A/cm^2$)]. Des courants ioniques sodium [I_{Na} ($\mu A/cm^2$)] et potassium [I_K ($\mu A/cm^2$)] sont observés au cours du potentiel d'action [V (mV)], en dépolarisant et répolarisant la membrane plasmique, respectivement. Dans ce cas, le potentiel (V) a une durée de 2 millisecondes. B) Le potentiel d'action est équivalent à celui de A), avec une amplification des courants de l'ordre de vingt fois. Le courant total pour la membrane [I_i ($\mu A/cm^2$)], issu principalement des courants sodium et potassium, est également montré.

II.3 – BASE MOLECULAIRE DU FONCTIONNEMENT DES CANAUX IONIQUES SENSIBLES A LA TENSION

Les avancées de la génétique et de la biologie moléculaire ont permis l'identification et le clonage d'une grande variété d'analogues de canaux ioniques sensibles à la tension (Goldin, 1999; Wang et al., 1992). Quelques unes des sources génétiques de cette variété sont attribuées à la divergence, la duplication et la fusion géniques, et le traitement des ARN (Rudy, 1999). Ces canaux sont généralement structurés en homo ou en hétéro-oligomères avec des sous-unités dissimilaires, telles que les sous-unités α et ß (Isom et al., 1994). Dans les canaux sodium et calcium, l'unité fonctionnelle est la sous-unité α. Cette unité monomérique contrôle l'ouverture et la fermeture du pore en fonction de la tension, et est donc responsable du flux ionique à travers de la membrane. D'une façon différente, l'unité fonctionnelle des canaux potassium, homologue à la sous-unité α des canaux sodium et calcium, présente une organisation tétramérique, pouvant inclure des unités monomériques identiques (MacKinnon, 1991).

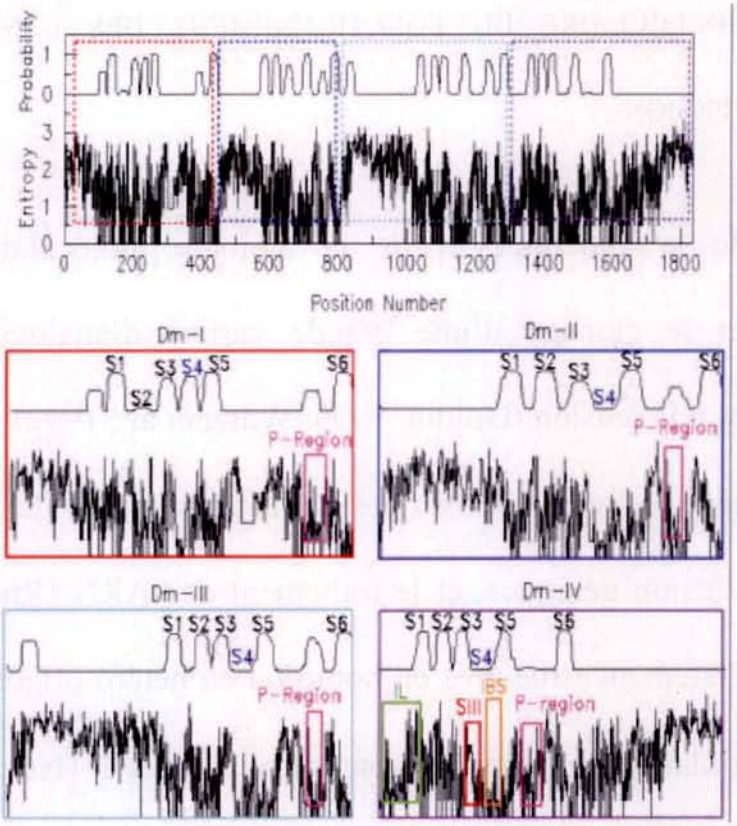

Figure 5 : Analyse de la séquence primaire du canal sodium sensible à la tension du muscle squelettique humain (SkM1) (George et al., 1992). En haut, la probabilité des segments transmembranaires et l'entropie d'information du canal SkM1 sont montrées en fonction de la position dans la séquence. La probabilité des segments transmembranaires a été calculée en utilisant le programme TMHMM (Krogh et al., 2001). Pour le calcul de l'entropie du SkM1, la théorie d'information a été employée (Hyvärinen, 1970). L'entropie de la séquence du SkM1 a été estimée en considérant un alignement multiple de dix séquences de canal sodium sensible à la tension, tirées d'organismes distincts au cours de l'évolution. Pour cette proposition, chaque position de l'alignement a été considérée comme un message de m=10 cellules, avec un canal d'information constitué par un bloc de n=22 caractères (i.e. les aminoacides et le *gap* de l'alignement). Chaque message correspond donc, au niveau syntaxique, à un système discret d'information sans bruit. Dans ce cas, la capacité d'information (C) de chaque position de l'alignement (M) est donnée par $C^{(10)} = \log_2(M_{10})$, où $M_{10} = 22^{10}$, avec l'entropie, ou taxe d'information, donnée par $I = -[p_1 \times \log_2(p_1) + ... + p_i \times \log_2(p_i)]$, où p_i est la probabilité du caractère i = 1, ..., 22, dans le message. Ce traitement est valable si l'on considère que les cellules successives du message ou les caractères occupant chaque cellule sont

effectivement indépendantes. Dans le cas d'un l'alignement multiple, une telle hypothèse est parfaitement acceptable eu égard à l'indépendance des séquences distinctes de canal sodium. En bas, une vision amplifiée de chaque région contenant un domaine transmembranaire (Dm-I, II, III e IV) est montrée. De tels domaines ont été prédits par le programme PFAM (Sonnhammer et al., 1997). La localisation détaillée des segments transmembranaires (S1–S6) et des autres régions fonctionnellement importantes est montrée, *e.g.* la région P, la boucle d'inactivation (IL), le site de liaison de la boucle d'inactivation (IBS) et le site de liaison des toxines peptidiques (SIII) (*vide infra*). Le segment S4 est colorié en bleu pour souligner sa nature chargée positivement.

L'ampliation du nombre de séquences dans les banques d'information rend possible la discrimination de régions conservées au cours de l'évolution. De telles régions apparaissent dans la sous-unité α ou unité fonctionnelle des canaux ioniques (Isom et al., 1994) et correspondent à des extensions de la séquence primaire contenant une faible entropie d'information. Ceci est illustré dans la figure 5, où une étude a été entreprise pour analyser ces séquences du point de vue de la théorie de l'information. Par ailleurs, ces régions conservées sont constituées, avec une grande probabilité, de segments transmembranaires en hélice a (figure 5). De manière générale, la sous-unité α des canaux sodium et calcium est donc organisée en quatre domaines transmembranaires homologues, Dm-I, II, III et IV, contenant des hélices a qui intégrales à la membrane plasmique. Chaque domaine transmembranaire possède six hélices transmembranaires (S1-S6) et un segment court (SS1-SS2 ou région P) entre les hélices S5 et S6 de chaque domaine. Seul un segment, S4, est chargé et contient quatre, cinq, six et huit résidus basiques dans les domaines Dm-I – Dm-IV,

respectivement. Dans l'organisation de l'unité fonctionnelle tétramérique des canaux potassium, la région transmembranaire de chaque monomère est équivalente à un domaine de la sous-unité α des canaux sodium et calcium. La topologie de ces canaux est illustrée dans la figure 6.

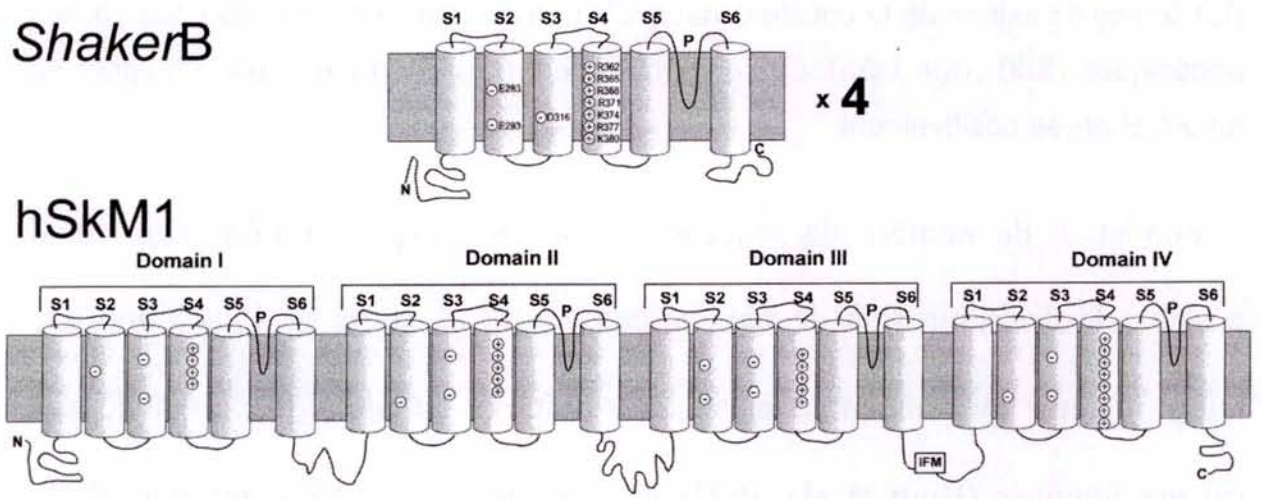

Figure 6 : Base moléculaire pour la conduction ionique (Bezanilla, 2000). La topologie des canaux ioniques sensibles à la tension est illustrée pour le canal potassium *Shaker* B de *Drosophila melanogaster* (Tempel et al., 1987) et pour le canal sodium hSkM1 du muscle squelettique humain (George et al., 1992). Pareillement aux canaux sodium, l'unité fonctionnelle des canaux calcium sensibles à la tension est la sous-unité α – une disposition successive de quatre domaines homologues dans la séquence primaire. Entre les domaines III et IV du canal hSkM1 est localisée la particule d'inactivation contenant les résidus Ile-Phe-Met (IFM) qui participent directement au mécanisme d'inactivation (*vide infra*).

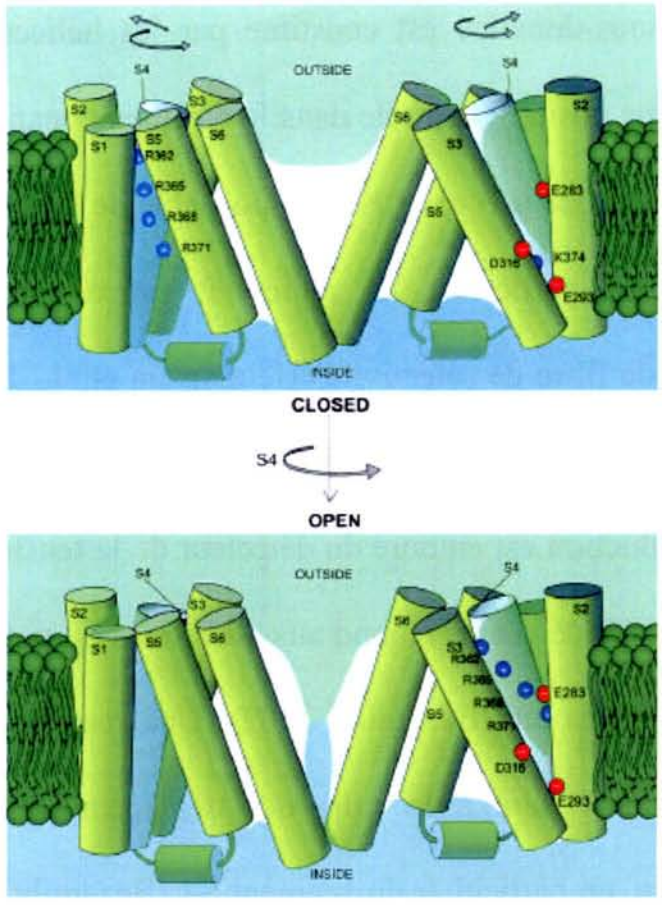

Figure 7: Modèle du mécanisme d'activation (Cha et al., 1999). Ici, le canal potassium sensible à la tension est considéré. Seules deux sous-unités du canal sont montrées, insérées dans la membrane lipidique. Des résidus chargés dans les segments S2–S4 sont indiqués en rouge et en bleu. Ces résidus contribuent au courant électrique issu des déplacements du domaine détecteur de la tension. En haut : Etat au repos du canal. Dans cet état, le pore de conduction, délimité par les segments S5 et S6, est fermé. En bas : Etat activé du canal. Dans cet état, le détecteur de la tension, constitué par les segments S1 - S4, change de conformation en réponse à la variation du potentiel transmembranaire. Ce changement conformationnel est couplé au pore de conduction induisant son ouverture. Il faut noter que les plus grandes variations conformationnelles sont suggérées pour l'hélice S4 (en bleue).

Les segments transmembranaires S1 à S6 sont fonctionnellement groupés en deux sous-domaines: le pore de conduction et le détecteur de la tension (Yellen,

2002). Le premier sous-domaine est constitué par les hélices S5 et S6. Ces segments occupent une position centrale dans le canal en constituant la route de conduction ionique (Tomaselli et al., 1995) responsable de la conduction et de la sélectivité ionique. En particulier, la région P est déterminante pour la sélectivité. On parle de filtre de sélectivité (Heinemann et al., 1992; Kim et al., 1993; Yang et al., 1993; Mikala et al., 1994; Favre et al., 1996). Le sous-domaine pore de conduction est entouré du détecteur de la tension, constitué par les segments S1 à S4. Ce détecteur répond aux variations du potentiel électrique transmembranaire (Chanda and Bezanilla, 2002). Une mesure directe de cette réponse est le courant généré à la suite des déplacements des hélices du détecteur de la tension, en particulier du segment S4 (Bezanilla, 2000). Dans ce cas, le mouvement des chaînes latérales des résidus basiques produit un courant mesurable entre les deux faces de la membrane (Yang et al., 1996). Au cours du mécanisme d'activation, des changements conformationels du détecteur de tension sont communiqués au pore de conduction (Horn, 2000), induisant ainsi son ouverture (voir figure 7). Le couplage conformationel entre le pore de conduction et le détecteur de tension est démontré par l'intime corrélation entre le courant ionique et le courant issu des déplacements du segment S4 (voir figure 8).

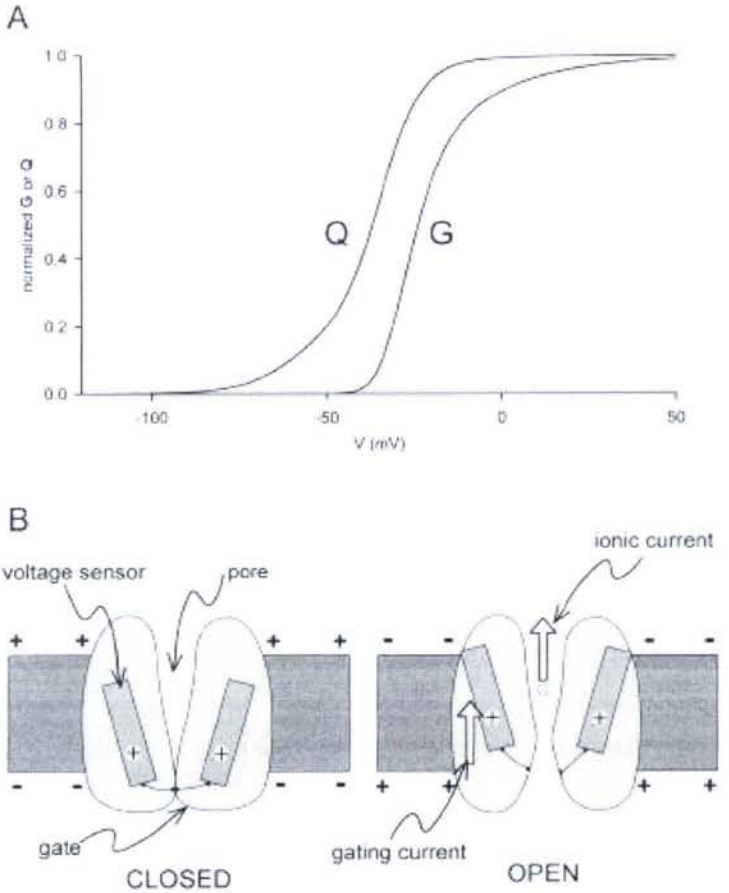

Figure 8 : Des courants électriques générés par le fonctionnement du canal (Bezanilla, 2000). A) Le courant ionique (G) du pore de conduction et le courant électrique (Q) issu du déplacement du détecteur de tension sont montrés. Les deux courants sont dépendants de la tension et, par conséquent, corrélés. B) Couplage conformationnel entre le détecteur de tension et le pore de conduction. A gauche, la membrane se trouve polarisée et le canal, au repos. Il convient de noter que le pore est fermé sur la face cytoplasmique de la membrane. A droite, des changements conformationels du détecteur de tension, en particulier dans le segment S4 (*gating current*), induisent l'ouverture du pore de conduction, permettant alors le passage d'ions (*ionic current*).

Une autre caractéristique marquante du fonctionnement des canaux ioniques sensibles à la tension est le processus d'inactivation. Sous une forme simpliste, ce mécanisme est analogue au modèle baptisé *ball and chain* (Armstrong and Bezanilla, 1977; Bezanilla and Armstrong, 1977). Le mécanisme d'inactivation

a été démontré pour les canaux potassium. Dans ce modèle, la face cytoplasmique du pore de conduction, *i.e.* la «chaîne», est bloquée après activation par la «balle» d'inactivation localisée dans la région N-terminale du canal (Isacoff et al., 1991; Zhou et al., 2001).

Un modèle approprié pour l'inactivation de canaux de Na^+ est le *hinged lid model* (Vassilev et al., 1988). D'après ce modèle, le flux ionique durant l'activation est bloqué par la liaison de l'extension cytoplasmique, entre les domaines Dm-III–Dm-IV (Vassilev et al., 1988), à une autre région, également cytoplasmique et localisée entre les segments S4 et S5, qui appartient au domaine Dm-IV (Tang et al., 1996; Filatov et al., 1998). Des preuves expérimentales indiquent que le motif constitué par les résidus Ile-Phe-Met (IFM) de l'extension entre les domaines Dm-III–Dm-IV fonctionne comme une particule d'inactivation (West et al., 1992). Ce motif IFM est montré sur la topologie du canal de Na^+ dans la figure 6. L'interaction de ces résidus avec le site de liaison se mettre en travers le pore de conduction en induisant l'inactivation rapide du canal (Moorman et al., 1990). Les corrélations structurales entre le mécanisme d'inactivation et d'activation sont bien caractérisées pour les canaux sodium (Chen et al., 1996; Goldman, 1999). En réalité, l'extension entre les domaines Dm-III – Dm-IV influe sur la sensibilité à la tension de la phase d'activation, principalement quand la distribution de charges dans cette région est modifiée par mutation (Patton et al., 1992). L'effet

de cette région sur l'activation est une conséquence de soit l'interaction avec le segment S4, soit la modification des charges sur la face cytoplasmique du canal. Un autre mécanisme d'inactivation, dénommé inactivation lente, a été observé dans les canaux ioniques sensibles à la tension. Au cours de la dépolarisation, le pore arrête de conduire via un mécanisme encore mal caractérisé (McCollum et al., 2003).

II.4 – UN MODELE POUR LES CANAUX IONIQUES SENSIBLES A LA TENSION

Le développement d'une théorie générale pour l'excitabilité cellulaire demande nécessairement la détermination des propriétés moléculaires participant à la fonction des canaux ioniques sensibles à la tension. La caractérisation fonctionnelle de ces protéines est donc l'un des principaux problèmes pour la biophysique moderne (Yellen, 2002). Dans cette proposition, la résolution d'un modèle structural constitue un prérequis fondamental (Chung and Kuyucak, 2002).

Des découvertes en biologie moléculaire indiquent une même origine génique pour les canaux sodium et potassium sensibles à la tension, en suggérant une structure moléculaire similaire pour ces protéines, en particulier pour la région transmembranaire (Rudy, 1999). De telles découvertes tendent à indiquer que le modèle structural pour le canal potassium ressemble globalement à celui du

canal de sodium et calcium. Les efforts investis par la communauté scientifique ont été concentrés pour éclaircir la structure et la fonction des canaux ioniques sensibles à la tension, en utilisant comme modèle d'étude le canal potassium (Domene et al., 2003). Avec cet objectif en tête, plusieurs approches expérimentales et théoriques ont été adoptées, parmi lesquelles on distingue les techniques électrophysiologiques, les essais pharmacologiques, la résonance paramagnétique électronique, la résonance magnétique du noyau, la mutagenèse dirigée, la diffraction des rayons X et les simulations numériques. Aujourd'hui, un grand nombre d'informations expérimentales sont disponibles pour les différents membres de la famille des canaux potassium, et plus spécialement pour le canal potassium sensible à la tension, *Shaker* B, extrait de *Drosophila melanogaster*.

La structure du sous-domaine pore de conduction a été établie par diffraction des rayons X à haute résolution pour le canal potassium bactérien, KcsA (Doyle et al., 1998). Cette dernière constitue une signature structurale homologue à tous les canaux potassium (Durell et al., 1999; Jiang et al., 2002) (voir figure 9). Le modèle structural peut d'une façon très générale être appliqué aux canaux sodium et calcium, bien que des différences structurales plus grandes soient attendues pour la région P. La relation structure/fonction du sous-domaine pore de conduction, à savoir les propriétés intervenant dans le mécanisme de conduction ionique, ont été déterminées par simulations moléculaires (Capener

et al., 2002; Sansom et al., 2002; Giorgetti and Carloni, 2003; Burykin et al., 2003; Holyoake et al., 2003). Ces études ont prouvé que les ions potassium circulent par le filtre de sélectivité en adoptant une conformation plus stable, dans laquelle deux ions sont intercalés entre deux molécules d'eau (Bernèche and Roux, 2003; Domene and Sansom, 2003).

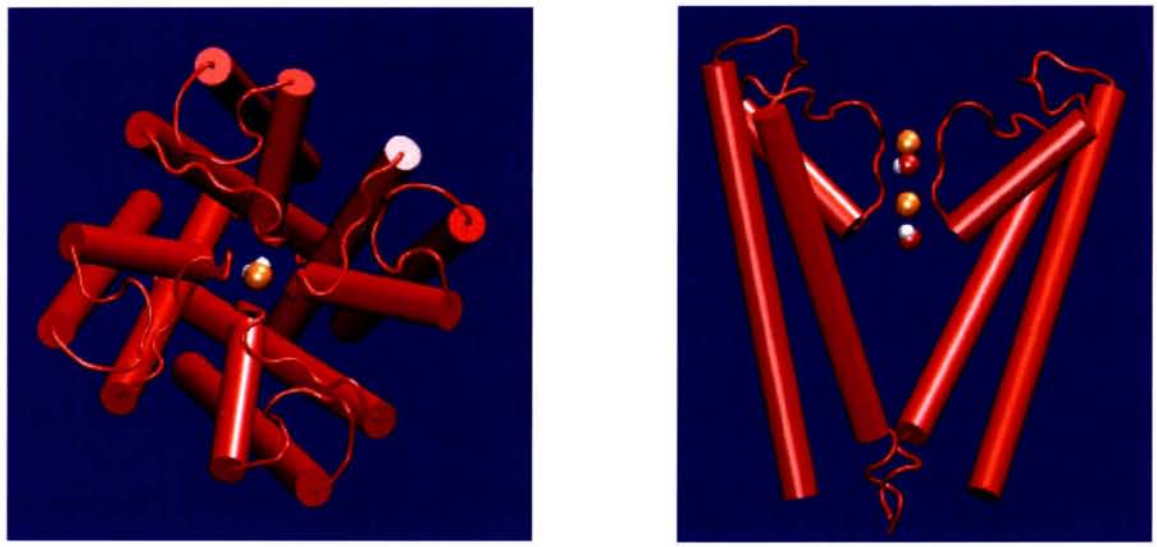

Figure 9: Pore de conduction du canal potassium (Doyle et al., 1998). La structure du canal KcsA de l'organisme *Streptomyces lividans* est représentée selon deux orientations différentes. A gauche : Vue extracellulaire du pore de conduction. L'organisation tétramérique est illustrée, dans laquelle chaque sous-unité est constituée par les hélices S5–S6 et la région P entre celles-ci. A droite : Vue latérale du pore de conduction. Seules deux sous-unités sont représentées. Il faut noter la présence de deux ions potassium (en orange) intercalés entre deux molécules d'eau dans la région du filtre de sélectivité. Les images ont été générées avec le programme VMD (Humphrey et al., 1996).

Récemment, un modèle structural cristallographique a été obtenu pour le canal potassium sensible à la tension, KvAP, extrait de la archea-bactérie *Aeropyrum pernix* (Jiang et al., 2003a). Ici, l'extension complète du domaine

transmembranaire (S1-S6) du canal potassium, dans une organisation tétramérique a été déterminée. Ce résultat correspond à une étape historique dans le secteur émergent de recherche sur les canaux ioniques sensibles à la tension, comme cela a été souligné dans la récente revue bibliographique proposée par Cohen et collaborateurs (Cohen et al., 2003). Roderick MacKinnon, l'auteur de cette découverte s'est vu récemment remettre le prix Nobel de chimie. Sa structure indique que le détecteur de tension est organisé autour du pore de conduction (voir figure 10). Dans le modèle proposé par MacKinnon, le segment S4 dans la structure du canal adopte une orientation parallèle par rapport à la face cytoplasmique de la membrane. Un mécanisme d'activation a été suggéré à la lumière de cette structure statique du canal KvAP (Jiang et al., 2003b). Ce mécanisme consiste en un déplacement conjoint des segments S3 et S4 en réponse à une variation de tension. Dans ce schéma, la portion S3–S4 fonctionne comme un «cation hydrophobe», qui peut se déplacer de la face intracellulaire de la membrane à l'autre extrémité, pendant la dépolarisation de celle-ci.

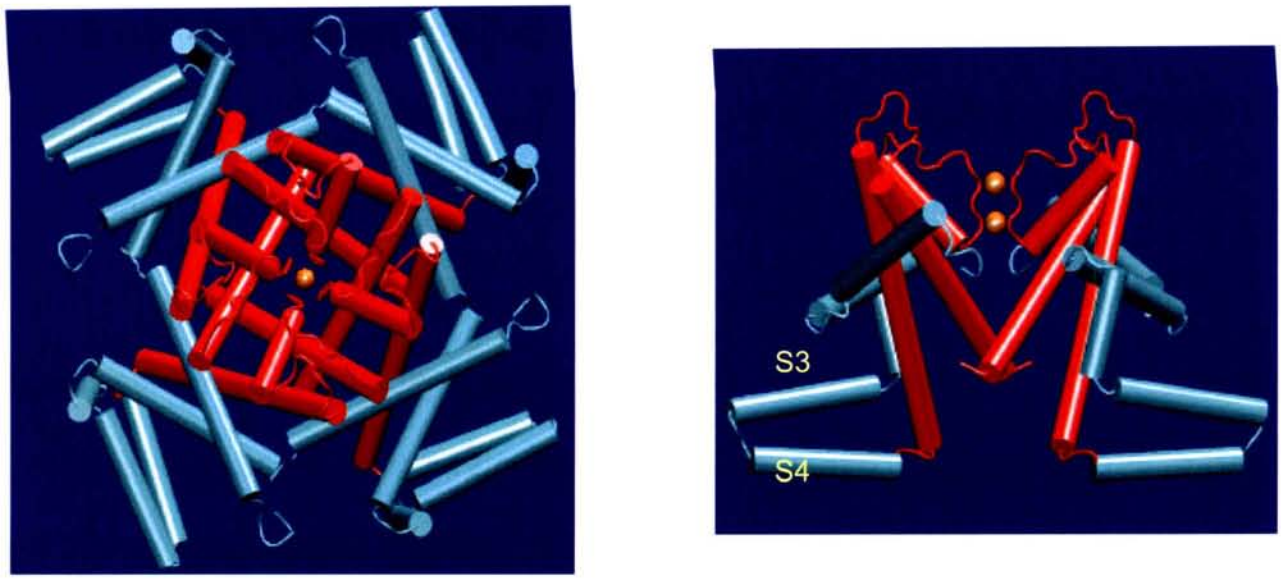

Figure 10 : Modèle structural des canaux potassium sensibles à la tension. Structure du canal KvAP de l'archeabactérie *Aeropyrum pernix*. A gauche : Vue extracellulaire de l'organisation tétramérique. Chaque sous-unité correspond à un domaine transmembranaire constitué par le détecteur de la tension, les segments S1–S4 (coloriés en bleu), et le pore de conduction, les segments S5–S6 (coloriés en rouge). A droite : Vue latérale des deux sous-unités du tétramère. Deux ions potassium sont montrés dans la région du filtre de sélectivité. Les hélices S3 et S4 adoptent une orientation perpendiculaire par rapport à l'axe longitudinal du pore de conduction. Cette disposition implique que de tels segments sont orientés parallèlement à la face cytoplasmique de la membrane. Ces images ont été générées avec le programme VMD (Humphrey et al., 1996).

