



HAL
open science

Études structurales, fonctionnelles et de la dynamique conformationnelle d'un canal à potassium Kir : vers le mécanisme moléculaire d'ouverture et de fermeture de ce canal

Charline Fagnen

► **To cite this version:**

Charline Fagnen. Études structurales, fonctionnelles et de la dynamique conformationnelle d'un canal à potassium Kir : vers le mécanisme moléculaire d'ouverture et de fermeture de ce canal. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS253 . tel-03346054

HAL Id: tel-03346054

<https://theses.hal.science/tel-03346054v1>

Submitted on 16 Sep 2021

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

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

Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du Vivant (ED515)

Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie/ Equipe BiBiP ;

ENS Paris-Saclay Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée

Études structurales, fonctionnelles et de la dynamique conformationnelle d'un canal à potassium Kir : vers le mécanisme moléculaire d'ouverture et de fermeture de ce canal

Par Charline Fagnen

Thèse de doctorat de Bioinformatique et Biologie des Systèmes

Dirigée par le Pr. Catherine Vénien-Bryan et le Dr. David Perahia

Présentée et soutenue par visio-conférence totale le 28/05/2020

Devant un jury composé de :

Pr. ETCHEBEST Catherine	Professeur des Universités	Rapporteur
Dr. SANEJOUAND Yves-Henri	Directeur de Recherches	Rapporteur
Dr. BAADEN Marc	Directeur de Recherches	Examinateur
Pr. EL AMRI Chahrazade	Professeur des Universités	Examinatrice
Dr. MALLIAVIN Thérèse	Directeur de Recherches	Examinatrice
Pr. VENIEN-BRYAN Catherine	Professeur des Universités	Directrice de thèse
Dr. PERAHIA David	Directeur de Recherches	Invité

« Je suis, de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées. »

Marie Curie

A mes parents,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Catherine Vénien-Bryan de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être ma directrice de thèse. Je vous remercie pour tous vos conseils et votre soutien : à chaque problème rencontré vous m'avez toujours apporté de l'aide que ce soit par des contacts ou par votre expérience. Je vous remercie également pour les collaborations très intéressantes auxquelles vous m'avez permis de participer, ainsi que pour les conférences auxquelles vous m'avez donné l'occasion d'assister. Je vous remercie pour votre bienveillance, votre optimisme et votre implication sans faille tout au long de ma thèse, rédaction incluse ! Merci de m'avoir fait découvrir et de m'avoir initiée au domaine passionnant qu'est la cryo-microscopie.

Je remercie le Dr. David Perahia d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse, je vous remercie pour vos remarques et votre rigueur, je pense que cela a aiguisé mon esprit critique et accru ma capacité de remise en questions de certaines informations, une arme de choix pour un scientifique.

Je remercie le Pr. Catherine Etchebest et le Dr. Yves-Henri Sanejouand d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également le Pr. Chahrazade El Amri et le Dr. Thérèse Malliavin de m'avoir fait l'honneur d'être mes examinatrices lors de ma thèse. Merci au Dr. Marc Baaden d'avoir accepté d'être l'expert scientifique de mon comité de suivi ainsi qu'examineur pour ma thèse.

Je remercie le Dr. Nadia Izadi-Pruneyre ainsi que Dr. Isabelle Broutin d'avoir accepté d'être membres de mon comité de suivi de thèse.

Je remercie le Dr. Guillaume Fiquet, directeur de l'IMPMC, d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire ainsi que les membres de l'équipe BiBiP pour leur accueil. Je remercie le Pr. Emmanuèle Mouchel-Viehl, directrice de l'école doctorale ED515, pour sa bienveillance et son accueil au sein de l'ED.

Merci au Dr. Ahmad Elbahnsi pour son aide et son soutien au cours de ma thèse, ainsi que pour toutes nos discussions à la fois enrichissantes et amicales. Merci au Dr. Natacha Cerisier pour son aide et ses réponses rapides et efficaces.

Merci au Dr. Mauricio Costa pour ses conseils, il a été très facile travailler avec toi.

Je remercie le Dr. Jacques Chomilier qui m'a beaucoup aidé en modélisation au début de ma thèse.

Je remercie le Dr. Gabor Papai pour ses conseils de traitement d'images en cryo-microscopie.

Je tiens également à remercier les stagiaires que j'ai eu l'opportunité d'encadrer pendant ma thèse: Leonardo Feletto et Marija Poporanovic.

Je remercie Carlos, Gisèle, Antoniel, Pedro et Andre, doctorants en co-tutelle entre le Brésil et l'ENS Paris-Saclay avec lesquels j'ai partagé d'excellents moments et des conversations enrichissantes.

Je remercie ma collègue doctorante Dania pour son aide en anglais ! Je remercie également Danielle Raddas qui m'a toujours aidée avec gentillesse pour préparer mes missions hors de l'établissement.

Je remercie l'Université Paris-Diderot qui m'a permis de découvrir l'enseignement par une mission de monitorat.

Je tiens à remercier mes professeurs Claudine Bénard, le Dr. Vincent Cobut et le Pr. Alexandre Varnek qui m'ont beaucoup apporté et passionné par leurs matières.

En dernier lieu, je tiens à remercier ma famille qui a été mon plus grand soutien. Je remercie mes parents Annie et Bruno Fagnen pour m'avoir soutenue tout au long de ma scolarité, et merci Maman d'avoir relu ma thèse ! Je remercie ma sœur Anne-Sophie avec laquelle je partage le goût des sciences et Damien Vasseur son futur époux pour sa disponibilité et sa gentillesse à toute épreuve. Je remercie mes grands-parents Hélène et Michel Dziwenko pour leur soutien et leur curiosité attendrissante sur mes travaux.

A mes sources de bonheur, elles se reconnaîtront.

Sommaire

REMERCIEMENTS	4
SOMMAIRE	6
INTRODUCTION	10
1 PARTIE 1 : CONTEXTE BIOLOGIQUE	11
1.1 CHAPITRE 1 : LES DIFFERENTS CANAUX POTASSIQUES	12
1.1.1 <i>Les canaux activés par le calcium</i>	12
1.1.2 <i>Les canaux à deux pores</i>	13
1.1.3 <i>Les canaux dépendants du potassium</i>	14
1.1.4 <i>Les canaux à rectification entrante</i>	15
1.2 CHAPITRE 2 : LES CANAUX A RECTIFICATION ENTRANTE KIR	18
1.2.1 <i>Les différentes sous-familles</i>	18
1.2.2 <i>Fonctionnement du canal</i>	21
1.2.2.1 Le potentiel de repos transmembranaire	21
1.2.2.2 Le potentiel d'action	22
1.2.2.3 La rectification entrante des canaux Kir	23
1.2.2.4 Facteurs d'influence sur l'activité des canaux Kir	24
1.2.3 <i>Structure du canal</i>	25
1.2.3.1 Présentation générale	25
1.2.3.2 Les canaux Kir2.1	27
1.2.3.3 Le canal Kir6.2	27
1.2.3.4 Le canal KirBac3.1	28
1.2.4 <i>Pathologies</i>	30
1.2.4.1 Pathologie dépendante du canal Kir2.1 : le syndrome d'Andersen	30
1.2.4.2 Sièges de mutations pathologiques pour Kir2.1	31
1.2.4.3 Pathologie dépendante du canal Kir6.2 : l'hyperinsulinisme	32
1.2.4.4 Sièges de mutations pathologiques pour Kir6.2	32
2 PARTIE 2 : ETUDE DU GATING DU CANAL BACTERIEN KIRBAC3.1	34
2.1 CHAPITRE 1 : ETUDES IN SILICO DU CANAL	35
2.1.1 <i>Modélisation Moléculaire</i>	35
2.1.1.1 Les différentes approches en Modélisation Moléculaire	37
2.1.1.1.1 Méthodes de premier principe sans information issue de bases de données	37
2.1.1.1.2 Méthodes de premier principe avec information issue des bases de données	39
2.1.1.1.3 Reconnaissance de repliements et méthodes de « filetage » (threading)	41
2.1.1.1.4 Modélisation comparative avec des stratégies d'alignement de séquence	42
2.1.1.2 Modélisation par homologie avec Modeller	44
2.1.1.2.1 Modélisation de la membrane	44
2.1.2 <i>Simulations</i>	44
2.1.2.1 Différentes méthodes existantes	45
2.1.2.1.1 Simulations gros grains	45
2.1.2.1.2 Dynamique Moléculaire dirigée	46
2.1.2.1.3 Recuit simulé	46
2.1.2.1.4 Métadynamique	47
2.1.2.2 Principe de la dynamique Moléculaire	48
2.1.2.2.1 Théorie/Principe	48
2.1.2.2.2 Paramètres de champ de forces	48
2.1.2.2.3 Algorithme de Leapfrog-Verlet	52
2.1.2.2.4 Contrôle de la pression et de la température	53
2.1.2.2.5 Contraintes	53
2.1.2.3 Les Modes Normaux	53
2.1.2.3.1 Théorie/Principe	53
2.1.2.3.2 Analyse des modes normaux	54
2.1.2.3.3 Générations des structures déplacées le long des modes	55
2.1.2.4 La méthode MDeNM : Molecular Dynamics using excited normal modes	56
2.1.2.4.1 Principe	57

2.1.2.4.2	Première étape : préparation des données	58
2.1.2.4.3	Seconde étape : Sélection et combinaison des modes normaux	59
2.1.2.4.4	Troisième étape : Excitation	60
2.1.2.4.5	Clustering et Relaxation des structures excitées	61
2.1.3	<i>Echange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse : HDX-MS</i>	61
2.2	CHAPITRE 2 : ETUDE DU MECANISME D'OUVERTURE/FERMETURE DU CANAL BACTERIEN KIRBAC3.1	64
2.2.1	<i>Abstract</i>	66
2.2.2	<i>Introduction</i>	67
2.2.3	<i>Results</i>	69
2.2.3.1	Theoretical data	69
2.2.3.1.1	Channel constriction points	70
2.2.3.1.2	Selection of modes contributing to the gating	70
2.2.3.1.3	Population of open and closed states from the relaxed structures issued from MDeNM simulations 71	
2.2.3.1.4	Implication of global and local motions to the gating	72
2.2.3.1.5	Side-chains rotational motions of residues at the constriction regions associated to gating	75
2.2.3.1.6	Correlations between types of global motions and gating from the relaxed structures obtained following MDeNM simulations	76
2.2.3.2	Experimental data	80
2.2.3.2.1	Hydrogen/Deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS)	80
2.2.3.2.2	Current recordings of KirBac3.1 in planar lipid bilayers	83
2.2.4	<i>Discussion</i>	83
2.2.5	<i>Materials and Methods</i>	86
2.2.5.1	Molecular Modeling and Dynamics	86
2.2.5.2	Normal Modes	87
2.2.5.3	Selection of a subset of most contributing normal modes to channel gating	87
2.2.5.4	Molecular Dynamics using Excited Normal Modes (MDeNM).	88
2.2.5.5	Relaxation of the excited MDeNM structures.	89
2.2.5.6	Protein expression and purification	90
2.2.5.7	Pepsin Digestion	90
2.2.5.8	Hydrogen/Deuterium exchange approach coupled to mass spectrometry (HDX-MS)	90
2.2.5.9	HPLC Peptide Separation	90
2.2.5.10	Mass Spectrometric Analyses of Peptides	91
2.2.5.11	Electrophysiology	91
2.2.6	<i>References</i>	91
2.2.7	<i>Acknowledgments</i>	95
2.2.8	<i>Supplementary</i>	96
2.2.8.1	Introduction	97
2.2.8.2	Results and Discussion	98
2.2.8.3	Discussion	105
2.2.8.4	Material and methods	106
2.3	CHAPITRE 3 : IMPACT DE LA MUTATION W46R SUR LE MECANISME D'OUVERTURE/FERMETURE DU CANAL BACTERIEN KIRBAC3.1	110
2.3.2	<i>Abstract</i>	113
2.3.3	<i>Introduction</i>	114
2.3.4	<i>Results</i>	116
2.3.4.1	Crystallographic Structure	116
2.3.4.2	HDX-MS measurements	117
2.3.5	<i>Theoretical Results</i>	120
2.3.5.1	Interaction Networks	120
2.3.5.2	Contacts between residues	122
2.3.5.3	Impact of the mutation on the gating	124
2.3.5.4	Population of open and closed states from the relaxed structures issued from MDeNM simulations 128	
2.3.6	<i>Discussion</i>	130
2.3.7	<i>Materials and methods</i>	132
2.3.7.1	Protein expression purification	132
2.3.7.2	Theoretical data	134
2.3.7.2.1	Modeling and Dynamics	134
2.3.7.2.2	Normal Modes	135
2.3.7.2.3	Molecular Dynamics using excited Normal Modes	135

2.3.7.2.4	Relaxation of the excited MDeNM	136
2.3.7.2.5	Interaction networks	136
2.3.7.2.6	Structural determinants	137
2.3.8	<i>Supplementary</i>	143
2.4	CHAPITRE 4 : IMPACT DE LA MUTATION S129R SUR MECANISME D'OUVERTURE/FERMETURE DU CANAL BACTERIEN	
KIRBAC3.1	145
2.4.1	<i>Abstract</i>	147
2.4.2	<i>Introduction</i>	148
2.4.3	<i>Results and discussion</i>	148
2.4.3.1	Theoretical data	148
2.4.3.1.1	Points of constrictions at the bottom of the channel in the KirBac3.1 WT and the mutant S129R 148	
2.4.3.1.2	π -Interaction between the side chain of Arg129 and the aromatic ring of Tyr132	150
2.4.3.1.3	State of gating at the level of the various constriction points.....	151
2.4.3.1.4	Structural modifications between the closed (KirBac3.1 WT) and open states (KirBac3.1 S19R)	152
2.4.3.2	Experimental data	154
2.4.3.2.1	Hydrogen/Deuterium exchange approach coupled to mass spectrometry (HDX-MS).....	154
2.4.3.2.2	Structural flexibility in the transmembrane during the gating	156
2.4.3.2.3	Cytoplasmic domain	156
2.4.3.3	Conclusion	157
2.4.3.4	Materials and Methods	157
2.4.3.4.1	Molecular Modelling.	157
2.4.3.4.2	Normal Modes.	157
2.4.3.4.3	Molecular Dynamics using Excited Normal Modes.	158
2.4.3.4.4	Clustering of the excited (MDeNM) structures.	159
2.4.3.4.5	Molecular Dynamics Simulations.	159
2.4.3.4.6	Analysis of Molecular Dynamics simulations.	159
2.4.4	<i>Acknowledgments</i>	160
2.4.5	<i>References</i>	160
3	PARTIE 3 : CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE, METHODOLOGIE ET DETERMINATION DE LA	
STRUCTURE 3D DU CANAL KIR2.1.....		163
3.1	CHAPITRE 1 : ANALYSES D'IMAGES ISSUES DE CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	164
3.1.1	<i>Cryo-microscopie</i>	164
3.1.2	<i>Prise d'images</i>	165
3.1.2.1	Préparation de l'échantillon	165
3.1.2.2	Microscopie électronique à transmission.....	167
3.1.2.3	Aberrations et astigmatisme	168
3.1.3	<i>L'image</i>	168
3.1.3.1	Formation de l'image	168
3.1.3.2	Fonction de transfert de contraste: CTF.....	169
3.1.3.3	Correction de la CTF	171
3.1.3.4	Estimation de la CTF	174
3.1.3.5	Caméra	175
3.1.4	<i>Analyse d'images</i>	176
3.1.4.1	Alignement des micrographes enregistrés par la caméra	176
3.1.4.2	Détection des particules	177
3.1.4.3	Génération d'un modèle initial.....	177
3.1.4.4	Normalisation des données	178
3.1.4.5	Alignement des particules	178
3.1.4.6	Classifications 2D et 3D	179
3.1.4.7	Principe de la reconstruction 3D	180
3.1.4.8	Reconstruction 3D	180
3.1.4.9	Affinement de la densité électronique	182
3.1.4.10	Fourier Shell Correlation : FSC	183
3.1.5	<i>Fitting de la structure 3D</i>	183
3.2	CHAPITRE 2: DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE KIR2.1 PAR CRYO-MICROSCOPIE.....	198
3.2.1.1	Introduction.....	198
3.2.1.2	Results	198
3.2.1.2.1	Expression, purification and biochemical characterization of the human Kir2.1 channel	198
3.2.1.2.2	Image Analysis.....	199

3.2.1.2.3	Functional studies	201
3.2.1.3	Methods	202
3.2.1.3.1	Expression of the human Kir2.1 channel	202
3.2.1.3.2	Purification of the human Kir2.1 channel.....	202
3.2.1.3.3	SDS/PAGE and Western blotting	203
3.2.1.3.4	Functional activity of the channel	203
4	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	204
5	BIBLIOGRAPHIE	207
6	ANNEXES.....	247
6.1	ETUDE DE LA STRUCTURE DU COMPLEXE CYCLODEXTRINE-ADN PAR CRYO-MICROSCOPIE.	248
6.1.1	<i>Contexte et Objectif</i>	248
6.1.2	<i>Résultats</i>	249
6.1.3	<i>Conclusions</i>	250
6.1.4	<i>Méthodes</i>	250
6.1.4.1	Préparation.....	250
6.1.4.2	Microscopie	251
7	TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	252
8	TABLE DES TABLEAUX.....	259

Introduction

Cette thèse porte sur les canaux rectifiants entrants dits Kir. Il s'agit de protéines membranaires ubiquitaires responsables d'importants processus physiologiques comme le volume cellulaire, le pouls ou encore la contraction musculaire. Nous nous intéressons plus précisément aux canaux humains des sous-familles Kir2.1 et Kir6.2. Ces canaux s'ouvrent et se ferment suivant un mécanisme moléculaire encore inconnu qui peut être affecté par des mutations.

Des mutations au sein de ces canaux potassiques peuvent entraîner des pathologies lourdes. Le syndrome Andersen chez le Kir2.1 est une maladie qui ne dispose toujours pas de traitement efficace aujourd'hui et peut entraîner la mort subite du patient. Chez le Kir6.2, les pathologies causées par des mutations donnent lieu à des maladies en lien avec le diabète néonatal comme l'hyperinsulinisme.

L'objectif de cette thèse est d'approfondir nos connaissances sur ces canaux en i) investiguant les mécanismes moléculaires et la dynamique d'ouverture et fermeture du canal sauvage KirBac3.1 WT, ii) comprendre l'impact de la mutation W68R chez le Kir6.2 (W46R chez l'homologue bactérien KirBac3.1) causant un gain de fonction et une pathologie liée à l'hyperinsulinisme iii) investiguer les propriétés du mutant KirBac3.1 S129R qui a été conçu pour obtenir la forme ouverte stable du canal. Ces trois premiers objectifs se focaliseront sur un canal bactérien homologue le KirBac3.1 par l'intermédiaire de simulations de dynamique moléculaire. Ces résultats seront comparés aux résultats expérimentaux à notre disposition. Le dernier objectif de cette thèse est de résoudre la structure de Kir2.1 humain afin de mieux comprendre son mécanisme d'ouverture et l'impact des mutations du syndrome d'Andersen sur ce dernier.

Cette thèse est écrite en trois parties distinctes. La première partie présente les canaux potassiques. La seconde fait un point sur les méthodes employées lors des simulations et les résultats en découlant sous la forme de trois articles. La troisième et dernière partie présentera la cryo-microscopie électronique combinée à l'analyse d'images et son application sur le Kir2.1 humain.

1 Partie 1 : Contexte Biologique

1.1 Chapitre 1 : Les différents canaux potassiques

Les canaux potassiques sont les canaux ioniques les plus largement distribués dans le corps, ils sont aussi présents dans la quasi-totalité des organismes vivants qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes. Tous les canaux potassiques sont des tétramères s'organisant autour d'une cavité centrale appelée canal. Plus de 80 gènes codent pour les sous-unités des canaux K^+ ; chez l'humain, certaines mutations de ces canaux peuvent entraîner des pathologies. L'étude des canaux ioniques est primordiale afin de comprendre et traiter ces pathologies, en 2003 le prix Nobel de Chimie a d'ailleurs récompensé Roderick Mackinnon(1) pour ses travaux sur les canaux potassium.

1.1.1 Les canaux activés par le calcium

Les canaux activés par le calcium (Figure 1) ont été découverts par Gardos en 1958(2). Ils se divisent en trois classes : les canaux BK à large conductance (supérieur à 100 pS), les canaux IK (25-100 pS) à conductance intermédiaire et les canaux à basse conductance SK (2-25 pS).

Ils sont composés de deux sous-structures appelées α et β . La sous-structure α est un tétramère regroupant le pore, le VSD et le domaine de détection du calcium. α possède sept domaines transmembranaires dans le cas des canaux BK et six dans le cas des canaux IK et SK. La sous-structure β est responsable de la régulation du canal et possède deux domaines transmembranaires. Ces canaux sont actifs sous forme de tétramère.

Ces canaux s'ouvrent en conséquence de l'entrée d'ions Ca^{2+} dans la cellule permettant la régulation de l'excitabilité cellulaire et le contrôle du potentiel d'action.

Les canaux activés par le calcium sont des cibles thérapeutiques dans les cas : de maladies neurologiques comme la schizophrénie(3), du cancer du sein(4), ou encore de la fibrillation auriculaire(5).

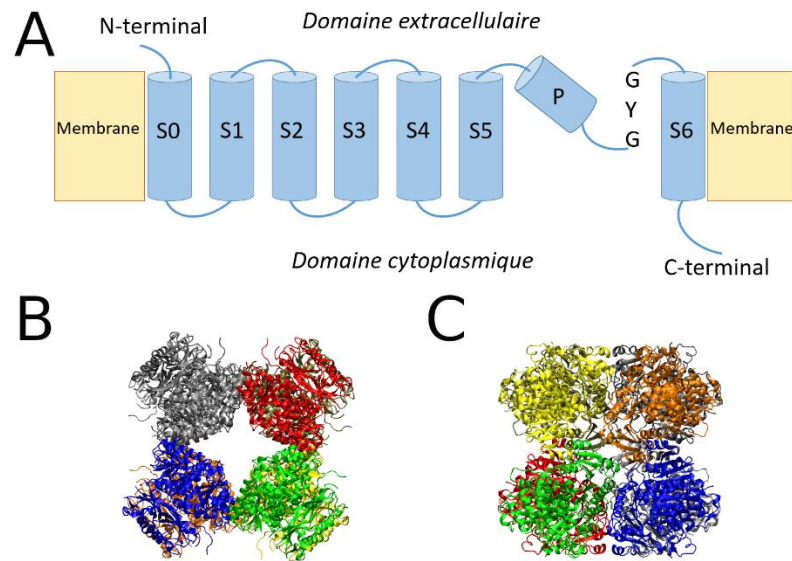


Figure 1- Les canaux activés par le calcium. A) Représentation schématique d'une unité de canal. B-C) Modèle atomique d'un canal activé par le calcium : PDB 3U6N. B) Vue du dessus du canal. C) Vue latérale du canal.

1.1.2 Les canaux à deux pores

Les canaux à deux pores (K2P) ou à domaine pore tandem (Figure 2) ont été découverts en 1995(6) malgré leurs effets détectés dès 1952 par Hodgkin et Huxley(7). Ils ont permis d'expliquer le phénomène de fuite des ions K^+ de la cellule permettant ainsi le contrôle de l'excitabilité cellulaire. Ce canal se distingue des autres membres des familles de canaux potassiques par la présence de deux boucles de pore et quatre domaines transmembranaires et sont actifs par dimère(8). Ils jouent un rôle dans le contrôle des ions K^+ , le volume cellulaire, la sécrétion hormonale ainsi que dans les excitabilités musculaire et neuronale. Ces canaux peuvent être divisés en quatre groupes : TWIK1 et TWIK2 des rectificateurs entrants faibles ; TREK-1 et TRAKK des canaux à flux variable ; TASK-1 et TASK-2 sensibles à l'acidité ; KCNK6 et KCNK7 qui nécessitent un partenaire pour être activés. Des pathologies ont été répertoriées comme étant une conséquence du dysfonctionnement de ce canal : l'hypertension artérielle(9), la migraine(10), le syndrome de Birk-Barel(11), l'arythmie cardiaque(12) et le cancer(13).

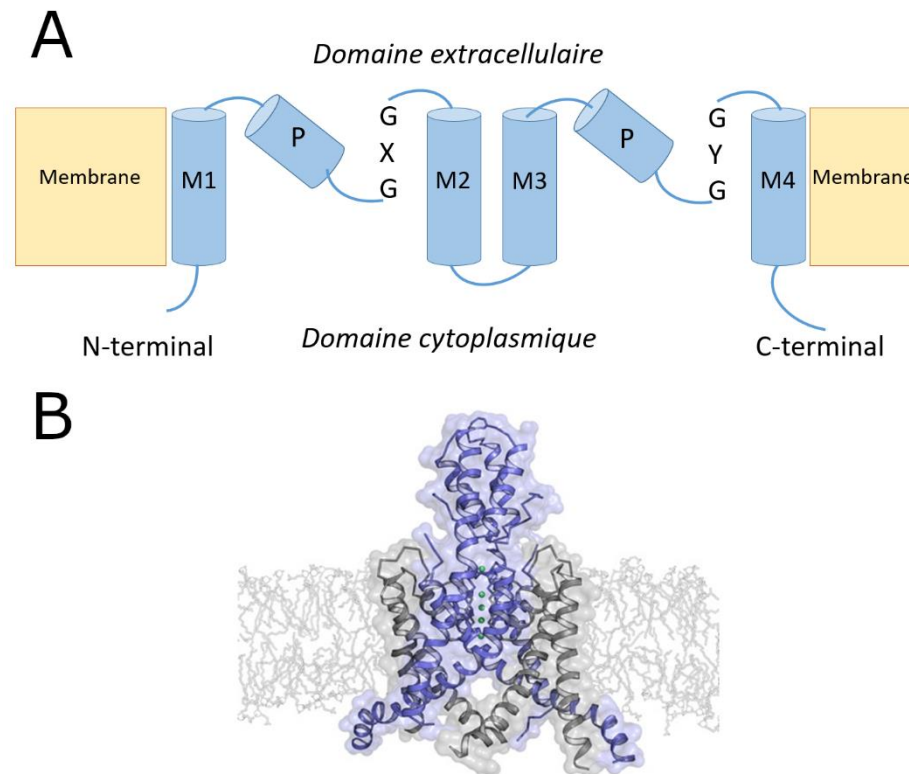


Figure 2 - Canaux à deux pores(K2P). A) Représentation schématique d'une unité du canal à deux pores.B) Représentation structurale du canal.

1.1.3 Les canaux dépendants du potassium

Ces canaux sont sensibles aux changements de potentiel et jouent un rôle crucial dans le retour du potentiel de repos à une valeur stable. Chaque chaîne est composée de six domaines transmembranaires numérotés de S1 à S6 (Figure 3). Une des spécificités des canaux activés par le potassium est la présence d'un domaine de capteur de tension appelée voltage sensor domain (VSD)(14, 15) sur chaque chaîne au niveau de S4. En effet, au niveau de S4, quatre à sept acides aminés positifs (en fonction du type de canal) forment le VSD. Ce domaine se trouve à la périphérie du canal et est attaché par des interactions faibles au domaine du pore (certaines structures montrent un détachement de ces deux parties : PDB : 2A79, 2R9R, 3BEH et 3LUT), cet espace entre ces deux domaines peut être occupé par des lipides (PDB 2R9R) jouant des rôles fonctionnels et structuraux importants(16–18). Ils sont composés de deux sous-structures appelées α et β . La sous-structure α se divise en 12 sous-familles nommées de $Kv\alpha 1-12$. Il en est de même pour β qui est capable de moduler l'activité du canal. Ces canaux sont actifs sous forme de tétramère.

Dans le cas de cellules nerveuses humaines, le lien entre le récepteur et des molécules telles que le glutamate cause l'ouverture du canal. Ceci déclenche l'ouverture des canaux sodiques : les ions Na^+ positifs entrent dans le milieu intracellulaire plus négatif entraînant la dépolarisation du potentiel membranaire. En conséquence, les canaux Kv s'ouvrent à leur tour permettant la sortie des ions K^+ de la cellule et ainsi un retour à la normale du potentiel membranaire(19).

Ces canaux peuvent entraîner des pathologies comme le syndrome de Morvan(20) ou encore des arythmies(21).

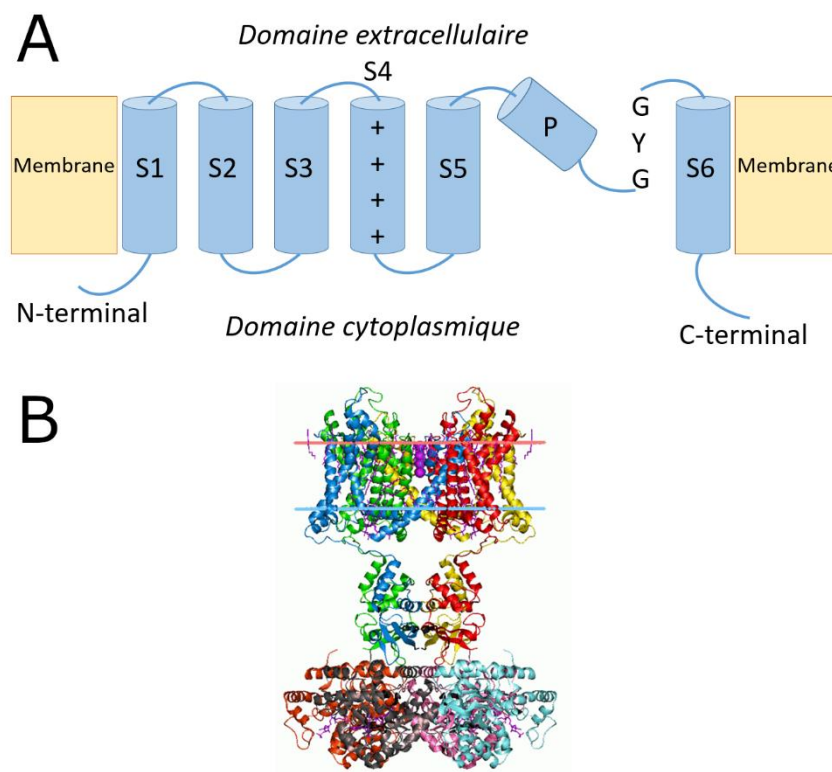


Figure 3 - Canaux dépendants du potassium (Kv). A) Représentation schématique d'une unité de canal dépendant du potassium. B) Représentation structurale d'un canal Kv .

1.1.4 Les canaux à rectification entrante

Les canaux à rectification entrante Kir (Figure 4) - nommés ainsi en raison de l'appellation anglaise Inwardly Rectifying Potassium (K^+) channel – sont ubiquitaires au sein du corps humain. Ils sont responsables de nombreux procédés physiologiques et leurs rôles dépendent de leurs localisations et de la nature du canal. Ils ont été trouvés dans les cellules cardiaques(22–26), les neurones(27–31), les globules rouges(32, 33), les ostéoclastes(34), les

cellules endothéliales(35), les cellules gliales(36, 37), les cellules épithéliales, les ovocytes(38–40).

Les canaux Kir permettent le transport plus facilement des ions K^+ vers l'intérieur de la cellule plutôt que vers l'extérieur. Les courants décrits par les canaux Kir ne suivent pas la cinétique du comportement d'Hodgkin-Huxley(41) et montrent un comportement éloigné des canaux Kv ; en effet les mouvements des ions K^+ semblent dépendre davantage du gradient électrochimique. L'explication du comportement de ce canal est apportée par l'asymétrie de l'ouverture du canal par l'intermédiaire de modulateurs intracellulaires comme des cations ou autres. Cette asymétrie de l'ouverture du pore a été observée dès la résolution de la première structure d'un canal Kir en 2003 par Kuo et al. (PDB 1P7B)(42) et dans toutes les autres structures déterminées par la suite. Ils expliquaient ainsi que le mauvais alignement des hélices du pore provoquait une déstabilisation au niveau de la cavité centrale conduisant à un état non conducteur.

Dans les conditions physiologiques, les canaux Kir montrent une grande conductance des ions K^+ à des valeurs de potentiels très négatives (inférieures au potentiel membranaire à l'équilibre) et une faible conductance lors d'une tendance inverse du potentiel(40, 43, 44). Les canaux Kir jouent donc un rôle clé dans la maintenance du potentiel membranaire de repos dans les cellules excitables telles que les cellules cardiaques.

Les canaux Kir ne possèdent pas de domaine sensible au voltage contrairement aux canaux Kv entraînant leur insensibilité au potentiel membranaire. Pour toutes valeurs de potentiel de repos membranaire les canaux sont actifs exceptés lors d'intervention régulatrice comme par exemple l'ATP responsable de la fermeture des canaux Kir6.x. La rectification entrante n'est donc pas une caractéristique intrinsèque du canal mais une conséquence d'un agent bloquant le flux des ions K^+ vers l'extérieur de la cellule. Les ions Mg^{2+} ainsi que les polyamines sont des espèces connues causant ces effets.

Des mutations au sein des canaux Kir peuvent entraîner des pathologies comme le syndrome d'Andersen(45, 46) pour le Kir2.1 et l'hyperinsulinisme(47–50) dans le cas du Kir6.2. Ces canaux sont actifs sous forme de tétramère.

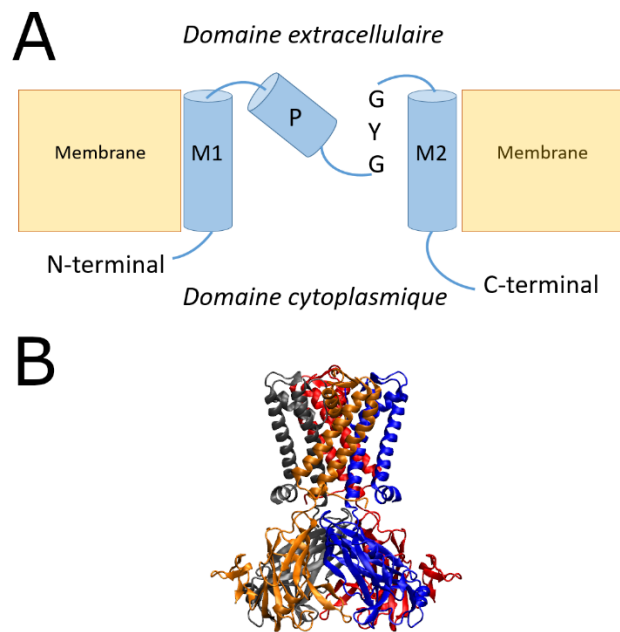


Figure 4 - A) Représentation schématique d'une unité de canal Kir. B-C) Représentation atomique provenant de PDB 2WLJ. B) Vue latérale du canal.

1.2 Chapitre 2 : Les canaux à rectification entrante Kir.

1.2.1 Les différentes sous-familles

Le canal Kir se présente sous la forme d'un tétramère qui peut s'avérer être un homo-tétramère lorsque la totalité de ces monomères sont identiques ou hétéro-tétramères lorsqu'au minimum une sous-unité du canal se différencie des autres(51). Les unités formant des canaux de type hétéro-tétramère sont pour le plus souvent issues de la même sous-famille de canaux(52) mais un mélange entre sous-famille est possible (comme Kir4.1 et Kir5.1 dans les cellules du foie de la souris). Les canaux Kir se divisent en sept sous-familles (Figures 5-6) dont l'appellation suit la nomenclature suivante : Kir1.x à Kir7.x où x représente le numéro des membres de ces sous-familles. Ces sous-familles sont catégorisées de la manière suivante :

- ✓ Kir2.x (canaux classiques) ;
- ✓ Kir3.x régulés par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui sont des récepteurs membranaires ;
- ✓ Kir6.x ou canaux K⁺ sensibles à l'ATP étroitement liés au métabolisme cellulaire ;
- ✓ Canaux de transports des ions K⁺ : Kir1.x, Kir4.x, Kir5.x, Kir7.x.

Une unité de canal Kir est composée de deux hélices transmembranaires et une seule boucle extracellulaire.

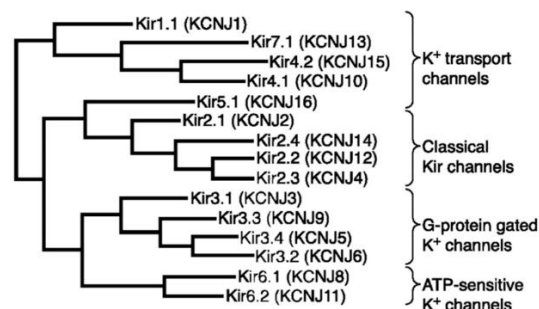


Figure 5 - Arbre phylogénétique des canaux Kir. (Adaptée d'Hibino(51))

Kir1.1 1 MNASSRNVFDLIRVLTESMFKHLRKW----V-V--TRFFG-HSRQRARLVSKDGRNCI
 Kir2.1 1 MGSVRTNR---YSIVSSEEDGMKLATMAVANGFGNGKSKVH-TRQQCRSRFVKKDGHCNV
 Kir3.1 1 MSALRRKFGDDYQVVTSSSGSGLQPQ---GPGQDPQQQLV-PKKKRQRFVDKNGRCNV
 Kir4.1 1 MTSVAKVYYSQTTQ--TES-----RPLMG-PGIRRRRVLTKDGRSNV
 Kir5.1 1 MSYYGSS---YHINADAKY-----PGYPPEHIAEKRRARRRLLHKDGSNCV
 Kir6.1 1 MLARKSIIPEEYVLARIAAE-----NLR--KPRIR-DRLPKARFIAKSGACNL
 Kir6.2 1 MLSRKGIPEEYVLRTRLAED-----P-A--EPRYR-ARQRARFVSKKGNVCNV
 Kir7.1 1 MDSSNCKVIAPL-----LSQRYRRMVTKDGHSTL
 KirBac1.1 1 MNVDPFSPHSSDSFA-QAA-----SPARK-PPRGGRRIW--SGTREV
 KirBac3.1 1 MTGGM-----K-PPARKPRILNSDGSSNI

Kir1.1 52 EFGNVEAQSRIFFVDIWTTLVLDLKWRYKMTIFITAFILGSWFFFGLLWYAVAYIHKDLPE
 Kir2.1 57 QFINVGEKG-QRYLADIFTTCDIRWRWMLVIFCLAFVLSWLFVFCVFWLIALLHGDLEDA
 Kir3.1 56 QHGNLGSSET-SRYLSDLFTTLVDLKWRLNLFIFILTYTVAWLFMASMWVVIAYTRGDLNK
 Kir4.1 40 RMEHIADKR-FLYKDLWTTFFIDMQWRYKLLFSATFAGTWFLFVWYLVAVAHGDLE
 Kir5.1 46 YFKHIFGEW-GSYVVDIFTTLVDTKWRHMFVIFSLYSILSWLIFGSVFWLIAFHGDLLN
 Kir6.1 46 AHKNIRE-Q-GRFLQDIFTTLVLDLKWPHLLVIFTMSFLCSWLLFAMWLLIAFAHGDLYA
 Kir6.2 45 AHKNIRE-Q-GRFLQDIFTTLVLDLKWPHLLVIFTMSFLCSWLLFAMWLLIAFAHGDLYA
 Kir7.1 30 QMDGA-QRG-LAYLRDAWGI LMDMRWRWMLVFSASFVHVLVFAVLWYVLAEMNGDLEL
 KirBac1.1 39 IAYGM---P-ASVWRDLYYALKVSWPVFFASLAALFVVNNTLFALLYQ-----LGDAP-
 KirBac3.1 24 TRLGL-E-K-RGWLDDHYHDLTVSWPVFITLITGLYLVNLFALAYL----ACGDV--

Kir1.1 112 FH-----PSANHTPCVENINGLTS AFLFSLETQVTIGYGFRCVTEQCATAIFLLIFQS
 Kir2.1 116 SK-----EGKACVSEVNSFTAFLFSIETQTTIGYGFRCVTECPVAVFMVVFQS
 Kir3.1 115 AH-----VGNYTPCVANVYNFSAFLFFIETEATIGYGYRYITDKCPEGIILFLFQS
 Kir4.1 99 LD-----PPANHTPCVQVHVLTGAF LFSLESQTTIGYGFYRISEECPLAIVLLIAQL
 Kir5.1 105 DP-----DITPCVDNVHSFTGAF LFSLETQTTIGYGYRCVTEECVAVLMVILQS
 Kir6.1 104 YMEKSGMEKSGLESTV CVTVNRSFTSAFLFSIEVQVTIGFGRMMTEECPLAITVLILQN
 Kir6.2 103 SE-----GTAEPCVTSIHSFSSAFLFSIEVQVTIGFGRMVTEECPLAILLIVQN
 Kir7.1 88 DHDA-----PPENHTICVKYITSFTA AFSFLETQLTIGYGTMFPSGDCPSAIALLAIQM
 KirBac1.1 89 -----IANQSPPGFVGAF FSVETLATVGYGDMHPQT--VYAHAIATLEI
 KirBac3.1 75 -----IENARPGSFTDAFFFSVQTMATIGYGKLIPIG--PLANTLVTLA

Kir1.1 165 ILGVIINSFMCGAILAKISRPKKRAKTITFSKNAVISKRGGKLCLLIRVANLRKSLIIGS
 Kir2.1 166 IVGCIIDAFIIGAVMAKMAKPKRNETLVFSHNAVIA MRDGLCLMWRVGNLRKSHLVEA
 Kir3.1 167 ILGSI VDAFLIGCMFIKMSQPKKRAETLMFSEHAVISM RDGKLTLMFRVGNLRNSHMVSA
 Kir4.1 152 VLTTILEIFITGTFLAKIARPKKRAETIRFSQHAVVASHNGKPCLMIRVANMRKSLIGC
 Kir5.1 155 ILSCIINTFIIGAALAKMATARKRAETIRFSYFALIGMRDGLCLMWRIGDFRPNHVEG
 Kir6.1 164 IVGLIINAVMLGCI FMKTAQAHRRAETLIFSRHAVIAVRNGKLCFMFRVGD LRKSMIISA
 Kir6.2 154 IVGLMINAIMLGCIFMKTQAHRRAETLIFSKHAVIALRHGR LCFMFRVGD LRKSMIISA
 Kir7.1 143 LLGLMLEAFITGAFVAKIARPKNRAF SIRFTDTAVVAHMDGKPNLIFQVANTRPSPLTSV
 KirBac1.1 132 FVGMGIALSTGLVFARFARPR---AKIMFARHAIVRPFNGRMTLMVRAANARQNVIAEA
 KirBac3.1 118 LCGMLGLAVAASLIYARFTRPT---AGVLFSSRMV ISDFEGKPTLMMLRANLRIEQIEA