Le modèle proposé par MacKinnon correspond donc à une vision «nouvelle» du mécanisme d'activation, s'opposant radicalement au modèle dit «conventionnel», construit sur la base de nombreux résultats expérimentaux accumulés au cours des dernières années (il convient de noter la différence entre la figure 7 et la figure 10) (Bezanilla, 2000; Horn, 2000; Choe, 2002; Yellen, 2002). Depuis la publication du modèle KvAP, plusieurs auteurs ont réalisé des expériences en démontrant que, en réalité, le segment S4 du canal potassium de

eucaryotes, au contraire de celui du KvAP, se situe à proximité du pore de conduction, s'orientant perpendiculairement par rapport au plan de la membrane, conformément au modèle «conventionnel» (Broomand et al., 2003; Laine et al., 2003; Neale et al., 2003; Gandhi et al., 2003; Bell et al., 2004). Ces résultats ont été obtenus pour les deux états au repos et activé, à partir de la mesure directe de l'interaction moléculaire du segment S4 et du pore de conduction. Dans celle-ci, des ponts disulfures entre les segments S4 et S5 ou S6 se forment spontanément après mutation ponctuelle en cystéine de résidus spécifiques dans chacun des segments impliqués. En outre, un autre résultat expérimental récent que ne peut expliquer le modèle structural du KvAP provient d'études de l'association de toxines au détecteur de tension. En particulier, il a été démontré que la toxine hanatoxine peut se lier au canal au repos par sa face extracellulaire – plus spécifiquement à la portion S3 – S4 du détecteur, indiquant ainsi sans ambiguïté que cette région est d'ores et déjà exposée au milieu externe avant même la phase de dépolarisation (Lee et al., 2003). Ces résultats suggèrent que le modèle cristallographique proposé pour le canal KvAP ne correspond pas à une structure fonctionnelle. L'explication la plus probable résidence dans la possibilité d'artéfacts expérimentaux au cours de la cristallisation du canal. Il faut souligner que le KvAP a été cristallisé dans un complexe protéique contenant des fragments monoclonaux de poids moléculaire équivalent à celui du canal. Des forces intermoléculaires sont donc susceptibles

d'avoir plus ou moins largement déformé la structure du KvAP pendant la cristallisation.

Cependant, d'autres modèles structuraux de haute résolution sont actuellement disponibles (Choe, 2002; Domene et al., 2003) et un grand nombre de leurs propriétés microscopiques ont été examinées à la loupe (Roux, 2002). Plusieurs questions clef sur les mécanismes de fonctionnement des canaux ioniques sensibles à la tension restent encore sans réponse (Yellen, 2002). En particulier, la détermination des propriétés moléculaires participant aux changements conformationnels couplés entre le domaine détecteur de tension et le pore de conduction qui contrôlent le flux ionique, est essentielle pour la compréhension de la fonction. Cette question représente donc un problème extrêmement complexe quant à la fonction de ces protéines et leur participation dans le phénomène de l'excitabilité cellulaire. Face à la controverse du modèle structural du KvAP et du mécanisme d'activation proposé à partir de celui-ci, nous présentons des résultats issus de calculs théoriques et proposons un modèle structural pour les canaux ioniques sensibles à la tension. En outre, l'originalité de ce travail de doctorat tient dans la réalisation jusqu'ici inédite d'expériences *in silico* pour caractériser au niveau moléculaire les changements conformationnels participant au mécanisme d'activation. Un modèle tout-atome de la région transmembranaire du canal de K^+ dépendant de voltage, *Shaker* B, dérivé de *Drosophila melanogaster*, a été développé ici grâce aux outils de la

modélisation moléculaire, en accord avec plusieurs résultats expérimentaux. Les propriétés moléculaires de cette structure ont été étudiées par des simulations de dynamique moléculaire sur architecture parallèle. La dynamique d'un système macromoléculaire constitué du canal inséré dans une membrane lipidique hydratée a été simulée en présence d'une différence de potentiel électrique transmembranaire, correspondant aux états polarisé et dépolarisé de la membrane. Au cours de l'expérience *in silico*, des changements conformationels ont été clairement mis en évidence des déplacements couplés entre le domaine détecteur de tension et le pore de conduction. La réorganisation structurale du pore dans les phases initiales de l'activation altère le passage de conduction ionique. Nos résultats montrent que le mécanisme d'activation est enclenché par un déplacement ascendant du segment S4 conformément à l'image classique du modèle «conventionnel». La structure interne du canal est hydratée et le taux d'hydratation augmente sous l'influence de la dépolarisation de la membrane, en contribuant au déplacement ascendant des segments S4 chargés. Ce résultat inattendu suggère que la structure d'hydratation peut correspondre à une propriété autant importante que nécessaire durant le mécanisme d'activation des canaux ioniques.

II.5 - REFERENCES

Armstrong, C. M., and F. Bezanilla. 1977. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.* 70:567-590.

Bell, D., H. Yao, R. Saenger, J. Riley, and S. Sielgelbaum. 2004. Changes in local S4 environment provide a voltage-sensing mechanism for mammalian hyperpolarization-activated HCN channels. *J. Gen. Physiol.* 123:5-19.

Berne, R., and M. Levy. 1998. Physiology. Mosby Press.

Bernèche, S., and B. Roux. 2003. A microscopic view of ion conduction trough the potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:8644-8648.

Bezanilla, F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80:555-592.

Bezanilla, F., and C. M. Armstrong. 1977. Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J. Gen. Physiol.* 70:549-566.

Broomand, A., R. Mannikko, P. Larsson, and F. Elinder. 2003. Molecular Movement of the voltage sensor in a potassium channel. *J. Gen. Physiol.*

Burykin, A., M. Kato, and A. Warshel. 2003. Exploring the origin of the ion selectivity of the KcsA potassium channel. *Proteins.* 53:412-426.

Buzatu, S. 2003. Discrete-state theory in nerve impulse modelling. *Riv. Biol.* 96:261-270.

Capener, C. E., H. J. Kim, Y. Arinaminpathy, and M. S. Sansom. 2002. Ion channels: structural bioinformatics and modelling. *Hum. Mol. Genet.* 11:2425-2433.

Catterall, W. A. 2002. Molecular mechanisms of gating and drug block of sodium channels. *Novartis Found Symp.* 241:206-232.

Cha, A., P. C. Ruben, A. L. George, E. Fujimoto, and F. Bezanilla. 1999. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature.* 402:813-817.

Chanda, B., and F. Bezanilla. 2002. Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *J. Gen. Physiol.* 120:629-645.

Chen, L. Q., V. Santarelli, R. Horn, and R. G. Kallen. 1996. A unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels. *J. Gen. Physiol.* 108:549-556.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Choe, S. 2002. Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience.* 3:115-121.

Chung, S. H., and S. Kuyucak. 2002. Recent advances in ion channel research. *Biochim. Biophys. Acta.* 1565:267-286.

Cohen, B. E., M. Grabe, and L. Y. Jan. 2003. Answers and questions from the KvAP structures. *Neuron.* 39:395-400.

Deutsch, C. 2003. The birth of a channel. *Neuron.* 40:265-276.

Domene, C., S. Haider, and M. S. Sansom. 2003. Ion channel structures: a review of recent progress. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* 6:611-619.

Domene, C., and M. S. Sansom. 2003. Potassium channel, ions, and water: simulation studies based on the high resolution x-ray structure of KcsA. *Biophys. J.* 85:2787-2800.

Doyle, D. A., J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science.* 280:69-77.

Durell, S. R., Y. Hao, T. Nakamura, E. P. Bakker, and H. R. Guy. 1999. Evolutionary relationship between potassium channels and symporters. *Biophys. J.* 77:775-788.

Favre, I., E. Moczydlowski, and L. Schild. 1996. On the structural basis for ionic selectivity among sodium, potassium and calcium in the voltage-gated sodium channel. *Byophis. J.* 71:3110-3125.

Filatov, G. N., T. P. Nguyen, S. D. Kraner, and R. L. Barchi. 1998. Inactivation and secondary structure in the D4/S4-5 region of the SKM1 sodium channel. *J. Gen. Physiol.* 111:703-715.

Gandhi, C., E. Clark, E. Loots, A. Pralle, and E. Isacoff. 2003. The orientation and molecular movement of a potassium channel voltage-sensing domain. *Neuron.* 40:515-525.

George, A. L. J., J. Komisarof, R. G. Kallen, and R. L. Barchi. 1992. Primary structure of the adult human skeletal muscle voltage-dependent sodium channel. *Ann. Neurol.* 31:131-137.

Giorgetti, A., and P. Carloni. 2003. Molecular modeling of ion channels: structural predictions. *Curr. Opinion. Chem. Biol.* 7:150-156.

Goldin, A. L. 1999. Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. Rudy, B. Seeburg, P., New York.

Goldman, L. 1999. On mutations that uncouple sodium channel activation from inactivation. *Biophys. J.* 76:2553-2559.

Gordon, D., and M. Gurevitz. 2003. The selectivity of scorpion alpha-toxins for sodium channels subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface. *Toxicon.* 41:125-128.

Heinemann, S. H., H. Terlau, W. Stuhmer, K. Imoto, and S. Numa. 1992. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature.* 356:441-443.

Hille, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer, Sunderland, MA.

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

Holyoake, J., C. Domene, J. N. Bright, and M. S. Sansom. 2003. KcsA closed and open: modelling and simulation studies. *Eur. Biophys. J.* Epub ahead of print.

Honma, T., T. Iso, M. Ishida, Y. Nagashima, and K. Shiomi. 2003. Occurrence of type 3 sodium channel peptide in two species of sea anemones (*Dofleinia armata and Entacmaea ramsayi*). *Toxicon.* 41:637-639.

Horn, R. 2000. Conversation between voltage sensors and gates of ion channels. *Biochemistry.* 39:15653-15658.

Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics.* 14:33-38.

Hyvärinen, L. P. 1970. Infromation theory for system engineers, New York.

Isacoff, E. Y., Y. N. Jan, and L. Y. Jan. 1991. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the *Shaker* K^+ channel. *Nature.* 353:86-90.

Isom, L. L., K. S. De Jongh, and W. A. Catterall. 1994. Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron.* 12:1183-1194.

Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chalt, and R. Mackinnon. 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature.* 417:523-526.

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

Jiang, Y., V. Ruta, J. Chen, A. Lee, and R. MacKinnon. 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K+ channel. *Nature.* 423:42-48.

Kim, M. K., T. Morii, L. X. Sun, K. Imoto, and Y. Mori. 1993. Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel. *FEBS Lett.* 318:145-148.

Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305:567-580.

Kullmann, D. M., and M. G. Hanna. 2002. Neurological disorders caused by inherited ion-channel mutations. *Lancet Neurol.* 1:157-166.

Laine, M., M. A. Lin, J. P. A. Bannister, W. R. Silverman, A. F. Mock, B. Roux, and D. M. Papazian. 2003. Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels. *Neuron.* 39:467-481.

Lee, H. C., J. M. Wang, and K. J. Swartz. 2003. Interaction between extracellular hanatoxin and the resting conformation of the voltage-sensor paddle in Kv channels. *Neuron.* 40:527-536.

MacKinnon, R. 1991. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potasium channel. *Nature.* 350:232-235.

Massensini, A. R., M. A. Romano-Silva, and M. V. Gomez. 2003. Sodium channel toxins and neurotransmitter release. *Neurochem. Res.* 28:1607-1611.

McCollum, I. L., Y. Y. Vilin, E. Spackman, E. Fujimoto, and P. C. Ruben. 2003. Negatively charged residues adjacent to IFM motif in the DIII-DIV linker of hNa(V)1.4 differentially affect slow inactivation. *FEBS Lett.* 552:163-169.

Mikala, G. A., A. Bahinski, A. Yatani, S. Tang, and A. Shuwartz. 1994. Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion selectivity site in the L-type Ca++ channel pore. *FEBS Lett.* 335:265-269.

Moorman, J. R., G. E. Kirsch, A. M. Brown, and R. H. Joho. 1990. Changes in sodium channel gating produced by point mutations in a cytoplasmic linker. *Science.* 250:688- 691.

Napolitano, C., I. Rivolta, and S. G. Priori. 2003. Cardiac sodium channel diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41:439-444.

Neale, E. J., D. J. S. Elliott, M. Hunter, and A. Sivaprasadarao. 2003. Evidence for intersubunit interactions between S4 and S5 transmembrane segments of the Shaker potassium channel. *J. Biol. Chem.* 278:29079-29085.

Norton, R. S. 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with sodium channel. *Toxicon.* 29:1051-1084.

Patton, D. E., J. W. West, T. Scheuer, Y. Wang, A. L. Goldin, and W. A. Catterall. 1992. Amino acid sequence required for fast Na+-channel inactivation: charge neutralization and deletions in the III-IV linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10905-10909.

Rojas, E., F. Bezanilla, and R. E. Taylor. 1970. Demonstration of sodium and potassium conductance changes during a nerve action potential. *Nature.* 225:747-748.

Roux, B. 2002. Theoretical and computational models of ion channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:182-189.

Rudy, B. 1999. Molecular diversity of ion channels and cell function. Rudy, B. Seeburg, P., New York.

Sansom, M. S., I. H. Shrivastava, J. N. Bright, J. Tate, C. E. Capener, and P. C. Biggin. 2002. Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochim. Biophys. Acta.* 1565:294-307.

Schoppa, N. E., and F. J. Sigworth. 1998. Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channel. *J. Gen. Physiol.* 111:313-342.

Sonnhammer, E. L., S. R. Eddy, and R. Durbin. 1997. Pfam: A comprehensive database of protein families based on seed alignments. *Proteins.* 28:405-420.

Srinivasan, K. N., P. Gopalakrishnakone, P. T. Tan, K. C. Chew, B. Cheng, R. M. Kini, J. L. Koh, S. H. Seah, and V. Brusic. 2002. SCORPION, a molecular database of scorpions toxins. *Toxicon.* 40:23-31.

Tan, P. T., A. M. Khan, and V. Brusic. 2003. Bioinformatics for venom and toxin sciences. *Brief. Bioinform.* 4:53-62.

Tang, L., R. G. Kallen, and R. Horn. 1996. Role of an S4-S5 linker in sodium channel inactivation probed by mutagenesis and a peptide blocker. *J. Gen. Physiol.* 108:89-104.

Tempel, B. L., D. M. Papazian, T. L. Schwarz, Y. N. Jan, and L. Y. Jan. 1987. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of Drosophila. *Science.* 237:770-775.

Tomaselli, G. F., N. Chiamvimonvat, H. B. Nuss, J. R. Balser, M. T. Perez-Garcia, R. H. Xu, D. W. Orias, P. H. Backx, and E. Marban. 1995. A mutation in the pore of the sodium channel alters gating. *Biophys. J.* 68:1814-1827.

Vassilev, P., T. Scheuer, and W. A. Catterall. 1988. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science.* 241:1658-1661.

Wang, J. Z., C. V. Rojas, J. H. Zhou, L. S. Schwartz, H. Nicholas, and E. P. Hoffmann. 1992. Sequence and genomic structure of the human adult skeletal muscle sodium channel alpha subunit gene on 17q. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182:794-801.

West, J. W., D. E. Patton, T. Scheuer, Y. Wang, A. L. Goldin, and W. A. Catterall. 1992. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na-channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10910-10914.

Yang, J., P. T. Ellinor, W. A. Sather, J. F. Zhang, and R. W. Tsien. 1993. Molecular determinants of Ca++ selectivity and ion permeation in L-type Ca++ channels. *Nature.* 366:158-161.

Yang, N., A. L. J. George, and R. Horn. 1996. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 16:113-122.

Yellen, G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature.* 419:35-42.

Zhou, M., J. H. Morais-Cabral, S. Mann, and R. MacKinnon. 2001. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature.* 411:657-661.

III - OBJECTIFS

III.1 – OBJECTIF GENERAL

Etudier les propriétés moléculaires fondamentales pour le mécanisme d'activation des canaux ioniques sensibles à la tension.

III.2 – OBJECTIFS SPECIFIQUES

1. Prédire la structure du domaine transmembranaire des canaux ioniques sensibles à la tension.

2. Analyser les changements conformationnels essentiels pour le couplage entre les domaines du pore de conduction et du détecteur de la tension.

IV - METHODES

IV.1 – MODELISATION MOLECULAIRE - CONSIDERATIONS GENERALES

La modélisation moléculaire est une branche pluridisciplinaire de la physique, de la chimie et de la biologie, appliquée à la détermination des propriétés structurales de la matière en utilisant des méthodes numériques (Goldsmith-Fischman and Honig, 2003; van Gunsteren et al., 1994). Elle met en œuvre des expériences *in silico* – outil puissant utilisé pour l'exploration de l'espace configurationel de systèmes en phase liquide (Hansson et al., 2002), en cherchant à caractériser la dynamique de ses changements d'états au niveau atomique (Berendsen, 2001). Il faut souligner que bien souvent, les propriétés microscopiques et dynamiques révélées par cette méthodologie ne peuvent pas être déterminées par les techniques expérimentales usuelles, y compris les plus sophistiquées comme la diffraction des rayons X, dans lesquelles, bien que le détail moléculaire sois atteint, aucune information dynamique du système ne peut directement être mesurée.

La modélisation moléculaire a été utilisée pour divers problèmes de la biologie structurale moderne (Brooks and Case, 2003; Norberg and Nilsson, 2002; Warshel, 2002). En particulier, ses méthodes ont été employées pour l'étude de repliement des protéines (Hünenberger et al., 1995; Daggett, 2002). Dans ce

cas, des modèles minimalistes (Pereira de Araujo, 1999) sont utilisés pour la caractérisation des propriétés moléculaires des protéines au cours du phénomène complexe de repliement (Treptow et al., 2002; Garcia et al., 2001). En outre, une application importante de la modélisation moléculaire ouvre la voie vers la prédiction structurale des protéines (Treptow et al., 2003). Par exemple, nous pouvons souligner l'utilisation de ces méthodes pour l'élucidation du mécanisme d'action d'enzymes, cruciales pour le fonctionnement de la machinerie cellulaire, ou dans le contexte des biotechnologies (De Freitas et al., 2003). La structure des protéines peut aujourd'hui être déterminée à haute résolution par des techniques expérimentales sophistiquées, telles que la diffraction des rayons X et la résonance magnétique nucléaire. Toutefois, dans quelques cas, ces informations structurales sont difficilement atteignables par de telles techniques. C'est le cas, par exemple, de la structure des protéines de transport présentes dans la membrane. Plusieurs facteurs contribuent à cette limitation. Parmi ceux-ci, nous notons la difficulté de cristallisation des protéines, ainsi que la difficulté de purification de la biomolécule en quantités suffisant pour réaliser l'expérience. Dans ces conditions, un certain nombre d'approches de la modélisation moléculaire peuvent s'avérer extrêmement utiles pour la détermination structurale des protéines. En outre, il convient de souligner que l'augmentation des banques d'informations structurales (Berman et al., 2002) permet aujourd'hui de prédire de façon satisfaisante les structures par les méthodes

théoriques (Weissig and Bourne, 2002), d'une façon plus rapide et moins coûteuse par rapport les méthodes expérimentales.

L'accroissement massif des ressources informatiques associé au développement d'algorithmes efficaces a permis la réalisation de telles études en recourant aux outils théoriques (Elber et al., 2002; Carloni et al., 2002). Il faut préciser, cependant, que l'examen, au niveau moléculaire, d'un système chimique par les méthodes théoriques est loin d'être une tâche triviale. D'une manière générale, la modélisation moléculaire peut être résumée en deux étapes principales : la détermination d'une configuration initiale du système d'intérêt et l'étude de ses propriétés thermodynamiques et cinétiques grâce aux simulations numériques. Dans ce qui suit, nous décrirons ces étapes en détail.

IV.2 – CONFIGURATION INITIALE

La configuration initiale du système correspond à un ensemble de coordonnées spatiales et de vitesses atomiques. Cette configuration est décrite classiquement comme une position dans l'espace de phase – *i.e.* la description du système en fonction des positions atomiques et des impulsions correspondantes. La détermination des vitesses initiales peut être directement obtenue à partir de la distribution probabiliste de Maxwell-Boltzman. En revanche, la détermination des coordonnées atomistiques du système d'intérêt est une tâche plus difficile.

Cette difficulté est la conséquence directe de la limitation imposée par le coût informatique rédhibitoire, en terme d'heures de calcul requises pour l'exploration de l'espace configurationnel de systèmes possédant un grand nombre de degrés de liberté. Seul recensement, des systèmes macromoléculaires contenant plus que cent mil atomes ont commencés à être étudiés par des simulations dans une durée relevant pour la correcte investigation des phénomènes considérés. Pour cette raison, la détermination des coordonnées atomiques initiales est particulièrement importante pour l'analyse rigoureuse des régions pertinentes de l'espace configurationnel. Plusieurs techniques peuvent être employées pour l'obtention des coordonnées initiales de divers systèmes, allant de structures chimiques simples jusqu'à des systèmes biologiques extrêmement complexes, comme, par exemple, des protéines ou des acides nucléiques. Dans les paragraphes à venir, deux techniques importantes pour la détermination de ces coordonnées, ou, plus précisément, la détermination de la conformation initiale de la protéine, seront décrites. Ces techniques relèvent de la modélisation conformationnelle des protéines par homologie de séquences primaires, ainsi que la modélisation des interactions moléculaires de type protéine-protéine.

IV.2.1 – MODELISATION PAR HOMOLOGIE DE SEQUENCES

Cette méthode (Petrey et al., 2003; Bourne and Shindyalov, 2003) permet la modélisation structurale de protéines en utilisant comme modèle des structures tridimensionnelles résolues par diffraction de rayons X ou par résonance magnétique nucléaire. Une telle approche trouve sa justification dans le fait que l'information conservée au niveau de la séquence primaire d'acides aminés chez différentes protéines peut également codifier l'organisation structurale tridimensionnelle conservée parmi celles-ci (Chan and Dill, 1998; Sander and Schneider, 1991).

Une conformation initiale d'une séquence protéique inconnue structuralement consiste donc en une structure tridimensionnelle dérivée des coordonnées atomiques d'une autre séquence d'acides aminés déterminées expérimentalement. La séquence utilisée pour le transfert des coordonnées atomiques est sélectionnée à partir de l'alignement de séquences sous le critère de l'homologie maximale. Cette séquence doit avoir une structure tridimensionnelle connue et déposée dans la *Protein Data Bank* (PDB) (Berman et al., 2002). La divergence évolutive observée parmi les séquences protéiques – *i.e.* séquences conservées au niveau primaire mais différentes structuralement – a pour conséquence la caractérisation fonctionnelle de la séquence inconnue structuralement, qui est très importante pour bien discriminer, dans l'alignement primaire, la séquence modèle devant fournir les coordonnées atomistiques. Un

deuxième aspect, tout aussi important, pour la discrimination rigoureuse de la séquence modèle tient au fait que les protéines remplissant une fonction identique possèdent grande similarité dans les régions de structures secondaires. La modélisation par homologie utilise des programmes informatiques très variés. Plusieurs de ces programmes sont disponibles dans des *packages* commerciaux, voire directement sur internet. Le diagramme ci-dessous illustre les étapes principales pour l'obtention d'une conformation initiale d'une protéine par les techniques d'homologie de séquences.

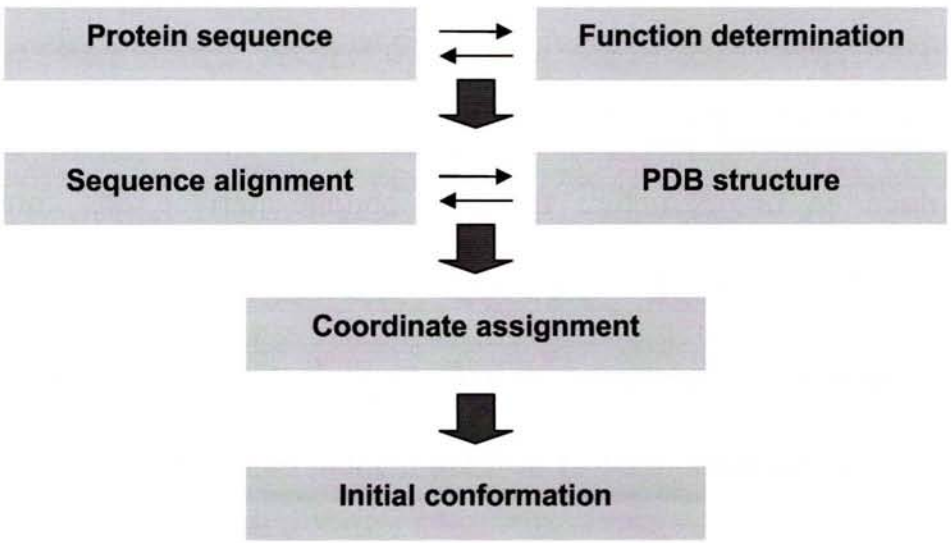

Diagramme : Etapes principales de la modélisation par homologie de séquences.

IV.2.2 – INTERACTIONS DE TYPE PROTEINE - PROTEINE ("*DOCKING*")

Une seconde classe de techniques de la modélisation moléculaire est la détermination des interactions de type protéine-protéine ou protéine-ligand. Dans de nombreux cas, le système d'intérêt est constitué de complexes moléculaires (Tovchigrechko et al., 2002) et l'obtention d'une configuration initiale demande une étude préliminaire des interactions intermoléculaires (voir figure 11). Cette technique consiste à optimiser ces interactions en fonction de plusieurs critères structuraux et énergétiques. Pour atteindre cet objectif, une approximation initiale suppose que les molécules en interaction sont des corps rigides. Dans ce contexte, l'optimisation de l'interaction se résume à un simple problème de la complémentarité de formes géométriques. Un point de vue plus sophistiqué consiste à additionner à ce critère rudimentaire un potentiel énergétique associé à la nature des interactions intermoléculaires (Clore and Schwieters, 2003). Dans ce cas, outre la forme, la compatibilité physico-chimique des interactions sur l'interface du complexe est prise en compte. Dans de nombreuses situations, une telle approximation ne suffit pas pour la détermination d'une configuration initiale satisfaisante – en particulier pour les systèmes impliquant, par exemple, l'interaction de petites molécules, comme des pharmacophores, dans le site catalytique d'enzymes. Chez ceux-ci, l'interaction protéine-ligand peut être envisagée en considérant des corps flexibles (Claussen et al., 2001). En procédant ainsi, les molécules peuvent subir

des transitions conformationnelles de manière à obtenir le meilleur ajustement possible du point de vue des interactions moléculaires – ce qui serait irréalisable dans une approximation de corps rigides. Actuellement, les calculs d'interactions moléculaires sont effectués par de nombreux programmes commerciaux ou domaine public (Vakser and Aflalo, 1994; Ritchie and Kemp, 2000; Claussen et al., 2001; Rarey et al., 1996).

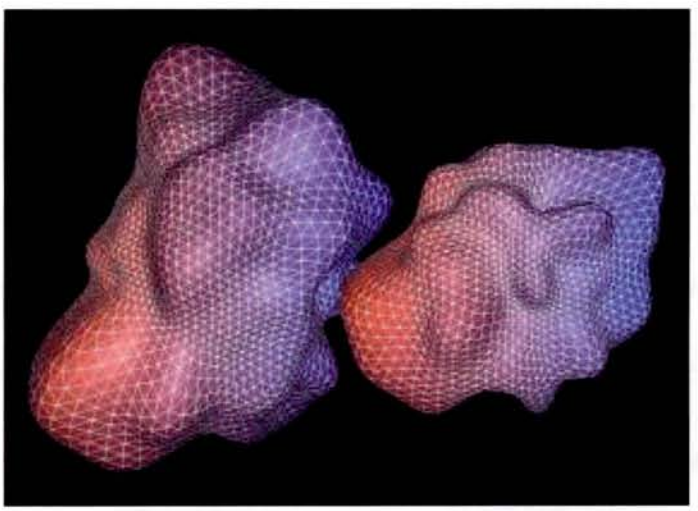

Figura 11: Illustration d'un complexe moléculaire obtenu à partir du calcul de l'interaction protéine – protéine, en considérant les propriétés structurales de chacune d'entre elles, ainsi que toutes les interactions moléculaires possibles. Seule la surface moléculaire est montrée. Cette configuration a été déterminée par le programme HEX (Ritchie and Kemp, 2000).

IV.3 – SIMULATIONS NUMERIQUES

Une fois la configuration initiale du système d'intérêt obtenue, ses propriétés microscopiques peuvent être étudiées par les simulations numériques. Dans ce cas, les propriétés statiques et dynamiques sont prises en compte, permettant ainsi la caractérisation thermodynamique et cinétique du système. Les informations statiques de la surface d'énergie sont obtenues par des méthodes de minimisation usuelles de la mécanique moléculaire. A contrario, les propriétés dynamiques du système sont examinées par les simulations statistiques. Plusieurs méthodes de simulation sont disponibles aujourd'hui, parmi lesquelles on distingue la dynamique moléculaire, la dynamique stochastique et ses cas particuliers, comme la dynamique Brownienne ou la dynamique de Langevin.