Kir1.1 225 HIYGKLLKTTVTPEGETIILDQININ FVVDAGNENLFFISPLTIYHVIDHNSPFHMAAE
 Kir2.1 226 HVRAQLLKSRI TSEGEYIPLDQIDIN VGFDSGIDRIFLVSPITIVHEIDEDSPLYDL SKQ
 Kir3.1 227 QIRCKLLKS RQTPEGEFLPLDQLELDVGFSTGADQLFLVSPITICHVIDAKSPFYDLSQR
 Kir4.1 212 QVTGKLLQTHQTK EGENIRLNQVNVTFQVDTASDSPFLILPLTFYHVVDETSPLKDLPLR
 Kir5.1 215 TVRAQLLRYTEDS EGRMTM-AFKDLKL---VNDQIILVTPVTIVHEIDHESPLYALDRK
 Kir6.1 224 SVRIQVVKKTTTPEGEVPIHQLDIPVDNPIESNNIFLVAPLIICHVIDKRSPLYDISAT
 Kir6.2 214 TIHMVVRKTTSP EGEVPLHQVDIPMENG VGGNSIFLVAPLIYHVIDANSPLYDLAPS
 Kir7.1 203 RVSAVLYQERE--NGKLYQ-TSVD FHL DGISSDECPFFIFPLTYHHSITPSSPLATLLQH
 KirBac1.1 189 RAKMRLMRREHSSEGYSLM-KIHDLKL---VRNEHPIFLLGWNMMHVIDESSPLFGETPE
 KirBac3.1 175 DVHLVLRSEISQEGM VFR-RFHDLTL---TRSRSPIFSLSWTMHPIDHHSPIYGETDE

Kir1.1 285 TLL-QQDFELVFLDGTVESTSATCQVRTSYVPEEVLWGYRFAPIVSKTKEGKYRVDFHN
 Kir2.1 286 DID-NADFEIIVILEGMVEATAMTTQCRSSYLANEILWGHRYEPVLFEE-EKHYYKVDYSR
 Kir3.1 287 SMQ-TEQFEIIVILEGIVETTGMTQCARTSYTEDEVLWGHRRFPVISL-EEGFFKVDYSQ
 Kir4.1 272 S-G-EGDFELVLIILSGTVESTSATCQVRTSYLPEEILWGYEFTPALISLSASGKYIADFSL
 Kir5.1 270 AVA-KDNFEILVTFIYTG DSTGTS HQSRSSVYPREILWGHRRFNDVLEV-KRKYYKVNCLQ
 Kir6.1 284 DLA-NQDLEVIIVILEGVVETTGITTTQARTSYIAEEIQWGHRRFVSIVTE-EEGVYSVDYSK
 Kir6.2 274 DLHHHQDLEIIVILEGVVETTGITTTQARTSYLADEILWQRFVPIVAE-EDGRYSVDYSK
 Kir7.1 260 E-N-PSHFELVFLSAMQEGTGEICQRRTSYLPSEIMLHHCFAALLTRGSKGEYQIKMEN
 KirBac1.1 245 SLA-EGRAMLLVMIEGSDETTAQVMQARHAWEHDDIRWHHRYVDLMSD-VDGMTHIDYTR
 KirBac3.1 231 TLR-NSHSEFLVFLFTGHHEAFAQNVHARHAYSCDEIIVGGHFFVDVFTTLPDGRRALDLGK

Kir1.1 344 FSKTVE-VE-TPHCAM-----CL--YNEKDV-----R
 Kir2.1 344 FHKTYE-VPNTPLCSA---RD--LAEKK-----YI
 Kir3.1 345 FHATFE-VP-TPPYSV---KE--QEEMLLMSSPLIAPAITNSKERHNSVECLDGLDDIT
 Kir4.1 330 FDQVVK-VA-SPGLRDSTVRY--GDPEKL-----K
 Kir5.1 328 FEGSVE-VY-APFCSA----KQ--LDWKD-----QQ
 Kir6.1 342 FGNTVK-VA-APRCSA---RE--LDEKP-----SI
 Kir6.2 333 FGNTIK-VP-TPLCTA---RQ--LDEDH-----SL
 Kir7.1 318 FDKTVPEFP-TPLVSK---S--PNRTDL-----D
 KirBac1.1 303 FNDTEP-VE-PPGAAP---DAQAFAAKP-----
 KirBac3.1 290 FHEIAQ-----

Kir1.1 367 AR--M-----KR-----
 Kir2.1 368 LS--N---A-----NSF
 Kir3.1 397 TK--LPSKL-QKITGREDFPKLLRMSSTTSEK-----AYSLGDLPMKL---
 Kir4.1 357 LE--E-----SLREQA-----EKE
 Kir5.1 351 LHIEK---A-----PPVRESC-----TSDTK--ARRRSF
 Kir6.1 365 LI--Q---TLQSE-----L-SHQNSLRKRNSMRRNNSMRRNNSIRR-----
 Kir6.2 356 LE--A---L-TLA-----SARGPLRKR-----SVPM-----
 Kir7.1 341 IH--I-----N-----
 KirBac1.1 326 -----GE-----
 KirBac3.1 -----

Kir1.1 372 -----GYDN-----PN--FIL-----SEVNET
 Kir2.1 375 CY-----EN-EVALTSKEEDDSENGVPESTS-TDTPPDIDLHNQASVPLE---PRPLR
 Kir3.1 438 --QRISVPGNSEEKLVSKTTKMLSD--PMSQSVADLPPKLQKMAGGAARMENLPAKLR
 Kir4.1 369 -----GSAL-----S--VRI-----SN---
 Kir5.1 375 SAVAIIVSSCENPEETTTTSATHEYRET--PYQKA-----LLT---LNRIS
 Kir6.1 401 -----NNSSLMV-----PKVQFMT-----PEGNQ
 Kir6.2 376 -----AKAK-----PK--FSI-----SPDSLS
 Kir7.1 345 -----GQSI-----DN--FQI-----SETGLT
 KirBac1.1 328 -----GDAR-----PV-
 KirBac3.1 -----

Kir1.1 387 ---DDTKM
 Kir2.1 423 ---RESEI
 Kir3.1 494 KMNSDRFT
 Kir4.1 379 -----V
 Kir5.1 414 ---VESQM
 Kir6.1 420 N-TSES--
 Kir6.2 391 -----
 Kir7.1 360 -----E
 KirBac1.1 -----
 KirBac3.1 -----

Figure 6 - Alignement des différents membres des sous-familles des canaux Kir humains et bactériens. Les recouvrements identiques sont représentés en rouge, les recouvrements similaires en bleu.

1.2.2 Fonctionnement du canal

1.2.2.1 Le potentiel de repos transmembranaire

Les canaux potassiques se trouvent au sein de la membrane plasmique, ils sont responsables du maintien du potentiel de repos membranaire (Figure 7) qui correspond à la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Un tableau récapitulatif des concentrations ioniques est disponible (Tableau 1).

La perméabilité de la membrane, soit sa capacité à se laisser traverser par les ions, va jouer un rôle important dans la régulation du passage des ions. La perméabilité de la membrane est plus importante dans le cas des ions K^+ que des ions Na^+ . Au repos, les ions Na^+ sont en plus grande concentration à l'extérieur de la cellule alors que la concentration intracellulaire de K^+ est plus importante qu'au niveau extracellulaire. L'interface interne de la membrane est dans ce cas plus négative à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur, on dit que la membrane est polarisée. Le potentiel de repos membranaire est alors situé aux alentours de $-70mV$.

Pour expliquer comment les canaux régulent la répartition et les concentrations des ions de part et d'autre de la membrane, les canaux s'appuient sur deux notions clés : le gradient chimique et le gradient électrique. Le premier va diffuser les ions du système de plus haute concentration vers le système de plus basse concentration suivant ainsi un gradient de concentration. Il est nécessaire de se rappeler que les ions sont des espèces chimiques chargées, ainsi les ions positifs vont diffuser vers les milieux plus négatifs et inversement. Par conséquent, les canaux vont suivre un gradient électrochimique. Les canaux de fuite (potassiques et sodiques) permettent ainsi l'entrée du Na^+ au sein de la cellule et la sortie du K^+ à l'extérieur de la cellule. Il est nécessaire de maintenir une différence de potentiel entre les milieux intra et extracellulaires ; la pompe Na^+/K^+ ATPase joue ce rôle.

Trois ions Na^+ intracellulaires vont se positionner au sein de la pompe, la réaction entre la pompe et une molécule d'ADP permet le changement de conformation de cette pompe et cause la sortie de ces trois ions Na^+ de la cellule. Un nouveau changement de conformation de la pompe permet l'entrée de deux ions K^+ extracellulaires dans la cellule. Ce travail de la pompe

permet de conserver une concentration en K^+ plus importante à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur et une concentration de Na^+ plus importante à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule.

Tableau 1 - Récapitulatif des concentrations intracellulaires et extracellulaires des différents ions.

Ions	Concentration intracellulaire (mM)	Concentration extracellulaire (mM)
Cations		
Na^+	5-15	145
K^+	140	5
Mg^{2+}	0.5	1-2
Ca^{2+}	10^{-4} mais variations possibles	1-2
H^+	7×10^{-5} ($10^{-7.2}M$ ou $pH=7.2$)	4×10^{-5} ($10^{-7.4}M$ ou $pH=7.4$)
Anions		
Cl^-	5-15	110

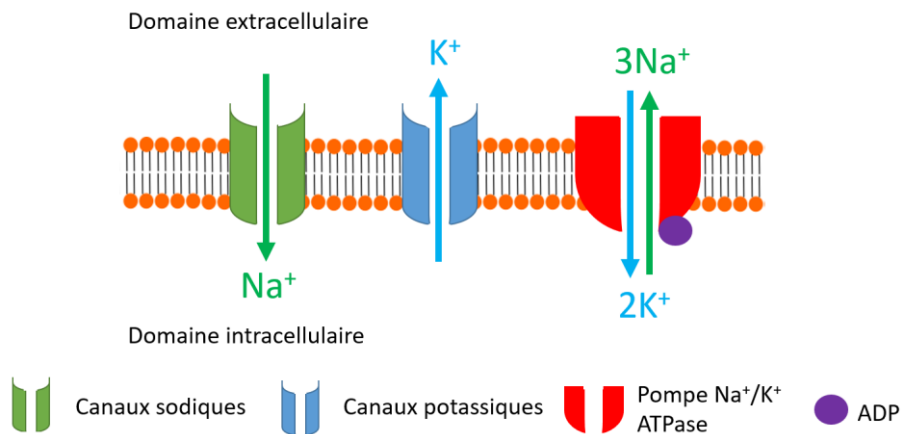


Figure 7 - Potentiel de repos.

1.2.2.2 Le potentiel d'action

Le potentiel d'action (Figure 8) est défini comme une inversion brutale et transitoire du potentiel de la membrane, il se propage tout au long de la membrane – il sera ainsi responsable de la propagation du signal dans les neurones. Pour chaque cellule, l'amplitude du potentiel d'action est identique, son intensité est alors évaluée en fonction de la fréquence du potentiel d'action. Lorsque la différence de potentiel entre les deux interfaces de la membrane est excessive, il existe un seuil critique au-delà duquel le canal sodique dépendant du potentiel

s'ouvre. Cette ouverture cause une entrée importante des ions Na^+ dans la cellule, il s'agit de la phase de dépolarisation(53, 54). En conséquence, les ions K^+ sortent de la cellule suivant leur gradient de concentration pour atteindre le potentiel de repos : il s'agit de la phase de repolarisation. A ce stade, les canaux sodiques sont inactifs et la pompe Na^+/K^+ extrait les ions Na^+ de la cellule et intègre les ions K^+ dans cette dernière. Le retard des ions K^+ pour entrer dans la cellule est responsable d'une hyperpolarisation qui va s'atténuer peu à peu.

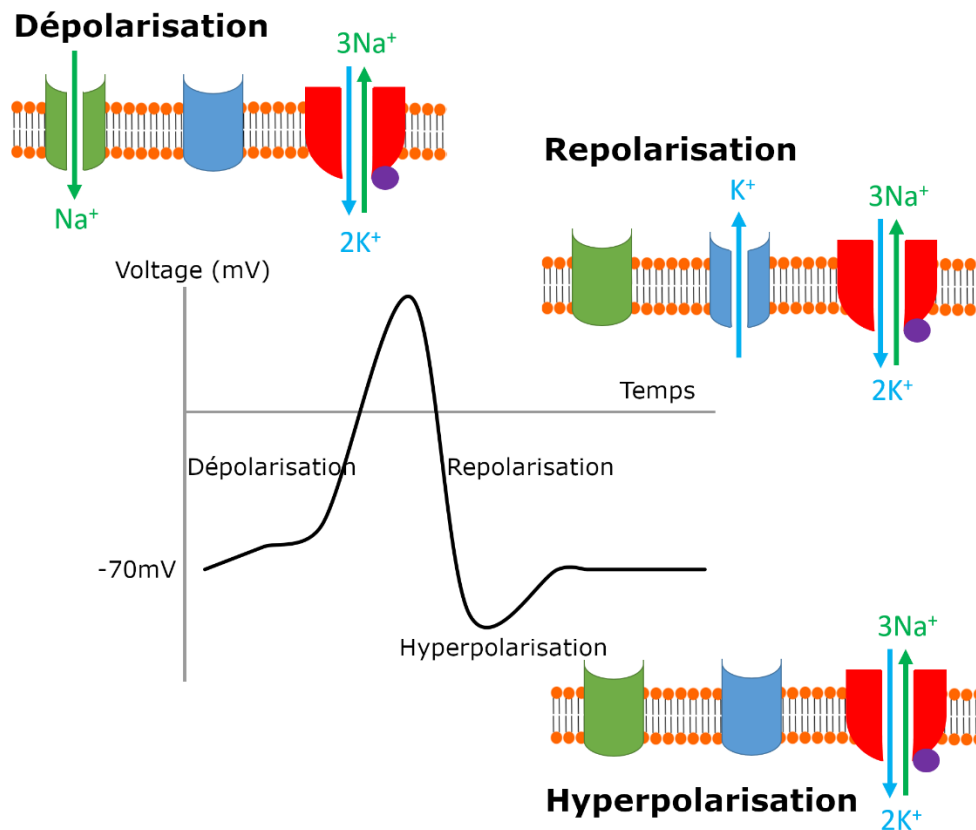


Figure 8 - Potentiel d'action.

1.2.2.3 La rectification entrante des canaux Kir

L'activité physiologique du canal repose sur trois critères : la régulation de l'ouverture du pore, le flux des ions et la localisation du canal dans la cellule. Les deux premiers sont souvent déterminés par des agents extérieurs qui vont entrer en interaction directe avec des zones cibles du canal. Un courant potassique rectifiant entrant est un courant causé par un canal ionique spécifique au potassium. Au potentiel de repos, le mouvement des ions K^+ est paradoxalement dans le sens sortant dans ce type de canal.

La rectification entrante des flux d'ions K^+ résulte de l'interaction entre deux espèces intracellulaires : le Mg^{2+} et les polyamines avec le pore du canal. Ces interactions vont annuler la perméabilité de la membrane au potassium en liant les domaines transmembranaires et cytoplasmiques(55, 56). Des études sur les cellules cardiaques ont montré que les ions Mg^{2+} entraînaient une rectification entrante instantanée où les ions K^+ entrent plus vite qu'ils ne sortent(57), suivie par une amélioration de cette rectification par un mécanisme d'ouverture du canal(58), cependant cette amélioration est perdue en présence de polyamines tels que la spermine(59, 60, 55, 61). Lors des phases dites de dépolarisation, les polyamines entraînent une diminution des courants des ions K^+ vers l'extérieur de la cellule alors que lors de l'hyperpolarisation le flux des ions K^+ entrants augmente avec le déblocage des ions Mg^{2+} et continue d'augmenter lors du déblocage des polyamines(62). Les différents canaux ne montrent pas un même niveau de rectification. Ils sont en effet classés en 3 catégories : rectification forte (Kir2.x, Kir3.x), intermédiaire (Kir4.x) et faible (Kir1.1 et Kir6.x). Une zone du canal située au niveau du résidu ASP172 (nomenclature de Kir2.1) sur l'hélice interne a été suspectée de jouer un rôle déterminant dans les rectifications fortes. L'étude des sites de fixation des ions Mg^{2+} et des polyamines a démontré qu'il existait plusieurs sites de fixation pour chacun d'entre eux. Il existe une compétition entre la fixation de ces deux espèces, cette compétition joue un rôle majeur sur l'importance des courants sortants des ions K^+ (63).

1.2.2.4 Facteurs d'influence sur l'activité des canaux Kir

Dans le précédent paragraphe a été noté l'impact des ions Mg^{2+} et des polyamines sur l'activité du canal. Cependant ces deux espèces ne sont pas les seules à avoir une influence sur l'ouverture du canal.

- ✓ La concentration des ions K^+ extracellulaires. Tous les canaux (excepté Kir7.1) montrent une conductance accrue avec l'augmentation de la concentration des ions K^+ extracellulaires. Les conductances relevées au cours d'une étude sur Kir2.1 sans Mg^{2+} et polyamines ont montré cette même relation entre la concentration des ions potassium et l'ouverture du canal(64).
- ✓ Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2). Des études ont montré que le PIP2 était essentiel pour maintenir la fonction des canaux Kir(65–68). En effet, lors d'études de l'impact de certaines mutations situées en C-terminal, il a été suggéré que le PIP2

interagissait avec des résidus chargés positivement(67, 69), une structure résolue en présence de PIP2 en 2011 (PDB 3SPI)(70) l'a confirmé.

- ✓ Autres molécules. Différents facteurs ont été reconnus comme ayant un impact sur le fonctionnement du canal. Par exemple, dans les cas des canaux Kir1.1, Kir2.3 et Kir4.1 un pH acide inhibe l'activité du canal. Kir3.2 et Kir3.4, quant à eux montrent une dépendance à la concentration intracellulaire des ions Na^+ (71, 72), une forte concentration favorisant l'activité du canal. Les canaux Kir6.x sont inhibés dans le cas d'une forte concentration d'ATP intracellulaire ; ce dernier étant en interaction directe avec le domaine cytoplasmique(73–81). Il est à noter que les Kir6.1 et Kir6.2 sont couplés à des récepteurs sulfonylurée (SUR), ces derniers lorsqu'ils sont liés aux nucléosides diphosphates vont activer l'ouverture du pore(82–87).
- ✓ Phosphorylation. La phosphorylation des canaux Kir peut en effet influencer leur activité. Par exemple la phosphorylation par protéine kinase A de Kir6.1 et de SUR2B va augmenter l'activité du canal(88, 89).
- ✓ Interactions protéines/protéines. Les interactions protéines/protéines sont en effet impliquées dans l'ouverture du canal. Le meilleur exemple ici est l'interaction des canaux Kir6.x avec les SUR. La partie cytoplasmique des SUR va interagir avec Kir6.x pour modifier l'activité du canal(78, 90).

1.2.3 Structure du canal

1.2.3.1 Présentation générale

Les canaux Kir s'organisent au sein de trois domaines : cytoplasmique, membranaire et extracellulaire (Figure 9). Des parties N à C-terminales, les canaux Kir2.1 et Kir6.2 sont construits ainsi :

- ✓ au niveau du domaine cytoplasmique : une hélice de côté à proximité de la membrane, sa séquence est conservée à travers les différentes familles de Kir(51);
- ✓ au niveau du domaine membranaire : une hélice externe ;
- ✓ au niveau du domaine extracellulaire sont présents deux petits feuilletts β et des boucles ;
- ✓ au niveau du domaine membranaire :
 - ✓ l'hélice du pore
 - ✓ le filtre sélectif
 - ✓ l'hélice interne

- ✓ le domaine cytoplasmique composé en majorité de feuillets β et de boucles. Le domaine cytoplasmique varie en fonction des différentes familles de canaux Kir. Cependant les séquences des domaines à proximité de la membrane en C-terminal sont conservées(51).

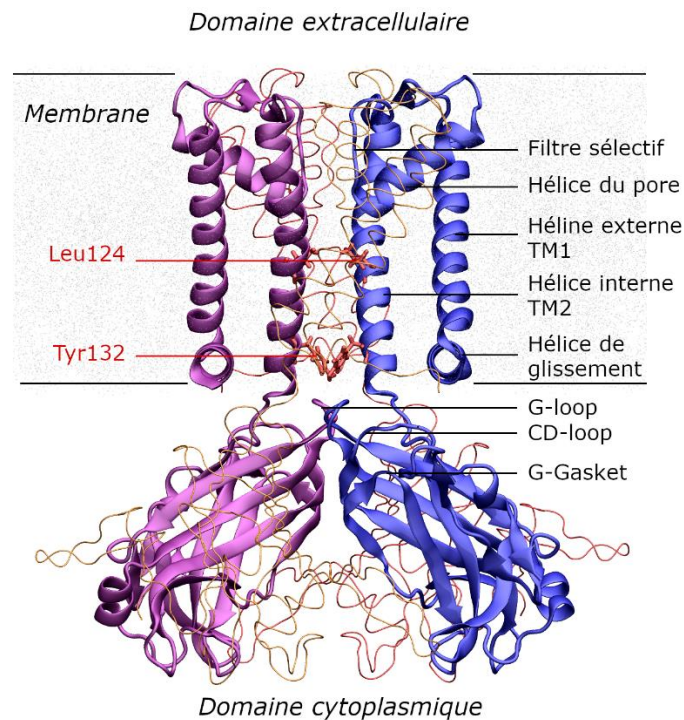


Figure 9 - Présentation des différents éléments composant le KirBac3.1. En rouge sont présentés les deux points de constriction du canal : Leu124 et Tyr 132.

Pour accomplir leurs rôles, les canaux K^+ doivent être capables de distinguer les ions K^+ des ions Na^+ . Ces deux types d'ions présentent le même type de charge, cependant leurs diamètres varient : l'ion K^+ est plus large que les ions Na^+ . Cette différence permet la perméabilité des ions K^+ et l'imperméabilité des ions Na^+ . Une courte séquence TXG[F/Y]G localisée dans le pore du canal est conservée dans toutes les familles de canaux K^+ . Ce domaine – le plus étroit du canal – est responsable de la sélectivité des canaux aux ions K^+ (91), il est appelé filtre sélectif. En solution, les ions K^+ sont entourés de molécules d'eau (K^+ hydratés). Lors du passage du K^+ au niveau du filtre sélectif, le canal est trop étroit pour accueillir l'ion et les molécules d'eau l'entourant. Les ions K^+ vont donc se déshydrater et le potassium ne va plus interagir avec le dipôle négatif de l'eau mais avec les atomes d'oxygène composant le squelette (dit backbone) du canal(92). Il est impossible pour les ions Na^+ de suivre le même processus : les ions Na^+ plus petits et étant mal déshydratés ne sont pas capables d'interagir

avec les atomes oxygène des chaînes principales opposées et ces dernières ne peuvent se rapprocher pour rétrécir le diamètre du canal suffisamment pour permettre cette interaction. Ces éléments expliquent l'imperméabilité de ces canaux aux ions Na^+ (93).

Tous les canaux Kir possèdent deux hélices transmembranaires : externe (TM1) et interne (TM2). Ces deux hélices sont reliées par le domaine du pore (composé de l'hélice et de deux boucles du pore).

La partie du canal la plus proche du domaine cytoplasmique est une cavité dont le volume est défini par la proximité du bas des hélices transmembranaires les unes par rapport aux autres. A ce niveau, le canal n'est plus sélectif spécifiquement aux ions K^+ , il laisse aussi passer tous les autres ions monovalents tels que le Na^+ , le Rb^+ ou encore le Li^+ , de plus cette cavité possède de nombreuses molécules d'eau.

1.2.3.2 Les canaux Kir2.1

Ces canaux peuvent être trouvés au niveau du cerveau, du cœur, des muscles squelettiques, des cellules macrophages. Il permet de maintenir le potentiel de repos membranaire et la repolarisation membranaire suite au potentiel d'action cardiaque, ils sont responsables d'une forte rectification. Ils sont souvent écrits sous forme de quatre monomères identiques où chaque chaîne est composée de 427 acides aminés pour un poids moléculaire de 48 288 Da. Cependant il a été observé que les tétramères formés pouvaient être un assemblage Kir2.1/Kir2.2 ou encore Kir2.1/Kir4.1. Leur conductance est estimée à 23 pS(94). Les canaux Kir2.1 sont activés par : la phosphorylation par PKA, l'hydrolyse de l'ATP(95) ainsi que par le PIP2(67, 96). Les bloqueurs connus du canal sont les ions Cs^+ , Rb^+ (97), Ba^{2+} (98), les ions Mg^{2+} intracellulaires, la putrescine et la spermine(99).

1.2.3.3 Le canal Kir6.2

Les canaux Kir6.2 appelés aussi canaux K_{ATP} sont localisés au niveau des cellules β pancréatiques, le cœur, les muscles squelettiques ainsi que le cerveau. Chaque chaîne est composée de 390 acides aminés d'un poids moléculaire de 43 541 Da. Pour son bon fonctionnement, ce canal est associé à des récepteurs sulfonylurée (SUR) plus exactement SUR1, SUR2A et SUR2B à raison d'une SUR par chaîne. Leur conductance est comprise entre 65 et 80 pS. Ces canaux sont activés par le MgADP, le diazoxide, le pinacidil, la cromakalime, le nicorandil et bloqués par les SUR, les dérivés de benzamide et les glinides. Le Kir6.2 est

responsable de la régulation de la sécrétion de l'insuline dans les cellules β pancréatiques(100), de la capture d'oxygène et de glucose au niveau du cerveau(101), de la cytoprotection pendant une ischémie cérébrale et cardiaque(102, 103), l'assimilation de glucose dans les muscles squelettiques et dans les tissus adipeux(104).

1.2.3.4 Le canal KirBac3.1

La structure du canal Kir2.1 n'a pas encore été résolue, concernant celle du canal Kir6.2, ce n'est que récemment qu'une structure de résolution satisfaisante a été déterminée(105). Pour mener à bien l'étude de la dynamique de ces canaux, un homologue bactérien KirBac3.1 a été utilisé. Un alignement des séquences montre un pourcentage d'identité de 27,21% et un recouvrement de 70% avec Kir2.1 humain (Figure 10A) ; ainsi qu'un pourcentage d'identité de 28,85% et un recouvrement de 80% avec Kir6.2 humain (Figure 10B).

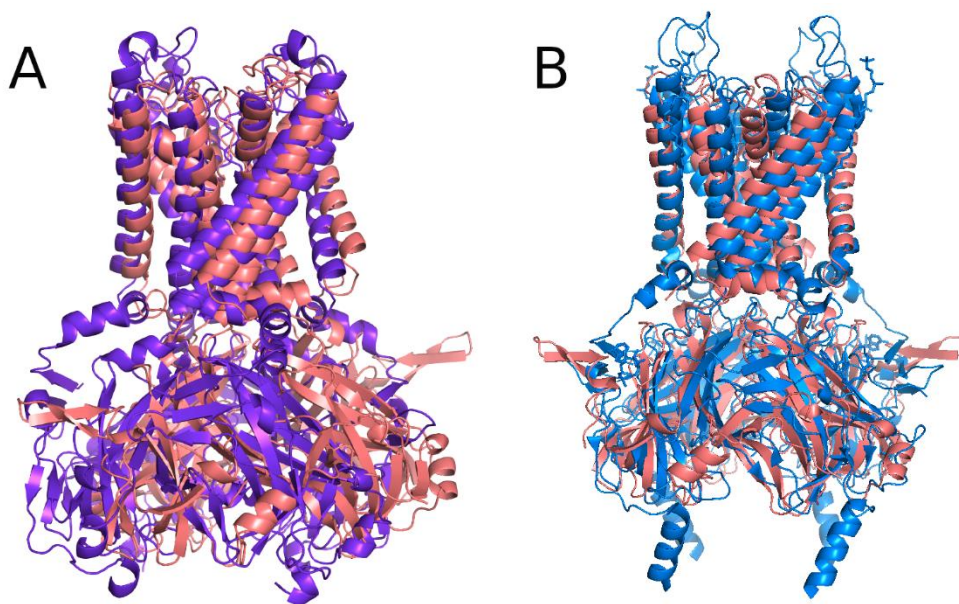


Figure 10 - Alignement des canaux humains Kir sur KirBac3.1. A) Alignement du canal KirBac3.1 (rouge) sur le canal humain Kir2.1 (violet). B) Alignement du canal KirBac3.1 (rouge) sur le canal humain Kir6.2 (bleu).

La structure du canal bactérien KirBac3.1 a été résolue à l'état fermé(106) ainsi qu'à l'état ouvert après mutation(107). Le tableau 2 liste les structures résolues de ce canal à une résolution inférieure à 4Å, ce qui nous permet de remarquer que KirBac3.1 a été rarement résolue à l'état ouvert.

Tableau 2 - Récapitulatif des différentes structures résolues de KirBac3.1 répertoriées dans la base de données des PDB.

PDB ID	Etats	Mutations	Organismes	Résolution
1XL4	Intermédiaire	WT	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	2.6 Å
1XL6	Intermédiaire	WT	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	2.85 Å
2WLH	Fermé	WT	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	3.28 Å
2WLI	Fermé	WT	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	3.09 Å
2WLJ	Fermé	WT	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	2.6 Å
2WLK	Intermédiaire	WT	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	2.8 Å
2WLM	Fermé	WT	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	3.61 Å
2WLN	Fermé	WT	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	3.44 Å
2X6C	Intermédiaire	Q170A	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	2.7 Å
3ZRS	Ouvert	S129R	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	3.05 Å
4LP8	Ouvert	S129R, S205L	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	2.46 Å

Les comparaisons réalisées dans la littérature entre l'état fermé et l'état ouvert ont montré plusieurs différences structurales reflétant des mouvements potentiellement responsables de l'ouverture du canal :

- ✓ une rotation du domaine cytoplasmique de l'ordre de 30° (107, 108),
- ✓ un pli (kink) des hélices transmembranaires TM1 et TM2 d'approximativement 20° (42, 109),
- ✓ l'expansion des hélices de glissement vers l'extérieur du canal (109),
- ✓ une rotation vers l'extérieur du canal de l'hélice TM2 (25°) (109).

Ces observations et comparaisons ont donné lieu à la proposition du mécanisme « twist-to-open »(107). Cette hypothèse repose sur la rotation du domaine cytoplasmique. Ce dernier interagissant avec les hélices de glissement les entrainerait (par cette rotation) vers l'extérieur du canal. Les hélices de glissement étant reliées aux hélices externes, tireraient les hélices transmembranaires avec elles permettant ainsi l'ouverture du canal. (Figure 11)

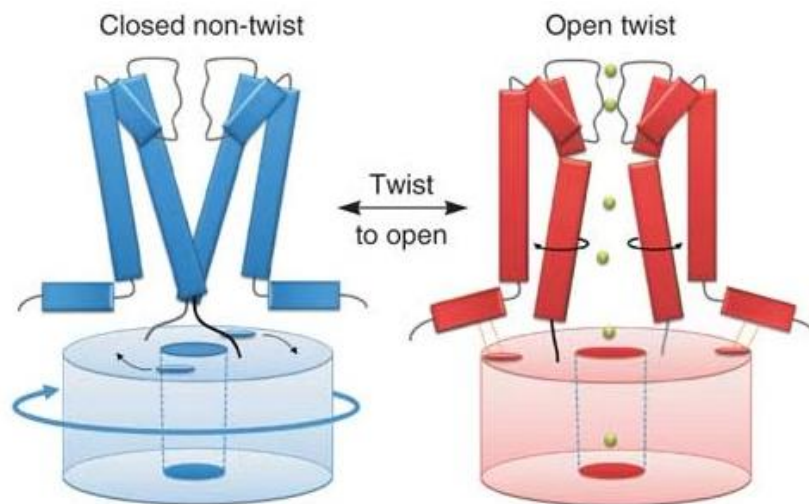


Figure 11 - Description du mécanisme twist-to-open, figure issue de Bavro(107).

1.2.4 Pathologies

Les canaux Kir sont impliqués dans certaines pathologies comme l'empoisonnement au baryum, des troubles neuropsychiatriques, la fibrillation auriculaire, le syndrome QT court de type 3, le syndrome de Bartter. Cette partie se focalisera sur le syndrome d'Andersen et l'hyperinsulinisme, deux pathologies entraînées par le dysfonctionnement des canaux Kir2.1 et Kir6.2 respectivement.

1.2.4.1 Pathologie dépendante du canal Kir2.1 : le syndrome d'Andersen

Une mutation du canal Kir2.1 peut entraîner un dysfonctionnement et générer des pathologies. Le syndrome d'Andersen (appelé aussi syndrome d'Andersen-Tawil ou syndrome QT long de type 7) est décrit pour la première fois en 1963(110) et son lien direct avec les canaux Kir2.1 est établi en 2001(111): 60% des individus touchés par ce syndrome possède une mutation sur le gène KCNJ2. Le syndrome d'Andersen est une maladie rare avec une prévalence estimée à une personne sur un million. Elle cause la triade de symptômes suivants :

une arythmie ventriculaire, une dysmorphie caractéristique (front large, augmentation de la distance entre les yeux : hypertélorisme, ...) et des paralysies périodiques(112). Cette pathologie ne connaît pas encore de traitement efficace bien que la flécaïnide(113, 114) ou des β -bloquants(115) puissent être délivrés au patient pour améliorer son état de santé. Le patient peut aussi dans certains cas être amené à porter un pacemaker. Cette maladie peut entraîner la mort subite du patient. Kir2.1 est un agent majeur dans la phase terminale de la repolarisation des cellules cardiaques, d'ailleurs ce canal est le plus abondant dans les tissus ventriculaires(116, 117). La perte de fonction de Kir2.1 entraîne la génération de potentiel d'action spontanée dans les myocytes isolés(118).

1.2.4.2 Sièges de mutations pathologiques pour Kir2.1

Le canal Kir2.1 dépend du gène KCNJ2 situé sur le chromosome 13. A ce jour, 38 mutations (perte de fonction) ont été répertoriées causant le syndrome d'Andersen(119–121). Ces mutations (Figure 12) sont répertoriées dans le domaine N-terminal dans le domaine cytoplasmique : C54F, R67W/Q, R68Y, D71V/N, T74A, T75R/A/M, D78Y ; sur l'hélice externe : R82W/Q, dans le domaine extracellulaire : V123G, C154F ; sur l'hélice du pore et ses boucles: S136F, G144S/A/D, G146D et dans le domaine cytoplasmique au niveau du domaine C-terminal : P186L, R189I, T192A, G215D, N216H, L217P, R218W/Q, V227F,V296F, G300V/D,V302M, E303K,T305A/P,T309I et R312C/H. Trois régions où des délétions d'acides aminés se produisent causent le syndrome : au niveau de l'hélice externe : résidus 95 à 98, de l'hélice interne : résidus 163 et 164 ainsi que dans le domaine cytoplasmique : résidus 314 et 315. D'autres mutations ont été répertoriées causant d'autres pathologies comme le syndrome QT court de type 3 par la mutation D172N sur l'hélice interne ou encore la mutation V93I dans l'hélice externe qui entraîne quant à elle une fibrillation auriculaire.

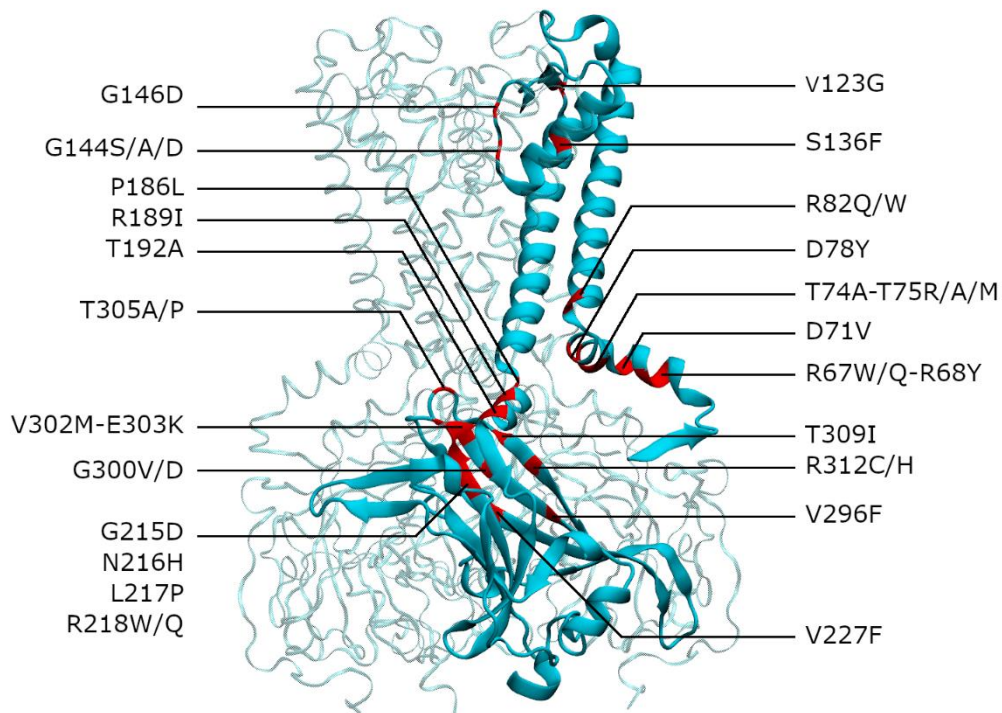


Figure 12 - Localisation des mutations causant le syndrome d'Andersen sur le canal Kir2.1 humain.

1.2.4.3 Pathologie dépendante du canal Kir6.2 : l'hyperinsulinisme

Approximativement 50% des diabètes de type permanent montrent une mutation au niveau du canal Kir6.2, c'est dans ce cas un gain de fonction(122–128). Les cas les plus sévères sont atteints du syndrome de DEND soit Developmental delay, Epilepsy and Neonatal Diabetes. Ce syndrome est caractérisé par un retard du développement, une faiblesse musculaire, l'épilepsie, des dysmorphies caractéristiques et un diabète néonatal(124, 126, 127, 129, 130). La réduction de la sensibilité à l'ATP est responsable des caractéristiques(131). Les mutations entraînant cette pathologie se situent au niveau de l'hélice de glissement et causent une ouverture plus fréquente du canal réduisant ainsi la sensibilité à l'ATP(132). Les patients atteints de cette pathologie sont aujourd'hui traités par des prises orales de sulfonylurées. Cette maladie touche une personne sur 50 000.

1.2.4.4 Sièges de mutations pathologiques pour Kir6.2

Le canal Kir6.2 est déterminé par le gène KCNJ11 positionné sur le chromosome 11. 18 mutations (gain de fonction) ont été détectées comme responsables de l'hyperinsulinisme (Figure 13). Il s'agit des mutations situées au niveau du domaine N-terminal dans le domaine

cytoplasmique : R34H, G40D, F55L, K67N, W68R ; de l'hélice externe : W91R, du domaine extracellulaire : A101D, S116P ; du domaine du pore et de ses boucles : G134A, R136L ; de l'hélice interne : L147P, G156R et du domaine C-terminal dans le domaine cytoplasmique D204E, P254L, H259R, P266L, E282K, R301H. D'autres mutations (gain de fonction) ont été répertoriées entraînant un diabète néonatal permanent(124, 126–129, 133–140), il s'agit des 31 mutations suivantes : F35V/L, C42R, H46Y, R50P/Q, Q52R, G53R/S/N/D, V59M/G, F60Y, V64L, L164P, C166F/Y, I167L, K170R/N/T, I182V, R201H/C/L, I296L, E322K, Y330C/S, F333I.

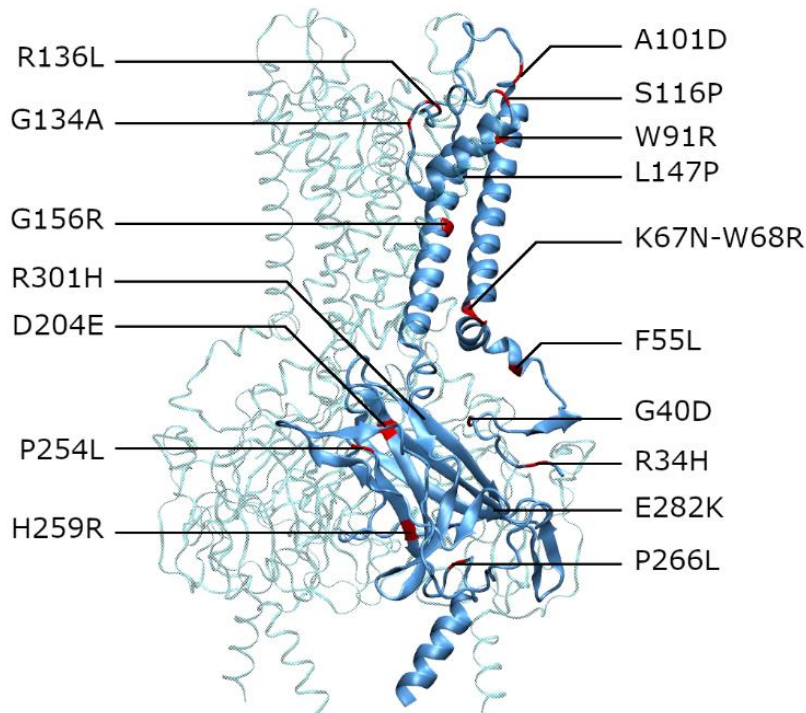


Figure 13 - Localisation des mutations responsables de l'hyperinsulinisme sur le canal Kir6.2 humain.

2 Partie 2 : Etude du gating du canal bactérien KirBac3.1

2.1 Chapitre 1 : Etudes in silico du canal

Déterminer le mécanisme d'ouverture/fermeture du canal Kir est l'un des enjeux majeurs de cette thèse. Pour y parvenir, j'ai étudié cette protéine sous l'angle dit *in silico*. Ce terme d'inspiration latine signifie mot à mot « en silice », il est utilisé pour qualifier des expériences biologiques réalisées sur ordinateur. Ce travail a en effet fait appel à des méthodes de bioinformatique structurale : la construction du modèle en 3 dimensions (3D) dans un premier temps puis l'application de simulations de dynamique moléculaire pour comprendre la dynamique du système. Ce chapitre a vocation de détailler les différentes méthodes utilisées pour étudier le canal bactérien KirBac3.1.