IV.3.1 – MECANIQUE MOLECULAIRE

Une méthode importante pour la détermination des propriétés statiques de l'hypersurface d'énergie potentielle est la minimisation d'énergie du système (Brooks et al., 1983). Cette méthode consiste à trouver les configurations du système correspondant à des points stationnaires de cette hypersurface. En ces points, la force résultante appliquée sur chaque atome est nulle. Normalement, des algorithmes de minimisation possèdent une routine générique de recherche

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

linéaire, qui permet de modifier la position actuelle du système sur l'hypersurface vers autre région de moindre énergie. Cette méthode effectue la minimisation selon une direction correspondant à la dérivée de l'énergie. Dans ce cas, l'énergie est minimisée au long d'une surface paramétrée en fonction de la coordonnée α :

$$\left(\mathbf{r}^N\right) = \left(\mathbf{r}_0{}^N + \alpha \frac{\partial E}{\partial \mathbf{r}^N}\bigg|_{\mathbf{r}_0{}^N}\right) \tag{1}$$

où, $\mathbf{r} = \left(r^N\right)$ est la position actuelle et $\mathbf{r}_0 = \left(r_0{}^N\right)$ est la position initiale sur l'hypersurface d'énergie N-dimensionnelle.

Dans la méthode dénommée *steepest descents* la minimisation est poursuivie dans la direction du gradient, $-\nabla E\left(r^N\right)$, et chaque nouvelle direction est orthogonale à la précédente. Cette propriété entraîne des oscillations indésirables au voisinage du minimum. Pour cette raison, cette méthode est plus appropriée pour des minimisations initiales, en des points situés loin du minimum. Une autre méthode bien connue, les gradients conjugués, utilise l'information fournie par les gradients antérieurs pour la détermination d'une nouvelle direction. Cette caractéristique élimine l'effet indésirable d'oscillations à l'approche du minimum, dans la mesure où la nouvelle direction n'est pas complètement orthogonale à celle antérieure. Il s'ensuit qu'une nouvelle direction, $\mathbf{h}_{i+1}$, obtenue à partir de la position en $i+1$, est déterminée en

additionnant au gradient $\mathbf{g}_{i+1}$ la direction antérieure $\mathbf{h}_i$, pondérée par la constante γ_i :

$$\mathbf{h}_{i+1} = \mathbf{g}_{i+1} + \gamma_i \mathbf{h}_i \tag{2}$$

où, γ_i peut être définie, par exemple, par l'équation de Polak-Ribiere :

$$\gamma_i = \frac{\mathbf{g}_{i+1} \cdot \mathbf{g}_{i+1}}{\mathbf{g}_i \cdot \mathbf{g}_i} \tag{3}$$

IV.3.2 – Simulation de dynamique moleculaire

Le principe de la dynamique moléculaire, particulièrement simple, consiste à générer une trajectoire pour un ensemble fini de particules, au moyen d'une intégration numérique des équations classiques du mouvement. Ceci permet de déterminer les propriétés dynamiques du système considéré. Pour atteindre cet objectif, plusieurs programmes sont actuellement disponibles (Bhandarkar et al., 2002; Lindahl et al., 2001; Brooks et al., 1983).

D'une manière rigoureuse, l'étude complète de systèmes chimiques complexes, comme les liquides, demanderait la résolution de l'équation de Schrödinger dépendant du temps pour un grand ensemble de noyaux et électrons. Une telle description reste encore illusoire, en raison des limitations informatiques

actuelles, restreignant l'étude de tels systèmes à un abordage classique. Cette approximation est justifiée par deux faits: (i) le mouvement du noyau et des électrons peut être dissocié en accord avec l'approximation de Born-Oppenheimer, et (ii) la longueur de l'onde de Broglie est beaucoup plus petite que les distances intermoléculaires dans les liquides. Il s'ensuit que les effets quantiques peuvent être globalement négligés. Les trajectoires classiques sont alors utilisées pour la détermination des propriétés thermodynamiques et dynamiques du système sous la forme de moyennes temporelles. Pour un système ergodique, ces moyennes temporelles coïncident avec les moyennes thermodynamiques (équation 4). En général, de telles moyennes thermodynamiques sont obtenues en considérant les degrés de liberté pertinents. Le tableau I décrit au moyen d'exemples les degrés de liberté considérés dans l'étude de propriétés déterminées.

$$\lim_{t\to\infty} \overline{A}t = \langle A \rangle \qquad (4)$$

où, A est une propriété observable quelconque. La quantité $\overline{A_t}$ représente la moyenne temporelle et $\langle A \rangle$, la moyenne thermodynamique.

Tableau - I: Modèles considérant différents niveaux d'approximation.

Modèle	Degrés de liberté (considérés)	Degrés de liberté (déconsidérés)	Propriétés
Mécanique quantique	*Noyaux et électrons*	*Noyaux*	*Réactions*
Tous les atomes et polarisation	*Atomes et des moments de dipôle électrique*	*Electrons*	*Liaison de ligantes chargés*
Tous les atomes	*Atomes du soluté et du solvant*	*Moment de dipôle électrique*	*Hydratation*
Tous les atomes du soluté	*Atomes du soluté*	*Solvante*	*Conformations de la phase gazeuse*
Modèle minimalistes	*Groupe des atomes*	*Atomes individuels*	*Topologie du repliement de protéines*

IV.3.2.1 – LES EQUATIONS DU MOUVEMENT

En dynamique moléculaire classique (van Gunsteren and Berendsen, 1990), la trajectoire du système est générée par intégration des équations de Newton du mouvement pour chaque particule i :

$$\begin{cases} m_i \dfrac{d^2\mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{f}_i(t) \\ \mathbf{f}_i(t) = -\dfrac{\partial U\left(\mathbf{r}^N\right)}{\partial \mathbf{r}_i(t)} \end{cases} \qquad (5)$$

où, $U(\mathbf{r}^N)$ est l'énergie du système qui dépend seulement des coordonnées cartésiennes des particules $\{\mathbf{r}_i\}$. En général, cette énergie peut être écrite sous la forme d'une somme de N termes :

$$U(\mathbf{r}^N) = \sum_i v_1(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{j>i} v_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) + \sum_i \sum_{j>i} \sum_{k>j>i} v_3(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j, \mathbf{r}_k) + \ldots \quad (6)$$

ici, $v_1(\mathbf{r}_i), v_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j), \ldots$ représente le potentiel intramoléculaire, le potentiel d'interaction de paires atomiques, *etc*...

IV.3.2.2 – LES INTEGRATEURS DU MOUVEMENT

L'équation 5 est intégrée numériquement en respectant la condition de conservation de l'énergie totale du système :

$$\lim_{n\to\infty} \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{k=1}^{n} \left| \frac{E(k\delta t) - E(0)}{E(0)} \right| \leq e_{MD} \quad (7)$$

ici, n est le nombre de pas d'intégration au cours de la simulation, $E(0) \equiv H(r^N, p^N, 0)$ est l'énergie initiale du système équilibré, ε_{MD} est la limite supérieure pour la conservation de l'énergie, *viz.* 10^{-4}.

Plusieurs méthodes d'intégration du mouvement ont été développées. Le principe de telles méthodes peut être illustré à travers l'exemple d'un des algorithmes les plus utilisés en dynamique moléculaire, l'algorithme de Verlet. Cette méthode repose sur la connaissance du triplet $\{\mathbf{r}_i(t), \mathbf{r}_i(t - \mathrm{d}t), \mathbf{a}_i(t)\}$, où

$\mathbf{a}_i(t) = \ddot{\mathbf{r}}_i(t) = \mathbf{f}_i(t)/m_i$ est l'accélération de la particule *i*. La variation de la position de la particule peut être alors écrite comme :

$$\mathbf{r}_i(t+dt) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t-dt) + \mathbf{a}_i(t)dt^2 \tag{8}$$

avec une erreur de l'ordre $O(dt^4)$. Cette équation résulte des développements de Taylor des positions en $t-dt$ et $t+dt$. Bien que la vitesse soit dispensable pour la détermination de la trajectoire, elle est nécessaire pour le calcul de l'énergie cinétique, $K(\mathbf{p})$, et de l'énergie totale, $E = H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)$. Dans ce schéma, la vitesse est donnée par :

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{\mathbf{r}_i(t+dt) - \mathbf{r}_i(t-dt)}{2dt} \tag{9}$$

avec une erreur associée de l'ordre $O(dt^2)$.

Le pas d'intégration infinitésimal dt doit donc être limité pour respecter la condition de conservation de l'énergie. Normalement, le choix de dt est dicté par les plus hautes fréquences de vibration, ce qui correspond à des pas de l'ordre d'une à deux fs. Cette restriction imposée sur le pas d'intégration constitue une importante limitation de la méthode de dynamique moléculaire. Compte tenu des capacités informatiques actuelles, il est difficile de générer des trajectoires longues, *ca.* la milliseconde, pour des systèmes possédant un grand nombre de degrés de liberté.

Par ailleurs, la partition de l'hamiltonien total du système permet l'utilisation d'algorithmes plus appropriés pour calculer chaque contribution de l'énergie, en vue d'une réduction appréciable de l'effort informatique impliqué dans la simulation. Cette partition de $H\left(\mathbf{r}^N,\mathbf{p}^N\right)$ en plusieurs termes, ou contributions, correspond à l'idée centrale des méthodes dites d'intégration à pas multiples, comme, par exemple, le RESPA (Martyna et al., 1996). Sous une forme plus générale, l'équation 5 peut être réécrite comme :

$$\mathbf{G}_t = e^{iLt}\mathbf{G}_0 \tag{10}$$

où, L est l'opérateur de Liouville, qui génère la distribution $g(\mathbf{G},t)$ pour un ensemble thermodynamique déterminé, selon :

$$\frac{\partial g(\mathbf{G},t)}{\partial t} = -iLg(\mathbf{G},t) \tag{11}$$

en appliquant la factorisation de Trotter, la déconvolution des contributions à longue et à courte portée devient évidente :

$$e^{iL\Delta t} = e^{iL_1\frac{\Delta t}{2}}e^{iL_2\Delta t}e^{iL_1\frac{\Delta t}{2}} + O\left(\Delta t^3\right) \tag{12}$$

ici, $iL = iL_1 + iL_2$. Des pas d'intégrations différents peuvent alors être utilisés pour la propagation du mouvement en fonction du type d'interaction considérée. De cette façon, la partition de l'hamiltonien total, $H\left(\mathbf{r}^N,\mathbf{p}^N\right)$, en contributions

cinétique, $K(\mathbf{p}^N)$, de valence, $U_{valence}(\mathbf{r}^N)$, et électrostatique, à courte et à longue portées – *i.e.* $U_{court}(\mathbf{r}^N)$ et $U_{long}(\mathbf{r}^N)$, s'écrit:

$$e^{iH(\mathbf{r}^N,\mathbf{p}^N)\Delta t} = e^{iU_{long}(\mathbf{r}^N)\frac{\Delta t}{2}}\left\{e^{iU_{court}(\mathbf{r}^N)\frac{\Delta t}{2n}}\left[e^{iU_{valence}(\mathbf{r}^N)\frac{\Delta t}{2pn}}e^{iK(\mathbf{p}^N)\frac{\Delta t}{pn}}\right.\right.$$
$$\left.\left.\times e^{iU_{valence}(\mathbf{r}^N)\frac{\Delta t}{2pn}}\right]^p e^{iU_{court}(\mathbf{r}^N)\frac{\Delta t}{2n}}\right\}^n e^{iU_{long}(\mathbf{r}^N)\frac{\Delta t}{2}} \qquad (13)$$

IV.3.2.3 – LES ENSEMBLES STATISTIQUES

Les simulations de dynamique moléculaire hamitoniennes génèrent des distributions caractéristiques de l'ensemble statistique microcanonique. Cependant, en certaines situations, il est désirable que d'autres quantités thermodynamiques, telles que la température et la pression, soient considérées comme des grandeurs indépendantes. De fait, différents types d'ensembles thermodynamiques peuvent être produits par les simulations numériques (tableau - II).

Tableau – II: Exemples d'ensembles thermodynamiques accessibles pour la simulation de dynamique moléculaire.

Ensemble	Energie libre	Hamiltonien consérvé
(N,V,E)		$H(\mathbf{r}^N,\mathbf{p}^N)=U$
(N,V,T)	$A=U-TS$	$H(\mathbf{r}^N,\mathbf{p}^N)\cong\sum_i\frac{1}{2m_i}(p_{xi}^2+p_{yi}^2+p_{zi}^2)+U(\mathbf{r}^N)$
$(N,P_\perp,A,T)$	$A=U-TS+P_\perp V$	$H(\mathbf{r}^N,\mathbf{p}^N)\cong\sum_i\frac{1}{2m_i}(p_{xi}^2+p_{yi}^2+p_{zi}^2)+U(\mathbf{r}^N)+P_\perp V$
$(N,P_\parallel,A,T)$	$A=U-TS+P_\parallel V$	$H(\mathbf{r}^N,\mathbf{p}^N)\cong\sum_i\frac{1}{2m_i}(p_{xi}^2+p_{yi}^2+p_{zi}^2)+U(\mathbf{r}^N)+P_\parallel V$
(N,V,γ,T)	$A=U-TS-\gamma A$	$H(\mathbf{r}^N,\mathbf{p}^N)\cong\sum_i\frac{1}{2m_i}(p_{xi}^2+p_{yi}^2+p_{zi}^2)+U(\mathbf{r}^N)-\gamma A$
$(N,P_\perp,\gamma,T)$	$A=U-TS+P_\perp V-\gamma A$	$H(\mathbf{r}^N,\mathbf{p}^N)\cong\sum_i\frac{1}{2m_i}(p_{xi}^2+p_{yi}^2+p_{zi}^2)+U(\mathbf{r}^N)+P_\perp V-\gamma A$

IV.3.2.3.1 – SIMULATIONS A TEMPERATURE CONSTANTE

Plusieurs méthodes permettant la réalisation de simulations isothermes, (N,V,T), ont été proposées. Un simple contrôle de la température peut être réalisé en

réajustant périodiquement la température – *i.e.* $\sqrt{T/T_K}$. Dans ce cas, $T_K = 2K(\mathbf{p})/3Nk_B$ est la température instantanée et T la température désirée.

Une méthode plus sophistiquée consiste en utiliser la dynamique de Langevin pour contrôler la température. Dans ce type de dynamique, deux termes sont ajoutés aux équations du mouvement – une force aléatoire et un terme de friction:

$$m_i \frac{d^2\mathbf{r}_i}{dt^2} = -\nabla_{\mathbf{r}i} E + f_i(t) - m_i b_i \frac{d\mathbf{r}_i}{dt}(t) \qquad (14)$$

ici, la force aléatoire $f_i(t)$ est dérivée d'une distribution Gaussienne satisfaisant au théorème de fluctuation-dissipation : $\langle f_i(t) \rangle = 0$ et $\langle f_i(t) f_i(0) \rangle = 2k_B T_0 b_i m_i \delta(t)$, avec k_B, la constante de Boltzmann, T_0, la température de référence, et b_i, le coefficient de friction. Dans ce cas, la température peut être contrôlée (Berendsen et al., 1984) en considérant une force aléatoire nulle et un coefficient de friction redimensionné :

$$b_i = b_i' \left(\frac{T_0}{T - 1} \right) \qquad (15)$$

b_i' est le coefficient de friction prédéfini pour l'atome i, T_0, la température désirée et $T = \sum_i \frac{m_i \frac{dx_i}{dt}^2}{nk_B}$, la température instantanée du système à n degrés de liberté.

IV.3.2.3.2 – SIMULATIONS A PRESSION CONSTANTE

Le formalisme du lagrangien étendu peut être appliqué pour la génération d'un ensemble isobare (Andersen, 1980). Dans cette méthode, le système est couplé à une variable externe, V, correspondant au volume de la boîte de simulation. Ce couplage représente l'action d'un piston sur le système. L'énergie cinétique et l'énergie potentielle du piston peuvent être écrites sous la forme:

$$\begin{cases} K_V = \frac{1}{2} m_P \dot{V}^2 \\ U_V = PV \end{cases} \qquad (16)$$

où, m_p est la masse du piston et P est la pression désirée. En redimensionnant les variables $\mathbf{r}$ et $\mathbf{v}$ selon $\mathbf{s} = \mathbf{r} / V^{1/3}$ et $\dot{s} = \mathbf{v} / V^{1/3}$, les énergies cinétique et potentielle sont réécrites comme : $U(\mathbf{r}) \equiv U\left(V^{1/3}\mathbf{s}\right)$ et $K(\mathbf{p}) = 1/2\, mV^{2/3} \sum_i \dot{\mathbf{s}}_i^2$. A

partir du lagrangien étendu, $L_V(\mathbf{r};\mathbf{p}) = K(\mathbf{p}) + K_V(\mathbf{p}) - U(\mathbf{r}) - U_V(\mathbf{r})$, les équations du mouvement sont prennent la forme:

$$\begin{cases} \ddot{\mathbf{s}}_i = \dfrac{\mathbf{f}_i}{m_i V^{1/3}} - \dfrac{2}{3}\dfrac{\dot{\mathbf{s}}_i \dot{V}}{V} \\ \ddot{V} = \dfrac{P_P - P}{m_P} \end{cases} \tag{17}$$

ici, la force $\mathbf{f}_i$ et la pression instantanée, P_p, sont déterminées en fonction des coordonnées cartésiennes et des impulsions. En particulier, la pression instantanée est dérivée du viriel $P_p = \frac{1}{V}\left(Nk_B T - \frac{1}{2}\sum_i \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{f}_i \right)$. La quantité conservée au cours de la simulation est donc l'hamiltonien du système étendu, $H_V(\mathbf{r};\mathbf{p}) = K(\mathbf{p}) + K_V(\mathbf{p}) + U(\mathbf{r}) + U_V(\mathbf{r})$. Ce formalisme produit un ensemble isobare-isenthalpique, (N,P,H), lequel, associé au contrôle de la température, fournit une distribution isobare-isotherme, (N,P,T).

Le schéma décrit ci-dessus conduit, cependant, à des oscillations de la pression instantanée, P_p, en fonction de la masse du piston, m_p. Dans une approche alternative, cet effet indésirable est éliminé en amortissant le degré de liberté du piston au moyen d'une équation de Langevin. Dans ce cas, l'équation antérieur peut se réécrire comme:

$$\begin{cases} \ddot{s}_i = \dfrac{f_i}{m_i V^{1/3}} - \dfrac{2}{3}\dfrac{\dot{s}_i \dot{V}}{V} \\ \ddot{V} = \dfrac{P_P - P}{m_P} - \gamma \dot{V} + R(t) \end{cases} \qquad (18)$$

ici, γ est la fréquence de collision et $R(t)$ est une force aléatoire obtenue à partir d'une distribution gaussienne de moyenne égale à zéro et variance égale à $\langle R(0)R(t)\rangle = {2\gamma k_B T\delta(t)}/{m_p}$. La force $R(t)$ satisfait au théorème de fluctuation-dissipation – *i.e.* $\langle R(t_1)R(t_2)\rangle = \dfrac{1}{mp} 2k_B T\kappa(t_1 - t_2)$, où $\kappa(t)$ correspond au facteur d'amortissement.

IV.3.2.4 – La fonctionnelle energie potentielle

La fonctionnelle énergie potentielle constitue la pierre angulaire de la modélisation moléculaire. Cette fonctionnelle doit être capable de reproduire les propriétés micro- et macroscopiques du système aussi fidèlement que possible. Dans cette perspective, elle est associée à plusieurs paramètres atomiques garantissant une description correcte des interactions inter- et intramoléculaires. De tels paramètres sont obtenus au travers d'expériences de spectroscopie et de cristallographie, ainsi que par des calculs sophistiqués de la mécanique quantique, en utilisant des systèmes prototypes comme modèles pour des structures plus complexes comme les biopolymers. L'ensemble {*fonctionnelle*

d'énergie potentielle + paramètres moléculaires} est généralement appelé «champ de force» (MacKerell Jr. et al., 1998).

La fonction énergie potentielle, $U(\mathbf{r}^N)$, est caractéristique d'un problème de plusieurs corps, devant rigoureusement être exprimé comme une somme de N termes. Dans un certain nombre d'approximations, cette somme est limitée au deuxième terme. Dans ce cas, les interactions de paires atomiques et d'ordre supérieur sont traitées par un potentiel effectif :

$$U(\mathbf{r}^N) \cong \sum_i v_1(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{j>i} v_2^{\text{effectif}}(\mathbf{r}_{ij}) \tag{19}$$

cette approximation est utilisée dans plusieurs champs de force, en particulier, ceux dédiés à l'étude de systèmes macromoléculaires. Parmi les diverses fonctions énergie potentielle implantées jusqu'ici, celle de AMBER offre une description minimaliste, mais appropriée du système (Cornell et al., 1995) :

$$U(\mathbf{r}) = \sum_{liaisons} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2$$

$$+ \sum_{dièdres} \sum_n \frac{U_n}{2}[1 + cos(n\varphi - \gamma)]$$

$$+ \frac{1}{k_{vdW}^{1-4}} \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\} \in 1-4}} \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} 2 \left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{1}{K_{Coulomb}^{1-4}} \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\} \in 1-4}} \frac{q_i q_j}{4\pi \in_0 \in_1 r_{ij}}$$

$$+ \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\}>1-4}} \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{6} \right] + \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\}>1-4}} \frac{q_i q_j}{4\pi \in_0 \in_1 r_{ij}} \tag{20}$$

dans lequel, k_r et r_0 représentent la constante de force de liaison et la longueur de la liaison à l'équilibre, respectivement ; k_θ et θ_0, représentent la constante de force angulaire et l'angle de valence à l'équilibre, respectivement ; $\frac{U_n}{2}$, n et γ représentent la barrière de torsion, sa périodicité et sa phase, respectivement ; $\in_1$ et $\in_0$ sont respectivement la permittivité du vide et la permittivité relative ; q_i est la charge partielle portée par l'atome i ; R_{ij}^* et ε_{ij} correspondent aux paramètres de van der Waals pour la paire atomique $\{ij\}$, obtenus à partir des règles de combinaison de Lorentz – Berthelot (équation 21).

$$\begin{cases} \varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j} \\ R_{ij}^* = R_i^* + R_j^* \end{cases} \tag{21}$$

Les deux composantes, électrostatiques et de van der Waals, sont considérées pour paramétrer le terme de torsion. Cependant, dans quelques champs de force, de tels components sont encore distingués en fonction du nombre de liaisons chimiques entre les atomes. De cette manière, le terme de torsion peut être séparé entre : (*i*) les interactions où les atomes sont connectés exactement par

trois liaisons chimiques – *i.e.* les termes 1 – 4 ; (*ii*) les autres interactions (voir figure 12). Cette distinction paraît dans l'équation 20, où les termes 1 – 4 sont redimensionnés par les facteurs $\frac{1}{k_{vdW}^{1-4}}$ et $\frac{1}{k_{Coulomb}^{1-4}}$.

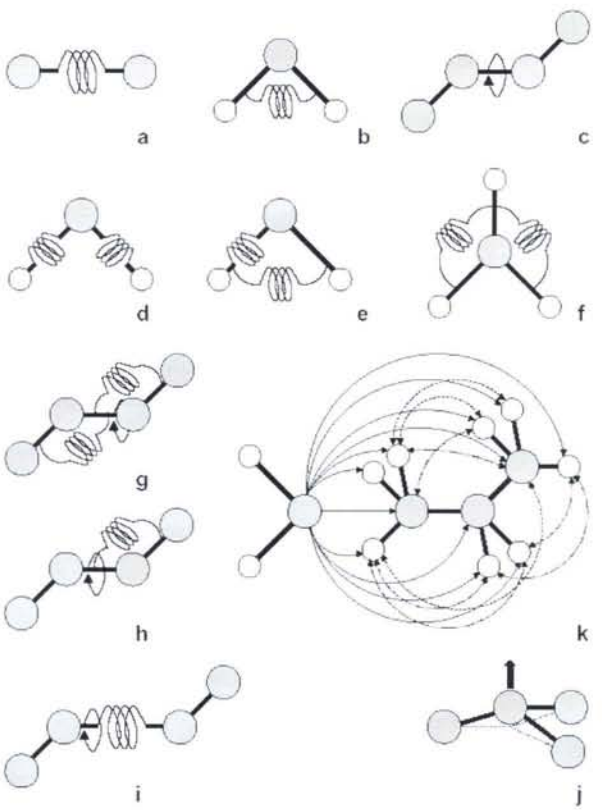

Figure 12: Illustration des différents termes d'une fonction énergie potentielle empirique. Les termes **a-j** représentent le champ de force de valence, parmi lesquels **d-j** sont des termes dits «croisés». **j** est appelé terme impropre ou *out–of–plane*, garantissant que l'atome central reste dans le plan des trois voisins auxquels il est lié chimiquement. **k** caractérise les interactions coulombiennes et de van der Waals d'atomes non liés chimiquement: Interactions intermoléculaires (trait plein), interactions intramoléculaires dites «1–4» (pointillés), et interactions intramoléculaires > 1 – 4 (tirets).

IV.3.2.4.1 – LIAISONS CHIMIQUES, ANGLES DE VALENCE ET DIEDRES

Un aspect important pour le calcul précis de l'énergie potentielle est la description précise des angles dièdres par le champ de force. Il est pour ainsi dire illusoire de vouloir reproduire correctement le comportement du potentiel de torsion, $U(\phi)$, par un développement limité de la série de Fourier – *cf.* équation 20. Ceci s'explique par la difficulté de décrire au cours de la simulation les transitions conformationnelles dans les chaînes aliphatiques, comme par exemple, les chaînes lipidiques. Dans ce cas, l'utilisation d'un potentiel plus sophistiqué, comme le potentiel de Ryckaert et Bellemans (Ryckaert and Bellemans, 1978), est recommandé pour une représentation correcte des lipides :

$$U(\phi) = \sum_{i=1}^{6} a_i \cos^i \phi \qquad (22)$$

ici, les coefficients a_i ont été optimisés en considérant la rotation interne du *n*-butane.

En outre, d'autres propriétés chimiques ne sont pas complètement reproduites par la fonction d'énergie décrite auparavant. Par exemple, pour modéliser l'élongation de la liaison chimique dans certaines molécules, le terme harmonique doit être substitué par un potentiel dissociatif de Morse :

$$U(r) = D_0 \left[e^{-\alpha(r-r_0)} - \frac{1}{1} \right]^2 \tag{23}$$

où, D_0 correspond à l'énergie de dissociation et r_0, à la longueur d'équilibre de la liaison. Par ailleurs, la considération explicite d'effets non harmoniques, dans la déformation des angles de valence et dans l'élongation des liaisons, peut requérir une correction additionnelle du potentiel :

$$U(r) = K_r (r - r_0)^2 \left[1 - K'_r (r - r_0) + K''_r (r - r_0)^2 \right] \tag{24}$$

dans un certain nombre de situations, la longueur des liaisons chimiques peut être réduite à cause de l'ouverture des angles de valence. Un tel effet n'est pas considéré explicitement dans l'équation 20. La modélisation précise de cette propriété nécessite l'ajout à la fonction énergie potentielle d'un terme de couplage :

$$U(r - \theta) = K_\theta (r - r_0)(\theta - \theta_0) \tag{25}$$

outre ce terme de couplage, d'autres mouvements couplés peuvent être introduits dans le potentiel. Quelques uns de ces mouvements sont illustrés dans la figure 12 (cf. termes e-j).

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

IV.3.2.4.2 – POTENTIEL DE LENNARD-JONES ET CHARGES PARTIELLES

La détermination des paramètres du potentiel de Lennard-Jones, R_{ij}^{*} et ε_{ij}, et des charges partielles, q_i, est également importante pour le développement d'un champ de force. En particulier, les paramètres de Lennard-Jones peuvent être obtenus à partir de calculs de la mécanique quantique. Dans ce cas, les termes de répulsion et dispersion du potentiel sont ajustés en considérant un grand nombre de configurations correspondant à des positions relatives différentes. Cette méthode est généralement applicable à des systèmes chimiques de taille réduite, comme par exemple, l'hétérodimère formamide-eau. Une approximation alternative aux calculs sophistiqués de la mécanique quantique consiste à recourir aux simulations statistiques de phases condensées. A partir d'un jeu initial, les paramètres $\left\{R_{ij}^{*}, \varepsilon_{ij}\right\}$ sont optimisés pour reproduire de façon satisfaisante des quantités thermodynamiques clef – *e.g.* enthalpie de vaporisation, densité.

Des modèles de charges ponctuelles peuvent être obtenus en ajustant celles-ci au potentiel électrostatique. Un ensemble optimal de N_{atomes} charges atomiques, $\{q_k\}$, est déterminé à partir de la minimisation de la fonction :

$$f(\{q_k\}) = \sum_{i=1}^{N_{\text{points}}} \left[V^{\text{reference}}(\mathbf{r}_i) - \sum_{j=1}^{N_{\text{atomes}}} \frac{q_j}{r_{ij}} \right]^2 \qquad (26)$$

où, $V^{reference}(\mathbf{r}_i)$ est le potentiel électrostatique au point $\mathbf{r}_i$ d'une distribution de points, N_{points}, répartis de façon homogène autour de la molécule. Le potentiel électrostatique, $V^{reference}(\mathbf{r}_i)$, est obtenue à partir de calculs de la mécanique quantique.