2.1.1 Modélisation Moléculaire

Le système biologique étudié ici est une protéine, ainsi il est important de prendre connaissance de son organisation avant de débiter la modélisation. Il existe une vingtaine d'acides aminés dans la nature. A l'état physiologique, chacun a ses caractéristiques concernant sa taille, sa charge, sa polarité et son hydrophobicité. L'enchaînement de ces résidus constitue la séquence d'une protéine, ainsi la combinaison de leurs caractéristiques aboutit à une structure unique. Les protéines possèdent quatre niveaux de structure :

- ✓ primaire : ce niveau correspond à la séquence en acides aminés de la protéine ;
- ✓ secondaire : ce degré prend en compte les liaisons hydrogènes entre l'hydrogène du groupe amine et l'oxygène du groupe carboxyle. Ces liaisons permettent la formation de motifs élémentaires comme les hélices α et les feuillets β .
- ✓ tertiaire : ce niveau est essentiel, la distribution des structures secondaires va imposer un repliement à la protéine et lui conférer ainsi une structure spatiale caractéristique. Cette structure est appelée structure native, et est dépendante des interactions covalentes, des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et électrostatiques, de Van der Waals et des forces répulsives. La structure tertiaire est fondamentale dans l'étude de la localisation des sites actifs ainsi que des sites de liaison à des molécules. En 1972, Anfinsen gagne le prix Nobel de chimie en 1972 en démontrant que la séquence primaire renferme toute l'information nécessaire au repliement d'une protéine dans sa structure naturelle c'est-à-dire son état fonctionnel.

- ✓ quaternaire : cette dernière n'existe qu'en cas de complexes puisqu'elle décrit l'assemblage de plusieurs polypeptides par exemple une protéine à plusieurs chaînes.

La structure d'une protéine est essentielle pour cerner son fonctionnement. Une hypothèse a été formulée selon laquelle la protéine ne peut réaliser sa fonction biologique uniquement si elle se replie en une structure unique déterminée par sa séquence en acides aminés afin d'adopter la conformation nécessaire à sa fonction. Il existe certains cas où les protéines ne satisfont pas cette hypothèse, elles sont appelées protéines désordonnées; ces cas représentent 30% (141) des séquences protéiques, qui doivent être désordonnées pour accomplir leur fonction. Malgré l'existence de ces protéines désordonnées, la détermination de la structure est une étape clé dans la compréhension de la fonction d'une protéine au sein de la cellule(142–145).

La prédiction structurale a pour finalité de construire un modèle d'un système en 3 dimensions. Les structures 3D sont résolues par différentes méthodes expérimentales comme la diffraction des rayons X (cristallographie), la microscopie électronique (cryo-microscopie électronique) ou encore la spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Cependant, la procédure de résolution d'une structure est complexe, coûteuse et chronophage. Il est donc peu surprenant de réaliser que la résolution de structures ne suit pas la vitesse de la détermination de séquences.

Les séquences sont répertoriées dans des bases de données depuis 1965 sur l'initiative de Margaret Dayhoff. Depuis 2003 la base de données UniProt(146) (Universal Protein Resource) a collecté (le 16/10/2019) 340 417 070 séquences. Du côté des structures, des bases de données ont également vu le jour, la plus importante : la RCSB Protein DataBank(147) appelée communément PDB compte 156 954 structures soit moins de 0.05% des séquences existantes.

Il est par conséquent facile de comprendre pourquoi la modélisation des structures est devenue un enjeu majeur pour les chercheurs. D'ailleurs, depuis 1994 le concours CASP : Critical Assessment of Structure Prediction(148) a lieu tous les deux ans dans l'optique de tester les différentes méthodes de prédiction. Il a permis de mettre en lumière les méthodes les plus efficaces en modélisation moléculaire. Ces méthodes explorées ont été classées en 4 catégories(141) : les méthodes de premier principe sans (i) et avec (ii) informations issues de

bases de données, iii) reconnaissance de repliements et méthode de « filetage » (threading) et (iv) la modélisation comparative avec des stratégies d'alignement de séquences.

2.1.1.1 Les différentes approches en Modélisation Moléculaire

2.1.1.1.1 Méthodes de premier principe sans information issue de bases de données

Comme son nom l'indique, cette première méthode ne s'appuie pas sur des informations disponibles dans les bases de données. Cela signifie que pour déterminer le repliement de la structure (c'est-à-dire la structure 3D caractéristique qu'adopte un polypeptide pour être fonctionnel), elle n'est pas limitée aux repliements déjà connus et répertoriés. Son point fort est la capacité de modéliser de nouveaux repliements qui n'auraient pas encore été observés.

La nature dispose d'un nombre de repliement limité(149–151), à ce jour nous disposons de la connaissance de 1375 types de repliement (Figure 14) extraits des protéines dont la structure est connue(152).

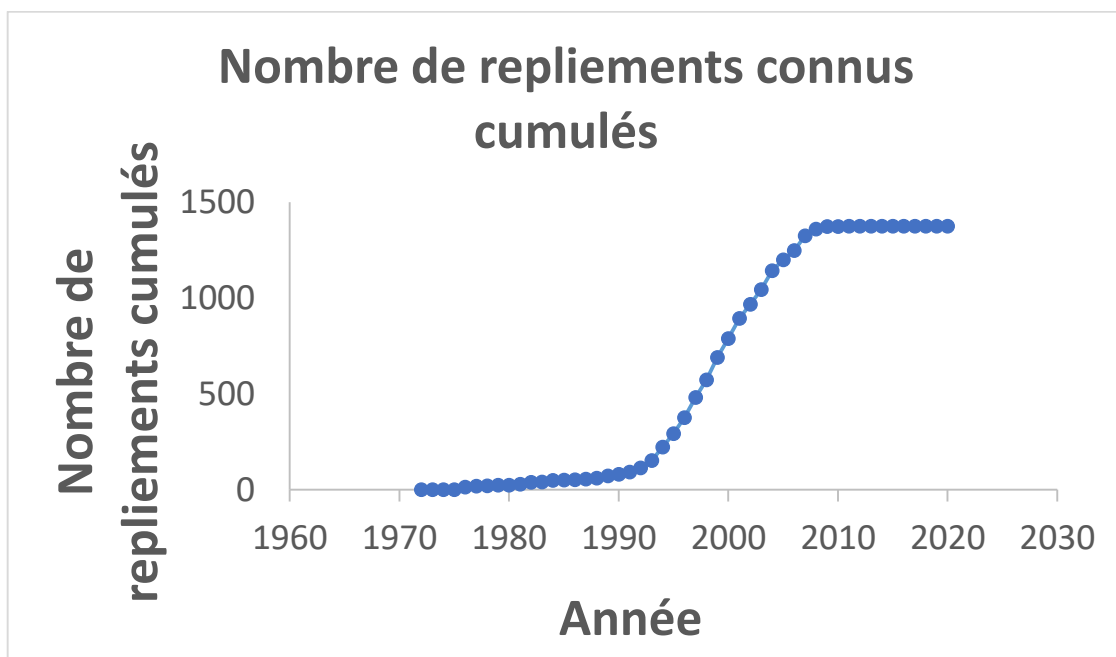


Figure 14 - Nombre de repliements connus cumulés depuis 1972.

Cette classe de méthodes est généralement appelée *ab initio* soit « depuis le commencement » en français, c'est à dire qu'elle repose sur les lois de physique de base ou/et des études empiriques. Ici, elle s'appuie plus précisément sur la thermodynamique pour rechercher la structure définie par le minimum global d'énergie libre(153, 154). Pour atteindre

cet objectif, elle dispose de la séquence en acides aminés(155) de la protéine et d'une fonction d'énergie potentielle détaillant la physique d'un état conformationnel. Les seules informations structurales employées par ces méthodes sont les paramètres décrits par les champ de forces.

Les champ de forces sont paramétrés d'une part à partir de calculs quantiques sur de petits systèmes, et d'autre part par les informations structurales et données thermodynamiques déjà observées afin d'optimiser leurs fonctions d'énergie potentielle. C'est d'ailleurs les seules informations structurales dont dispose la méthode (hormis la séquence) pour mener à bien la modélisation *ab initio* du système. L'objectif est de tester différentes possibilités concernant les angles de torsion, la position de tous les atomes ainsi que les distances pour obtenir une structure correspondant à une énergie minimale. Cette modélisation prend en considération les différentes interactions entre le système biologique étudié et l'environnement dans lequel il a été inséré grâce à l'utilisation d'une fonction d'énergie.

Comme mentionné précédemment, les méthodes *ab initio* peuvent prédire de nouveaux repliements encore non observés dans les structures répertoriées. Les protéines possèdent un grand nombre d'atomes et ainsi un grand nombre de degrés de liberté ; l'espace conformationnel est vaste et impossible à explorer en intégralité dans des délais de temps raisonnables avec les ressources actuelles.

Trois éléments sont nécessaires pour mener à bien une modélisation *ab initio* : une représentation géométrique du système étudié, une fonction de potentiel et une technique pour explorer la surface de l'énergie potentielle(156, 157).

Concernant la modélisation, l'utilisateur doit savoir quel type de représentation il désire pour son modèle. Ce choix va directement impacter le coût computationnel de la prédiction de structure. L'utilisateur peut demander pour réduire ce coût :

- ✓ de faire appel à des particules virtuelles où un atome représenterait un résidu ;
- ✓ de faire appel à des pseudos-atomes où chaque pseudo-atome définirait un ensemble d'atomes partageant les mêmes propriétés ;
- ✓ il est possible aussi d'agir au niveau du solvant, en effet il existe plusieurs représentations du solvant : explicite, implicite et hybride. La première décrit le solvant de la manière la plus fidèle possible essayant de se coller au plus près de la réalité, il est aussi le plus couteux en ressources informatiques(158). Le second modèle nommé

implicite ne décrit pas les atomes explicitement mais un milieu continu avec des propriétés équivalentes. Le modèle hybride est utilisé pour identifier les conformations qui contribuent le plus aux interactions entre le solvant et le système en réalisant une moyenne de plusieurs modèles explicites(159).

Les fonctions d'énergie potentielle sont couramment employées en prédiction de structures, elles seront détaillées dans le paragraphe relatif au champ de forces.

Chaque atome est composé de son noyau et d'électrons à sa périphérie; l'approximation de Born-Oppenheimer(160) permet de réduire le système aux mouvements des noyaux en raison de leur masse supérieure à celle des électrons. L'énergie d'une molécule peut alors être assimilée à une fonction d'énergie relative aux noyaux uniquement. Les variations énergétiques résultent des déplacements sur une surface appelée énergie de surface.

Le point fort de cette méthode *ab initio* est de permettre de considérer de nouveaux repliements, encore inconnus parmi les structures déjà résolues. L'inconvénient de cette méthode est son coût computationnel. Ne reposant que très peu sur les informations structurales connues, l'espace conformationnel à explorer est extrêmement vaste. Bien sûr, ce coût peut être réduit en simplifiant la représentation de la structure géométrique.

Ces méthodes peuvent être appliquées en utilisant des logiciels tels que Amber(161) ou encore Gromacs(162).

2.1.1.1.2 Méthodes de premier principe avec information issue des bases de données

Ces méthodes créent une structure de départ en faisant appel aux informations des bases de données, cependant elles le réalisent non à partir d'une comparaison de séquences mais de fragments. De nouveaux types de repliements composés de motifs structuraux semblables à ceux des protéines déjà résolues ont été identifiés et classés(163, 164). Un motif est un assemblage de plusieurs structures secondaires formant une structure dite « supersecondaire ». L'assemblage des fragments permet une première construction du modèle. Ces fragments sont évalués et optimisés, il s'agit de la procédure d'assemblage des fragments(165, 166) qui aboutit à une structure d'énergie potentielle minimale. Cette méthode est aussi connue sous le nom 'fragment-based' partant du principe que les interactions locales définissent les structures locales.

Cependant, il a été observé que des fragments de séquences similaires peuvent aboutir à des structures 3D différentes. Ce fait est relié aux interactions physico-chimiques impactant la stabilité de la protéine mais aussi la configuration de ses structures secondaires. Les modélisateurs doivent donc évaluer les différents fragments et sélectionner celui avec les meilleures chances d'insertion au sein de la structure. Il s'agit de juger l'aptitude d'un fragment à s'insérer au sein de la structure, cela peut être réalisé par des fonctions de scoring dérivées des statistiques conformationnelles des protéines déjà connues.

Le processus de modélisation par méthode basée sur les fragments se déroule en 5 étapes :

- ✓ la division de la séquence ciblée en fragments
- ✓ la recherche des séquences similaires pour chaque fragment défini dans la base de données des structures résolues,
- ✓ l'évaluation et la classification des fragments par une fonction de scoring,
- ✓ la construction de la structure 3D en utilisant une technique de combinaison,
- ✓ l'affinement de la structure.

Cette technique montre certains avantages comme la capacité de prédire de nouveaux repliements. De plus, comparativement aux méthodes *ab initio* évoquées précédemment où l'espace conformationnel est trop vaste pour être exploré en sa totalité dans des temps raisonnables, cette méthode permet de réduire cet espace de recherche en s'appuyant sur des structures déjà connues, le seul mouvement d'un fragment d'une région à une autre permet d'atteindre une structure de plus basse énergie.

Ces méthodes montrent malheureusement certaines limites. La première est de faire face à de grands espaces conformationnels de recherche causés par les combinaisons différentes de ces fragments. La deuxième limitation intervient pour savoir réduire l'énergie potentielle dans les régions où se produit la combinaison de plusieurs fragments.

Ces méthodes peuvent être observées dans les logiciels tels que I-Tasser(167) et Rosetta(168).

2.1.1.1.3 Reconnaissance de repliements et méthodes de « filetage » (threading)

Ces techniques reposent sur la prise en compte d'une meilleure conservation structurale que séquentielle au cours de l'évolution. Il a en effet été observé que des protéines sans aucune similarité de séquence possédaient des repliements similaires(169–172).

Le principe de cette méthode est de faire correspondre une séquence d'acides aminés à un modèle de repliement. La séquence en acides aminés est alors placée au sein du modèle de manière optimisée. Pour ce faire, il faut :

- ✓ sélectionner un modèle de repliement dans la bibliothèque de modèles,
- ✓ trouver le placement optimal de la séquence d'acides aminés dans le modèle sélectionné.

Les méthodes de filetage s'appuient sur des informations structurales comme les différents types de contact entre résidus, les structures secondaires et la surface accessible au solvant. Les similarités structurales sont ainsi identifiées et permettent de prendre en compte des propriétés qui ne peuvent pas être apportées uniquement par les informations relatives à la séquence. Le modèle est ensuite construit en prenant en compte ces informations.

Comme précisé précédemment, la seconde problématique est de trouver le placement optimal entre plusieurs structures résolues et plusieurs séquences. Les méthodes de filetage identifient différents repliements analogues ce qui signifie que les protéines n'ont pas nécessairement le même ancêtre ou encore la même fonction. Elles partagent uniquement une similarité structurale. Ces méthodes optimisent la fonction de score en évaluant la qualité de correspondance entre la séquence et la configuration du repliement sélectionné. La reconnaissance de la forme du repliement peut se faire selon le profil(173–176) ou être basée sur les paires de potentiels(177–180). Dans le cas de l'utilisation de la méthode employant le profil, ce dernier regroupe les informations structurales des cibles. La protéine est comparée à chacune des cibles décrites par le profil. La méthode des paires basées sur le potentiel estime la tendance de deux résidus à se positionner à une certaine distance l'un de l'autre.

La méthode de filetage nécessite trois éléments :

- ✓ Une librairie décrivant les repliements potentiels, elle est réalisée grâce aux informations disponibles dans les bases de données structurales telles que la RCSB Protein DataBank.

A ce stade, les informations concernant les chaînes latérales sont supprimées et celles concernant les structures secondaires sont les plus recherchées.

- ✓ Une méthode d'évaluation pour chaque configuration de la séquence dans un repliement. Différentes approches peuvent être employées comme les statistiques de Boltzmann(181) les potentiels de contact hydrophobe(182), les modèles de probabilités sur les champs aléatoires Markoviens(183) ou encore la régression logistique(177).
- ✓ Une méthode de recherche à travers les possibles placements afin de trouver la structure optimisée. Cela signifie l'emploi d'un algorithme d'identification de la meilleure pose entre séquence et structure. Cet algorithme a pour but d'identifier le repliement avec le plus haut score de corrélation et celui montrant le meilleur recouvrement entre structure et séquence. Ces algorithmes sont aujourd'hui basés pour la majorité sur les potentiels de contact(177, 184–186) mais d'autres algorithmes sont basés sur les profils 3D(187–191).

L'avantage de cette méthode est d'utiliser dans la construction du modèle des informations structurales non disponibles par la seule donnée de la séquence. Cependant ces méthodes sont dans l'incapacité de prédire de nouveaux repliements structuraux car la construction du modèle n'emploie que des données déjà répertoriées dans les bases de données existantes.

Ces méthodes sont implémentées dans les logiciels tels que Sparks-X(192) ou encore Prospect (PROtein Structure Prediction and Evaluation Computer Toolkit) (193, 194).

2.1.1.1.4 Modélisation comparative avec des stratégies d'alignement de séquence

L'objectif de cette méthode est de construire un modèle de la protéine cible à partir de sa séquence qui permet de trouver des protéines homologues dont les structures sont déjà résolues dans les bases de données(195–201). De ce fait, la modélisation comparative nécessite de sélectionner des structures déjà résolues montrant un haut coefficient d'identité avec la séquence cible. Cette dernière est ensuite alignée avec les séquences des structures sélectionnées. Une fois les modèles identifiés, le modèle est construit et affiné.

Il est possible d'utiliser cette méthode pour détecter une relation d'évolution entre la protéine ciblée et une protéine modèle(202). L'évolution est un facteur fondamental dans la

modélisation comparative. La similarité de la cible avec ses modèles reposent sur leurs propriétés physico-chimiques caractéristiques de différentes régions de la protéine. Aujourd'hui, cette méthode est employée à plusieurs fins : dans la conception de médicaments(203) où le couplage du criblage virtuel et de l'amarrage moléculaire (docking) permettent de sélectionner des molécules potentiellement actives à tester expérimentalement, ou encore pour la détection de sites de mutations. L'un des critères majeurs dans la réussite de la modélisation comparative est la qualité d'alignement des séquences puisque la production du modèle en dépend.

Pour réaliser l'alignement, deux catégories de méthodes ont été explorées : la comparaison de la séquence cible à une autre (par paire)(204) et la comparaison de la séquence cible à plusieurs séquences(205–208). Cet alignement peut être réalisé par des logiciels tels que Blast(209) ou encore Fasta(210, 211). L'alignement multiple compare la séquence cible à toutes les séquences potentielles de manière dépendante pour améliorer la performance de la recherche. Les logiciels comme CLUSTALW(212) Blast(209) et T-Coffee(213) utilisent cet alignement multiple.

En 1997, Marti-Renom(202) et Sanchez(200) créent un protocole en quatre étapes pour réaliser cette modélisation comparative :

- ✓ L'assignement du repliement et la sélection du modèle. Cette étape consiste en la détermination des meilleures structures de protéines connues montrant une grande similarité de séquences avec la protéine cible.
- ✓ L'alignement de la séquence cible avec le(s) modèle(s) sélectionné(s). L'alignement par paire ou multiple permet de trouver les meilleurs alignements aussi bien locaux que globaux des séquences.
- ✓ La construction du modèle. Cette dernière débute par la construction du squelette dit « backbone » des régions homologues, suivi par les régions non homologues, les boucles et les chaînes latérales. Trois types de méthodes existent pour créer le modèle : la modélisation par assemblage de corps rigides(197, 214), par correspondance de fragments ou reconstruction de coordonnées(215, 216), par satisfaction des contraintes spatiales(217–219).
- ✓ L'évaluation et l'affinement du modèle.

Cette modélisation est la plus utilisée des méthodes de prédiction : du fait de la relation d'évolution entre la protéine et ses modèles, le modèle prédit est de meilleure qualité. Il est important de préciser que la fiabilité du modèle peut être estimée. Il s'agit d'une méthode rapide et efficace cependant elle n'est pas capable de prédire de nouveaux repliements. De plus, la méthode d'alignement doit être choisie avec soin et l'alignement vérifié car il est un point crucial dont dépend la qualité de la modélisation. Une autre impossibilité est d'étudier le procédé de repliement de la protéine comme par exemple la transition allant d'un état désordonné vers l'état fonctionnel.

Ces méthodes sont implémentées dans les logiciels tels que Modeller(202, 220) ou encore Swiss-Model(221–223).

2.1.1.2 Modélisation par homologie avec Modeller

Modeller(202, 220) est un logiciel de modélisation moléculaire par homologie développé par Sali et Blundell en 1993(197). Cet outil a été privilégié pour modéliser la structure de KirBac3.1 sauvage et KirBac3.1 W46R à partir du modèle PDB 2WLJ(106) à l'état fermé et la structure de KirBac3.1 S129R à partir du PDB 3ZRS(224) à l'état ouvert. L'emploi de cette méthode a permis de modéliser les résidus manquants tout en gardant la structure du modèle pour les résidus connus. La modélisation par Modeller se déroule selon les étapes décrites dans la modélisation par homologie avec stratégies d'alignement de séquences.