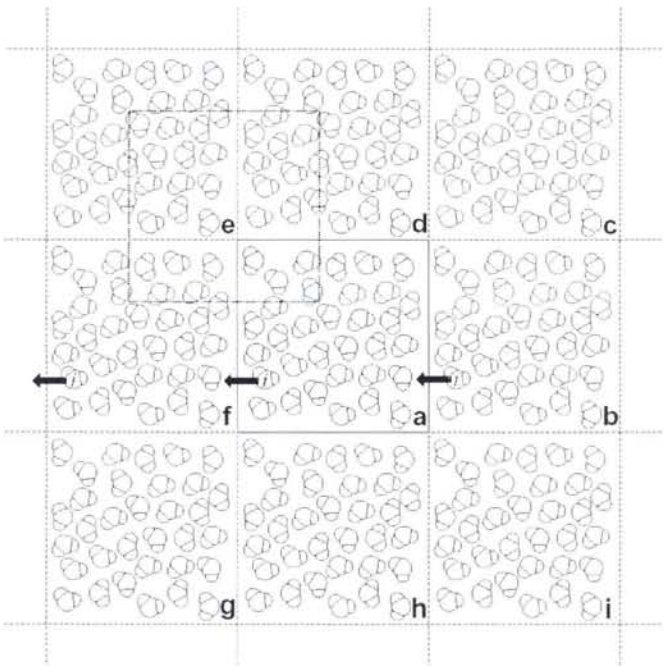

Figure 13 : Vue bidimensionnelle d'une cellule de simulation répliquée dans les trois dimensions de l'espace cartésien. En utilisant les conditions aux limites périodiques, lorsque la molécule *i* quitte la boîte centrale **a**, ses images dans les cellules fantômes voisines se déplacent de manière similaire. La boîte en pointillés, sur les cellules **a**, **d**, **e** et **f**, symbolise la convention de l'image minimale.

IV.3.2.4.3 – INTERACTIONS ELECTROSTATIQUES

Dans le calcul de l'énergie potentielle, les systèmes chimiques sont modélisés comme un ensemble fini de particules confinées dans la boîte centrale de simulation, généralement orthorhombique. Cependant, pour une corrélation correcte des propriétés macro- et microscopiques, les effets de bord du système doivent être éliminés. Dans la pratique, des conditions aux limites périodiques sont utilisées, impliquant la réplication du système dans les trois directions de l'espace cartésien (voir figure 13). Le caractère pseudo-infini de cette approche demande un traitement spécial des interactions intermoléculaires, en particulier, des interactions électrostatiques (Allen and Tildesley, 1989). Une première approximation, dite de l'image minimale, est basée sur la supposition que chaque particule *i* dans la boîte centrale interagit avec l'image la plus proche de toutes les autres particules *j*. En outre, la considération d'une sphère de troncature, ou *cut-off*, permet de supprimer les interactions au-delà d'une distance arbitraire, définie comme étant inférieure ou égale à la moitié du plus petit coté de la cellule de simulation (voir figure 14).

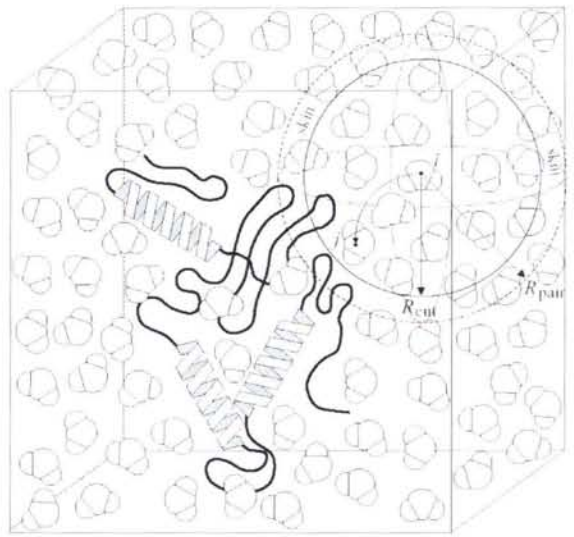

Figure 14 : Utilisation d'une sphère de troncature de rayon R_{cut} pour limiter le calcul des interactions de la particule *i* avec ses voisins dans la convention de l'image minimale. Une sphère de rayon R_{pair}, supérieur à R_{cut}, est employée pour établir la liste de tous les voisins de la particule *i*. La liste des paires de particules $\{i, j\}$ est mise à jour périodiquement.

La validité du *cut-off*, comme une approximation pour la détermination des interactions moléculaires, dépend du type d'interaction considérée, en particulier, des interactions électrostatiques. La taille du système croissant en r^3, les interactions en $1/r^n$, pour $n < 3$, ne seront pas calculées correctement en utilisant la simple approximation de *cut-off*. Ce problème peut être résolu en employant des méthodes plus appropriées, dans lesquelles les interactions charge-charge et charge-dipôle sont déterminées par la solution de l'équation linéaire de Poisson-Boltzmann (Barker, 1994). Cette méthode, appelée de champ de réaction généralisé, n'élimine pas, cependant, tous les artéfacts associés à une approximation de *cut-off* (Rozanska and Chipot, 2000).

Un traitement plus rigoureux de ce problème consiste à recourir à une solution de type somme de réseaux – *e.g.* Ewald-Kornfeld ou Ladd (Allen and Tildesley, 1989; Frenkel and Smit, 1996), dans laquelle les interactions de particules sont considérées sur tout l'espace. Dans le schéma développé par Ewald (figure 15), la somme de Coulomb (équation 27) est séparée en deux expressions (équation 28), correspondant à une somme dans l'espace direct et une seconde dans l'espace:

$$U_{Coulomb}(\mathbf{r}) = \sum_{i<j} \frac{q_i q_j}{4p \in_0 \in_1 r_{ij}} \tag{27}$$

$$\sum_n \frac{1}{|n|} F(n) + \sum_m \frac{1}{|m|} [1 - F(n)] \tag{28}$$

dans ce cas, chaque point chargé du système est entouré par une distribution Gaussienne de charges :

$$g_i(\mathbf{r}) = q_i a^3 \frac{e^{\left(-a^2 r^2\right)}}{\sqrt{p^3}} \tag{29}$$

ici, α est un paramètre positif caractérisant la largeur de la distribution. Le premier terme converge rapidement quand $n \to \infty$. La seconde somme est évaluée en utilisant une transformée de Fourier pour résoudre l'équation de Poisson, $\nabla^2 U(\mathbf{r}) = -4p g_i(\mathbf{r})$. La transformée décroît rapidement et la somme

converge de la même manière (Toukmaji, 1996). En suivant cette méthode, le potentiel caractérisant les interactions électrostatiques peut se résumer en :

$$U_{Ewald}(\mathbf{r}) = \frac{1}{2V\in_0}\sum_{k\neq 0}\frac{exp\left(-k^2/4a^2\right)}{k^2}\left[\sum_j q_j\, exp\left(i\mathbf{k}\cdot\mathbf{r}_j\right)\right]\left[\sum_j q_j\, exp\left(i\mathbf{k}\cdot\mathbf{r}_j\right)\right]$$
$$+\frac{1}{4p\in_0}\sum_i\sum_{j>i}\frac{q_iq_j}{r_{ij}}erfc\left(ar_{ij}\right)-\frac{a}{4p^{3/2}\in_0}\sum_i q_i^2$$
$$+\frac{1}{4p\in_0}\sum_i\sum_{j>i}\frac{q_iq_j}{r_{ij}} \qquad (30)$$

où, le premier terme correspond à la somme dans l'espace réciproque pour $\mathbf{k}$ vecteurs. Le second terme est la somme dans l'espace direct, où $erfc(x)$ est la fonction complémentaire de l'erreur – *i.e.* $1-erf(x)$. Les troisièmes et quatrièmes termes sont des corrections provenant du fait que la somme dans l'espace réciproque prend en compte toutes les paires atomiques $\{i,j\}$.

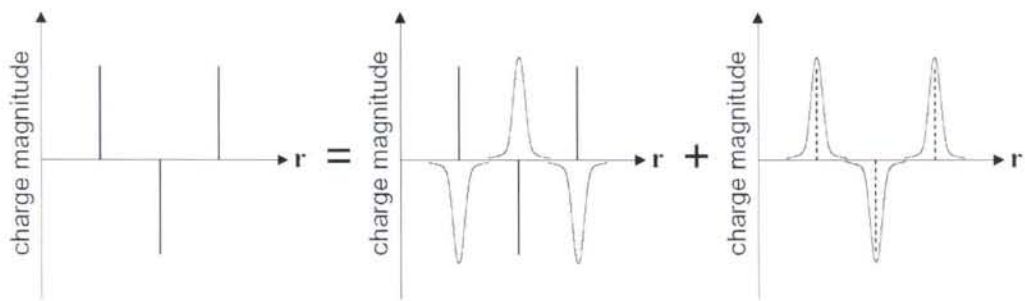

Figure 15 : Composantes d'une somme d'Ewald dans un système unidimensionnel de charges ponctuelles. Dans l'espace direct, chaque charge est entourée d'une distribution de charge gaussienne, $g_i(\mathbf{r})$, d'amplitude égale mais de signe opposé. Cette contribution est contre–balancée dans l'espace réciproque par une distribution gaussienne $g_j(\mathbf{r})$ de signe contraire.

L'effort informatique impliquée dans la méthode d'Ewald est de l'ordre de $O(N^2)$, où N est le nombre de particules du système. Cette effort peut être réduit à $O(N^{3/2})$, en choisissant astucieusement la largeur de la distribution, α, le nombre de vecteurs $\mathbf{k}$ et le *cut-off* pour le calcul des interactions dans l'espace direct. Un traitement mois coûteux correspond à une variante de la méthode classique d'Ewald, dans lequel le terme de l'espace réciproque est résolu en utilisant une transformée rapide de Fourrier (FFT). Pour atteindre cet objectif, l'espace cartésien dans la région de la boîte centrale de simulation est divisé grâce à une grille tridimensionnelle (figure 16). Les charges ponctuelles de chaque particule du système sont interpolées sur cette grille et la distribution correspondante, $g_i(\mathbf{r})$, est calculée. En employant la technique FFT, la transformée de la distribution, $g_i(\mathbf{k})$, est calculée sur la base vectorielle de l'espace réciproque. Il s'ensuit que les interactions à longue portée du potentiel électrostatique sont déterminées selon $\hat{V}(\mathbf{k}) = \hat{P}(\mathbf{k})\hat{g}(\mathbf{k})$, où $\hat{P}(\mathbf{k})$ est appelée de la fonction d'influence, $\hat{P}(\mathbf{k}) = \hat{\lambda}(\mathbf{k}) / \varepsilon_0 k^2$, et $\lambda(\mathbf{r})$ est une distribution qui dépend seulement de la géométrie de la boîte centrale de simulation. La contribution de $V(\mathbf{k})$ est calculée sur plusieurs points de la grille par une transformée inverse. Les force électrostatiques sont déterminées par une dérivation numérique du potentiel. Enfin, le champ électrique et le potentiel sont interpolés de la grille vers la position des particules. Ce procédé constitue l'idée centrale de la

méthode *particle-mesh* (Darden et al., 1993; Essmann et al., 1995), ainsi que *particle-mesh Ewald* (PME), pour lesquelles, formellement, le coût informatique est réduit à $O(N \ln N)$.

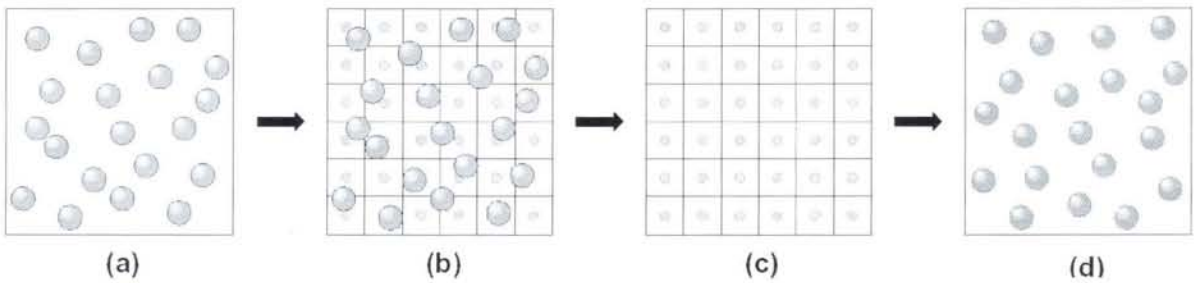

Figure 16: Approche de type *particle–mesh* sur un réseau bidimensionnel. **(a)** Système de particules chargées. **(b)** Les charges sont interpolées sur une grille bidimensionnelle. **(c)** En utilisant une approche de transformée de Fourier rapide (FFT), le potentiel et les forces sont évalués en chaque point de la grille. **(d)** Les forces sont interpolées en retour vers les particules, dont la position est ensuite mise à jour.

IV.4 – REFERENCES

Allen, M. P., and D. J. Tildesley. 1989. Computer Simulation of Liquids. Clarendon Press, Oxford.

Andersen, H. C. 1980. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *J. Chem. Phys.* 72:2384-2393.

Barker, J. A. 1994. Reaction field, screening, and long-range interactions in simulations of ionic and dipolar systems. *Mol. Phys.* 83:1057-1064.

Berendsen, H. J. 2001. Bioinformatics. Reality simulation - observe while it happens. *Science.* 294:2304-2305.

Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak. 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81:3684-3690.

Berman, H. M., T. Battistuz, T. N. Bhat, W. F. Bluhm, P. E. Bourne, K. Burkhardt, Z. Feng, G. L. Gilliland, L. Iype, S. Jain, P. Fagan, J. Marvin, D. Padilla, V. Ravichandran, B. Schneider, N. Thanki, H. Weissig, J. D. Westbrook, and C. Zardecki. 2002. The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58:899-907.

Bhandarkar, M., R. Brunner, C. Chipot, A. Dalke, S. Dixit, P. Grayson, J. Gullinsrud, A. Gursoy, W. Humphrey, D. Hurwitz, N. Krawetz, M. Nelson, J. Phillips, A. Shinozaki, G. Zheng, and F. Zhu. 2002. NAMD version 2.4. *http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd.*

Bourne, P. E., and I. N. Shindyalov. 2003. Structure comparison and alignment. *Methods Biochem Anal.* 44:321-337.

Brooks, B. R., R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus. 1983. CHARMM: a Program for Macromolecular Energy, Minimizations, and Dynamics Calculations. *J. Comp. Chem.* 4:187-217.

Brooks, C. L., and D. A. Case. 2003. Theory and simulation. The control and timescale of structure and reactivity in biological systems: from peptide folding to cellular networks. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:143-145.

Carloni, P., U. Rothlisberger, and M. Parrinello. 2002. The role and perspective of ab initio molecular dynamics in the study of biological systems. *Acc. Chem. Res.* 35:455-464.

Chan, H. S., and K. A. Dill. 1998. Protein folding in the landscape perspective: chevron plots and non-Arrhenius kinetics. *Proteins.* 30:2-33.

Claussen, H., C. Buning, M. Rarey, and T. Lengauer. 2001. FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations. *J. Mol. Biol.* 308:377-395.

Clore, G. M., and C. D. Schwieters. 2003. Docking of protein-protein complexes on the basis of highly ambiguous intermolecular distance restraints derived from 1H/15N chemical shift mapping and backbone 15N-1H residual dipolar couplings using conjoined rigid body/torsion angle dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 125:2902-2912.

Cornell, W. D., P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz Jr., D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. C. Caldwell, and P. A. Kollman. 1995. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117:5179-5197.

Daggett, V. 2002. Molecular dynamics simulations of the protein unfolding/folding reaction. *Acc. Chem. Res.* 35:422-429.

Darden, T., D. York, and L. Pedersen. 1993. Particle mesh Ewald - An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98:10089-10092.

De Freitas, S., W. Treptow, F. De Faria, M. Azevedo, and B. Maigret. 2003. Structural contributions for themostability of a new endo-1,4-beta-xylanase from the fungus *Humicola grisea*. *Internet Electron. J. Mol. Des.* 2:835-851.

Elber, R., A. Ghosh, and A. Cardenas. 2002. Long time dynamics of complex systems. *Acc. Chem. Res.* 35:396-403.

Essmann, U., L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, and L. G. Pedersen. 1995. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 103:8577-8593.

Frenkel, D., and B. Smit. 1996. Understanding molecular simulations: from algorithms to applications. Academic Press, San Diego.

Garcia, L., W. Treptow, and A. Pereira de Araujo. 2001. Folding simulations of a three-dimensional protein model with a nonspecific hydrophobic energy function. *Phys. Rev. E.* 64:1-5.

Goldsmith-Fischman, S., and B. Honig. 2003. Structural genomics: computational methods for structure analysis. *Protein Sci.* 12:1813-1821.

Hansson, T., C. Oostenbrink, and W. van Gunsteren. 2002. Molecular dynamics simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:190-196.

Hünenberger, P. H., A. E. Mark, and W. F. van Gunsteren. 1995. Computational Approaches to Study Protein Unfolding: Hen Egg White Lysozyme as a Case Study. *Proteins: Struct. Funct., Genetics.* 21:196-213.

Lindahl, E., B. Hess, and D. van der Spoel. 2001. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Model.* 7:306-317.

brack Jr., J. Evanseck, M. J. Field, S.
arthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T.
Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher
. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J.
. 1998. All-atom empirical potential
s of proteins. *J. Phys. Chem. B.*

L. Klein. 1996. Explicit reversible
Phys. 87:1117-1157.

plied to nucleic acids. *Acc. Chem.*

→MAGASIN·SC

N1998 120

→ " "

N2004 1U A
1U B

Pereira de Araujo, A. F. 1999. Folding protein models with a simple hydrophobic energy function: the fundamental importance of monomer inside/outside segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:12482-12487.

Petrey, D., Z. Xiang, C. L. Tang, L. Xie, M. Gimpelev, T. Mitros, C. S. Soto, S. Goldsmith-Fischman, A. Kernytsky, A. Schlessinger, I. Y. Koh, E. Alexov, and B. Honig. 2003. Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling. *2003.* 53:430-435.

Rarey, M., B. Kramer, T. Lengauer, and G. Klebe. 1996. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.* 261:470-489.

Ritchie, D. W., and G. J. L. Kemp. 2000. Protein docking using spherical polar fourier correlations. *Proteins.* 39:178-194.

Rozanska, X., and C. Chipot. 2000. Modeling ion-ion interaction in proteins: A molecular dynamics free energy calculation of the guanidinium-acetate association. *J. Chem. Phys.* 112:9691-9694.

Ryckaert, J., and A. Bellemans. 1978. Molecular dynamics of liquids alkanes. *Chem. Soc. Faraday Discuss.* 66:95-106.

Sander, C., and R. Schneider. 1991. Database of Homology-Derived Structures and the Structural Meaning of Sequence Alignment. *Proteins.* 9:56-68.

Toukmaji, A. Y. 1996. Ewald summation techniques in prespective: a survey. *Comput. Phys. Comm.* 95:73-92.

Tovchigrechko, A., C. A. Wells, and I. A. Vakser. 2002. Docking of protein models. *Protein Sci.* 11:1888-1896.

Treptow, W., M. Barbosa, L. Garcia, and A. Pereira de Araujo. 2002. Non-native interactions, effective contact order, and protein folding: a mutational investigation with the energetically frustrated hydrophobic model. *Proteins.* 49:167-180.

Treptow, W., M. Sousa, K. Carvalho, and B. Maigret. 2003. The structure of a new sea anemone toxin: a molecular modeling study of cangitoxin. *Teochem.* 62:87-95.

Vakser, A., and C. Aflalo. 1994. Hydrophobic docking: a proposed enhancement to molecular recognition techniques. *Proteins.* 20:320-329.

van Gunsteren, W. F., and H. J. C. Berendsen. 1990. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications, and perpectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29:992-1023.

van Gunsteren, W. F., F. J. Luque, D. Timms, and A. E. Torda. 1994. Molecular mechanics in biology: from structure to function, taking account of solvation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:847-863.

Warshel, A. 2002. Molecular dynamics simulations of biological reactions. *Acc. Chem. Res.* 35:385-395.

Weissig, H., and P. E. Bourne. 2002. Protein structure resources. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58:908-915.

V – RESULTATS

V.1 – MODELISATION MOLECULAIRE DU CANAL POTASSIUM SENSIBLE A LA TENSION, *SHAKER* B

Les résultats de la modélisation du mécanisme d'activation des canaux ioniques sensibles à la tension sont présentés sous la forme d'un manuscrit scientifique soumis pour publication à *Biophysical Journal* et intitulé "Coupled motions between pore and voltage-sensor domains: A model for *Shaker* B, a voltage-gated potassium channel". En quelques mots, ce travail décrit les propriétés moléculaires d'un modèle structural pour les canaux potassium, examinés par modélisation moléculaire. Plusieurs outils, en particulier, la dynamique moléculaire «état de l'art», ont été employés pour atteindre une description atomique de la région transmembranaire. La séquence considérée est celle du canal *Shaker* B. Cette protéine est le principal objet d'étude des canaux ioniques sensibles à la tension, et a déjà été caractérisée en détails (Cohen et al., 2003; Bell et al., 2004). La quantité impressionnante de données expérimentales sur le sujet fournit un nombre considérable de restrictions structurales facilitant la procédure de modélisation. Enfin, ce modèle a été corroboré par l'étude de l'action de toxines sur celui-ci.

Coupled motions between pore and voltage-sensor domains: a model for *Shaker* B, a voltage-gated potassium channel

Werner Treptow[1,2], Bernard Maigret[1], Christophe Chipot[1] and Mounir Tarek[1]

[1]*Equipe de dynamique des assemblages membranaires, Unité mixte de recherche CNRS/UHP 7565, Institut nancéien de chimie moléculaire, Université Henri Poincaré, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France.*

[2]*Departamento de Biologia Celular, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70862-030, Brasil*

Correspondence should be addressed to **M.T.** e-mail: mtarek@edam.uhp-nancy.fr

Abstract

A high-resolution crystal structure of KvAP, archeabacterial voltage-gated potassium (Kv) channel, complexed with a monoclonal Fab fragment has been recently determined. Based on that structure, a mechanism for the activation (opening) of Kv channels was proposed. This mechanism has since been criticized suggesting that the resolved structure is not representative of the family of voltage-gated potassium channels. Here, we propose a model of the transmembrane (TM) domain of *Shaker* B, a well-characterized Kv channel, built by homology modeling and docking calculations. In this model, the positively charged S4 helices are oriented perpendicular to the membrane and localized in the groove between segments S5 and S6 of adjacent subunits. The structure and the dynamics of the full atomistic model, embedded in a hydrated lipid bilayer, were investigated by means of two large-scale molecular dynamics simulations under TM voltage conditions known to induce respectively the resting state (closed) and the activation (opening) of voltage-gated channels. Upon activation, the model undergoes conformational changes that lead to an increase of the charged S4 helices hydration, correlated with an upward translation and a tilting of S4 and movements of S5 and of the activation gate. Although small, these conformational changes ultimately result in altering the ion-conduction pathway. Our results give support to the transporter model

proposed by Bezanilla and collaborators, and underline the crucial role played by internal hydration in the activation of the channel.

Introduction

Voltage-gated potassium (Kv) channels allow K^+ ions to flow through membranes. This remarkable property is of major importance for electric signaling in excitable tissues, especially for regulation of the action potential (Hodgkin and Huxley, 1952). Consequently, several human diseases are related to abnormal functions of such proteins, e.g., cardiac diseases (Mandegar and Yuan, 2002). Kv channels control ion conduction by adopting different molecular states in response to variations of the transmembrane (TM) voltage. Three main states, *viz* resting, activation and inactivation, have been identified. The resting state occurs at hyperpolarized potentials of the membrane while activation and inactivation, are induced by membrane depolarization. Whereas the resting and the inactivated states present low or no level of ion conductance (closed channel), the activated state is related to high ion conductance (open channel). Transitions between these states are usually treated as a general gating mechanism (Hille, 1992).

Kv channels are complex quaternary structures, in which the central hydrophilic pore results from an arrangement of four TM domains (Choe, 2002). The primary

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

sequence of each domain is predicted to form six TM helices (S1-S6) and a small pore helical segment buried in the membrane, found between S5 and S6 (Fig.1). Segments S5 through S6 constitute the central pore domain and delineate the hydrophilic pathway for ionic current. A conserved motif between these segments forms the so-called selectivity filter responsible for ion selectivity. The central pore is surrounded by an arrangement of segments S1 through S4, experimentally identified as the voltage-sensor domain (Lu et al., 2001). When the membrane is depolarized, this domain senses the variations of the TM voltage and triggers the conformational changes necessary for channel gating (Horn, 2000). A direct measure of this conformational modification is the gating current believed to derive mainly from the movement of the highly positively charged S4 helix (Bezanilla, 2000; Bezanilla, 2002) and to lead to the opening of the channel during activation. The inactivated state involves complex molecular rearrangements believed to result from two mechanisms: fast inactivation and slow inactivation. The first involves blocking the inner mouth of the pore with the intracellular N-terminus of the TM domain (Zhou et al., 2001). After prolonged depolarization the pore domain becomes non-conductive by slow inactivation, mechanism that is still not well characterized (McCollum et al., 2003).

Ionic currents are coupled to gating currents in Kv channels (Horn, 2000). This stresses the importance of determining how the motion of the voltage sensor is

coupled to the motion of the pore domain. Not only the structure of the former is to be known, but it is also crucial to decipher the coupled conformational changes induced by TM voltage variations that lead to opening of the ion-conduction pathway (Yellen, 2002). Very few elements of the puzzle are well known. Among those, the structure of the pore domain, that is homologous to all Kv channels, has been resolved for the bacterial channel KcsA (Doyle et al., 1998). In recent months, a high resolution X-ray structure of the TM domain of KvAP, an archeabacterial Kv channel from *Aeropyrum pernix* has been determined (Ruta et al., 2003; Jiang et al., 2003a; Jiang et al., 2003b). In this structure, the S4 charged helical segment and parts of S3 are found to form a paddle lying at the periphery of the channel, parallel to the intracellular membrane/water interface. It is suggested, based on the structure, that activation of the channel during depolarization induces a large, upward movement of the paddle bringing it from the cytoplasmic region to the extracellular side of the membrane, through the hydrophobic lipid region. The model has since been challenged (Broomand et al., 2003; Lainé et al., 2003; Neale et al., 2003; Gandhi et al., 2003; Lee et al., 2003; Starace and Bezanilla, 2004; Bell et al., 2004; Ahern and Horn, 2004). It was indeed shown that, for eukariotic *Shaker* channels, in their native membrane environments, S4 is rather oriented perpendicular to the membrane plane and located in the groove between pore domains from different subunits, as previously suggested. Several of these results were based on measurements of affinity binding between specific residues in S4 and the pore domain. When

cysteine mutations are performed on those residues, they undergo spontaneous disulfide bond formation. It is hence claimed that the published structure of KvAP is unlikely to correspond to that of a functional channel. As the paddle conformation and the opening/closing mechanism proposed by Mackinnon and coworkers contradicts also several earlier reports (Bezanilla, 2000; Horn, 2000; Yellen, 2002; Choe, 2002), one may question indeed how much, both the complexation of the KvAP channel with a monoclonal Fab fragment, and the detergent solubilization that were necessary to crystallize the protein, may have distorted the channel structure. In summary, there is a body of evidence that the paddle model based on the resolved KvAP structure disagrees strongly with a series of recent experiments on Kv channels and therefore may not be appropriate for describing the rearrangements of the voltage-sensor domain taking place during activation of the family of voltage-gated channels.

Modeling techniques and specifically molecular dynamics (MD) simulations can in principle be used to investigate the stability of the KvAP channel in a simplified lipid bilayer model mimicking a membrane environment, starting from the structure determined by Mackinnon and coworkers. We are pursuing this route, though if one assumes that the structure is not stable, a very long time scale will be required for its relaxation to a conformation where the paddle lies perpendicular to the membrane. The second main issue in this scheme is to propose a reasonable configuration of the channel embedded in a lipid bilayer

environment. Indeed, there are no membranes in the KvAP crystal, and probably no bilayers of any sort but rather and uncharacterized dispersion of detergent and bacterial lipid (Cohen et al., 2003). All modeling results will obviously depend on the initial configuration of the system and may therefore be questionable.

While awaiting further experiments aimed at resolving the controversy, we present, here, computational results proposing a model of *Shaker* B and investigating for the first time the gating mechanism. To do so, a full atomistic TM-domain model of the channel was built using homology modeling and docking calculations. Stability and dynamics of the TM domain in a lipid membrane were studied by means of MD simulations considering the influence of applied TM voltages characteristic of the resting state and the activation of the channel. In the following, we first describe the model of the *Shaker* B channel built by homology and docking procedures. We then present the results of the MD simulations where conformational changes involving coupling of the voltage-sensor and the pore domain were clearly witnessed under the influence of the activating TM voltage. Finally we discuss the overall results in comparison with the three models proposed for the activation of voltage-gated ion channels.

Methods

Building the TM-domain model

Piece-wise decomposition into domains is a necessary approach to understand the molecular function of large TM proteins (Kreusch et al., 1998). For the gating mechanism, the main conformational changes in Kv channels appear to be located within the TM domain since it was shown that mutants lacking the complete N-terminal extension might be activated (Kobertz and Miler, 1999). In *Shaker* B, the TM domain is predicted by HMMTOP (Tusnády and Simon, 1998; Krogh et al., 2001) to contain 270 residues (Phe^{217} to His^{486}). The channel sequence was taken from the Swissprot databank (P08510). Six segments were identified along this extension and have been grouped into voltage-sensor and pore domains (Fig. 1). S5 and S6 segments were inferred from the KcsA channel, whereas the extension of each voltage-sensor segment was predicted from sequence analysis (Tusnády and Simon, 1998; Krogh et al., 2001). In the region of the voltage-sensor domain, the primary sequence contains highly conserved proline residues, as revealed from sequence multiple-alignment (Corpet, 1988). As these residues may act as helix breaking points between successive TM segments, four segments, featuring proline residues at the tail-ends and containing one of the predicted segments S1 through S4 were split along the complete extension of the voltage-sensor domain.