2.1.1.2.1 Modélisation de la membrane

La modélisation de la membrane se déroule en deux étapes. La première consiste à calculer les positions de rotation et de translation de la protéine pour rechercher l'emplacement de la membrane. Pour ce faire, le programme PPM(225) server s'appuie sur les données connues disponibles dans la PDB Database. La construction de la membrane est réalisée avec Charmm-GUI(226), l'utilisateur peut alors décider de la composition de cette dernière en choisissant le nombre ou le pourcentage des types de lipides en fonction de l'environnement qu'il estime le plus proche de la réalité vis-à-vis de son sujet d'étude.

2.1.2 Simulations

Afin de comprendre les différents mécanismes opérant au sein d'un système biologique au niveau atomique, la résolution de la structure est une étape fondamentale. Cependant, la

structure ne représente qu'une représentation instantanée, elle ne permet pas d'étudier les différents processus en jeu au sein du système. C'est pourquoi les scientifiques se sont intéressés à la représentation dynamique des systèmes biologiques, ce qui a donné lieu au développement des techniques de simulations de dynamique moléculaire. Ces dernières ont d'ailleurs fait l'objet du prix Nobel de Chimie en 2013 récompensant Martin Karplus, Michael Levitt et Arieh Warshel pour le développement de modèles multi-échelles des systèmes chimiques complexes.

2.1.2.1 Différentes méthodes existantes

Il existe aujourd'hui différentes stratégies de simulations disponibles pour étudier la dynamique d'un système. Toutes ne sont pas adaptées à chaque problématique, il est important de choisir la méthode de dynamique en fonction du cas étudié et l'objectif final. Ce paragraphe évoque dans un premier temps : une liste non exhaustive de différentes méthodes de simulations existantes et leurs applications puis se focalise sur les méthodes utilisées au cours de ma thèse.

2.1.2.1.1 Simulations gros grains

Il est important de réaliser que la durée d'une simulation à effectuer dépend de différents facteurs, bien sûr de l'échelle de temps du processus physique à atteindre, mais aussi de la taille du système biologique comme il a été notifié précédemment pour la modélisation moléculaire. La méthode gros grains(227) connue sous le nom de '*coarse grain*' en anglais a été développée spécialement pour des gros systèmes, pour lesquels une simulation standard serait trop coûteuse.

Pour pouvoir étudier ces systèmes et contourner cette contrainte de temps, le principe de cette méthode est de changer la représentation géométrique du système pour qu'un point ne représente plus un unique atome mais un ensemble d'atomes partageant les mêmes propriétés physico-chimiques. L'effet du solvant aussi est pris en compte dans cette réduction.

L'algorithme de simulation reste inchangé malgré ce changement, ainsi les paramètres de champ de forces vont être modifiés en conséquence en utilisant par exemple un champ de force très populaire : le champ de force Martini(228). Pour empêcher toute déstructuration des structures secondaires, les champ de forces gros grains intègrent un réseau élastique. Ce dernier permet de prendre en compte les interactions entre les structures secondaires. D'autres champ

de force gros-grains n'imposant pas de contraintes ont aussi été développés tel que « sirah force field » implémentés dans AMBER et GROMACS (<http://www.sirahff.com/>)

Ces méthodes ont l'avantage de pouvoir réaliser des simulations de plus longues durées sur des systèmes de grande taille. L'inconvénient principal de ces méthodes est que la représentation réduite du système moléculaire ne permet pas de décrire les mouvements locaux du système avec une bonne précision, ni de décrire les interactions précises à l'échelle atomique.

2.1.2.1.2 Dynamique Moléculaire dirigée

La question du temps de simulation reste une question sensible : comme en témoigne la méthode par gros grains qui sacrifie une part de précision pour atteindre une échelle de temps plus grande. Cependant, l'une des applications majeures des simulations est de comprendre le processus d'un mécanisme moléculaire à une échelle atomique plus précise, ce que ne permet pas le modèle à gros-grain. Malheureusement, la durée réelle des processus peut atteindre la milliseconde voire la seconde. Ces temps de simulations ne sont pas atteignables par les simulations actuelles à l'échelle atomique malgré des avancées sur cette question.

La dynamique moléculaire dirigée⁽²²⁹⁾ (connue sous le nom de *Targeted Molecular Dynamic* en anglais) donne la possibilité d'ignorer les échelles de temps. Pour recourir à cette méthode, il est nécessaire de disposer de la structure sous deux formes : la structure de départ et la structure cible. Les deux structures doivent être identiques en topologie. Les deux structures sont comparées en réalisant le calcul de 'Root-Mean Square Deviation' (RMSD) permettant de calculer la similitude conformationnelle de deux structures entre elles. Plus cette valeur est faible, plus les structures sont proches d'un point de vue structural.

L'avantage de cette procédure est de distinguer le chemin suivi par le système pour atteindre la conformation cible. L'inconvénient majeur est que la possibilité de distinguer des états de transition ou encore des états de conformations plus stables est fortement réduite à cause d'un manque d'échantillonnage étendu de l'espace conformationnel.

2.1.2.1.3 Recuit simulé

Lors d'une simulation de dynamique moléculaire classique, le système explore son espace conformationnel qui comporte différents minima locaux d'énergie. Lorsque la structure

est piégée dans un de ces minima représentant un puits de potentiel, le temps de simulation effectué par dynamique moléculaire n'est parfois pas suffisant pour pouvoir observer la sortie de ce puits et d'explorer d'une façon plus étendue l'espace conformationnel ce qui empêche de découvrir d'autres puits de plus basse énergie et donc plus favorables pour la structure.

Pour contourner ce problème, l'idée fut de s'appuyer sur une méthode initialement destinée à la métallurgie en 1983(230). Cette méthode repose sur le fait qu'un refroidissement brutal du système ne lui permet pas d'optimiser son organisation dans son état le plus stable ; ainsi un refroidissement contrôlé à partir d'une température élevée donnerait au système l'opportunité d'optimiser sa structure. En adaptant cette méthode aux simulations de système biologiques, les chercheurs ont ajouté de l'énergie cinétique au système afin d'augmenter sa température lorsque le système se retrouvait dans un puits de potentiel duquel il ne pouvait s'extraire. Suite à cette augmentation de température, sa décroissance est contrôlée jusqu'à atteindre un minimum local d'énergie.

2.1.2.1.4 Métadynamique

La métadynamique(231, 232) est une autre méthode développée pour contourner la contrainte du temps de simulation qui empêche d'atteindre des structures de transition ou de structures d'états différents. Grâce à cette méthode les simulations peuvent évoluer à des échelles de temps plus grandes. L'objectif de la métadynamique est d'optimiser l'échantillonnage des simulations. Elle est très proche de la dynamique moléculaire classique à l'exception de l'introduction d'un biais. Ce biais va agir sur certains degrés de liberté du système par l'intermédiaire de variables collectives dont le choix est laissé au soin de l'utilisateur. Ces dernières doivent satisfaire trois critères : elles doivent distinguer nettement les états initiaux, intermédiaires et finaux ; décrire les événements lents ciblés dans la recherche ; et dans un dernier temps être peu nombreuses pour assurer la convergence. Ces variables sont souvent des éléments géométriques tels que des distances, des angles, des dièdres par exemple. Ces simulations cartographient les énergies des différentes structures obtenues et détectent ainsi les différents états clés du système.

Le point fort de l'accès à ces échelles de temps implique la possibilité de visualisation d'événements rares tels que des associations ligand/récepteur ou encore des dissociations. Malgré les avancées permises par cette méthode, il faut garder en tête que la plupart des transitions conformationnelles ne sont toujours pas accessibles. En effet, l'espace

conformationnel est complexe et dispose d'un nombre important de degrés de liberté, le limiter par certaines variables collectives limite aussi l'accès à d'autres configurations possibles du système.

2.1.2.2 Principe de la dynamique Moléculaire

Comme l'indiquent les méthodes de simulation précédemment évoquées, comprendre les différentes étapes des différents processus à un détail atomique est un enjeu majeur. La dynamique moléculaire classique est la méthode la plus répandue pour comprendre l'évolution d'un système. Elle repose sur deux principes : le premier concerne le caractère indivisible d'un atome, qui possède un rayon de Van der Waals fixe ; le second concerne les liaisons covalentes entre les atomes qui ne peuvent être rompues, excluant toute étude de réaction chimique. La dynamique moléculaire est l'une des trois méthodes majeures employées dans cette thèse.

2.1.2.2.1 Théorie/Principe

La dynamique moléculaire repose sur la seconde loi de Newton :

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} \text{ soit } \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \frac{\vec{F}_i}{m_i}$$

où i représente un atome, m_i sa masse, \vec{a}_i son accélération, \vec{r}_i sa position, et \vec{F}_i la force appliquée sur cet atome. Cette équation est appliquée à l'ensemble des atomes du système. La résolution en fonction du temps de cette équation crée une trajectoire des positions et des vitesses des atomes.

2.1.2.2.2 Paramètres de champ de forces

Il existe différents types de champ de forces. Durant cette thèse, le champ de forces utilisé dans Charmm (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics) a été adopté(233) (charmm36). La plupart des paramètres ont été établis en faisant appel à des calculs de mécanique quantique sur les différentes composantes moléculaires, non seulement les acides aminés mais aussi les acides nucléiques, les lipides et les sucres. La première version du champ de forces a vu le jour en 1978 par Reiher. Les champ de forces utilisés sont dits tout-atomes car ils décrivent explicitement tous les atomes. Des améliorations ont été effectuées sur les champ de forces depuis 2004 par l'introduction de la polarisabilité (méthode des drudes) dans laquelle les charges partielles varient au cours du temps (234–236).

Calcul de l'énergie potentielle

L'énergie potentielle est définie par l'équation suivante :

$$\begin{aligned}
 U(\vec{R}) = & \sum_{\text{liaisons}} k_l (l - l_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{dièdres}} k_\varphi^n (1 + [\cos(n\varphi - \delta)]) + \sum_{\text{impropres}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 \\
 & + \sum_{i,j} \left(4\varepsilon_{ij} \left| \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right| + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon\varepsilon_0 r_{ij}} \right)
 \end{aligned}$$

Le premier terme est relatif aux liaisons covalentes, le second décrit les angles de valence formés par trois atomes, le troisième les angles dièdres aussi appelés angle de torsion. Le quatrième est utilisé pour les angles impropres. Le cinquième représente les interactions non liées soit les interactions entre atomes distants d'au moins quatre liaisons covalentes, ce terme est composé des interactions de Van der Waals et électrostatiques.

Les termes k_l , k_θ et k_ω sont les constantes de force relatives aux liaisons, angles et angles impropres respectivement, leurs valeurs sont propres aux types d'atome qui les composent. l , θ et ω : les valeurs de distances et d'angles observées alors que l_0 , θ_0 et ω_0 représentent les mêmes valeurs mais à l'équilibre; k_φ^n représente la hauteur de la barrière d'énergie à franchir pour réaliser une rotation autour de la liaison en faisant l'approximation qu'un seul terme est conservé dans les séries de Fourier. n est la multiplicité soit le nombre de points minimum dans la fonction sur 360° , δ : l'angle de phase qui détermine lorsque l'angle de torsion atteint son minimum. ε_{ij} est la profondeur du puits de potentiel, r_{ij}^{-12} représente un terme répulsif dominant à courte distance (répulsion de Pauli) alors que r_{ij}^{-6} est un terme attractif dominant à grande distance (Van der Waals). σ_{ij} correspond à la distance entre les atomes i et j pour laquelle l'énergie est minimale, il est aussi appelé diamètre de collision. q_i et q_j sont les charges partielles des atomes i et j respectivement. ε_0 est la permittivité du vide, et ε la constante diélectrique du milieu. Les simulations étant effectuées dans un système complet incluant les atomes de l'environnement, on adopte en général une valeur égale à 1 pour ce paramètre.

Il est important de noter que les constantes de force, les valeurs à l'équilibre, la multiplicité, le facteur de phase, le diamètre de collision et la permittivité sont déterminées expérimentalement par les structures résolues par diffraction des rayons X, par spectre Raman et infrarouges, les valeurs restantes ont été optimisées par des calculs de mécanique quantique.

Les quatre premiers termes de cette équation expriment l'énergie potentielle des termes liés alors que le dernier évalue celle des termes non liés.

Les termes liés (Figure 15)

Le premier terme exprimé dans le calcul de l'énergie potentielle décrit l'interaction entre deux atomes liés de manière covalente. Chaque atome est décrit comme une bille et les liaisons comme des ressorts. Ce potentiel augmente dans le cas où la longueur l s'éloigne de sa valeur à l'équilibre l_0 . Les liaisons covalentes étant des interactions fortes, leur déformation nécessite une énergie importante.

Le second terme correspond à la somme concernant tous les angles de valence dans la molécule. Il s'agit d'un potentiel harmonique et θ oscille autour de θ_0 représentant la valeur de référence.

Le troisième terme est relatif aux angles dièdres comme mentionné précédemment, il s'agit de l'angle décrit par quatre atomes successifs reliés par des liaisons covalentes. Il correspond à la rotation autour de la liaison covalente centrale décrit par ces quatre atomes.

Le quatrième terme est relatif aux angles impropres qui représentent l'angle entre le plan formé par trois atomes avec un quatrième atome.

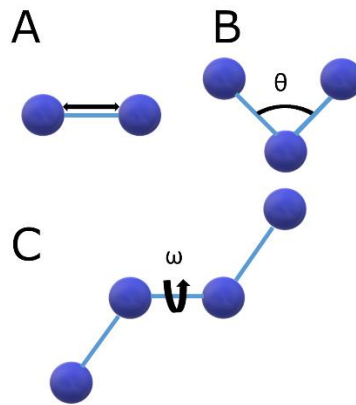


Figure 15 - Description des interactions liées. A) Liaisons. B) Angles. C) Angles dièdres.

Les termes non liés (Figure 16)

Les interactions de Van der Waals sont décrites par le potentiel de Lennard-Jones qui se décompose en deux relations. La première décrit un terme répulsif où les atomes se repoussent à faible distance (principe d'exclusion de Pauli(237)). La seconde quant à elle fait référence au terme attractif où les atomes vont s'attirer sur une longue distance (Principe de London(238)). Il est à noter que contrairement aux interactions électrostatiques les interactions de Van der Waals sont des interactions à courte distance.

Les interactions électrostatiques suivent la loi de Coulomb selon laquelle deux charges de même signe se repoussent alors que deux charges de signes opposés s'attirent, ces interactions étant inversement proportionnelles à leur distance de séparation.

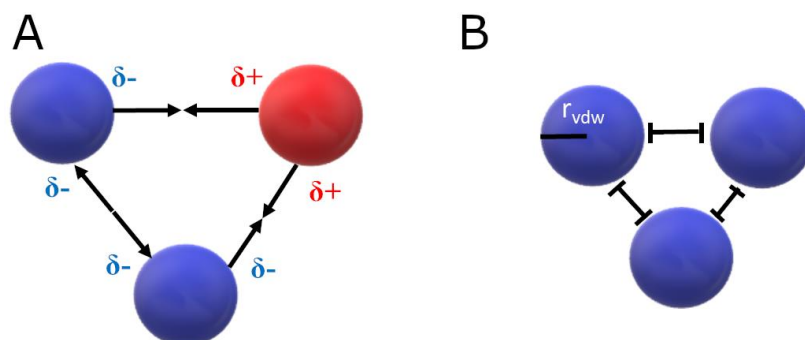


Figure 16 - Interactions non liées. A) Interactions électrostatiques. B) Interactions de Van der Waals.

2.1.2.2.3 Algorithme de Leapfrog-Verlet

Un grand nombre d'algorithmes ont été développés pour résoudre les équations de mouvements en dynamique moléculaire. Dans tous ces algorithmes les positions des atomes, leurs vitesses et accélérations sont approximées par l'intermédiaire des séries de Taylor :

$$\begin{aligned}r(t + \delta t) &= r(t) + \delta t v(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 b(t) + \frac{1}{24} \delta t^4 c(t) + \dots \\v(t + \delta t) &= v(t) + \delta t a(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 b(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 c(t) + \dots \\a(t + \delta t) &= a(t) + \delta t b(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 c(t) + \dots \\b(t + \delta t) &= b(t) + \delta t c(t) + \dots\end{aligned}$$

Où v est la vitesse, a l'accélération, b la dérivée troisième par rapport au temps. L'algorithme de Verlet(239) est sans doute le plus utilisé. L'algorithme Leapfrog-Verlet(240) est l'une de ses variantes. Les relations employées par cet algorithme sont les suivantes :

$$\begin{aligned}r(t + \delta t) &= r(t) + \delta t v\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) \\v\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) &= v\left(t - \frac{1}{2} \delta t\right) + \delta t a(t)\end{aligned}$$

Les vitesses au temps $v\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right)$ sont calculées à partir des vitesses de l'étape $t - \frac{1}{2} \delta t$ et l'accélération au temps t . Suite à cela, il est possible de déterminer la position au temps $t + \delta t$. La vitesse au temps t peut être calculée de la manière suivante :

$$v(t) = \frac{1}{2} \left[v\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) + v\left(t - \frac{1}{2} \delta t\right) \right]$$

Les vitesses « sautent des positions » pour donner leurs valeurs à $t + \frac{1}{2} \delta t$, d'où le nom « saut de grenouille ». Les positions « sautent les vitesses » pour donner leurs nouvelles valeurs à $t + \delta t$ puis $t + \frac{3}{2} \delta t$ et ainsi de suite. Cette variante a pour avantage de considérer les vitesses, malheureusement son inconvénient est le manque de synchronisation entre les positions des atomes et leurs vitesses, ce qui cause l'impossibilité de calculer exactement l'énergie cinétique au même instant qu'on évalue l'énergie potentielle, l'équation précédente permet cependant de l'estimer.

2.1.2.2.4 Contrôle de la pression et de la température

Lors des simulations, la pression et la température ont été contrôlées pour qu'elles fluctuent chacune autour d'une valeur donnée (ici température de 300 K et pression d'1 bar), générant ainsi un ensemble thermodynamique isobare et isotherme connu sous l'appellation NPT où N correspond au nombre d'atomes, P à la pression et T à la température. Nous avons utilisé au cours de cette thèse le thermostat de Nosé-Hoover(241) et le piston de Langevin(242) intégré dans le logiciel NAMD(243).

2.1.2.2.5 Contraintes

Pour réaliser une simulation de dynamique moléculaire, le système a été inséré dans une boîte de solvant. Nous avons utilisé les conditions périodiques pour éviter ce qu'on appelle les effets de bords, la boîte étant répliquée tout autour d'elle. Ce dispositif permet aux molécules de solvant arrivant à une extrémité de la boîte de réapparaître au niveau du côté opposé de la boîte.

2.1.2.3 Les Modes Normaux

Les méthodes citées précédemment ont montré que l'optimisation d'un échantillonnage conformationnel restait un enjeu important. L'accès à des mouvements de larges amplitudes reste difficile malgré la recrudescence de nouvelles méthodes pour y parvenir, alors que ces mouvements jouent généralement un rôle majeur dans la fonction de la protéine. La méthode des modes normaux est une alternative appropriée donnant accès à ces conformations.

2.1.2.3.1 Théorie/Principe

Dans le cas d'études de systèmes biologiques, les modes normaux ont fait leurs preuves pour la première fois en 1983(244); les auteurs expliquent retrouver des résultats en accord avec la dynamique moléculaire exceptés pour les mouvements des chaînes latérales. Cette méthode a pour avantage d'être peu coûteuse en ressource computationnelle mais elle ne donne aucune indication sur le temps dont la structure a besoin pour atteindre les conformations pouvant être obtenues par les modes normaux.

L'avantage de cette méthode est de décomposer un mouvement complexe en mouvements plus simples. Ces modes sont dits normaux car ils sont indépendants les uns des autres. De la même façon que la dynamique moléculaire, les modes normaux sont basés sur la

résolution d'équation de mouvement de Newton avec l'approximation que la surface d'énergie potentielle considérée est quadratique: leur but est donc de déterminer les valeurs propres (fréquences de vibration) ainsi que les vecteurs propres (mouvements associés) de la matrice Hessienne du système à étudier.

2.1.2.3.2 Analyse des modes normaux

Les modes normaux reposent sur l'approximation quadratique de la fonction d'énergie potentielle. Il a été montré que cette approximation n'empêche pas cette méthode d'être efficace et de retrouver des résultats expérimentaux(245, 246). Cette approximation est appliquée pour une structure se trouvant dans un minimum d'énergie , alors sa fonction d'énergie potentielle peut être approximée à une fonction quadratique(247, 248). Pour des petits déplacements la fonction d'énergie potentielle peut être exprimée sous la forme d'une série de Taylor :

$$V(\vec{r}) = V(\vec{r}^0) + \sum_{i=1}^{3N} \left(\frac{\partial V}{\partial r_i} \right)_0 (r_i - r_i^0) + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{3N} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_i \partial r_j} \right)_0 (r_i - r_i^0)(r_j - r_j^0) + \dots$$

où les coordonnées de chaque atome sont pondérées par sa masse comme ceci :

$$r_i = \sqrt{m_i} x_i$$

L'indice 0 représente la structure de référence correspondant au minimum d'énergie. Le second terme de l'équation est ici égal à 0 puisque $\left(\frac{\partial V}{\partial r_i} \right)_0$ est la force agissant sur la masse i alors que celle-ci est nulle à l'équilibre. En posant $V(\vec{r}^0) = 0$ et en négligeant les termes supérieurs au deuxième ordre, on peut écrire :

$$V(\vec{r}) = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{3N} k_{ij} (r_i - r_i^0)(r_j - r_j^0) \text{ où } k_{ij} = \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_i \partial r_j} \right)_0$$

où k_{ij} est la constante de force correspondant à l'interaction entre les atomes i et j . La matrice formée par les constantes de force est la matrice Hessienne. Pour calculer les modes normaux, il est nécessaire de diagonaliser la matrice Hessienne.

Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode implémentée dans Charmm appelée DIMB : Diagonalization In a Mixed Basis(249, 250) et développée par Liliane Mouawad et David Perahia dès 1993. Cette méthode repose sur le principe que les modes de basse fréquence peuvent être affinés s'ils sont couplés à des degrés de liberté de fréquences plus hautes. La matrice est dans un premier temps divisée en sous-blocs diagonaux dont les vecteurs propres de plus basses valeurs propres constituent une première approximation des vecteurs propres de la matrice Hessienne qui seront affinés par la suite. Dans un second temps, cet affinement est réalisé en couplant les vecteurs approximatifs aux degrés de liberté de haute fréquence ce qui permet de prendre en considération les sous blocs extérieurs à la diagonale. Ces degrés de liberté peuvent être des modes normaux de haute fréquence mais cette option ne s'est pas révélée efficace, la méthode DIMB s'appuie alors sur des sous-ensembles des coordonnées cartésiennes. Cette combinaison explique le nom qui se réfère aux sous-ensembles provenant des modes normaux mais aussi des coordonnées cartésiennes. Cette méthode permet de faire converger les modes approximatifs vers des modes normaux exacts d'une façon itérative. Elle présente l'avantage de calculer un grand nombre de modes normaux, de plus sa rapidité permet de calculer les modes normaux de systèmes importants en un temps raisonnable.

2.1.2.3.3 Générations des structures déplacées le long des modes

Il est tout d'abord important de préciser que les six premiers modes normaux générés ne sont pas étudiés. Il s'agit des modes décrivant les translations le long des axes x,y et z, et des rotations autour de ces mêmes axes, ce qui signifie qu'ils ne donnent aucune indication sur les mouvements internes du système étudié.

Les modes normaux ont été calculés à partir d'une structure correspondant à un minimum d'énergie; le déplacement de la structure le long des vecteurs propres augmente l'énergie du système, et cela d'autant plus que le déplacement est important le rendant peu réaliste d'un point de vue énergétique.

Il est nécessaire de considérer que les directions des modes normaux pour des déplacements importants ne sont pas toujours compatibles avec la structure du système et peuvent causer des interpénétrations d'atomes sur certaines zones de la protéine. Les structures générées ne peuvent être directement étudiées, c'est pourquoi il a été élaboré une méthode pour générer des structures de basses énergies le long des modes normaux(251). Ce protocole s'appuie sur la minimisation de l'énergie potentielle du système en appliquant une contrainte

propre au mode normal considéré. Ceci aboutit à la génération d'une structure d'énergie potentielle raisonnable.

L'application de cette méthode nécessite de mesurer le déplacement le long du mode normal étudié, ceci est réalisée en calculant la MRMS soit Mass-Weighted Root Mean Square deviation. Cette valeur est exprimée par la formule suivante :

$$MRMS = \frac{1}{\sqrt{M}} \sum_{i=1}^N \sum_{\alpha=1}^3 \sqrt{m_i} (r_{i\alpha} - r_{i\alpha}^R) q_{i\alpha j}$$

où M la masse totale des N atomes du système, m_i : la masse de l'atome i , α : une des trois coordonnées cartésiennes : x,y ou z, $r_{i\alpha}$: l'une des trois coordonnées cartésiennes x,y ou z relative à l'atome i , $r_{i\alpha}^R$: une des trois coordonnées cartésiennes relative à l'atome i pour la structure de référence et $q_{i\alpha j}$: la valeur de la composante $i\alpha$ du vecteur de mode normal j .

Pour que l'énergie de la structure corresponde au déplacement d_{kj} , la contrainte suivante lui est appliquée :

$$U = \frac{k_d}{2} (d_j - d_{kj})^2 + \frac{k_{trans}}{2} (r_{CM} - r_{CM}^R)^2 + \frac{k_{rot}}{2} \left[\sum_{i=1}^N m_i (\mathbf{r}_i^R [\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i^R]) \right]^2$$

où, k_d, k_{trans}, k_{rot} : les constantes de force relatives au MRMS et aux contraintes de translation et rotation respectivement, d_j : la valeur du déplacement de la structure le long du vecteur exprimé en MRMS par rapport à la structure initiale, d_{kj} : la valeur MRMS cible à atteindre, r_{CM}, r_{CM}^R : les coordonnées du centre de masse du système étudié et de référence respectivement, et $\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_i^R$: les vecteurs par rapport au centre de masse de l'atome i de la structure étudiée et de référence respectivement.

Les contraintes relatives à la translation et à la rotation sont nécessaires pour éviter une translation ou une rotation du système.

2.1.2.4 La méthode MDeNM : Molecular Dynamics using excited normal modes

Toutes les méthodes présentent des avantages et des inconvénients, c'est sur cette base qu'a été conçue la méthode MDeNM(252, 253). Cette dernière combine les avantages de la

dynamique moléculaire classique ainsi que des modes normaux afin d'explorer le plus vaste espace conformationnel possible.

2.1.2.4.1 Principe

La dynamique moléculaire classique tout-atomes ne permet pas encore de simuler de grandes échelles de temps (bien au-delà de la micro-seconde) surtout pour des systèmes moléculaires de grande taille. Ce fait limite l'exploration de l'espace conformationnel. C'est par exemple le cas pour les changements conformationnels de grande amplitude, non observable par dynamique moléculaire classique. Les modes normaux, quant à eux permettent de calculer les directions de mouvements collectifs énergétiquement favorables avec un coût en ressource computationnelle relativement faible. Les modes normaux, bien que permettant l'exploration de ces grands mouvements, ne donnent pas une description satisfaisante des mouvements locaux comme les rotations des chaînes latérales qui sont par nature de type anharmonique, contrairement à la dynamique moléculaire classique. Ainsi Mauricio Costa et David Perahia(252, 253) ont conçu une méthode (Figure 17) s'appuyant sur la combinaison de ces deux méthodes pour combiner à la fois leurs avantages mais aussi de mieux explorer l'espace conformationnel correspondant aux différents types de mouvements et aux différentes échelles de temps. Pour ce faire, de l'énergie cinétique est ajoutée dans la direction des modes normaux modifiant ainsi les vitesses des atomes. Cette excitation le long des modes (ou du vecteur combinant plusieurs modes) est répétée à intervalle de temps régulier pendant un nombre déterminé de cycles. Cela fait propager les mouvements globaux loin de la structure de départ. Les structures obtenues à la fin de chaque cycle n'ayant pas dissipée complètement toute l'énergie cinétique additionnelle se trouvent dans un état énergétique relativement élevé, et ont été appelées structures excitées. Ces dernières sont ensuite utilisées comme point de départ de simulations de dynamique moléculaire classique pour les relaxer et aussi de détecter d'autres conformations se trouvant près de l'état excité.

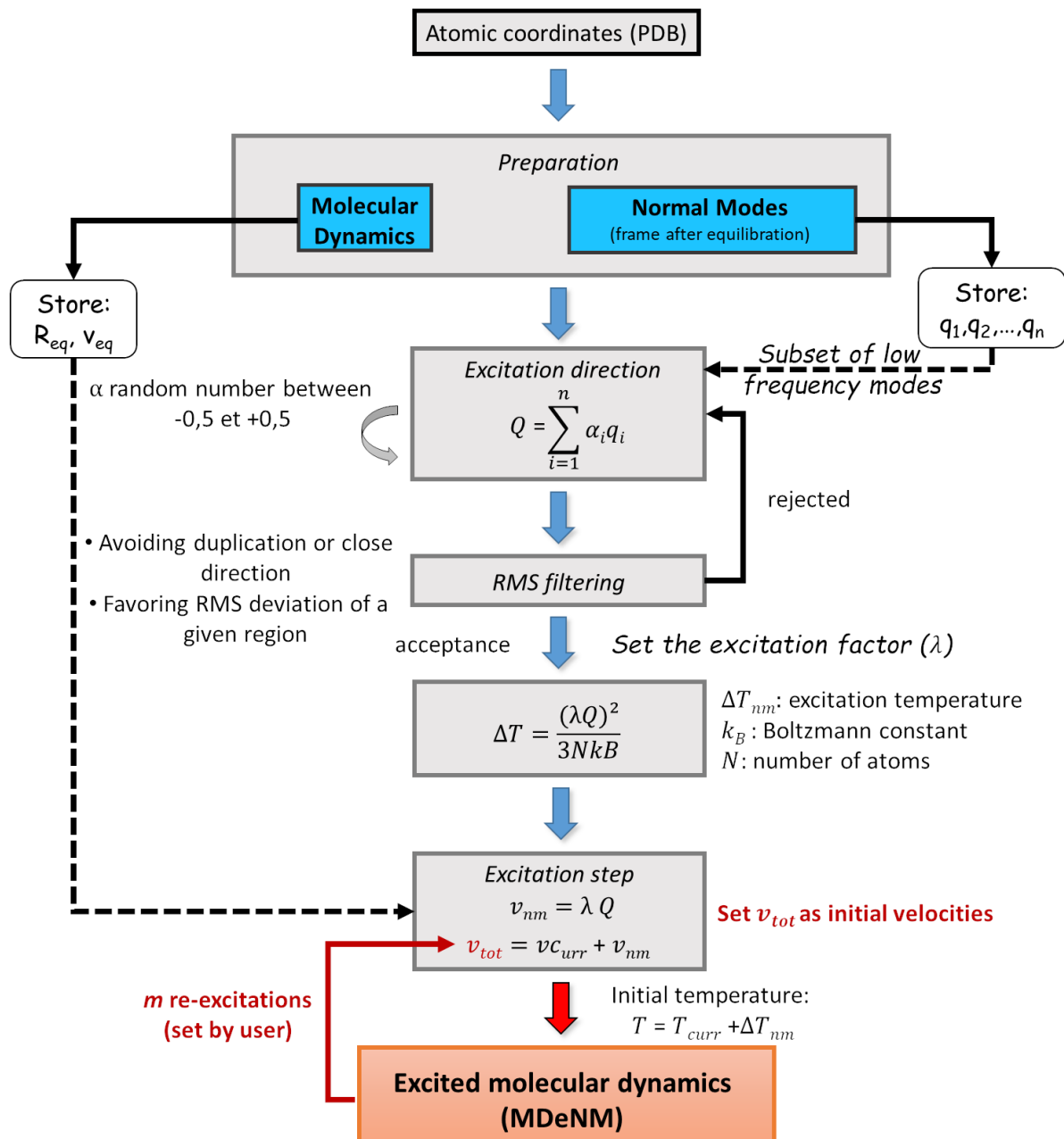


Figure 17 - Principe de la MDeNM (adapté de Costa et al.(252))

2.1.2.4.2 Première étape : préparation des données

La préparation des données en vue de l'application de la MDeNM se divise en deux procédures parallèles.

La première concerne les données relatives à la dynamique moléculaire, une étape d'équilibration du système biologique est conduite dans le but d'obtenir les positions ainsi que les vitesses relatives à chaque atome du système.

La seconde procédure est relative aux modes normaux, la structure de départ est minimisée. A partir de cette dernière, les modes normaux sont calculés et les vecteurs relatifs aux directions des différents modes normaux sont stockés. Dans le cadre de ma thèse, pour chaque système, 200 modes normaux ont été calculés.

2.1.2.4.3 Seconde étape : Sélection et combinaison des modes normaux

Tous les modes normaux ne sont pas pris en considération dans l'application de cette méthode. La génération des structures déplacées le long des modes normaux permet de visualiser le mouvement décrit par chaque mode. L'utilisateur doit sélectionner les modes normaux d'intérêt dans son investigation. Dans notre cas, le but étant de comprendre comment le canal à potassium Kir s'ouvre et se ferme, les modes normaux décrivant le phénomène d'ouverture/fermeture ont été sélectionnés.

Cette sélection est nécessaire pour définir la direction dans laquelle les structures devront être excitées. Si la sélection implique plus d'un mode, la direction d'excitation est déterminée en appliquant l'équation suivante :

$$\vec{Q} = \sum_{i=1}^n \alpha_i \vec{q}_i$$

où \vec{Q} est le vecteur correspondant à la combinaison linéaire des modes normaux; il représentera après normalisation la direction dans laquelle sera excitée la structure ; n le nombre de modes normaux sélectionnés ; \vec{q}_i le vecteur relatif au mode sélectionné ; α_i un facteur aléatoire dont la valeur est comprise entre -0.5 et +0.5, l'alternance de signe permet l'exploration dans les deux sens de la direction du mode normal.

Les répliques correspondent ici au nombre de combinaisons de modes normaux testées. Le nombre de répliques peut aller d'une dizaine à plusieurs centaines, ou plus, dépendant de la dimensionnalité de l'espace des modes normaux considéré, et de la finesse recherchée. Dans le souci d'explorer au maximum l'espace conformationnel, les directions issues des combinaisons des modes doivent être isotropiquement réparties. Pour ce faire une structure est déplacée structurellement jusqu'à 1Å de long du vecteur pour une combinaison donnée, et cette combinaison est acceptée à condition que ses distances RMSD par rapport aux autres structures déplacées qui avaient été retenues préalablement soient plus grandes qu'une valeur seuil. Le RMSD peut concerner toute la structure (globale) ou bien une zone spécifique du système

(locale). Le but de toute cette manœuvre est de rejeter toutes les structures trop proches d'une première structure générée par la combinaison des modes. Le RMSD est calculé en suivant cette formule :

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

où δ_i représente la distance entre l'atome i de la structure testée et l'atome i de la structure de référence ; N le nombre total d'atomes présents dans le système (global) ou la zone d'intérêt du système (local).

2.1.2.4.4 Troisième étape : Excitation

L'ajout de l'énergie cinétique est fait de façon que la température du système augmente d'une certaine quantité (T_{nm}). Elle ne doit pas être très élevée car cela peut mener à la déstabilisation du système.

L'addition de la température est réalisée à intervalle de temps régulier, au début de chaque cycle. Le choix de l'intervalle de temps entre chaque apport de température (appelé temps de relaxation) est aussi un paramètre à prendre en compte. Si le temps de relaxation se révèle trop court entre deux injections de température, l'énergie cinétique apportée ne va pas pouvoir se dissiper d'une façon importante avant le nouvel apport d'énergie cinétique. Ce phénomène entraîne l'absorption (voire l'accumulation) de l'énergie cinétique par le système risquant ainsi sa dénaturation.

Pour réaliser l'excitation le long du vecteur \vec{Q} , la formule suivante est appliquée :

$$\frac{\overline{(E_f M^{\frac{1}{2}} \vec{Q})^2}}{3N} = k_B T_{nm}$$

où M représente la matrice des masses, k_B la constante de Boltzmann, E_f le facteur d'excitation. Les vitesses dans l'espace des modes normaux (v_{nm}) est ensuite ajoutée aux vitesses dans l'espace cartésien obtenues lors de l'équilibration de la dynamique moléculaire (v_{eq}) réalisée au cours de l'étape de préparation :

$$\vec{v}_{nm} = \vec{Q} E_f$$

$$\overrightarrow{v_{tot}} = \overrightarrow{v_{eq}} + \overrightarrow{v_{nm}}$$

A partir de ce point, une courte simulation de l'ordre de quelques picosecondes est réalisée sur le système utilisant la structure à l'équilibre à laquelle est appliquée les vitesses $\overrightarrow{v_{tot}}$ comme vitesses initiales.

2.1.2.4.5 Clustering et Relaxation des structures excitées

Les structures obtenues par la méthode MDeNM sont des structures ayant un excès d'énergie. Il est donc nécessaire de réaliser une étape de relaxation des structures pour obtenir des structures relaxées. Cependant, le nombre final de structures excitées résultant de l'échantillonnage de l'espace conformationnel est égale au nombre de répliques multiplié par le nombre d'excitations. La MDeNM fournit ainsi des centaines voire des milliers de structures en fonction des paramètres choisis par l'utilisateur. Il est coûteux de lancer des simulations de dynamique classique sur chacune des structures excitées obtenues, c'est pourquoi les structures sont regroupées en clusters. Chaque cluster est représenté par une structure qui va être utilisée comme point de départ pour une simulation de dynamique moléculaire classique. Au cours de cette thèse, l'outil de clustering de VMD a été utilisé permettant de distribuer les structures en clusters. La structure moyenne de chaque cluster a été calculée et comparée par RMSD aux structures composant le cluster. La structure la plus proche de la structure moyenne du cluster a été sélectionnée pour poursuivre le traitement avec des simulations de dynamique moléculaire (relaxation).

2.1.3 Echange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse : HDX-MS

Les résultats provenant des méthodes précédentes sont dits théoriques. Pour compléter l'analyse théorique du KirBac3.1, nous avons fait appel à une méthode expérimentale, il s'agit de l'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse (Hydrogen-Deuterium eXchange Mass-Spectrometry HDX-MS) (Figure 18).

L'objectif de cette méthode est d'étudier la dynamique des protéines. Cette méthode a été utilisée sur les protéines en solution(254, 255). Concernant les protéines membranaires solubilisées en détergent, cette approche se développe depuis le début des années 2010(256–

258). HDX-MS peut aussi être mis en œuvre pour investiguer les dynamiques d'interaction protéine/ligand ou encore protéine/protéine. Lors d'une incubation de la protéine dans de l'eau lourde (D_2O), HDX-MS suit l'échange entre l'atome H d'un amide du squelette d'une protéine avec des atomes de deutérium. Cette méthode peut apporter des informations précieuses sur la dynamique des protéines membranaires(259–261).

Les atomes H des chaînes latérales des résidus d'acides aminés ainsi que du squelette des protéines sur lequel sont branchées les chaînes latérales sont labiles c'est-à-dire qu'ils sont facilement détachables, ils sont d'ailleurs en échange permanent avec les hydrogènes des molécules d'eau présentes aux alentours. Il est important de noter que seulement l'échange des atomes d'hydrogène des amides peut être suivi. Ce suivi donne un taux d'échange dépendant de l'implication des atomes H au sein des structures et de leur accessibilité au solvant. Dans le cas d'échange H/D, seule l'implication au sein des structures est prise en compte(262). Quand la protéine se trouve dans un milieu de D_2O , les atomes de deutérium prenant la place des atomes H sont détectés par spectrométrie de masse, ainsi leur taux au sein de la protéine est possible à calculer. Les variations des taux d'échange H/D peuvent avoir différentes causes : l'oligomérisation, les changements conformationnels allostériques, les interactions directes avec la membrane.

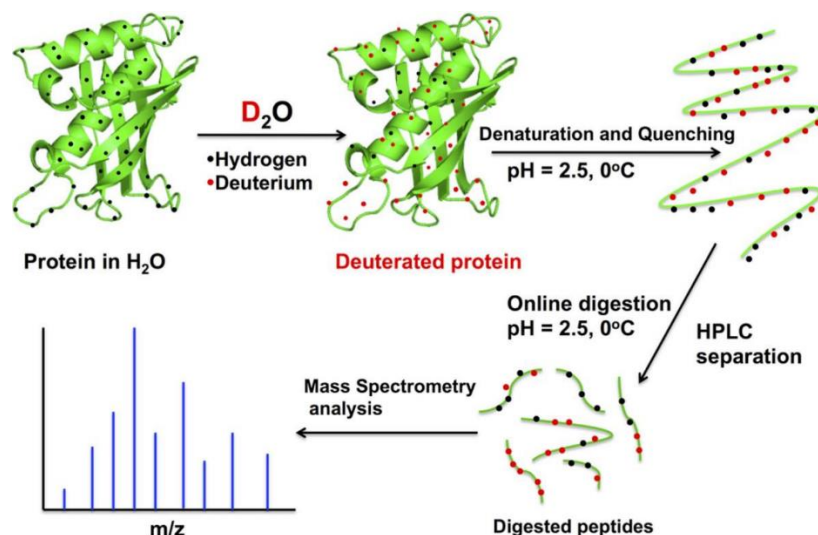


Figure 18 - Principe de l'échange hydrogène deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS), cette figure est adaptée de Cao et al(263).

L'HDX-MS se réalise en quatre étapes. Dans un premier temps, la protéine est incubée dans de l'eau lourde permettant l'échange H/D. Cet échange est ensuite stoppé pour fixer les

atomes de deutérium qui ont remplacé les atomes H, ceci est réalisé par une baisse du pH (ce qui dénature la protéine) et une baisse de température de la solution. La protéine est ensuite traitée par une colonne de HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) où se trouve une protéase qui permet la coupe de la protéine en peptides de différentes longueurs. La colonne va séparer ces peptides en fonction de leur hydrophobicité. L'éluant provenant de l'HPLC va quant à lui être analysé par spectrométrie de masse donnant l'accès au taux d'échange H/D.