The pore domain was considered to extend from Leu^{382} to His^{486} (Fig. 1). The region of Met^{393} to His^{486} was modeled by homology from the KcsA structure (PDB 1bl8) considering the same sequence alignment presented and discussed by Ranatunga et al. (2001), in which the residue accessibility in the KcsA structure is correlated with the residue variability in a given position of the multiple alignment of voltage-gated channels. The remaining extension at the N-terminus of the pore domain of the *Shaker* B, not present in KscA, was here modeled as a helical continuation of the S5 in agreement with NMR data (Ohhlenschlager et al., 2002).

The complete sequence of the voltage-sensor domain was initially considered as four independent standard helical structures. A docking pathway was employed to search preferential positions of these 4 segments around the pore domain, considering all helices to be in TM orientations. This strategy is consistent with the two-stage model (Popot and Engelman, 1990) for the folding of membrane proteins, in which, blocks of secondary structure are formed prior to molecular assembly into higher-order tertiary and quaternary structures. 16! (factorial) docking pathways are necessary to sample all the possibilities for a given topology of the voltage-sensor domains (placing randomly 4x4 helices around the pore).The number of docking pathways was reduced considering that: (a) there is evidence of a symmetrical structure of Kv channels (Sokolova et al., 2001) and (b) specific mutagenesis experiments that show that S1 and S2 are highly tolerant to side-chain replacements compared to S3 and especially S4 (Li-Smerin et al., 2000; Hong and

Miller, 2000; Monks et al., 1999). This suggests that those amino acids that can be replaced are necessarily involved in lipid-protein rather than protein-protein interactions. S1 and S2 are, therefore, expected to occupy the outer position closer to the membrane. A symmetry argument was thus applied to dock the voltage-sensor helices following four pathways, in which S3 and S4 were first docked to the pore prior to S1 and S2.

The specific energy function for TM-helix interactions present in the GRAMM protein-protein docking algorithm (Vakser and Aflalo, 1994) was used for calculation of the docking pathways. From this procedure one configuration of the complete TM domain was selected in which specific orientations of the voltage sensor segments were chosen to satisfy the following experimental constraints: (i) residues of segments S1 through S3 (green shades in Fig. 1.c), found to be tolerant to replacement (Li-Smerin et al., 2000; Hong and Miller, 2000; Monks et al., 1999), are located in the protein/membrane interface region. (ii) the contact between tetramer units occurs through an electrostatic network (red doted lines in Fig. 1.c) involving residues Arg^{368} and Arg^{371} of S4 and Asp^{283} of S2 of the neighboring subunits in agreement with site-directed mutagenesis experiments (Planells-Cases et al., 1995) and second-site-suppressor analysis (Tiwari-Woodruff et al., 1997). This network is further extended by means of intra-voltage-sensor interactions that involve salt-bridges between Glu^{293} of S2 and Arg^{377} of S4, and Asp^{316} of S3 and Lys^{374} of S4. Mutation experiments have demonstrated that these

residues are involved in a well-defined electrostatic network with direct implications in functional protein maturation (Woodruff et al., 1997; Planells-Cases et al., 1995).

The minimized conformation of the TM domain obtained after the docking procedure possesses five well-defined cavities. The central cavity is located below the selectivity filter and four other cavities are located in the voltage-sensor domains. As the latter may correspond to hydrated regions of the protein with direct implications in the function of the channel, the protein was fully hydrated (*viz* 391 water molecules) before placing it in a membrane model. The Kv channel was inserted at the center of the bilayer, optimizing the distance between conserved aromatic side chains (belonging to S1 through S3) and the phospholipid head-groups (Tieleman et al., 1998).

Molecular Dynamics

The MD simulations were carried out in the NPT ensemble using the program NAMD2 (Kalé et al., 1999). The equations of motion were integrated using a multiple time-step algorithm (Izaguirre et al., 1999). Short- and long-range forces were calculated every 2 and 4 time-steps respectively, with a time step of 1.0 fs. Langevin dynamics and Langevin piston methods were applied to keep the temperature (300 K) and the pressure (1 atm) of the system fixed. Chemical bonds between hydrogen and heavy atoms were constrained to their equilibrium value.

Long-range electrostatics forces were taken into account using the particle mesh Ewald (PME) approach (Darden et al., 1993). The water molecules were described using the TIP3P model (Jorgensen et al., 1983). Bond stretching, valence angle deformation, torsion and non-bonded parameters of the protein and the lipids were extracted from the all-atom CHARMM force field (MacKerell Jr. et al., 1998). A united-atom representation was adopted for the alkyl chains of the palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholine (POPC) lipid molecules forming the bilayer. The complete system contains the Kv channel, 488 lipid units, 391 internal water molecules, 34,463 membrane hydration water molecules and 2 potassium ions located in the selectivity filter (a total of *ca.* 158,000 atoms). To ensure the neutrality of the system, 10 sodium counter ions were distributed uniformly in the solvent. The initial dimensions of the simulation cell were 137 × 148 × 100 $Å^3$. Three-dimensional periodic boundary conditions were applied. Execution of NAMD2 was partially performed on 64 R14000 (500 MHz) processors of an SGI Origin 3800 at the CINES supercomputer center.

External Field and the transmembrane voltage

In experiments, a voltage difference ΔV may be imposed by means of a voltage clamp or a pulse. In a lipid system formed by a membrane of thickness *d*, and an electrolyte, the voltage applied results in a constant electrical field $E = \Delta V / d$ across the membrane and an effective zero field in the bulk (electrolyte) solution. In simulations, due to the small sizes of the systems and the use of periodic

boundary conditions, it is impossible to impose a TM voltage by simple addition of explicit ions to the solution, at both sides of the bilayer (Roux, 1997; Tieleman et al., 2001). Here, we have adopted the same strategy as in Tieleman *et al.* (2001), i.e. applied an external electric field, perpendicular to the membrane plane, in order to maintain a fixed voltage difference across the bilayer. In practice, this is done by adding a force on all the atoms bearing a charge q_i, $F = q_i E$, where E is the constant external electric field. Assuming that the field is low enough so that the linear response approximation may be applied, the total field in the water phase, roughly E/e (e dielectric constant ~ 80, effectively 91 for TIP3P water model (Tieleman et al., 2001)), may be neglected compared to that in the membrane medium (e ~ 2, effectively 1 in the hydrocarbon region). Recent evidence from calculations of the dielectric permittivity profile from a lipid bilayer simulation (Stern and Feller, 2003) suggests that the width d of the low dielectric media is roughly 25 Å, and that the interfacial region, due to the presence of the lipid polar head groups is of higher permittivity than water. Therefore, the electric field induces a voltage difference $E = \Delta V / d$ across the membrane and may be neglected in the solvent due to the polarization of the water.

For *Shaker* B, the resting state as determined by electrophysiological experiments (Hille, 1992), is obtained under a TM voltage of ~ -100 mV (negative at the intracellular side of the membrane). Assuming therefore a typical membrane thickness of 25 Å (Tieleman et al., 2001; Stern and Feller, 2003), the resting field

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

trajectory was generated by applying an exterenal field of ~ 4 mV/Å pointing from the outer side of the membrane to the inner side (defined by the orientation of the channel, i.e. from top to bottom in Fig. 3). Inversion of the external field produces a TM potential of ~ +100 mV that promotes the activation of the channel (Hille, 1992). Estimates from Hille suggest that the time scale for activation is within milliseconds. A lower bound of opening and closing of the channel, within microseconds, has been recently proposed for the fast component of the gating current (Sigg et al., 2003). Investigating such dynamics evidently remains beyond the current capabilities of MD simulations. We have therefore chosen, in order to promote a faster response of the system, to apply an electrical field about five times larger than that of experimental conditions (e.g. corresponding to a TM voltage difference of +500 mV). The TM voltages involved in both the resting-field and the activating-field trajectories are shown not to produce any unrealistic effects such as a destabilization of the channel model, specifically in the region of the selectivity filter, nor a denaturation of the helical TM segments.

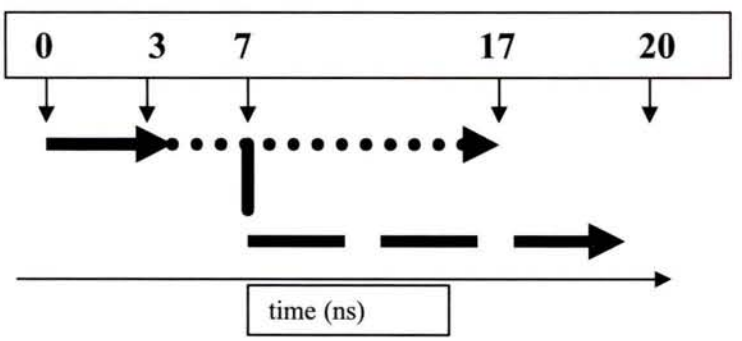

Diagram: MD simulations. Equilibration (solid line), resting-field trajectory (doted) and activating-field trajectory (dashed).

Covariance analysis

Essential dynamics analysis is a well-suited method for filtering out locally confined fluctuations in a large macromolecule from global structural anharmonic motions. This is based on the analysis of a covariance displacement matrix evaluated from the MD trajectory (Amadei et al., 1993; Horiuchi and Go, 1991; Ichiye and Karplus, 1991).

$$\mathbf{C} = \left\langle \left(\mathbf{x}(t) - \langle \mathbf{x}(t) \rangle\right) \cdot \left(\mathbf{x}(t) - \langle \mathbf{x}(t) \rangle\right)^T \right\rangle \tag{1}$$

where < > denotes average over time. $\mathbf{x}(t)$ is the 3N-dimensional vector of atomic coordinates at time t after elimination of the overall translation and rotation of the molecule.

The diagonalization of the covariance matrix results in a set of eigenvectors describing a direction in the high configurational space and eigenvalues, λ_i, representing the mean-square fluctuations of the total displacements along the eigenvectors.

$$\mathbf{C} = \mathbf{R} \cdot diag(\lambda_1, \ldots, \lambda_N) \cdot \mathbf{R}^T \tag{2}$$

$$\sum_{i}^{N}\left\langle\left(\mathbf{x}_i(t)-\langle\mathbf{x}_i(t)\rangle\right)^2\right\rangle=\sum_{i}^{N}\lambda_i \tag{3}$$

In many proteins, there are only a few essential eigenvectors that describe protein dynamics. Motions along these eigenvectors are mainly large anharmonic fluctuations that can generally be linked to the protein biological function. Eigenvalues at higher indices represent harmonic fluctuations (thermal fluctuations) that have narrow Gaussian distributions in the displacement space and do not contribute significantly to the positional fluctuations. For a long simulation, the first few modes usually describe collective motions along the so-called principal components. These are evaluated from the projection of the trajectory on the corresponding eigenvectors.

$$\mathbf{p}(t)=\mathbf{R}^T\cdot\mathbf{x}(t) \tag{4}$$

Random diffusion is known to produce patterns that resemble collective behavior. Hess has, however, shown that for random diffusion in a flat energy surface, principal components of the major modes are cosines with the number of periods equal to half of the principal component index (Hess, 2002). The cosine content (c_i), a measure of the similarity to random diffusion, may be used to estimate how much of the major modes are likely to describe functional motions: it is equal to unity for a perfect cosine, and zero in the case of no similarity. It may be evaluated from the covariance analysis as:

$$c_i = \frac{2}{T}\left(\int_0^T \cos(i\pi t)\cdot p_i(t)\cdot dt\right)^2 \cdot \left(\int_0^T {p_i}^2(t)\cdot dt\right)^{-1} \quad (5)$$

Finally, it is possible to investigate how much of space sampled by one trajectory overlaps with another (Hess, 2002). This can be estimated by calculating the overlap (o) between the covariance matrices of two simulations parts of a trajectory, or that of two independent trajectories (A and B):

$$o = 1 - \left\{ tr\left[\mathbf{A}^{\frac{1}{2}} - \mathbf{B}^{\frac{1}{2}}\right]^2 \cdot (tr\mathbf{A} + tr\mathbf{B})^{-1} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

If sampling is identical for the two trajectories, the overlap is 1, otherwise, *i.e.* for orthogonal spaces, the overlap is 0.

Toxin binding

Hanatoxin was found to bind to Kv channels of the *Shab* and *Shal* families, whereas the *Shaker* and *Shaw* families were relatively insensitive. Recent studies demonstrated, however, the inhibition of a *Shaker* B channel chimera containing a segment of 20 residues from the Shab *Drk*1 channel (Swartz and MacKinnon, 1997b). This chimera was directly homology modelled by mutations of the *Shaker* B model. One conformation of the channel representative of the resting-field trajectory was used. After relaxation, the mutant model was docked with the structure of hanatoxin recently determined by NMR (Takahashi et al., 2000). Kv

channels possess four independent toxin-binding sites (Swartz and MacKinnon, 1997a). This fact was exploited to investigate the docking of four different structures from the set of NMR solutions of the hanatoxin. To do so, a specific energy function for protein-protein interaction (Vakser and Aflalo, 1994) was employed to search preferential low-resolution positions of the toxin on the molecular surface of the channel. Successive docking calculations were performed until saturation of the channel. The initial configurations were further relaxed by means of MD simulations.

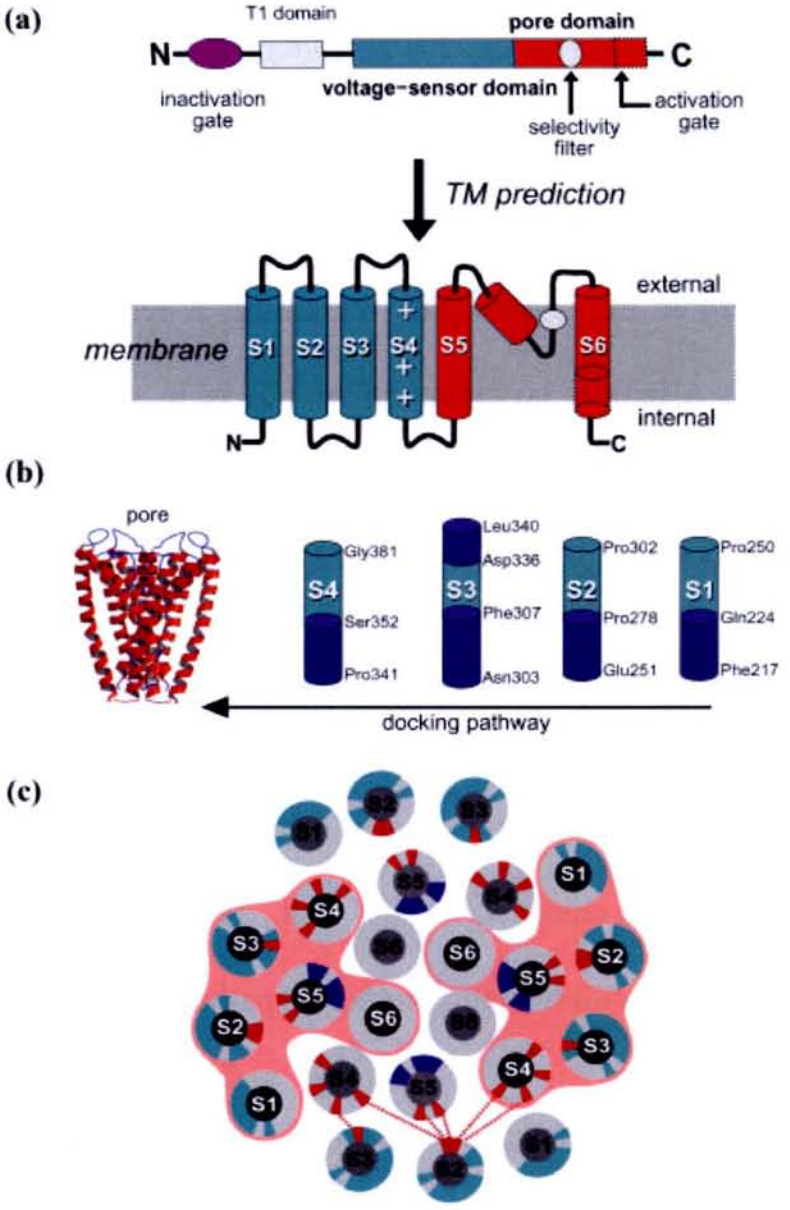

Figure 1: Homotetrameric Kv channel: (**a**) Domain organization of the *Shaker* B. (**b**) Homology modeling and docking calculations. Left: Model of the pore domain. Right: The four helices containing each a predicted voltage-sensor segments (green). (**c**) Projection of a 15 Å slab of the TM domain located below the selectivity filter. The representation shows the charged residues (red) involved in the indicated electrostatic network (broken red lines), residues of S1-S3 found to be tolerant to side-chain replacements (green) and residues of S5 located at the N-terminus of the pore domain, in contact with the central hydrophilic pathway (blue).

Results

In the initial configuration of the *Shaker* B model the pore domain is closed. The KcsA structure used to model part of this domain corresponds indeed to a closed conformation (Perozo et al., 1999). The remaining N-terminal region of this domain, modeled as a helical continuation of S5, is in contact with the ion-conduction pathway. In particular, residues Leu^{385}, Thr^{388}, Ser^{392}, Glu^{395} and Leu^{396} (blue shades in Fig. 1.c) are accessible to this pathway. Their side chains have been recognized to be part of the binding site of the N-terminal region of the protein (Isacoff et al., 1991) that works as an *inactivation particle* by binding to the inner mouth of the pore in the inactivated state (Zhou et al., 2001). Some of these side chains alter ionic currents (Isacoff et al., 1991), highlighting therefore a reasonable close contact with the ion-conduction pathway.

In the overall topology of the model, S4 occupy the groove between segments S5 and S6 of adjacent subunits and are oriented perpendicular to the membrane. This agrees with recent experiments showing atomic proximity of S4 and pore-domain segments (Broomand et al., 2003; Lainé et al., 2003; Neale et al., 2003), as well as with the molecular model obtained independently by Lainé *et al.* (2003). S4 helices occupy central positions in the voltage-sensor domain and are protected from the membrane by segments S1 through S3. The estimates of the hydrophobic moments and hydrophobicities (Fig. 2. a) of the voltage-sensor segments suggest that S4 participate in protein-protein interactions more than S1,

S2 and S3. Indeed, a hydrophobic moment higher then hydrophobicity characterizes buried transmembrane helical segments, compared to peripheral or solvent exposed segments (Eisenberg et al., 1984). Finally, segments from different subunits are in close contact in agreement with fluorescence measurements that show that voltage sensor domains from different subunits are coupled. This is based on the measured cooperativity movement of segments S4 during activation (Mannuzzu and Isacoff, 2000).

The obtained model of the *Shaker* B channel was imbedded within the POPC bilayer. The hydrophobic regions of the segments S1 to S6 overlap with the membrane hydrophobic core (Fig. 2a). Regarding the amphipathy of the sequence, large hydrophobic moments are witnessed at the tail-ends of the helical segments rather than along their buried TM extension, which is consistent with the location of these regions near the membrane-water interface.

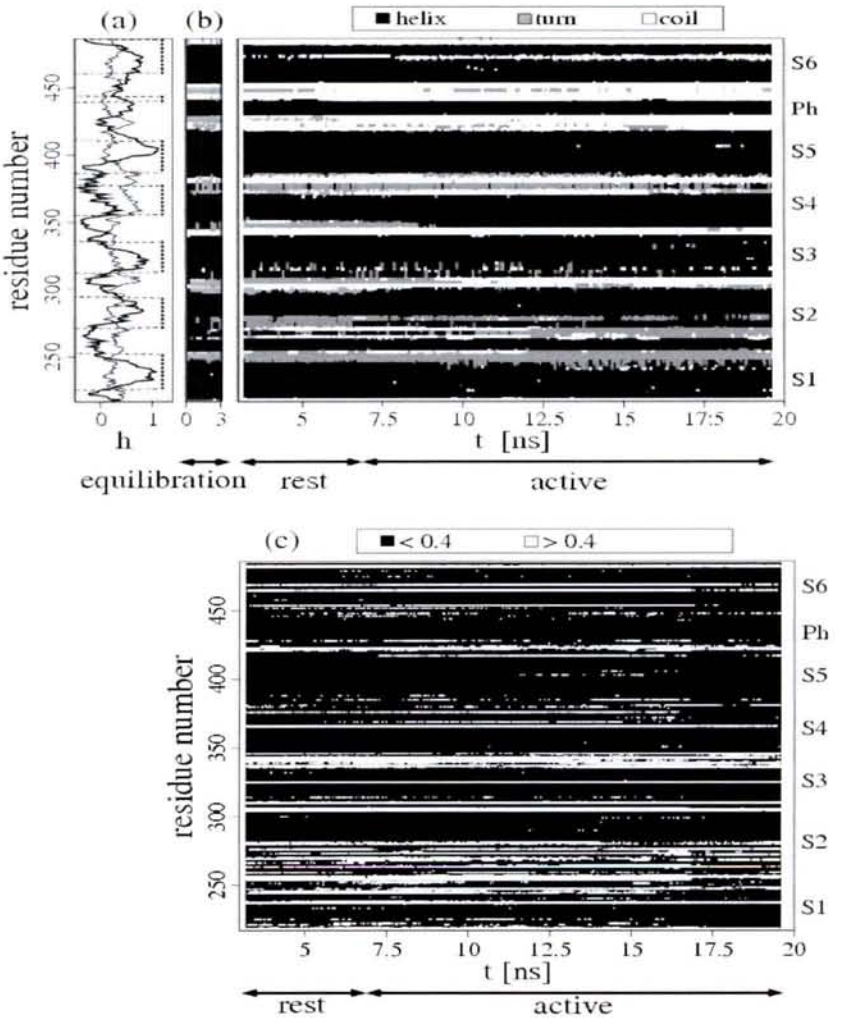

Figure 2: Microscopic properties. **(a)** Sequence analysis of the Kv channel. Hydrophobicity (solid lines, Eisenberg scale) and hydrophobic moment (Eisenberg et al., 1984) (thin lines) calculated along the *Shaker* B sequence and limits of the hydrophobic membrane domains from the MD simulation (dashed squares). **(b)** Secondary structure analysis (Frishman and Argos, 1995). This property is shown for the equilibration run, the initial part of the resting-field trajectory and for the activating-field trajectory. Note the disruption of the secondary structure in the N-terminal region of S3 and the formation of the coil around the PVP motif in S6. **(c)** Solvent-accessibility analysis (Flower, 1997) of a given subunit during the simulation. Residues were considered buried (black) for relative accessibilities less than 0.4 and accessible (white) otherwise. Similar results were observed for all subunits.

All well-defined helical segments remain conserved during both resting and activating-field trajectories (Fig. 2b). Due to helix-break points containing proline residues, helices S3 and S6 show mild disruption of their secondary structure (c.f. below). One remarkable change in the *Shaker* B model between the resting and activating-field trajectories lies in the hydration of the TM region. For the former, equilibration has led to the formation of two disconnected hydrated regions located at the upper and the lower parts of the TM domain (Fig. 3). The voltage-sensor domain is hydrated by means of cytoplasmic opened cavities centered on S4 and communicating with other hydration regions of the channel (Fig. 4). In particular, water molecules participating in S4 hydration communicate with the bulk aqueous medium and with the central cavity in the pore domain region. For instance, for a selected 2ns time window, up to half of the 365 ± 10 water molecules located in the TM domain migrated from bulk.

For all but one subunit (Kch3), the number of water molecules inside the voltage-sensor domain has converged for the resting-field trajectory, and increased under the influence of the activating field, specifically around S4 (Fig. 4). These hydration changes are not due to a destabilization of the model under inversion of the field, such as opening of large pores through the protein. Indeed, the solvent accessibility of the helices shows that the TM domain remains a compact structure during the activating-field trajectory (Fig. 2c). Only minor and localized variations of this microscopic property, especially in the C-terminus region of S4

altered the hydration. Overall, this is consistent with the picture emerging from the 20-Å resolution structure of a related voltage-gated sodium channel (Sato et al., 2001), showing a TM region with several cavities. Hydration of the voltage-sensor domain in the presence of the resting field is also consistent with the accessibility of several side chains of S4 from the internal side of the membrane (Bezanilla, 2000). In addition, several experiments have shown that this accessibility changes upon variation of the TM voltage (Starace et al., 1997).

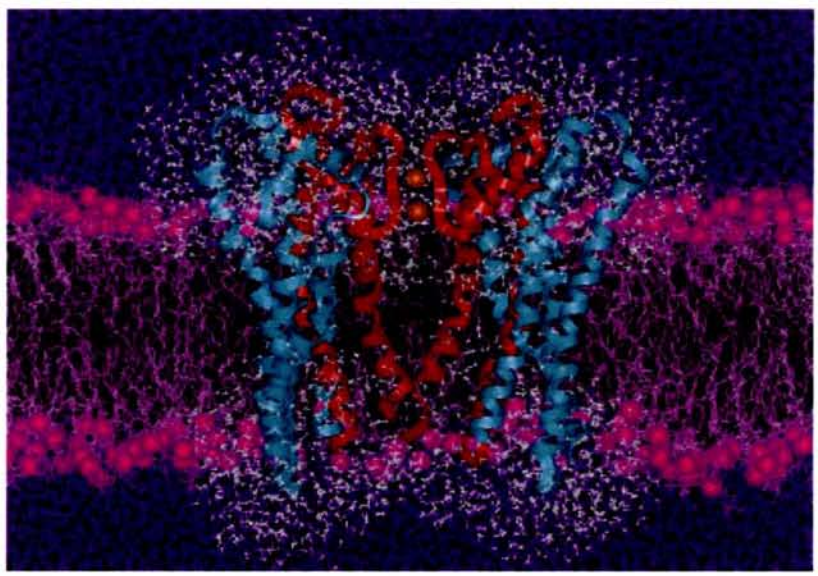

Figure 3: Description of the macromolecular system for one configuration representative of the resting-field trajectory. Representation of the Kv channel embedded in a POPC lipid bilayer. For clarity, only 2 subunits of the Kv channel are displayed. The lipid atoms (pink) are represented as sticks and the head-group phosphate atoms (magenta) are represented as CPK. The two potassium ions (orange) are located in the selectivity filter. The water molecules located in the selectivity filter are not shown. The bulk and the protein-hydration water molecules are colored in purple and white, respectively. Note the separation of two protein-hydration domains located at the upper and the lower regions of the channel.

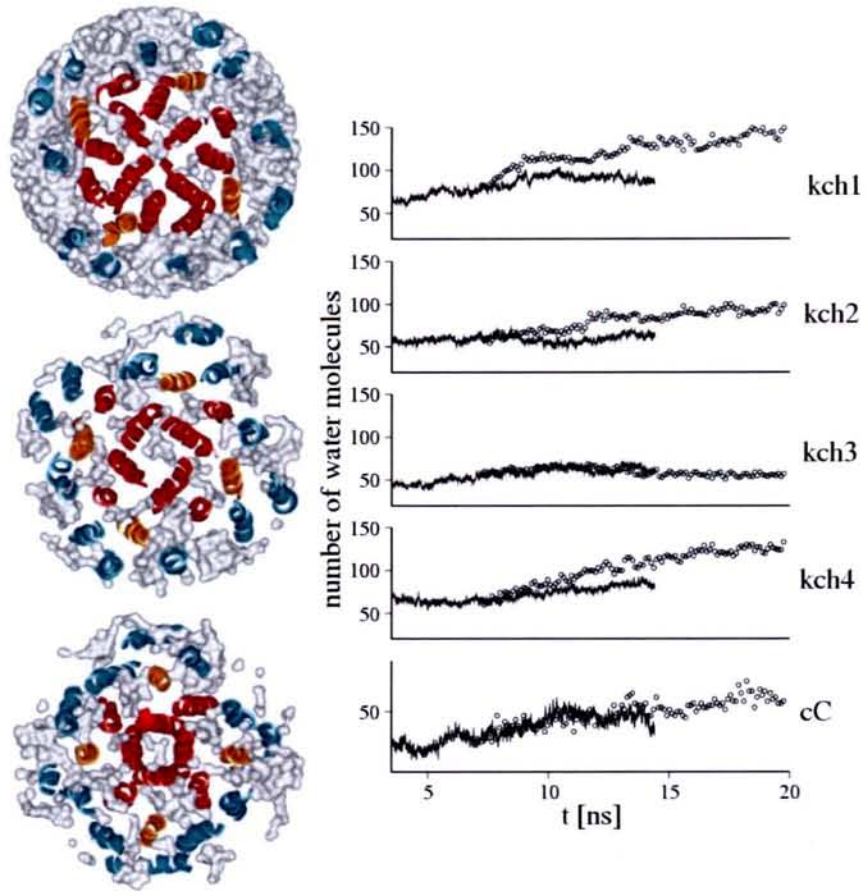

Figure 4: Hydration of the Kv channel model. Left panel: Water densities (white) around the TM segments (ribbons) from the resting-field trajectory estimated for transverse slabs of 15 Å each. From top to bottom, slabs located around the selectivity filter, the central cavity and the activation gate. Note the hydration of S4 (orange) and the water communication through the cavities in the voltage-sensor and the pore domains (red). Right panel: Hydration changes of S4 during the MD simulation for both the resting (solid lines) and the activating-field (open circles) trajectories. The number of water molecules hydrating S4, of each subunit (kch1 through kch4), was calculated considering a cutoff of 15 Å from the geometrical center of the helix, localized at the middle of the TM region. Only the trace of S4 was used for determination of the geometrical center. For comparison, the number of water molecules in the region of the central cavity (Cc) is also shown (bottom plot). A cutoff of 15 Å from was also considered here even though this cutoff is slightly larger than the diameter of the central cavity.

External segments of the voltage-sensor domain are shown to be more mobile than the inner ones for both trajectories (Fig. 5). The pore helical segment exhibited the lowest fluctuations in agreement with the small mobility of spin labels attached to this region as determined by EPR measurements (Perozo et al., 1999). The conformational changes of the *Shaker* B model have been determined through the analysis of the root mean squared deviations (RMSDs) with respect to the initial structure (Fig. 5). Although these quantities appear to have converged during the simulation for the resting-field trajectory, larger deviations are witnessed when the system is under the activating field. This suggests that the resting and activating fields act differently on the overall structure of the channel. When looking specifically at S4, conformational changes of the helices are, for all but Kch3, correlated with the hydration increase during activation.

The conservation of most helical segments (Fig. 2b) indicates that the conformational changes correspond to rigid-body movements. These motions were analyzed, for each helix, considering its upward translation, its tilt angle with respect to **n** (the normal to the bilayer), and its precession around **n** (Fig. 6). The results indicate clearly an inversion of most movements after variation of the TM voltage. In particular, under the influence of the activating field, S4 undergoes an upward translation and a tilt. This shows again, that S4 helices respond to the applied external field, in agreement with gating charge

measurements that demonstrate that S4 movements contribute mostly to the gating current (Seoh et al., 1996).

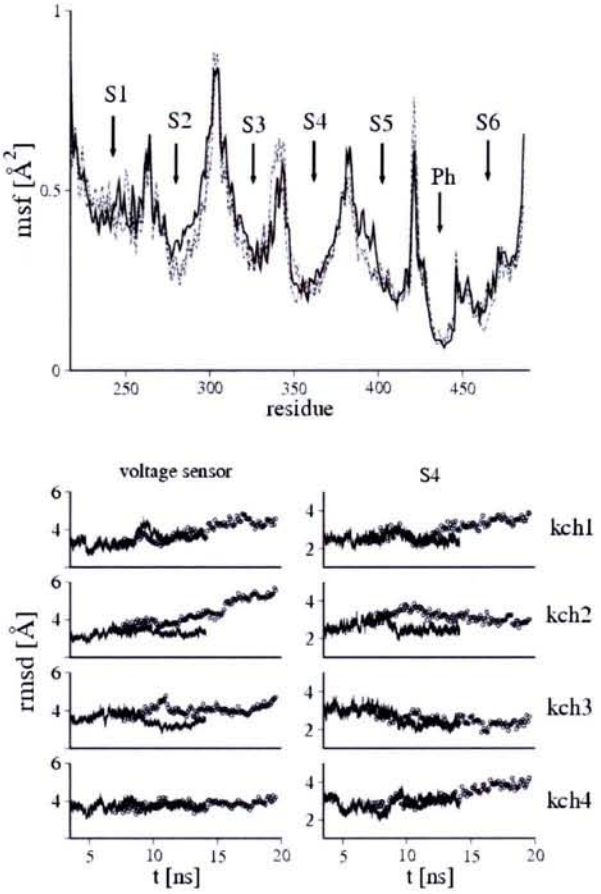

Figure 5: Mobility of the TM domain. Top: Mean-squared fluctuation (MSF) of the backbone atoms averaged from time blocks of 250 ps along the MD simulation are plotted as a function of residue number for both the resting (broken line) and a selected activating-field (solid line) trajectory. The MSFs were calculated after elimination of overall translation and rotation. The small arrows indicate the location of the TM helices (S1-S6) and the small pore helical segment (Ph). Note for S6, the largest mobility is localized at its C-terminus. Bottom: Root-mean-square deviations (RMSD) of the voltage sensor domain (left) and of S4 (right) from their structure at the beginning of equilibration run, for the resting (solid lines) and the activating-field (open circles) trajectories. The RMSDS were calculated after elimination of overall translation and rotation. Only the traces of the voltage-sensor domain and of S4 of each subunit were considered.

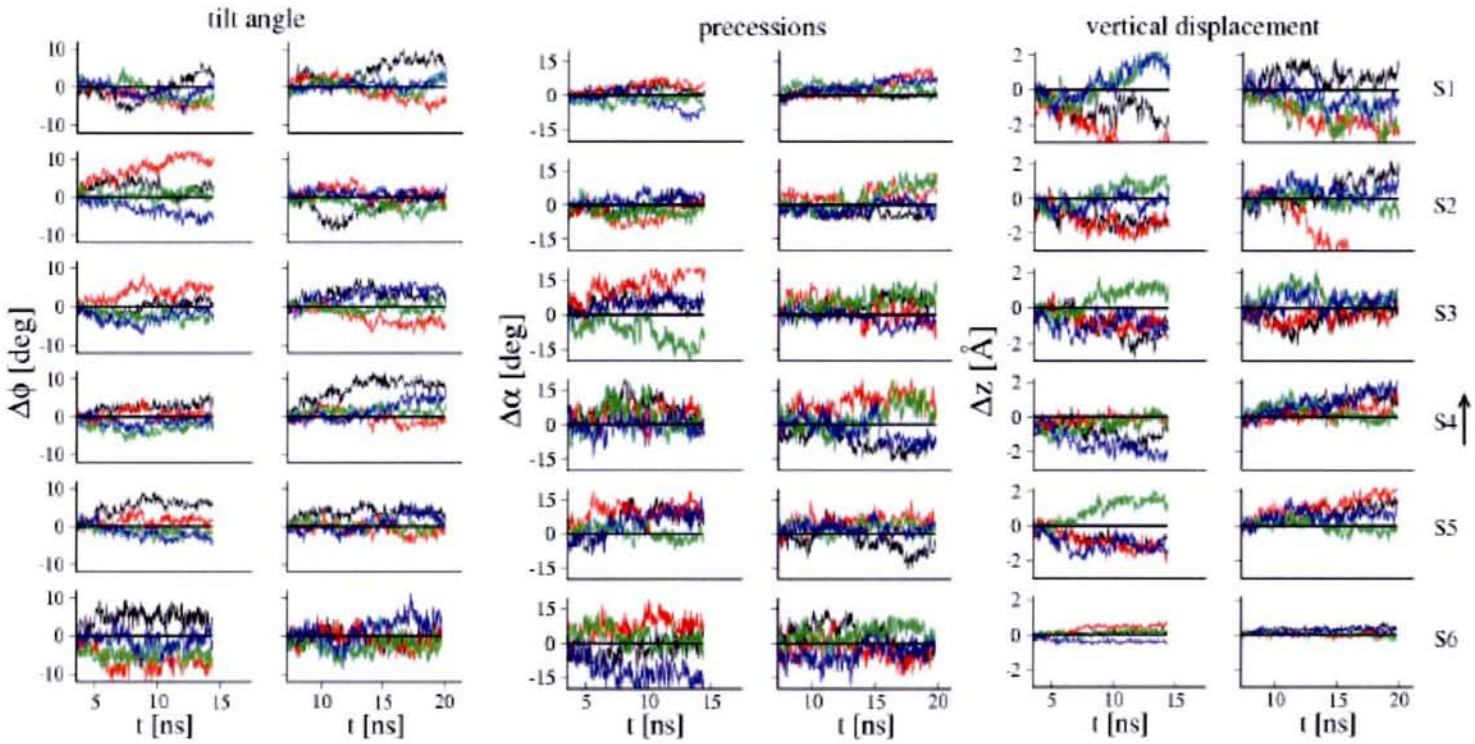

Figure 6: Rigid-body movements of the TM domain segments during the resting field (left) and activating field (right) trajectories. Three movements are considered for each helical segment: Its tilt angle $\Delta\phi$ with respect to **n**, the normal to the bilayer, its precession $\Delta\alpha$ around **n** and its upward translation Δz. These were calculated as follows: $\Delta\phi_i = \phi_i(t) - \phi_i(0)$, $\Delta\alpha_i = \alpha_i(t) - \alpha_i(0)$ and $\Delta z_i = z_i(t) - z_i(0)$, where, $\phi_i(0)$, $\alpha_i(0)$ and $z_i(0)$ are the tilt, precession and translations at the beginning of the respective trajectory. $\phi_i(t)$, $\alpha_i(t)$ and $z_i(t)$ were determined after elimination of overall translation and rotation by fitting to the pore helices in the tetramer, at the beginning of the respective trajectory. For S6, only the region below the PVP motif was considered. Movements of helical segments from different subunits are colored as follows: kch1 (black), kch2 (red), kch3 (green) and kch4 (blue).

Translation and tilt of S4 segments have a direct consequence on the motions of S5, which, in turn, influence segment S6. The mean-squared deviation of the pore domain between the conformations at the end of the resting and the end of the activating-field trajectories amounts to 2.5 Å. Rigid-body movements in S5 and S6 helices account for most of the deviation, in agreement with EPR measurements (Perozo et al., 1999). Motions of S5 are mainly dominated by an upward translation, just like for S4, and by a precession around **n**. Motions of S6 are on the other hand more complex. This is due to the existence of two hinge points that increase its internal flexibility. The first corresponds to a conserved Gly residue that is shown to work as a hinge in the opened conformation of MthK channel (Jiang et al., 2002). The second is the well-known Pro-Val-Pro (PVP) motif, not conserved in all K^+ channels, but present in *Shaker* B (Bright et al., 2002). The secondary structure analysis of S6 in the present model reveals a kinked helix around this motif (Fig. 2b).

The region below the PVP motif is known to work as an activation gate that opens and closes the inner mouth of the pore (Perozo et al., 1999; del Camino et al., 2000; Bright et al., 2002). This region undergoes under the activating field a tilt and a precession as shown in Fig. 6. The internal motions of S6, on the other hand were investigated by monitoring the bending angle between the helical regions above and below the PVP motif. Although this bending persists in both trajectories, S6 adopts a less extended structure under the influence of the

activating field (right panel of Fig. 7). Finally, the activating field has induced an overall precession of S5 and S6 resulting in a collective anti-clock wise motion, though not too drastic for subunit 3 (*c.f.* Fig. 8).

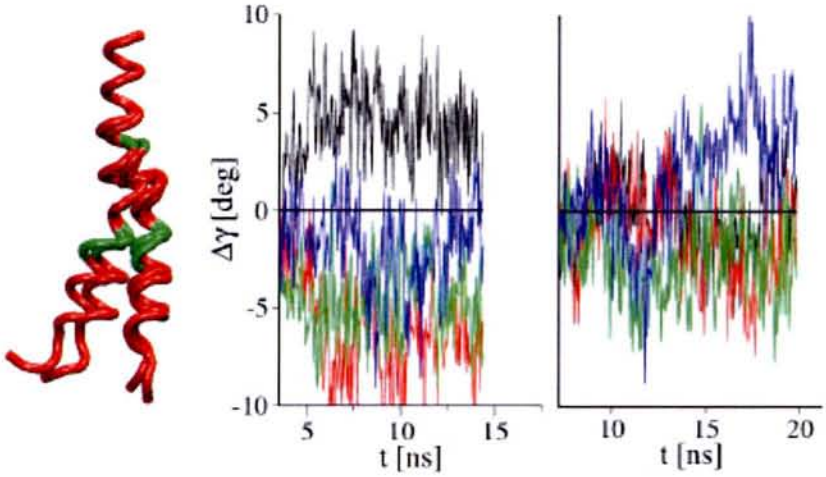

Figure 7: Internal motion of S6 segments. Left: Kinked helical structure of S6. The average structure from the resting-field trajectory is shown for each subunit. Hinge points are shown in green. Right: Internal motions of S6 during the simulation runs. A bending movement, corresponding to the angle $\Delta\gamma$ between the helical regions before and after the Pro-Val-Pro motif is considered for both the resting field (left) and the activating field (right) trajectories. It was calculated as: $\Delta\gamma_i = \gamma_i(t) - \gamma_i(0)$, where, $\gamma_i(0)$ is the angle value at the beginning of the respective trajectory. $\gamma_i(t)$ was determined after elimination of overall translation and rotation of the tetramer. Movements of helical segments from different subunits are colored as follows: kch1 (black), kch2 (red), kch3 (green) and kch4 (blue).

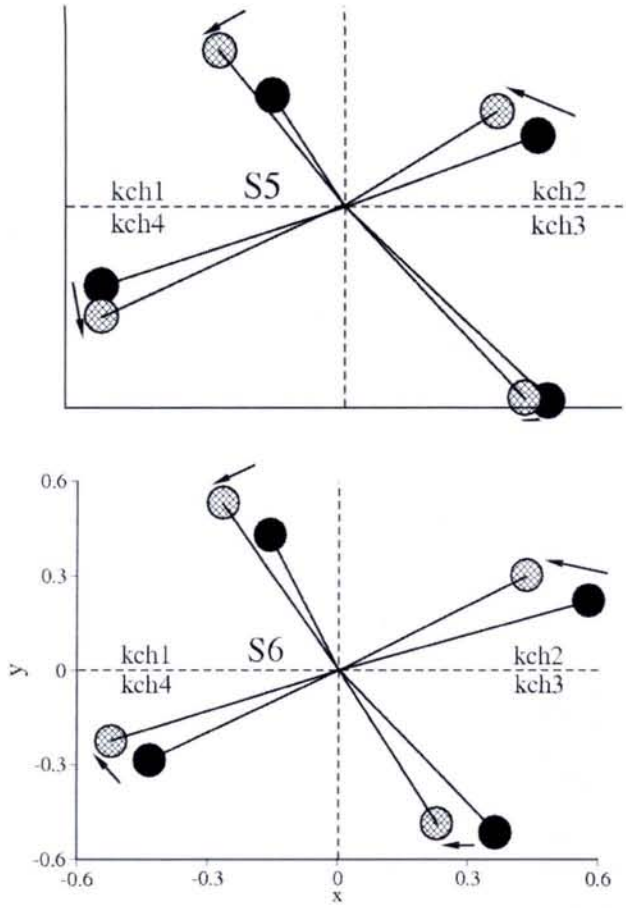

Figure 8: Precession movements of segments S5 and S6. The dark and gray points correspond to plane projections of the overall tilt of these segments at respectively the end of resting and the activating-field trajectories. Differences between the final conformations symbolically represented by the arrows indicate a near anticlockwise motion of the helices. In the case of S6, the activation gate located bellow the Pro-Val-Pro motif is considered.

A direct consequence of the conformational changes of the pore domains is the alteration of the ion-conduction pathway. This pathway can be investigated by analyzing the profile of the pore radius (Fig. 9) and shows clear differences between the resting and the activating-field trajectories. Changes around the selectivity filter region result from the high flexibility of the structure, as has

been observed for the inward rectifier (Kir) potassium channel (Capener and Sansom, 2002). In the present case, this flexibility has not led to translocation of the potassium ions during the simulation. The structural alterations of S6 have also led to an increase of the pore volume in the region of the activation gate while maintaining it constricted at the PVP motif. However, the discrete increase of the radius observed near the activation gate is not enough to affect the number of water molecules present in the central cavity (right panel of Fig. 4).

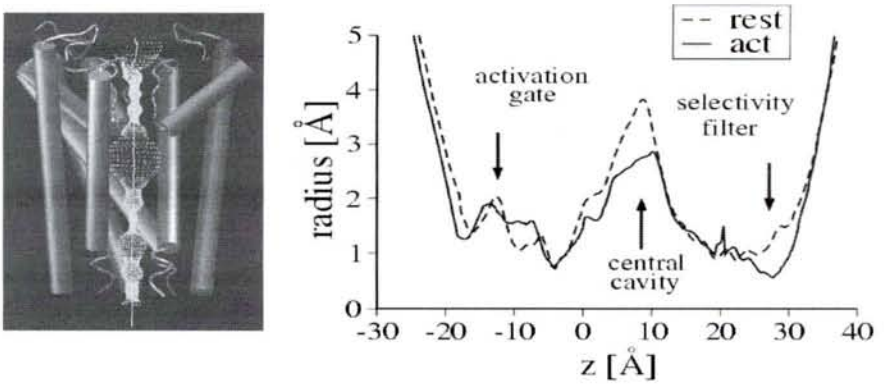

Figure 9: Pore radius profile (Smart et al., 1993). Left: pore volume (point density) along the ion-conduction pathway. For clarity, only three channel subunits are shown. Right; pore radius profile calculated along the Z direction, normal to the channel for both the resting and the activating-field trajectories, corresponding to an average over a window time of 1.5 ns at the end of each trajectory. The regions of the selective filter, central cavity and activation gate are indicated.

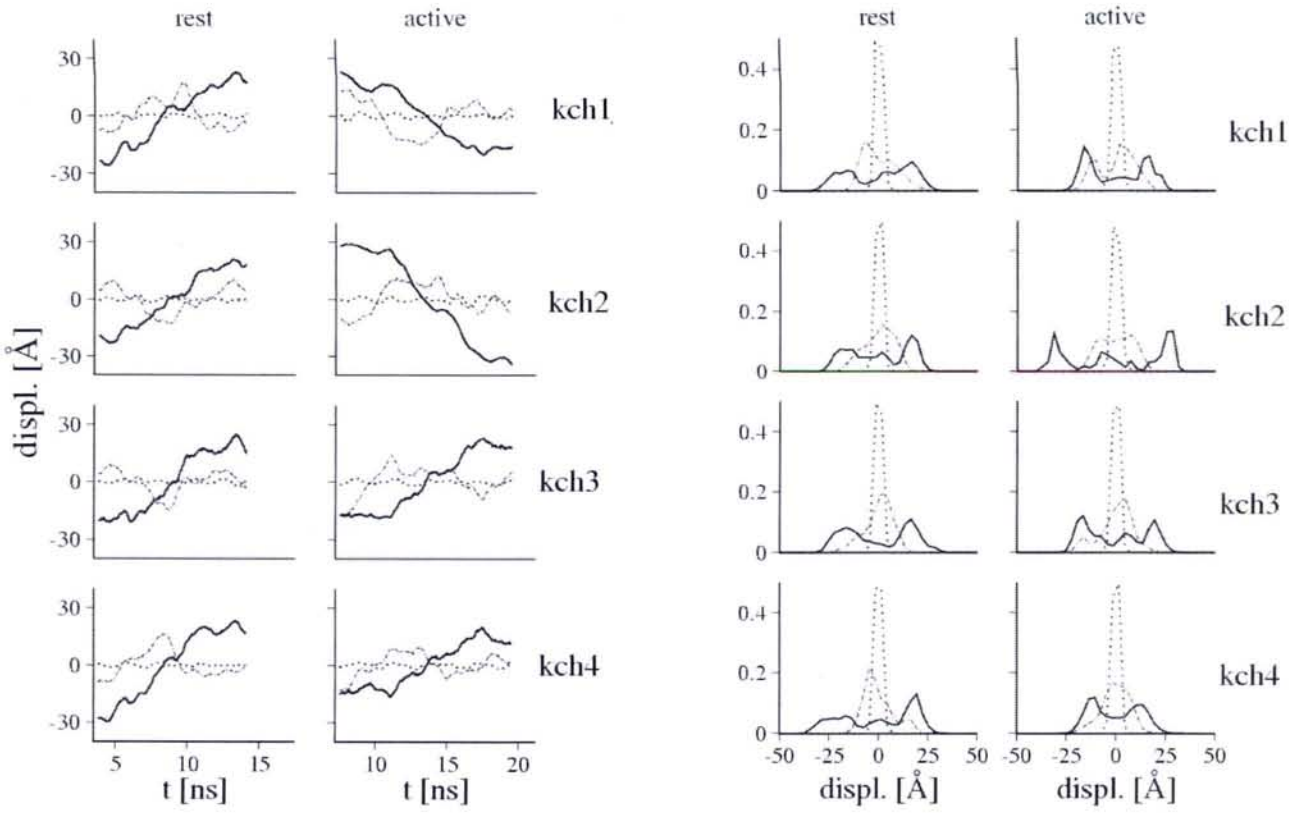

Figure 10: Collective motions in the TM domain model. Left: Motions along selected essential modes are depicted for both the resting (left) and activating-field (right) trajectories for each tetramer subunit. Only the protein trace was considered for the covariance analysis (see methods). Displacements were calculated from the projection of internal movements along the 1th (solid lines), 2nd (long dashed lines) and 15th (dotted lines) modes (classified according to their amplitudes). Right: Probability distribution of the selected motions along the modes. Note the highly non-Gaussian amplitude of motion along the 1th mode compared to motions along the high frequency mode (15th).

Several questions remain yet to be addressed. Are the motions of the voltage-sensor domain coupled to those of the pore domain? Are the previously identified movements occurring during the activating-field trajectory merely diffusive-like, or are they relevant collective motions leading to the opening of the pore? To address this, the MD trajectories were analyzed using essential dynamics techniques (Amadei et al., 1993). Collective motions were

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

determined by covariance analysis (Merlino et al., 2002; de Groot et al., 1996; Ichiye and Karplus, 1991; Horiuchi and Go, 1991; Amadei et al., 1993; Tieleman et al., 2002). In both trajectories, the first non-harmonic mode was identified for each subunit as having larger amplitudes than the following ones combined. Movements along this mode account for ~ 60% of the total atomic mean-squared displacement of the subunit (Fig. 10). Estimates of the cosine content reveal that this mode does not correspond to random diffusion, and, therefore, is expected to be functional (see method section).

For the resting-field trajectory, motions of each subunit, projected onto their first essential mode, show only small movements involving S4 and the pore domain segments (motions are delocalized over the whole subunit) (fig. 11). In contrast, the same analysis performed for the activating-field trajectory highlights movements with larger amplitudes in the S4-S6 region, in particular, an upward translation of S4, and complex motions of both S5 and the cytoplasmic region of S6. The motions sampled by the essential modes are clearly different for the two trajectories. This has been confirmed by the analysis of the overlap of the covariance matrices (table-I), indicating that the two trajectories occupy different regions of the conformational space.

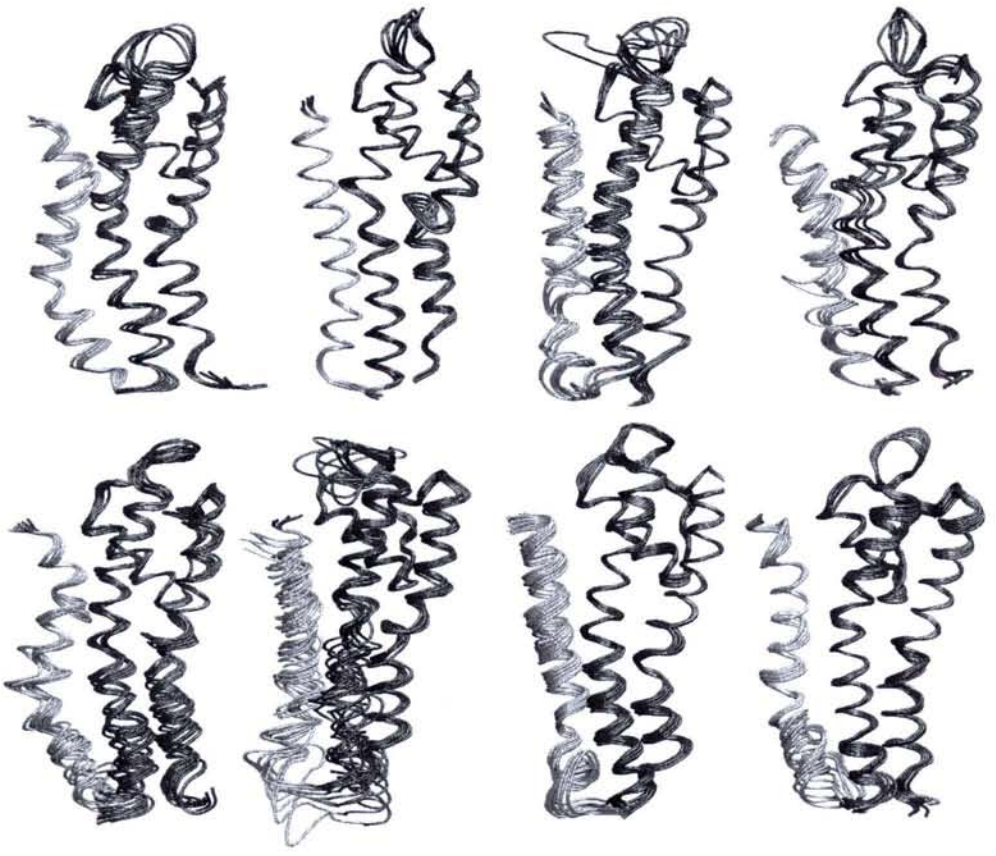

Figure 11: Collective motions of the tetramer subunits. Superposition of frames (snapshots for time windows of 2 ns) obtained from the projection of motion onto the first essential mode. For clarity, only S4 (gray) and pore domain segments (black) are shown and the amplitudes of the motion are rescaled by a factor of 0.1. Motions of subunits kch1 through kch4 (from left to right) are depicted for the resting-field trajectory (top panels) and the activating-field trajectory (lower panels).

Further analysis show that the overall response of the *Shaker* B model to the activating field results from collective modes involving all subunits. The first non-harmonic mode extracted from the essential dynamics analysis of the tetramer is found again to possess an amplitude larger than all other modes combined, and accounts for ~ 65% of the total motion in the essential space. This mode encompasses upward motions of most S4 helices and motions localized at the cytoplasmic region of the pore (Fig. 12).

It is important to recall for completeness, that, along the activating-field trajectory, the most important essential modes are different for each subunit (Fig. 11). This implies that the monomers, occupy different regions of the conformational space. This is confirmed by the small values of the overlap between the subunit trajectories (table-II). This suggests the existence of several sub-states on the road toward activation, where each subunit undergoes different transitions between canonical conformations of the resting and the activated states (Schoppa and Sigworth, 1998).

Table I: Overlap* among the subunits for both resting and activating-field trajectories.

	kch1	kch2	kch3	kch4
kch1	0.30	0.20	0.24	0.26
kch2	0.24	0.24	0.22	0.24
kch3	0.23	0.20	0.33	0.26
kch4	0.21	0.21	0.25	0.32
***see methods for overlap determination**				

Table II: Overlap* among the subunits for the activating-field trajectory.

	kch1	kch2	kch3	kch4
kch1	1.00	0.20	0.24	0.27
kch2	0.20	1.00	0.20	0.22
kch3	0.24	0.20	1.00	0.30
kch4	0.27	0.22	0.30	1.00
***see methods for overlap determination**				

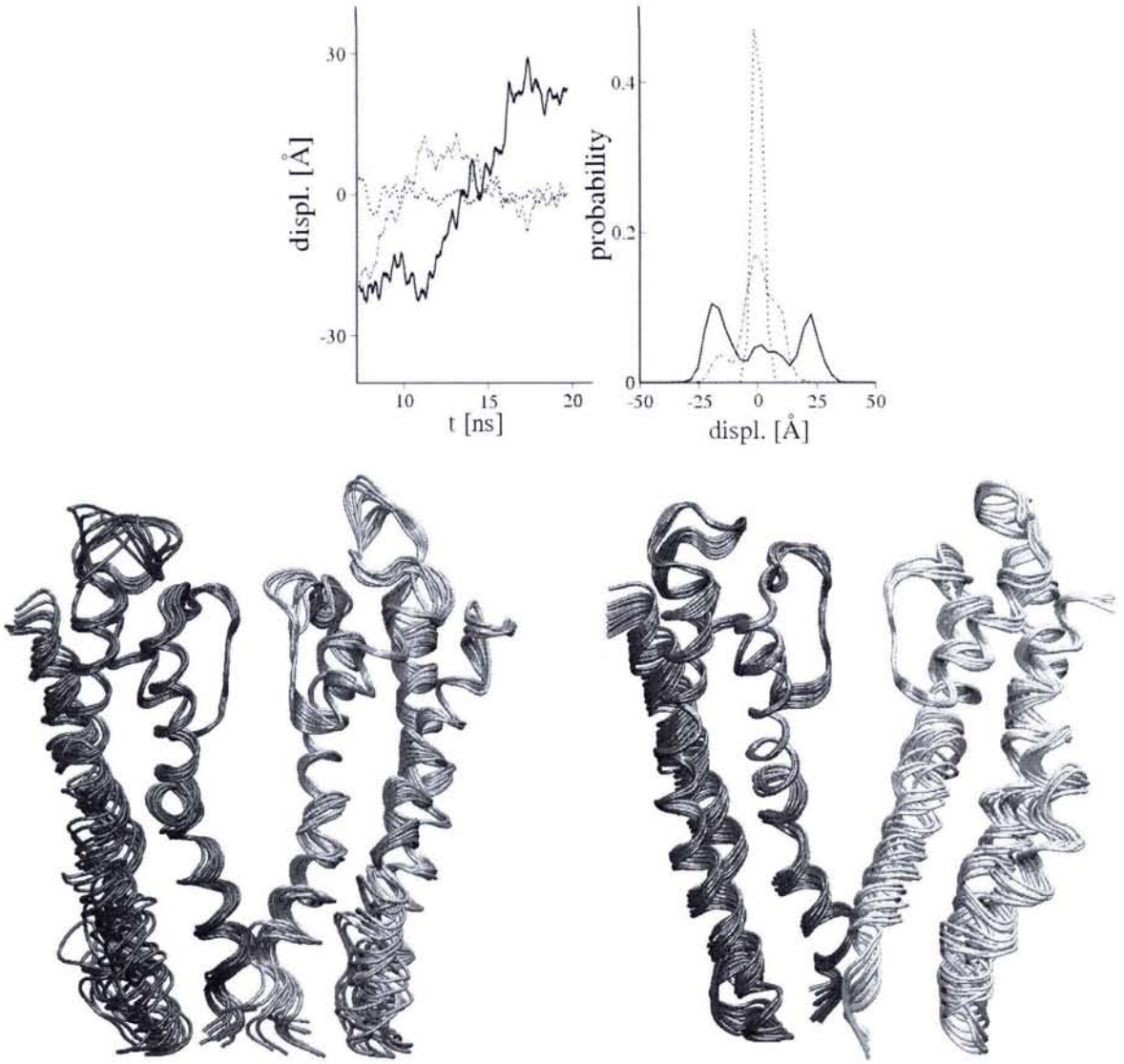

Figure 12: Collective motions of the tetramer for the activating-field trajectory. **(a)** Motion along selected essential modes determined from the covariance analysis. Left: displacements calculated from the projection of internal movements along the 1^{th}, 2^{nd} and 15^{th} modes (eigenvector). Right: corresponding probability distributions of the displacement along the modes. **(b)** Superposition of frames (time windows of 2 ns) obtained from the projection of the motion onto the first essential mode. For clarity, only S4 and pore domain segments are shown for subunits kch1 and kch3 (left) and kch2 and kch4 (right). The amplitudes of the motion are rescaled by a factor of 0.2.

Discussion

In the present investigation, we have studied the *stability* and the *activation* of a TM-domain model of the voltage-gated potassium *Shaker* B channel obtained by homology modeling and docking techniques. A significant amount of effort has been performed to model the conduction states of the pore domain of voltage-gated channels. (Bernèche and Roux, 2000; Roux, 2002; Bernèche and Roux, 2003; Luzhkov et al., 2003; Åqvist and Luzhkov, 2000; Beckstein et al., 2003; Domene and Sansom, 2003; Domene et al., 2003; Chung and Kuyucak, 2002) So far, simulation studies have been restricted mainly to the investigation of the pore domain using the KcsA and MthK structures for modeling respectively the closed and opened states. Here, as in previous studies, KcsA was used to model part of the pore domain of *Shaker* B. This domain is a homologous structure in potassium channels (Jlang et al., 2002) derived from a common ancient gene (Jan and Jan, 1997; Milkman, 1994; Jan and Jan, 1994). The crystal structure of the bacterial KscA channel and comparative structural studies on eukariotic potassium channels indicate that the pore architecture of potassium transporters is remarkably conserved from bacteria, yeast and plants to animals (Koprowski and Kubalski, 2001). In particular, the crystal structures of KcsA, MthK and KvAP reveal a similar fold of the pore domain even though the sequence identity between them is small. The remaining extension at the N-terminus of the pore domain of the *Shaker* B, not present in KscA, was here

modeled as a helical continuation of the S5 in agreement with NMR data (Ohhlenschlager et al., 2002).

An additional effort was made to model the voltage-sensor domain. Despite the low-resolution quality of our docking procedure, we selected one configuration of the channel in which S4 helices adopt TM orientations, are packed against the pore domain near the interface between adjacent units, and are protected from the membrane by the segments S1 through S3. The TM domain is organized in a right-handed-quaternary structure in which the voltage-sensor domains of neighbouring subunits interdigitate. The main difference between this topology and that proposed recently by Lainé et al. (Lainé et al., 2003) resides on the localization of segments S1 and S2. In their model, obtained by MD simulated annealing and experimental constraints using the MthK structure for the pore, the TM domain is arranged in a left-handed-quaternary structure and the four subunits of the tetramer are well separated.

The initial conformation of our model is probably not a unique solution of the docking procedure that satisfies available experimental constraints. As more specific features emerge from experiment, the model could be improved by optimizing for instance the atomic proximity of S4 to the pore or the arrangement of the external segments S1-S3. Several such studies have been recently carried out and those concerning the potassium channels in the closed state may be directly confronted with our model. For instance, in the HERG K^+

channel, second-site-suppressor analysis show that the terminal ends of S4 (Asp^{540}) and S6 (Arg^{665}) are in close proximity at hyperpolarized membrane potentials (Tristani-Firouzi et al., 2002). In the *Shaker* B model, the C^{β} atoms of the corresponding Arg^{377} and Tyr^{483} residues, are distant 11 Å in average during the resting-field trajectory. This distance is ~ 3 Å larger than the one of a typical electrostatic interaction. In another recent study (Neale et al., 2003), a disulphide bridge has been shown to form spontaneously in the closed state of the *Shaker* B channel, between Ser^{357} and Glu^{418}, respectively localized at the extracellular ends of S4 and S5. The corresponding C^{β} atoms of these residues are distant 15 Å in average, *i.e.* 7 Å far away to enable spontaneous disulphide bridge formation. Comparison to similar experiments for the open state (Broomand et al., 2003; Gandhi et al., 2003; Lainé et al., 2003) shows that further rotation and translation of S4 is necessary to reconcile our final configuration of the activating-field trajectory with experiment. This stresses the fact that, as expected, the complete response of the model to activation was not reached in the present calculation. Interestingly enough, although the modeling techniques and, specially, the set of constraints that are considered in deriving the tri-dimensional *Shaker* B model in both Lainé *et al.* and ours are not exactly the same, the obtained configurations share many key structural features that are shown here to play the most significant role in the activation process. In particular, S4 is oriented perpendicular to the membrane plane and

localized in the groove between segments S5 and S6 of adjacent subunits and protected from the membrane by segments S1-S3.

While the MD simulation trajectories are un-doubtfully dependent on the initial molecular model, the conformational changes resulting from the depolarization of the membrane are relevant for rationalizing the activation mechanism of the *Shaker* B channel. The initial structure was relaxed in a realistic membrane environment in order to investigate the structural modifications of the *Shaker* B model when the system is subject to TM voltages corresponding to depolarization and hyperpolarization of the bilayer. The voltage-sensor S4 segments were found to be hydrated. This remarkable property may correspond to a structural stabilizing requisite to maintain the positively charged S4 segments inside the protein core, even in the resting state (Green, 2002). Hydration properties were significantly affected by variations of the TM voltage with direct consequences on the structure of the voltage-sensor domain. Concomitant conformational changes in this domain, triggering the motions of the segments of the pore, underline the correlation between the hydration of S4 and the opening of the channel. Internal TM hydration of Kv channels may constitute therefore a crucial property allowing for the conformational transitions taking place during the activation gating mechanism. This hydration of the voltage-sensor domain and especially that of S4 is consistent with the model proposed by Islas and Sigworth (2001) to rationalize the observed

electrostatic effects on the gating currents for *Shaker* B channels. It is also in agreement with Yang and Horn (1995) who proposes that S4 is located in a water-filled cavity called the gating pore in sodium channels.

Hydration of the voltage-sensor domain has been suggested to explain the results of accessibility measurements of several S4 residues in *Shaker* B channels (Starace and Bezanilla, 2001). Histidine scanning mutagenesis experiments show that the charged residues 365, 368, and 371 of S4 contribute to the gating current. These results provide evidence that in both the resting and the activated states, the charged residues reside in aqueous crevices surrounded by anions of the bulk solution. In particular it is suggested that external aqueous crevices that allows access to residue 368 in the hyperpolarized state may extend down to expose residue 371 (located right in the middle of the putative S4 segment) when depolarized. Similarly, the internal crevice that extends up to residue 365 in the hyperpolarized state may also expose residue 371 in the depolarized state. This picture is in agreement with our finding as clearly shown in the equilibrium configuration of the model under the resting field.

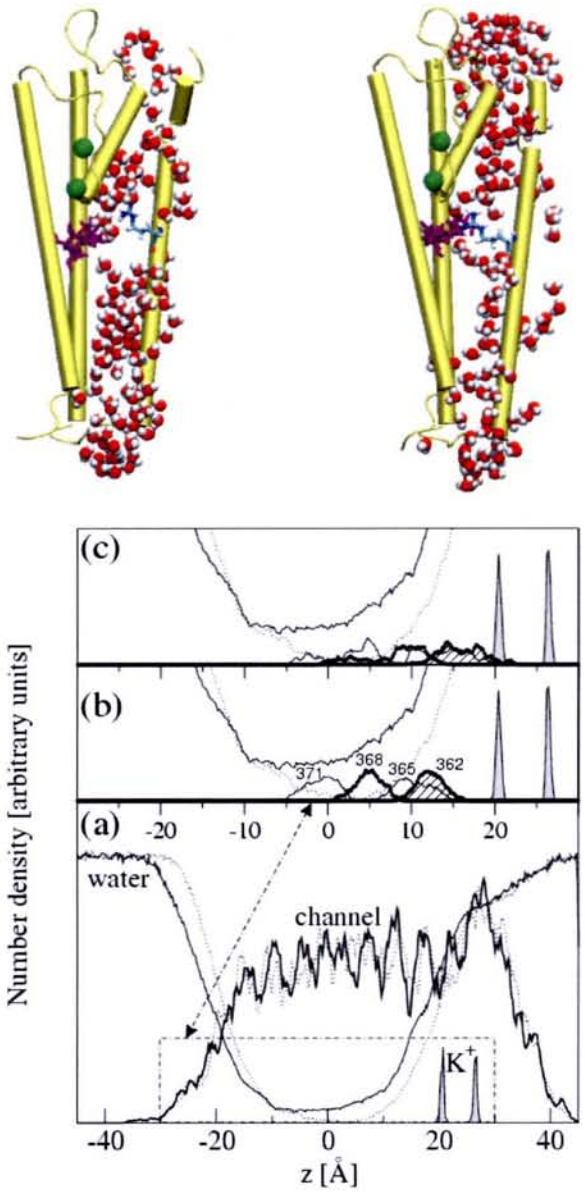

Figure 13: Hydration properties of the *Shaker* B model. Top: Selected conformations for the S4-S6 segments and S4 hydration shell of subunit kch4 from the resting (left panel) and the activating-field trajectories (right panel). Note the gate formed by Arg^{362} of S4 (cyan) and nearby channel residues (purple) that opens under activation of the model. Bottom: Density profiles of the channel and the water along the normal to the membrane (z=0 being the center of the bilayer) averaged over 750 ps from the MD simulations of the resting (dotted lines) and activated (solid lines) states. Are also displayed the density profiles of the two potassium ions and of the charged Arg^{362}, Arg^{365}, Arg^{368} and Arg^{371} of S4. Note the location of the charged residues with respect of the water density at the resting state (b) and their displacement toward the extracellular side under activation (c).

Solvent-connected pathways penetrating the hydrophobic region around S4 are believed to become narrower and restricted and to converge on a space confined enough to confer selectivity to proton passage. Very recent experiments show indeed that for *Shaker* B channels, in the closed state, mutation of Arg^{362} by histidines promotes proton conductance with a high turnover rate (Starace and Bezanilla, 2004). This proton conduction implies that residue 362 has to be simultaneously accessible through water crevices from both sides of the membrane and be in a conformation such that it forms a gate between those water columns. This is consistent with our finding, as can be seen in Fig 13 showing selected configurations from the resting-field and activating-field trajectories for subunit kch4 (similar behavior was observed for all but subunit kch1). As suggested by Bezanilla and coworkers (Starace et al., 1997; Starace and Bezanilla, 2001; Starace and Bezanilla, 2004; Bezanilla, 2000), the solvent region is very constricted around the charged S4 residues in the resting-field trajectory (Fig 13.b). Further analysis shows that when the model is activated, there are several other water pathways, not involving this specific gate, that connect the intra and extra-cellular sides. Interestingly enough, the activation induces upward charge movements in S4 in the order of 2-6 Å. This shows clearly that the gating current (charge movements) in the *Shaker* B model may be achieved by rather small conformational changes of S4 (Cha et al., 1999; Bezanilla, 2002).

The conformational changes of the *Shaker* B model under the activating field were shown to be part of collective motions and not only random fluctuations. The structural variations of the channel during the activating-field trajectory (13ns) are not very large yet differ clearly from those of the resting-field trajectory (14ns). The upward motion of S4 segments appears to be communicated to S5 and to propagate further into the activation gate in S6. A bending in S6 around the PVP motif has led to an increase in the pore volume below the motif. The pore remains however constricted around the PVP motif during the activation. Previous simulation studies restricted to the pore domain of the *Shaker* B channel (starting from the KcsA structure) have also reproduced the kink in S6 (Beckstein et al., 2003; Domene et al., 2003; Domene and Sansom, 2003; Luzhkov et al., 2003) and have underlined the possible role that the PVP motif might play in the opening of the pore. Here, by considering the complete TM domain, modifications of the ion conduction pathway under activation, owing to the presence of the voltage sensor domain, have reproduced a consistent picture with experiment. Indeed, the movements around the activation gate obtained from the present study are in agreement with the results by Yellen and collaborators (Webster et al., 2004) derived from high-affinity metal binding experiments on *Shaker* channels. Taken together, these results suggest that the gating mechanism in voltage-gated channels containing the PVP motif results mainly from a bending of S6 at this motif. The gating transition would swivel blocking residues away from the ion pathway, resulting

in an increased volume of the pore bellow that point, without widening of the pore at the PVP motif. This mechanism is different from that proposed based on the X-ray structure of the opened MthK channel, not containing the PVP motif. When MthK is activated, the Glycine conserved hinge enables a large outward swing of S6 opening a wide internal vestibule (Jiang et al., 2002).

Until now three classes of competing models have been proposed for the activation of voltage-gated potassium channels, named *conventional*, *paddle* and *transporter* models (Blaustein and Miller, 2004). The *Shaker* B model here investigated is clearly different from the X-ray structure of KvAP channel (Jiang et al., 2003a). We recall that in the KvAP structure, parts of S3 segment and S4 are oriented parallel to the membrane water interface forming a voltage-sensor paddle. In the resting state the paddle is localized at the periphery of the channel, near the cytoplasmic face of the membrane. It is believed to undergo a large upward movement under depolarization (Jiang et al., 2003b). This corresponds to a model that appears in drastic rupture with several experimental data accumulated so far on eukariotic channels (Bezanilla, 2000; Horn, 2000; Yellen, 2002; Choe, 2002; Broomand et al., 2003; Lainé et al., 2003; Neale et al., 2003; Gandhi et al., 2003; Lee et al., 2003; Starace and Bezanilla, 2004; Bell et al., 2004; Ahern and Horn, 2004). The sequence homology between KvAP and eukariotic channels such as the *Shaker* B is not high. The most obvious differences between the two corresponding sequences are in the S1-S2

and the S3-S4 loops, and it is not clear whether the voltage sensor paddle sequence is conserved in voltage-gated potassium channels (c.f. (Cohen et al., 2003)). Whether the KvAP structure and the proposed activation mechanism are specific to this channel from *hyperthermophilic archaebacteria* remains an open question and further experimental and simulations studies are necessary to shed light on the question. In the two other models, S4 is buried in the protein, and adopts a transmembrane orientation. In the *conventional* model, S4 slides within its own protein-lined pathway or "gating pore" formed by the other voltage-sensor segments and the pore domain (Larsson et al., 1996; Yang et al., 1996; Horn, 2000). The piston like movement of S4 is characterized by large up and down displacements. In the *transporter* like model proposed by Bezanilla and coworkers, S4 is also protected from the membrane by the voltage-sensor segments. However, a specific hydration of S4 shapes the electric field in the TM domain region. Depolarization of the membrane produces rather small conformational changes of S4 that account for the activation mechanism (Starace et al., 1997; Bezanilla, 2002; Starace and Bezanilla, 2004; Bezanilla, 2000).

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

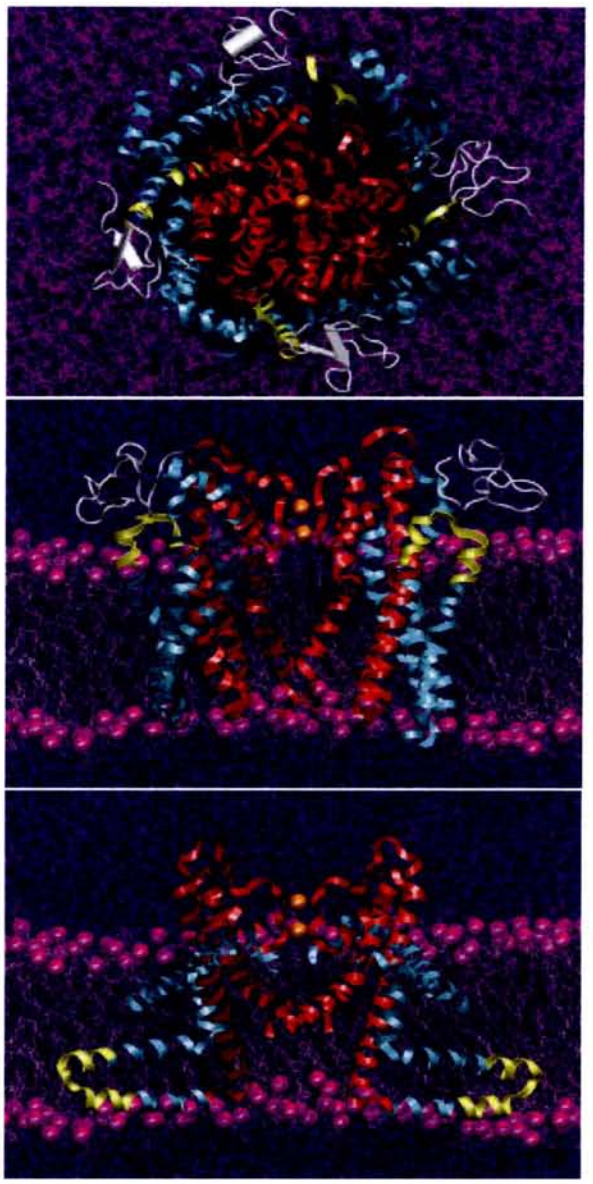

Figure 14: Binding interaction between gating-modifier toxins and Kv channels. Top panel: extracellular view of hanatoxin docked on *Shaker* B channel model. Four docked hanatoxin molecules are shown on the external surface of model. Middle panel: hanatoxin docked on *Shaker* B channel model, side view. For clarity, only 2 subunits are displayed. Hanatoxin (white) is shown as cartoon. Note the tip region is accessible from the extracellular side of the membrane for toxin binding. Bottom panel: KvAP channel model embedded in a POPC lipid bilayer after initial relaxation of lipid and water by MD simulation. The tip region of helices S3 and S4 are highlighted in yellow. The same colour pattern of figure 3 is used.

Investigation of ion channel pharmacology, especially, interaction with toxins, constitutes a powerful and complementary mean of characterization of Kv channel function (Li-Smerin and Swartz, 1998; Swartz and MacKinnon, 1995). As essential proteins controlling membrane excitability, Kv channels constitute ideal targets for a number of vegetal and animal toxins. The toxins binding alter the ion flow by affecting one or more of the channel functional properties. A wide variety of pore-occluding toxins for Kv targets have been identified (MacKinnon and Miller, 1989). These toxins inhibit the ionic current by blocking the external entrance of the pore region. Differently, gating-modifier toxins, such as hanatoxin, inhibit Kv channels by binding preferentially to the resting-closed state of the channel (Swartz and MacKinnon, 1995). Hanatoxin shifts the channel activation to more depolarized voltages from the extracellular side of the membrane, e.g., delays the conformational changes required for transition between the resting and activated states (Swartz and MacKinnon, 1997a).

In an attempt to further test the model herein built, docking analysis were performed in order to identify the possible binding sites for hanatoxin on a chimera molecule based on the *Shaker* B model (see methods). Considering the hanatoxin structure determined by NMR, 4 binding sites located on the external surface of the channel were identified. Each site is located at the periphery of the voltage-sensor domain, about 20 Å distant from the pore region (Fig. 14),

which agrees with results of channel cohabitation by both pore-occluding and gating-modifier toxins (Swartz and MacKinnon, 1997b). The binding site is an external crevice beside the lipid headgroups, near which the tip of helices S3 and S4 is located. This region contains side chains found to influence toxin binding significantly (Li-Smerin and Swartz, 2000; Li-Smerin and Swartz, 2001). On the other hand, the specific molecular surface of hanatoxin, interacting with the channel, contains residues which are conserved among all known gating-modifier toxins (Takahashi et al., 2000). Although double-cycle-mutation analyses are missing, it is likely that side chains on this surface are participating in the interaction with Kv channels.

The results of the docking procedure suggest that positive shift in the voltage-activation curve caused by gating-modifier toxin binding may be explained in terms of a constraining mechanism. Such toxins may directly hinder the large movements of S4, movements that are at the origin of the channel opening. Stronger depolarization and molecule dissociation would then be necessary for overcoming the toxin action. Differently, in the KvAP based model, the tip of helices S3 and S4 would be accessible from the extracellular side only after large motion of the paddle under depolarization (Jiang et al., 2003b). In this case, toxin binding would happen after conformational changes for activation, not explaining, therefore, the positive shift in the channel gating caused by binding.

In summary, the dynamical processes taking place at least to some extent during the "*in silico*" activation indicate that S4 moves upward and tilts, triggering the necessary conformational changes that are required for the channel opening. Movements of the tetramer are shown to be collective essential modes and not mere independent fluctuations. The main motion of S4, in contrast to what has been proposed in the conventional model is rather small, and is correlated with an increase of hydration of the channel by water molecules migrating from both extra- and intracellular regions of the membrane. This is believed to constitute a crucial structural modification of the channel that is necessary for its opening, rationalizing the activation model of voltage-gated potassium channels proposed by Bezanilla and coworkers (Starace and Bezanilla, 2001; Starace and Bezanilla, 2004).

Acknowledgments

The authors would like to thank the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) for the *Action Thematique Anticipee sur Programme* (ATIP) grant of M. T. and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the fellowship of W. T. The Centre Informatique National de l'Enseignement Supérieur (CINES), Montpellier, France, is gratefully acknowledged for provision of generous amounts of CPU time on the SGI Origin 3800. WT would like to thank Dr. Sonia M. de Freitas for helpful discussions and comments on an earlier version of the manuscript.

References

Ahern, C. A., and R. Horn. 2004. Specificity of charge-carrying residues in the voltage sensor of potassium channels. *J; Gen. Physiol.* 123:205-216.

Amadei, A., A. B. M. Linssen, and H. J. C. Berendsen. 1993. Essential dynamics of proteins. *Proteins: Struct., Funct. Genetics.* 17:412-425.

Åqvist, J., and V. Luzhkov. 2000. Ion permeation mechanism of the potassium channel. *Nature.* 404:881-884.

Beckstein, O., P. C. Biggin, P. Bond, J. N. Bright, C. Domene, A. Grottesi, J. Holyoake, and M. S. P. Sansom. 2003. Ion channel gating: insights via molecular dynamics. *FEBS Letters.* 555:85 - 90.

Bell, D., H. Yao, R. Saenger, J. Riley, and S. Sielgelbaum. 2004. Changes in local S4 environment provide a voltage-sensing mechanism for mammalian hyperpolarization-activated HCN channels. *J. Gen. Physiol.* 123:5-19.

Bernèche, S., and B. Roux. 2000. Molecular dynamics of KcsA K^+ channel in a bilayer membrane. *Biophys. J.* 78:2900-2917.

Bernèche, S., and B. Roux. 2003. A microscopic view of ion conduction trough the potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:8644-8648.

Bezanilla, F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80:555-592.

Bezanilla, F. 2002. Voltage sensor movements. *J. Gen. Physiol.* 120:465-473.

Blaustein, R. O., and C. Miller. 2004. Shake, rattle or roll. *Nature.* 427:499-500.

Bright, J. N., I. H. Shrivastava, F. S. Cordes, and M. S. P. Sansom. 2002. Conformational dynamics of helix S6 from *Shaker* potassium channel: simulation studies. *Biopolymers.* 64:303-313.

Broomand, A., R. Mannikko, P. Larsson, and F. Elinder. 2003. Molecular movement of the voltage sensor in a potassium channel. *J. Gen. Physiol.*

Capener, C. E., and M. S. P. Sansom. 2002. Molecular dynamics simulations of a K channel model: sensitivity to changes in ions, waters, and membrane environment. *J. Phys. Chem.* 106:4543-4551.

Cha, A., P. C. Ruben, A. L. George, E. Fujimoto, and F. Bezanilla. 1999. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature.* 402:813-817.

Choe, S. 2002. Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience.* 3:115-121.

Chung, S. H., and S. Kuyucak. 2002. Recent advances in ion channel research. *Biochim. Biophys. Acta.* 1565:267-286.

Cohen, B. E., M. Grabe, and L. Y. Jan. 2003. Answers and questions from the KvAP structures. *Neuron.* 39:395-400.

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids. Res.* 16:10881-10890.

Darden, T., D. York, and L. Pedersen. 1993. Particle mesh Ewald - An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98:10089-10092.

de Groot, B. L., A. Amadei, R. M. Scheek, N. A. J. van Nuland, and H. J. C. Berendsen. 1996. An extended sampling of the configurational space of HPr from E. coli. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*:314-322.

del Camino, D., M. Holmgren, Y. Liu, and G. Yellen. 2000. Blocker protection in the pore of a voltage-gated K^+ channel and its structural implications. *Nature.* 403:321-325.

Domene, C., S. Haider, and M. S. P. Sansom. 2003. Ion channel structures: a review of recent progress. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* 6:611-619.

Domene, C., and M. S. Sansom. 2003. Potassium channel, ions, and water: simulation studies based on the high resolution x-ray structure of KcsA. *Biophys. J.* 85:2787-2800.

Doyle, D. A., J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science.* 280:69-77.

Eisenberg, D., E. Schwarz, M. Komaromy, and R. Wall. 1984. Analysis of membrane and protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* 179:125-142.

Flower, D. R. 1997. Serf: a program for accessible surface area calculations. *J. Mol. Graph. Model.* 15:238-244.

Frishman, D., and P. Argos. 1995. Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins.* 23:566-579.

Gandhi, C., E. Clark, E. Loots, A. Pralle, and E. Isacoff. 2003. The orientation and molecular movement of a potassium channel voltage-sensing domain. *Neuron.* 40:515-525.

Green, M. E. 2002. Water as a structural element in a channel: gating in the KcsA channel, and implications for voltage-gated ion channels. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 19:725-730.

Hess, B. 2002. Convergence of sampling in protein simulations. *Phys. Rev. E.* 65:1-10.

Hille, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer, Sunderland, MA.

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

Hong, K. H., and C. Miller. 2000. The lipid-protein interface of a Shaker K^+ channel. *J. Gen. Physiol.* 115:51-58.

Horiuchi, T., and N. Go. 1991. Projection of monte carlo and molecular dynamics trajectories onto normal mode axes: human lysozyme. *Proteins.* 10:106-116.

Horn, R. 2000. Conversation between voltage sensors and gates of ion channels. *Biochemistry.* 39:15653-15658.

Ichiye, T., and M. Karplus. 1991. Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctutations in molecular dynamics and normal mode simulation. *Proteins.* 11:205-217.

Izaguirre, J. A., S. Reich, and R. D. Skeel. 1999. Longer time steps for molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* 110:9853-9864.

Jan, L. Y., and Y. N. Jan. 1994. Potassium channels and their evolving gates. *Nature.* 371:119-122.

Jan, L. Y., and Y. N. Jan. 1997. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* 20:91-123.

Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chalt, and R. Mackinnon. 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature.* 417:523-526.

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

Jiang, Y., V. Ruta, J. Chen, A. Lee, and R. MacKinnon. 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K+ channel. *Nature.* 423:42-48.

Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79:926-935.

Kalé, L., R. Skeel, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gursoy, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinozaki, K. Varadarajan, and K. Schulten. 1999. Namd2: Greater scalability for parallel molecular dynamics. *J. Comput. Phys.* 151:283--312.

Kobertz, W. R., and C. Miler. 1999. K^+ channels lacking the 'tetramerization' domain: implications for pore structure. *Nat. Struct. Biol.* 6:1122-1125.

Koprowski, P., and A. Kubalski. 2001. Bacterial ion channels and their eukariotic homologues. *BioEssays.* 23:1148-1158.

Kreusch, A., P. J. Pfaffinger, C. F. Stevens, and S. Choe. 1998. Crystal structure of the tetramerization domain of the *Shaker* potassium channel. *Nature.* 392:945-948.

Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305:567-580.

Lainé, M., M. A. Lin, J. P. A. Bannister, W. R. Silverman, A. F. Mock, B. Roux, and D. M. Papazian. 2003. Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels. *Neuron.* 39:467-481.

Larsson, H. P., O. S. Baker, D. S. Dhillon, and E. Y. Isacoff. 1996. Transmembrane movement of the *Shaker* K^+ Channel S4. *Neuron.* 16:387-397.

Lee, H. C., J. M. Wang, and K. J. Swartz. 2003. Interaction between extracellular hanatoxin and the resting conformation of the voltage-sensor paddle in Kv channels. *Neuron.* 40:527-536.

Li-Smerin, Y., D. H. Hackos, and K. J. Swartz. 2000. Alpha-helical structural elements within the voltage-sesing domains of a K+ channel. *J. Gen. Physiol.* 115:33-49.

Li-Smerin, Y., and K. J. Swartz. 1998. Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated calcium and potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8585-8589.

Li-Smerin, Y., and K. J. Swartz. 2000. Localization and molecular determinants of the hanatoxin receptors on the voltage-sensing domians of a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 115:673-684.

Li-Smerin, Y., and K. J. Swartz. 2001. Helical structure of the COOH terminus of S3 and its contribution to the gating modifier toxin receptor in voltage-gated ion channels. *J. Gen. Physiol.* 117:205-217.

Lu, Z., A. M. Klem, and Y. Ramu. 2001. Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature.* 413:809-813.

Luzhkov, V., J. Nilsson, P. Arhem, and J. Aqvist. 2003. Computational modelling of the open-state Kv 1.5 ion channel block by bupivacaine. *Biochim Biophys Acta.* 1652:35 - 51.

MacKerell Jr., A. D., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack Jr., J. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher III, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus. 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B.* 102:3586-3616.

MacKinnon, R., and C. Miller. 1989. Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science.* 245:1382-1385.

Mandegar, M., and J. X. J. Yuan. 2002. Role of K^+ channels in pulmonary hypertension. *Vasc. Pharmacol.* 38:25-33.

Mannuzzu, L. M., and E. Y. Isacoff. 2000. Independence and cooperativity in rearrangements of a potassium channel voltage sensor revealed by single subunit fluorescence. *J. Gen. Physiol.* 115:257-268.

McCollum, I. L., Y. Y. Vilin, E. Spackman, E. Fujimoto, and P. C. Ruben. 2003. Negatively charged residues adjacent to IFM motif in the DIII-DIV linker of hNa(V)1.4 differentially affect slow inactivation. *FEBS Lett.* 552:163-169.

Merlino, A., L. Vitagliano, M. A. Ceruso, A. Di Nola, and L. Mazzarela. 2002. Global and local motions in ribonuclease A: a molecular dynamics study. *Biopolymers.* 65:274-283.

Milkman, R. 1994. An Escherichia coli homologue of eukaryiotic potassium channel proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:3510-3514.

Monks, S. A., D. J. Needleman, and C. Miller. 1999. Helical structure and packing orientation of the S2 segment in the *Shaker* K^+ channel. *J. Gen. Physiol.* 113: 415-423.

Neale, E. J., D. J. S. Elliott, M. Hunter, and A. Sivaprasadarao. 2003. Evidence for intersubunit interactions between S4 and S5 transmembrane segments of the Shaker potassium channel. *J. Biol. Chem.* 278:29079-29085.

Perozo, E., D. M. Cortes, and L. G. Cuello. 1999. Structural rearrangements underlying K^+ channel activation gating. *Science.* 285:73-78.

Planells-Cases, R., A. V. Ferrer-Montiel, C. D. Patten, and M. Montal. 1995. Mutation of conserved negatively charged residues in the S2 and S3 transmembrane segments of a mammalian K^+ channel selectively modulates channel gating. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92:9422-9426.

Popot, J.-L., and D. M. Engelman. 1990. Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry.* 2721:4031-4037.

Roux, B. 1997. Influence of the membrane potential on the free energy of an intrinsic protein. *Biophys. J.* 73:2980-2989.

Roux, B. 2002. Theoretical and computational models of ion channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:182-189.

Ruta, V., Y. Jliang, A. Lee, J. Chen, and R. MacKinnon. 2003. Functional analysis of an archaebacterial voltage-dependent K+ channel. *Nature.* 422:180-185.

Sato, C., Y. Ueno, K. Asal, K. Takahashi, M. Sato, A. Engel, and Y. Fujiyoshi. 2001. The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature.* 409:1047-1051.

Schoppa, N. E., and F. J. Sigworth. 1998. Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channel. *J. Gen. Physiol.* 111:313-342.

Seoh, S. A., D. Sigg, D. M. Papazian, and F. Bezanilla. 1996. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K+ channel. *Neuron.* 16:1159-1167.

Sigg, D., F. Bezanilla, and E. Stefani. 2003. Fast gating in the shaker K+ channel and the energy landscape of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:7611-7615.

Smart, O. S., J. M. Goodfellow, and B. A. Wallace. 1993. The pore dimensions of gramicidin A. *Biophys. J.* 72:1109-1126.

Sokolova, O., L. Kolmakova-Partensky, and N. Grigorieff. 2001. Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure (Camb.).* 9:215-220.

Starace, D., and F. Bezanilla. 2001. Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the shaker potassium channel. *J Gen Physiol.* 117:469-490.

Starace, D. M., and F. Bezanilla. 2004. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature.* 427:548 - 553.

Starace, D. M., E. Stefani, and F. Bezanilla. 1997. Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the *Shaker* K^+ channel. *Neuron.* 19:1319-1327.

Stern, H. A., and S. E. Feller. 2003. Calculation of the dielectric permettivity profile for a nonuniform system: application to a lipid bilayer simulation. *J. Chem. Phys.* 118:3401--3412.

Swartz, K. J., and R. MacKinnon. 1995. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a chilean tarantula. *Neuron.* 15:941-949.

Swartz, K. J., and R. MacKinnon. 1997a. Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent potassium channel through multiple binding sites. *Neuron.* 18:665-673.

Swartz, K. J., and R. MacKinnon. 1997b. Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent potassium channels. *Neuron.* 18:675-682.

Takahashi, H., J. I. Kim, H. J. Min, K. Sato, K. J. Swartz, and I. Shimada. 2000. Solution structure of hanatoxin 1, a gating modifier of voltage-dependent potassium channels: common surface features of gating modifier toxins. *J. Mol. Biol.* 297:771-780.

Tieleman, D. P., J. H. C. Berendsen, and M. S. P. Sansom. 2001. Voltage-dependent insertion of alamethicin at phospholipid/water and octane water interfaces. *Biophys. J.* 80:331-346.

Tieleman, D. P., L. R. Forrest, M. S. P. Sansom, and H. J. C. Berendsen. 1998. Lipid properties and the orientation of aromatic residues in OmpF, Influenza M2 and alamethicin systems: Molecular dynamics simulations. *Biochemistry.* 37:17544-17561.

Tieleman, D. P., B. Hess, and M. S. P. Sansom. 2002. Analysis and evaluation of channel models: simulations of alamethicin. *Biophysical Journal.* 83:2393-2407.

Tiwari-Woodruff, S. K., C. T. Schulteis, A. F. Mock, and D. M. Papazian. 1997. Electrostatic interactions between transmembrane segments mediate folding of *Shaker* K^+ channel subunits. *Biophys. J.* 72:1489-1500.

Tristani-Firouzi, M., J. Chen, and M. Sanguinetti. 2002. Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of Herg potassium channels. *J. Biol. Chem.* 277:18994 - 19000.

Tusnády, G. E., and I. Simon. 1998. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* 283:489-506.

Vakser, A., and C. Aflalo. 1994. Hydrophobic docking: a proposed enhancement to molecular recognition techniques. *Proteins.* 20:320-329.

Webster, S. M., D. del Camino, J. P. Dekker, and G. Yellen. 2004. Intracellular gate opening in Shaker K1 channels defined by high-affinity metal bridges. *Nature.* 428:864-868.

Yang, N., A. L. J. George, and R. Horn. 1996. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 16:113-122.

Yellen, G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature.* 419:35-42.

Zhou, M., J. H. Morais-Cabral, S. Mann, and R. MacKinnon. 2001. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature.* 411:657-661.

VI - DISCUSSION

Les avancées récentes dans la connaissance des systèmes biologiques ont permis d'étudier l'excitabilité cellulaire au niveau moléculaire. Cette étude est marquée par la caractérisation des canaux ioniques sensibles à la tension. Ces canaux sont apparus tôt au cours de l'évolution, depuis les archaebactéries, comme, par exemple, *Aeropyrum pernix* (Ruta et al., 2003), jusqu'aux eucaryotes supérieurs (Durell et al., 1999). Des phénomènes complexes, telle que la signalisation nerveuse, dérivent du fonctionnement microscopique de ces protéines (Bezanilla, 2000).

VI.1 – ETAT D'ART

La détermination de la structure moléculaire constitue une étape limitante dans la caractérisation fonctionnelle des canaux (Domene et al., 2003). En outre, l'étude de ces canaux requiert l'utilisation de méthodes expérimentales capables d'accéder à leurs propriétés dynamiques. Dans ce contexte, la modélisation moléculaire, en particulier, les simulations statistiques, resprésente une classe d'outils indispensables pour l'examen à l'échelle atomique des canaux ioniques (Domene and Sansom, 2003).

Il faut souligner que récemment seulement, avec le développement des calculs sur architectures massivement parallèles et l'emploi d'algorithmes appropriés, des systèmes macromoléculaires complexes ont pu être étudiés de façon satisfaisante par les méthodes informatisées. Ceci se traduit par le fait qu'aujourd'hui, un nombre limité d'équipes scientifiques maîtrise la technologie nécessaire pour la réalisation de telles études. Dans cette perspective, il convient de noter que les simulations présentées ici ont été réalisées grâce à l'utilisation du centre de calcul national CINES (www.cines.fr) de Montpellier. Ce centre dispose actuellement d'un ensemble de 758 processeurs répartis sur différentes architectures parallèles à accès non uniforme de la mémoire (NUMA). Un total d'environ quatre mois de calcul continu a été nécessaire pour la production des trajectoires décrites ici. Il est également important de souligner qu'une grande partie de la théorie utilisée pour analyser ces trajectoires a été implantée dans des programmes informatiques indépendants développés au cours de l'exécution de cette thèse. Un total de vingt codes d'analyse a ainsi été écrit en langages C et Fortran, allant de l'inclusion de routines écrites antérieurement par d'autres auteurs, jusqu'au développement complet de codes originaux, comme, par exemple, celui permettant la dynamique essentielle (Amadei et al., 1993).

VI.2 – MODELISATION DES CANAUX IONIQUES SENSIBLES A LA TENSION

Un modèle structural pour le canal potassium *Shaker* B a été construit par modélisation moléculaire en accord avec les résultats expérimentaux accumulés jusqu'ici. Le mécanisme d'activation mis en lumière ici est issu de la mesure directe des propriétés dynamiques échantillonnées à partir des positions atomiques. Un système macromoléculaire complexe, incluant la protéine membranaire, son environnement lipidique et un nombre approprié de molécules d'eau, a été utilisé pour décrire le canal *Shaker* B. En outre, les états polarisés de la membrane ont été considérés implicitement, à travers les variations d'un champ électrique externe. Dans cette approche, la structure présente des caractéristiques microscopiques cohérentes avec les résultats expérimentaux disponibles, et peuvent, par conséquent, correspondre à des propriétés moléculaires essentielles pour la fonction des canaux. De tels résultats ont été obtenus sans aucune hypothèse supplémentaire, hormis peut-être, la conformation initiale du canal. Cette expérience *in silico* offre de façon inédite une vision microscopique du mécanisme d'activation des canaux ioniques sensibles à la tension.

Il est possible que les transitions conformationnelles échantillonnées soient, d'une façon générale, communes aux canaux sodium, calcium et potassium, en particulier, pour le couplage entre le segment S4 et le pore de conduction. L'examen du modèle structural du *Shaker* B par la simulation a permis de saisir

les changements conformationnels du segment S4 en réponse aux variations du potentiel électrique transmembranaire. Ces mouvements sont corrélés aux fluctuations de l'hydratation interne du canal, en produisant des forces capables d'induire des changements au niveau du pore, ainsi que la modification du passage de conduction ionique. Le mécanisme proposé pour le canal potassium, dans ce manuscrit, est probablement le même pour les canaux sodium et calcium. Cette supposition est renforcée par l'homologie entre tous les canaux ioniques sensibles à la tension (Rudy, 1999). La conservation de la séquence primaire suggère que la nature, au cours de l'évolution, n'a pas trouvé d'autres solutions structurales répondant aux critères drastiques de fonction-nement de cette machinerie sophistiquée dans les divers organismes supérieurs. Il est, en revanche, vraisemblable que des variations conformationnelles locales puissent exister, provenant des particularités cinétiques du fonctionnement de chaque canal (Buzatu, 2003).

Notre modèle du canal *Shaker* B est clairement différent de la structure moléculaire rencontrée pour le canal KvAP, récemment décrite par MacKinnon et ses collaborateurs, et plus spécialement, dans sa région du détecteur de la tension (Jiang et al., 2003a; Jiang et al., 2003b). Au contraire du modèle KvAP, le segment S4 a été ici modélisé dans une orientation perpendiculaire au plan de la membrane. Cette orientation de l'hélice S4 est fortement corroborée par plusieurs données expérimentales (Choe, 2002; Yellen, 2002; Horn, 2000;

Bezanilla, 2000). En particulier, il a été démontré au cours des derniers mois, suivant la publication du modèle structural du canal KvAP, que la région N-terminale de l'hélice S4 des canaux eucaryotes occupe une position proche de la face extracellulaire du pore de conduction, que ce soit à l'état au repos ou activé (Broomand et al., 2003; Laine et al., 2003; Neale et al., 2003; Gandhi et al., 2003; Bell et al., 2004). En tout état de cause, la structure statique récemment proposée par MacKinnon n'est pas capable d'expliquer ces résultats expérimentaux.

VI.3 – Pharmacologie des canaux ioniques sensibles a la tension

Naturellement, en raison de leur fonction déterminante pour la régulation du potentiel d'action, les canaux ioniques sensibles à la tension sont des cibles spécifiques pour un grand nombre de molécules présentant un potentiel pharmacologique (Tan et al., 2003; Catterall, 2002), comme les anesthésiants et les toxines d'origine végétale et animale – *e.g.* celle du scorpion (Massensini et al., 2003; Gordon and Gurevitz, 2003; Srinivasan et al., 2002) et d'anémone marine (Honma et al., 2003; Norton, 1991). En général, de telles substances se lient aux canaux ioniques en altérant leurs propriétés (Wang and Wang, 2003), et constituent donc des sondes moléculaires pour la caractérisation structurale et fonctionnelle de ceux-ci (Gilquin et al., 2002). L'identification, l'isolement et la

caractérisation biochimique de nouveaux agonistes et inhibiteurs ont fait l'objet de recherches constantes dans l'étude des canaux ioniques sensibles à la tension (Li et al., 2003). L'objectif ultime de ces études est la compréhension du mécanisme d'action de ces espèces chimiques au niveau moléculaire. Une étape initiale pour atteindre ce but est la prédiction structurale du récepteur et du ligand. Les interactions intervenant dans le complexe *récepteur+ligand* peuvent alors être identifiées, de même que les propriétés moléculaires essentielles pour la formation du complexe et le mécanisme d'action des toxines.

Des études d'affinité ont mis en lumière six sites de liaison des toxines avec les canaux sodium sensibles à la tension (Benoit, 1998). Parmi ceux-ci, les sites un, trois et cinq sont localisés dans la sous-unité α. Les toxines s'associant au canal peuvent être divisées en trois groupes : les toxines peptidiques (du venin de scorpion et d'anémones marines), les toxines lipophiliques (de la vératrine, des alcaloïdes et pyréthroïdes) et les toxines guanidines (tétrodotoxine et saxitoxine) (Benoit, 1998). A cause de l'importance que revêt la phase de repolarisation du potentiel d'action, les canaux potassium sensibles à la tension sont également des cibles pour plusieurs toxines (Rodriguez de la Vega et al., 2003). Deux classes de toxines sont identifiables : les toxines bloquant le pore de conduction (MacKinnon and Miller, 1989) et les toxines modifiant le fonctionnement du détecteur de la tension des canaux potassium (Swartz and MacKinnon, 1995)

Les toxines peptidiques, et plus particulièrement, les toxines d'anémo-nes marines, se lient, d'une manière dépendant de la tension, au site trois de la surface externe des canaux sodium sensibles à la tension (Schweitz et al., 1985). Cette liaison inhibe alors le fonctionnement du détecteur de la tension. En vertu du couplage entre les mécanismes d'activation et d'inactivation dans ces canaux, le blocage du détecteur entraîne l'inhibition du processus d'inactivation. En conséquence, la dépolarisation de la membrane est prolongée (Benoit, 1998). Ce mécanisme explique l'action d'agents ionotropiques puissants (Pallaghy et al., 1995), comme, par exemple, les toxines Ap-A et Ap-B dérivées de l'anémone marine *Anthopleura xanthogramica.*

Un modèle d'interaction moléculaire pour les canaux potassium sensibles à la tension et les toxines modifiant le fonctionnement du détecteur de la tension est proposé ici. Dans ce modèle, la toxine hanatoxine s'associe à la face extracellulaire de la cible, dans une crevasse produite par les segments S3 et S4. Ce résultat suggère que le mécanisme d'action consiste effectivement en un blocage de l'hélice S4, empêchant ainsi les changements conformationnels requis pour l'activation du canal. L'homologie entre l'hanatoxine et les toxines qui se lient au site trois des canaux sodium sensibles à la tension, confirme un mécanisme d'action conservé chez cette classe de toxines. En particulier, une grande similarité est rencontrée entre l'hanatoxine et les toxines d'anémone de mer (Takahashi et al., 2000). Cette similarité structurale ajoutée à l'homologie

rencontrée chez les canaux ioniques corrobore une telle possibilité. Des expériences de réactivité croisée entre canaux sodium et calcium (Li-Smerin and Swartz, 1998) démontrent, en réalité, une convergence évolutive pour le mécanisme d'action de ces toxines (Winterfield and Swartz, 2000). Les caractéristiques du complexe moléculaire formé par le canal *Shaker* B et l'hanatoxine, rapportées ici, peuvent correspondre à des propriétés générales pour un mécanisme d'action conservé des toxines sur les canaux ioniques sensibles à la tension.

VI.4 – RÉFÉRENCES

Amadei, A., A. B. M. Linssen, and H. J. C. Berendsen. 1993. Essential Dynamics of Proteins. *Proteins: Struct., Funct. Genetics.* 17:412-425.

Bell, D., H. Yao, R. Saenger, J. Riley, and S. Sielgelbaum. 2004. Changes in local S4 environment provide a voltage-sensing mechanism for mammalian hyperpolarization-activated HCN channels. *J. Gen. Physiol.* 123:5-19.

Benoit, E. 1998. Mechanism of action of neurotoxins on the inactivation of voltage-gated sodium channels. *C R Seances Soc. Biol. Fil.* 192:409-436.

Bezanilla, F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80:555-592.

Broomand, A., R. Mannikko, P. Larsson, and F. Elinder. 2003. Molecular Movement of the voltage sensor in a potassium channel. *J. Gen. Physiol.*

Buzatu, S. 2003. Discrete-state theory in nerve impulse modelling. *Riv. Biol.* 96:261-270.

Catterall, W. A. 2002. Molecular mechanisms of gating and drug block of sodium channels. *Novartis Found Symp.* 241:206-232.

Choe, S. 2002. Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience.* 3:115-121.

Domene, C., S. Haider, and M. S. Sansom. 2003. Ion channel structures: a review of recent progress. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* 6:611-619.

Domene, C., and M. S. Sansom. 2003. Potassium channel, ions, and water: simulation studies based on the high resolution x-ray structure of KcsA. *Biophys. J.* 85:2787-2800.

Durell, S. R., Y. Hao, T. Nakamura, E. P. Bakker, and H. R. Guy. 1999. Evolutionary relationship between potassium channels and symporters. *Biophys. J.* 77:775-788.

Gandhi, C., E. Clark, E. Loots, A. Pralle, and E. Isacoff. 2003. The orientation and molecular movement of a potassium channel voltage-sensing domain. *Neuron.* 40:515-525.

Gilquin, B., J. Racape, A. Wrisch, V. Visan, A. Lecoq, S. Grissmer, A. Menez, and S. Gaspari. 2002. Structure of the BgK-Kv1.1 complex based on distance restraints identified by double mutant cycles. Molecular basis for convergent evolution of Kv1 channel blockers. *J. Biol. Chem.* 277:37406-37413.

Gordon, D., and M. Gurevitz. 2003. The selectivity of scorpion alpha-toxins for sodium channels subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface. *Toxicon.* 41:125-128.

Honma, T., T. Iso, M. Ishida, Y. Nagashima, and K. Shiomi. 2003. Occurrence of type 3 sodium channel peptide in two species of sea anemones (*Dofleinia armata and Entacmaea ramsayi*). *Toxicon.* 41:637-639.

Horn, R. 2000. Conversation between voltage sensors and gates of ion channels. *Biochemistry.* 39:15653-15658.

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

Jiang, Y., V. Ruta, J. Chen, A. Lee, and R. MacKinnon. 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K+ channel. *Nature.* 423:42-48.

Laine, M., M. A. Lin, J. P. A. Bannister, W. R. Silverman, A. F. Mock, B. Roux, and D. M. Papazian. 2003. Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels. *Neuron.* 39:467-481.

Li, M. H., N. X. Zhang, X. Q. Chen, G. Wu, H. M. Wu, and G. Y. Hu. 2003. BmKK4, a novel toxin from the venom of Asian scorpion Buthus martensi Karsch, inhibits potassium currents in rat hippocampal neurons in vitro. *Toxicon.* 42:199-205.

Li-Smerin, Y., and K. J. Swartz. 1998. Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated calcium and potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8585-8589.

MacKinnon, R., and C. Miller. 1989. Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science.* 245:1382-1385.

Massensini, A. R., M. A. Romano-Silva, and M. V. Gomez. 2003. Sodium channel toxins and neurotransmitter release. *Neurochem. Res.* 28:1607-1611.

Neale, E. J., D. J. S. Elliott, M. Hunter, and A. Sivaprasadarao. 2003. Evidence for intersubunit interactions between S4 and S5 transmembrane segments of the Shaker potassium channel. *J. Biol. Chem.* 278:29079-29085.

Norton, R. S. 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with sodium channel. *Toxicon.* 29:1051-1084.

Pallaghy, P. K., M. J. Scanlon, A. S. Monks, and R. S. Norton. 1995. Three-dimensional structure in solution of the polypeptide cardiac stimulant Anthopleurin A. *Biochemistry.* 34:3782-3794.

Rodriguez de la Vega, R. C., E. Merino, B. Becerril, and L. D. Possani. 2003. Novel interactions between potassium channels and scorpions toxins. *Trends Pharmacol. Sci.* 24:222-227.

Rudy, B. 1999. Molecular diversity of ion channels and cell function. Rudy, B. Seeburg, P., New York.

Ruta, V., Y. Jliang, A. Lee, J. Chen, and R. MacKinnon. 2003. Functional analysis of an archaebacterial voltage-dependent K+ channel. *Nature.* 422:180-185.

Schweitz, H., J. N. Bidard, C. Frelin, D. Pauron, H. P. M. Vijverberg, D. M. Mahasneh, and M. Lazdunski. 1985. Purification, sequence, and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus paumotensis.* A new class of sea anemone toxin acting on the sodium channel. *Biochemistry.* 24:3554-3561.

Srinivasan, K. N., P. Gopalakrishnakone, P. T. Tan, K. C. Chew, B. Cheng, R. M. Kini, J. L. Koh, S. H. Seah, and V. Brusic. 2002. SCORPION, a molecular database of scorpions toxins. *Toxicon.* 40:23-31.

Swartz, K. J., and R. MacKinnon. 1995. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a chilean tarantula. *Neuron.* 15:941-949.

Takahashi, H., J. I. Kim, H. J. Min, K. Sato, K. J. Swartz, and I. Shimada. 2000. Solution structure of hanatoxin 1, a gating modifier of voltage-dependent potassium channels: common surface features of gating modifier toxins. *J. Mol. Biol.* 297:771-780.

Tan, P. T., A. M. Khan, and V. Brusic. 2003. Bioinformatics for venom and toxin sciences. *Brief. Bioinform.* 4:53-62.

Wang, S. Y., and G. K. Wang. 2003. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cell Signal.* 15:151-159.

Winterfield, J. R., and K. J. Swartz. 2000. A hot spot for the interaction of gating modifier toxins with voltage-dependent ion channels. *J. Gen. Physiol.* 116:637-644.

Yellen, G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature.* 419:35-42.

VII – CONCLUSIONS ET PERPECTIVES

Les propriétés moléculaires examinées ici suggèrent de nouvelles directions pour l'étude des canaux ioniques sensibles à la tension et fournissent des idées originales pour de nouveaux développements dans d'autres domaines de recherche, comme la pharmacologie. Le changement d'hydratation du segment S4, observé au cours de l'inversion du champ électrique, pourrait correspondre à une propriété essentielle pour la fonction de ces canaux. Il sera intéressant d'étudier cette propriété expérimentalement. Dans cette perspective, des expériences d'échange de deutérium-hydrogène (Pintar et al., 2003) pourront être utiles pour déterminer la différence de protection des groupes de la chaîne peptidique dans la région transmembranaire du canal, entre les états au repos et activé. En outre, il est probable que les mouvements de type corps rigides, mis en lumière au cours des simulations, puissent être mesurés directement par la technique de résonance paramagnétique électronique (Alonso et al., 2003). Dans ce cas, le paramètre d'ordre du marqueur peut être utilisé pour décrire les mouvements du détecteur de la tension. Une telle stratégie a d'ores et déjà été utilisée pour la caractérisation des mouvements du pore de conduction du canal KcsA (Perozo et al., 1999).

Enfin, quelques interactions moléculaires échantillonnées parmi les segments transmembranaires pourront être analysées plus avant par des mutations en considérant des cycles thermodynamiques (Gilquin *et al.*, 2002). De la même

manière, le modèle d'interaction du canal *Shaker* B avec l'hanatoxine peut être employé aux fins de proposer des expériences rationalisées de mutations ponctuelles en cherchant à caractériser les interactions locales des molécules. Cette expérience sera particulièrement importante pour la corroboration du modèle proposé ici. D'une manière générale, les toxines qui s'associent au détecteur de la tension sont des molécules rigides, et, de fait, fonctionnent comme des sondes moléculaires capables de révéler la disposition spatiale des hélices transmembranaires dans ce domaine.

VII.1– REFERENCES

Alonso, A., J. Vasques da Silva, and M. Tabak. 2003. Hydration effects on the protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1646:32-41.

Gilquin, B., J. Racape, A. Wrisch, V. Visan, A. Lecoq, S. Grissmer, A. Menez, and S. Gaspari. 2002. Structure of the BgK-Kv1.1 complex based on distance restraints identified by double mutant cycles. Molecular basis for convergent evolution of Kv1 channel blockers. *J. Biol. Chem.* 277:37406-37413.

Perozo, E., D. M. Cortes, and L. G. Cuello. 1999. Structural rearrangements underlying K^+ channel activation gating. *Science.* 285:73-78.

Pintar, A., O. Carugo, and S. Pongor. 2003. Atom depth in protein structure and function. *Trends Biochem. Sci.* 28:593-597.

université HENRI POINCARÉ
NANCY 1

Monsieur **TREPTOW Werner Leopoldo**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY 1

en CHIMIE INFORMATIQUE & THEORIQUE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER 930

Nancy, le 9 avril 2004

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1 LE PRÉSIDENT

J.P FINANCE

Université Henri Poincaré, Nancy I
24-30 rue Lionnois - B.P. 3069 - 54013 NANCY Cédex
Tél. : 03 83 68 20 00 - Fax : 03 83 68 21 00

RESUME

La signalisation nerveuse est dérivée de la fonction des canaux ioniques sensible à la tension. Plusieurs pathologies sont la conséquence directe d'un dysfonctionnement de ces systèmes moléculaires complexes qui correspondent également à des cibles pour l'association de toxines. Une structure cristallographique de haute résolution du canal potassium sensible à la tension, KvAP, a été déterminée récemment. Ce modèle a été critiqué à la lumière d'expériences publiées durant les derniers mois, suggérant que la structure proposée du KvAP ne constitue pas à un canal fonctionnel. Dans ce contexte, un modèle tout-atome de la région transmembranaire du canal potassium sensible à la tension, *Shaker* B, obtenu par modélisation moléculaire, est proposé ici. Les propriétés moléculaires de cette structure ont été étudiées grâce à des simulations de la dynamique moléculaire – i.e. le canal inséré dans une membrane lipidique hydratée a été simulée en présence d'une différence de potentiel électrique transmembranaire. La variation du potentiel transmembranaire induit des changements conformationels indicatifs d'un mécanisme d'activation conforme à la fonction observée des canaux. Au cours de l'expérience *in silico*, la structure interne du canal est hydratée et le degré d'hydratation augmente sous l'influence du potentiel transmembranaire. Ce résultat inattendu suggère que la structure d'hydratation peut correspondre à une propriété importante et nécessaire pour le mécanisme d'activation de tels canaux. La vue microscopique mise en lumière ici fournit de nouvelles directions pour l'étude des canaux ioniques sensibles à la tension, et un modèle pour le développement scientifique dans d'autres secteurs de recherche, comme, la médicine et la pharmacologie.

Les mots clés: excitabilité cellulaire, canaux ioniques sensibles à la tension, toxines, dynamique moléculaire, déplacements collectifs.