Les données de HDX-MS présentées dans cette thèse ont été acquises par Iman Oubella (stage M2) sous la supervision du Pr. C. Vénien-Bryan et du Dr. L. Bannwarth dans l'équipe du Dr. E. Forest à l'institut de Biologie Structurale de Grenoble. Elles ont permis l'analyse de la dynamique de KirBac3.1 WT et de deux mutants W46R et S129R.

2.2 Chapitre 2 : Etude du mécanisme d'ouverture/fermeture du canal bactérien KirBac3.1

Ce chapitre est centré sur l'étude du mécanisme du canal bactérien KirBac3.1 sauvage. Il répond au premier objectif de la thèse concernant la compréhension du mécanisme permettant au KirBac3.1 de passer d'un état fermé à un état ouvert.

Des simulations de MDeNM ont été lancées afin d'étudier les différentes conformations que peut arborer KirBac3.1. Le diamètre du canal en ces deux points de constriction a été investigué et les mouvements conformationnels participant à son ouverture ont été détectés et décrits dans ce travail.

Parallèlement, des études expérimentales ont été menées. La première concerne l'étude de la flexibilité de la protéine par l'intermédiaire de la méthode HDX-MS, elle a été réalisée par Iman Oubella sous la direction du Pr. Vénien-Bryan et du Dr. Forest. Une seconde étude expérimentale a été réalisée sur le KirBac3.1 WT, il s'agit d'une étude d'électrophysiologie menée par le Dr. Bendahhoud permettant d'obtenir le pourcentage d'ouverture du canal.

L'étude par MDeNM souligne le rôle joué par les mouvements globaux des différentes régions (le domaine cytoplasmique, les hélices, etc...) et les mouvements locaux (distances mesurées pour évaluer l'ouverture du canal, etc...) ainsi que les différentes conséquences des premiers sur les seconds. Ces résultats mettent en évidence plusieurs changements conformationnels en relation avec l'ouverture du canal comme : le balancement du domaine cytoplasmique, les mouvements de pivot et de soulèvement de l'hélice de glissement ainsi que les coudes formés par les hélices transmembranaires. Ces régions impliquées ont été analysées par HDX-MS : les descriptions réalisées lors de la MDeNM coïncident avec le résultat expérimental obtenu. La MDeNM donne accès aux différents états du canal, le pourcentage de structures à l'état d'ouvert théorique est du même ordre de grandeur que celui trouvé en électrophysiologie (12%).

Cet article a été accepté pour publication dans Scientific Reports le 29/04/2020.

New Structural and functional insights into Kir channel gating from molecular simulations, HDX-MS and functional studies

Charline Fagnen^{1,2} Ludovic Bannwarth¹, Iman Oubella¹, Eric Forest³, Rita De Zorzi⁴, Aline de Araujo^{1,2}, Yasmina Mhoumadi^{1,2}, Saïd Bendahhou⁵, David Perahia² and Catherine Vénien-Bryan¹

¹Sorbonne Université, UMR 7590, CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Institut de Minéralogie, Physique des Matériaux et Cosmochimie, IMPMC, 75005 Paris, France.

²Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée, Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay, Centre National de la Recherche Scientifique, 91190 Gif-sur-Yvette, France.

³University Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France, CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France, CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France.

⁴Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Trieste, Via Licio Giorgeri 1, 34127, Trieste, Italy ⁵CNRS UMR7370, LP2M, Université Côte d'Azur, Faculté de Médecine, Nice, France.

To whom correspondence is addressed: catherine.venien-bryan@upmc.fr

Running title: Gating mechanism of potassium channel

Keywords: Potassium channels, Molecular Dynamics, Normal Modes, Mass spectrometry, Electrophysiology

2.2.1 Abstract

Inward rectifier potassium (Kir) channels play diverse and important roles in shaping action potentials in biological membranes. An increasing number of diseases are now known to be directly associated with abnormal Kir function. However, the gating of Kir still remains unknown. To increase our understanding of its gating mechanism, a dynamical view of the entire channel is essential. Here the gating activation was studied using a recent developed in silico method, MDeNM, which combines normal mode analysis and molecular dynamics simulations that showed for the very first time the importance of interrelated collective and localized conformational movements. In particular, we highlighted the role played by concerted movements of the different regions throughout the entire protein, such as the cytoplasmic and transmembrane domains and the slide helices. In addition, the HDX-MS analysis achieved in these studies provided a comprehensive and detailed view of the dynamics associated with open/closed transition of the Kir channel in coherence with the theoretical results. MDeNM gives access to the probability of the different opening states that are in agreement with our electrophysiological experiments. The investigations presented in this article are important to remedy dysfunctional channels and are of interest for designing new pharmacological compounds.

2.2.2 Introduction

Inward rectifier potassium (Kir) channels play diverse and important roles in shaping action potentials of cardiac myocytes, membrane potentials of nerve and glial cells, hormone secretion of pancreatic β cells and potassium homeostasis of kidney¹. Kir Channel dysfunction causes an increasing number of diseases¹. The flow of K^+ ions through the pore is controlled by conformational changes in the Kir channels^{2,3} described as gating. KirBac3.1 is a prokaryotic Kir homolog (28% identity with human Kir2.1) that has the same characteristic structural elements as eukaryotic Kir channels^{4,5} (see also sequence alignment **Fig. 24**). The X-ray crystallographic structures reveal that KirBac3.1 is a tetramer and the secondary structural elements include the slide, outer (TM1) and inner (TM2) helices plus the pore helix, the selectivity filter, and the C-terminal cytoplasmic domain (CTD) (see **Fig. 19a** for nomenclature).

Different Kir-channel structures are available of both prokaryotic and eukaryotic channels, and those of the same channel in different conformational gating states are particularly informative. These structures have given some clues regarding the dynamics of the channel, for instance: i) the kink in the TM1 and TM2 helices⁵⁻⁷ ii) the slide helix orientation^{7,8} iii) the cytoplasmic domain position relative to the transmembrane domain⁹⁻¹¹ iv) the K-channel selectivity filter described rather as a rather rigid entity^{12,13}. However, these crystallographic “snapshots” might not be relevant to the dynamic gating conformations of ion channels as they give a partial and limited view of the process. One of the major challenges in ion channel structural biology is to understand how these different static crystallographic states relate to the function of the channel.

Targeted global structural rearrangements during gating have been investigated using single-molecule FRET measurements^{14,15} and structural mass spectrometry¹⁶. Despite valuable experimental data on structural dynamics of the channel¹⁷, the overall conformational changes of gating transitions remain speculative, and the global and local motions of the whole protein are still missing. Molecular dynamics studies have also been performed,^{18,19} but the short simulation times (hundreds of ns) often make it difficult to observe the whole gating process.

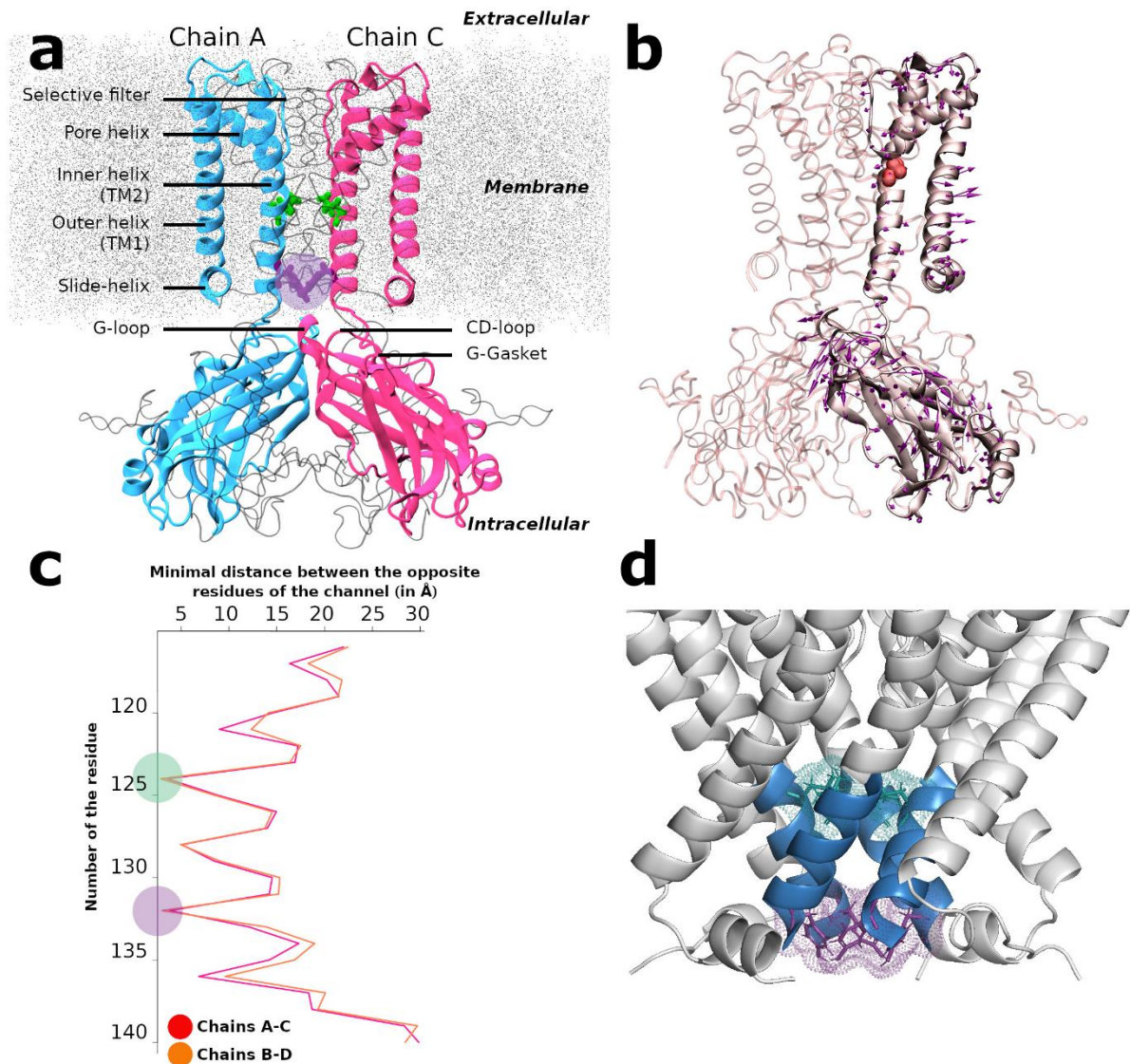


Figure 19 - Structure, Normal Mode and constriction points of KirBac3.1. (a) Overview of the KirBac3.1 structure (from PDB 2WLJ). NewCartoon representation of two opposite monomers (chain A in blue, chain C in pink) for clarity, the other two subunits (chains B and D) are represented in Newribbon gray. Leu124 and Tyr132 at the constriction points are respectively in green and purple. The membrane is in dotted gray. The purple circle represents the Helix Bundle Crossing (HBC) gate. (b) Direction of motion of mode 123 involved in the opening/closing of the KirBac3.1 channel. Gly120 is in red in Van der Waals representation, arrows show the direction followed by the C α atoms. (c) Minimal atomic distances on the plane parallel to the membrane between opposite residues of chains A and C (in red) and between chains B and D (in orange) versus residue numberings. The position of the constriction regions located at Leu124 and Tyr132 are highlighted in green and purple circles, respectively. (d)

Crystallographic structure of the KirBac3.1 channel. Stretch of residues from Met121 to Ala 133 is in blue. The constriction residues Leu124 (green) and Tyr132 (purple) are highlighted.

In the present work, for the very first time, we provide a clear view of the transition from closed to open of the whole KirBac3.1 protein using *in silico* methods and experiments. We present a clear description of the global and local (side chain) motions involved in the gating mechanism, bridging the gap between the crystal structures and the dynamics of the channel. One of the main challenges in computational biology is to structurally characterize functional motions occurring at long time scales, in particular when large movements are involved such as in the gating mechanism of the Kir channels. To overcome this problem, we used a recently developed computational method: Molecular Dynamics with excited Normal Modes (MDeNM)²⁰. The great advantage of this hybrid simulation is that it exhaustively explores the energetically accessible conformations within the space spanned by a given number of low-frequency normal modes, all of which are associated to slow collective dynamics of the molecular system. Moreover, MDeNM enables the exploration of relatively higher energy low-populated states that might be important to biological functions. We describe how different structural changes, such as the kinks of the internal and external TM helices, are associated to motions of slide helices and CTD (swinging and rotational movements) in the gating mechanism, at the global and local levels. Furthermore, the calculations provide open and closed states populations that can be compared with those obtained by electrophysiological experiments. *In silico* results are also supported by Hydrogen/Deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS). Different types of motions were involved in the gating, which appears more complex than currently perceived.

2.2.3 Results

2.2.3.1 Theoretical data

The theoretical results presented in this section are based on MDeNM simulations in which a selected set of normal modes (NMs) related to opening/closing of the channel are excited within molecular dynamics (MD) simulations. Through a combination of MD and NMs, the MDeNM is a realistic exploration of the relevant normal mode space for opening/closing processes taking into account the full environment (membrane, water, ions) of the protein at a given temperature. These simulations are completed by standard MD simulations carried out

for a uniformly distributed set of structures that provide a fairly good estimation of the populations of the open/closed (and partially open) states.

2.2.3.1.1 Channel constriction points

To be able to select relevant NMs for gating, the positions of constriction points along the channel in the closed conformation crystallographic structure (2WLJ) were identified by scanning the minimal distances between facing residues along the segment forming the channel and buried within the membrane, i.e. between the residues 115 and 140. The width of the pore at each residue can be estimated using this method; the resulting values are given in **Fig. 19c**. The two most constricted regions correspond to the position of Leu124 and Tyr132 residues, with pore width minimal distances of 3.58 Å (Leu124AC: between opposite chains A and C) and 2.89 Å (Tyr132BD: between opposite chains B and D) respectively as shown in **Fig. 19d**. These distances are not sufficient to let a potassium ion with an ionic diameter of 3.53 Å²¹ hardly go through the channel unless global and local motions cause an increase of the pore diameter.

2.2.3.1.2 Selection of modes contributing to the gating

Eleven most representative modes out of 200 involved in the opening of the channel were identified (see Supplementary data). In one of the selected modes, shown in **Fig. 19b**, the arrows of motion in the regions under and above the residue Gly120 of the inner helix (red residue in **Fig. 19b**) are directed in opposite directions, accounting for the kinking of the inner helix observed in the X-ray crystallographic structure of KirBac3.1, open conformation⁹. A similar trend is observed for the external helix, in which the arrows indicate also a motion causing a kink at Ala62 facing Gly120. The bending of the outer helix is confirmed by rearrangements observed in cryo-electron microscopy (cryo-EM) data⁶. Both helices display a concerted motion during their kinking. In this type of collective motion, the lower half of TM2 helices move outward, contributing to the opening of the channel in the constriction regions. More interestingly, arrows on the slide helix indicate that its outward movement is correlated with that of TM helices, most probably contributing to the opening of the channel. As far as the CTD is concerned a swing type motion is observed. Note that **Fig. 19b** shows one particular mode where the opening of the channel has been investigated and the movement of the CTD is less important. Other modes will show different dynamics. The amplitude of the arrows are

such that they correspond to a 1 Å of RMSD displacement and is just illustrative of the kind of movement. The final real amplitudes are those obtained by the cumulative contribution of all the selected modes provided by MDeNM simulations.

2.2.3.1.3 Population of open and closed states from the relaxed structures issued from MDeNM simulations

In order to get dynamic information from the selected normal modes described in Materials and Methods, we carried out MD simulation including the full environment (water, lipids, ions) using MDeNM. Four channel-gating states can be discriminated based on the open or closed conformation of the two main constriction points (Leu124 and Tyr132) observed in the ensemble of relaxed structures: 1) Fully open state, when the minimal distances at both the constriction points are greater than the ionic diameter of K^+ ; 2) Fully closed state, when both distances are less than the ionic diameter of K^+ ; 3) Half-open state 1, when gating at Leu124 is open and gating at Tyr132 is closed; 4) Half-open state 2, when gating Tyr132 is open and gating at Leu124 is closed. A clear definition of open or closed functional states is challenging to give in the context of our study. We have given a minimum definition based on the distances between the opposing residues at constriction points, which could provide an estimate on the minimal probabilities of having the open state. Inevitably, we overlook other possible effects such as ion permeation through a channel with a diameter smaller than the size of the ion as happens along the protein selectivity filter. Such permeation implies an induced effect of ions favoring structural adjustments as they pass through the channel, which this study cannot address. Rather, our objective was to show how global movements could participate in channel widening that could increase the probability of ion flux. Our definition of open and closed states is supported by the representation of fully closed, fully open and half open structures with the HOLE software (**Fig. 26**). It is clear that in our closed structure the conduction pathway is shut (red patches at the two constriction points of the channel) and that the open structure can accommodate water molecules in the channel and thus K^+ ions. Also, we checked the open structure's ability to accept a polyamine. Under physiological conditions, the inward rectifying current from the Kir channels are the results of intracellular block of the polyamines. A spermine molecule was docked in one of our KirBac3.1 WT open structures with the Autodock Vina software (**Fig. 27**). The open state structure of the channel allows the positioning of the spermine so that the state of the structure can be considered as open.

Interestingly, the fully open state is only populated of about 6.8 %, and it is worth noticing that the gating at Tyr132, closer to the cytoplasmic domain, is more often closed and more restricted than the gating at Leu124 (28.8 % compared with 14.2 %, respectively, **Table 3**). These data are consistent with our experimental functional data (see below).

Tableau 3 - Populations (in percentage) of different opening states in the relaxed structures of KirBac3.1 WT obtained through MDeNM simulations.

<i>Channel States</i>	<i>KirBac3.1 WT</i>
<i>Fully open</i>	6.8%
<i>Fully closed</i>	50.2%
<i>Half open 1 (124 open, 132 closed)</i>	28.8%
<i>Half open 2 (132 open, 124 closed)</i>	14.2%

More details about the gating states can be obtained by analyzing the scatter plots of minimal distances between the opposite chains A and C and those between chains B and D at both constriction points over all the MDeNM relaxed structures as shown in **Fig. 20a**. Minimal distances between the chains A and C (AC) at Leu124 range from 1.52 to 11.30 Å, and between the chains B and D (BD) from 1.66 to 8.81 Å (**Fig. 20a** in red). The corresponding values at Tyr132 range from 0.44 to 7.00 Å and from 0.75 to 6.22 Å, respectively for chains AC and for chains BD (**Fig. 20a** in blue).

From the gray areas in **Fig. 20a**, it is clear that structures with a closed gate at Tyr132 are much more populated (more than 79.00 % of all the structures) than those with a closed gate at Leu124 (around 64.40 %). Therefore, Tyr132 constitutes the main constriction point. Interestingly, from a statistical point of view, one can observe that larger distances between the chains A and C correspond to smaller distances between chains B and D, and vice versa, indicating an elliptical movement of the channel.

2.2.3.1.4 Implication of global and local motions to the gating

MDeNM simulations couple global and local motions through NM excitations in the framework of MD simulations, making it possible to distinguish the implication of both types of motions in the gating. To determine the contribution of the global motions to channel opening/closing, the scatter plot of C α -C α distances between opposite residues in the AC and BD chains were analyzed at the constriction points level. This was done over the same relaxed ensemble as used for the minimal distances. The plot shape for distances between C α atoms at Tyr132 (**Fig. 20b**, in blue) is similar to that of minimal distances between chains (**Fig. 20a** in

blue), suggesting that global motions are playing an important role in the opening of this gate. Nevertheless, in the minimal distances plot, some points are scattered outside the elliptical core, towards smaller values (**Fig. 20a**), indicating the contribution of local motions too. The same analysis at Leu124 (**Fig. 20a and b** in red) shows a larger outgoing dispersion of minimal distances towards the closed region, indicating that the local motions play a significant role in the opening/closing of this gate of the channel.

In order to better differentiate the implication of global and local motions, different subsets of structures were considered: a subset of structures closed at both constriction locations (Leu124 and Tyr132), a subset fully open in both locations, and two subsets of structures open in one site and closed in the other. The C α -C α distance scatter plots between opposite chains AC and BD of all these subsets are given in **Fig. 20 c-d** for both constriction regions.

Some general features can be noted: 1) the distributions are in general more circular at Leu124 (**Fig. 20c**), and more elliptical at Tyr132 (**Fig. 20d**), which is indicative of an inverse correlation between distance variations of chains AC and BD at Tyr132 for either open and closed states; 2) The closed states for both constriction points are centered at C α -C α distances of about 12 Å between facing chains; 3) A larger variation in the distribution of points is obtained at the constriction of Leu124 rather than at Tyr132 indicating a larger global structural variability at Leu124, consistent with the fact that Leu124 gating is less restrictive.

A more detailed analysis points out that at Leu124 (**Fig. 20c**) both the AC and BD C α -C α distances corresponding to the open state (blue and green) have their maximal populations located very close to each other, but are further away from the most populated distance of the closed state (red). Furthermore, when AC and BD distances are simultaneously larger than 12.8 Å, the structures are mostly open, considering that such value is too large for local motions of residues to be able to close the channel. For distances below 11.0 Å, the region is highly restricted to the point that no side chain movement would allow an opening of the channel. For distances between 11.0 Å and 12.8 Å, local motions have a determinant role: opening/closing of the channel in this range of distances depends only on motions of side chains. There is interplay between the global and local motions for the opening/closing of the gate at Leu124, the former determining the widening range of the channel, and the latter intervening mostly within a given intermediate range.

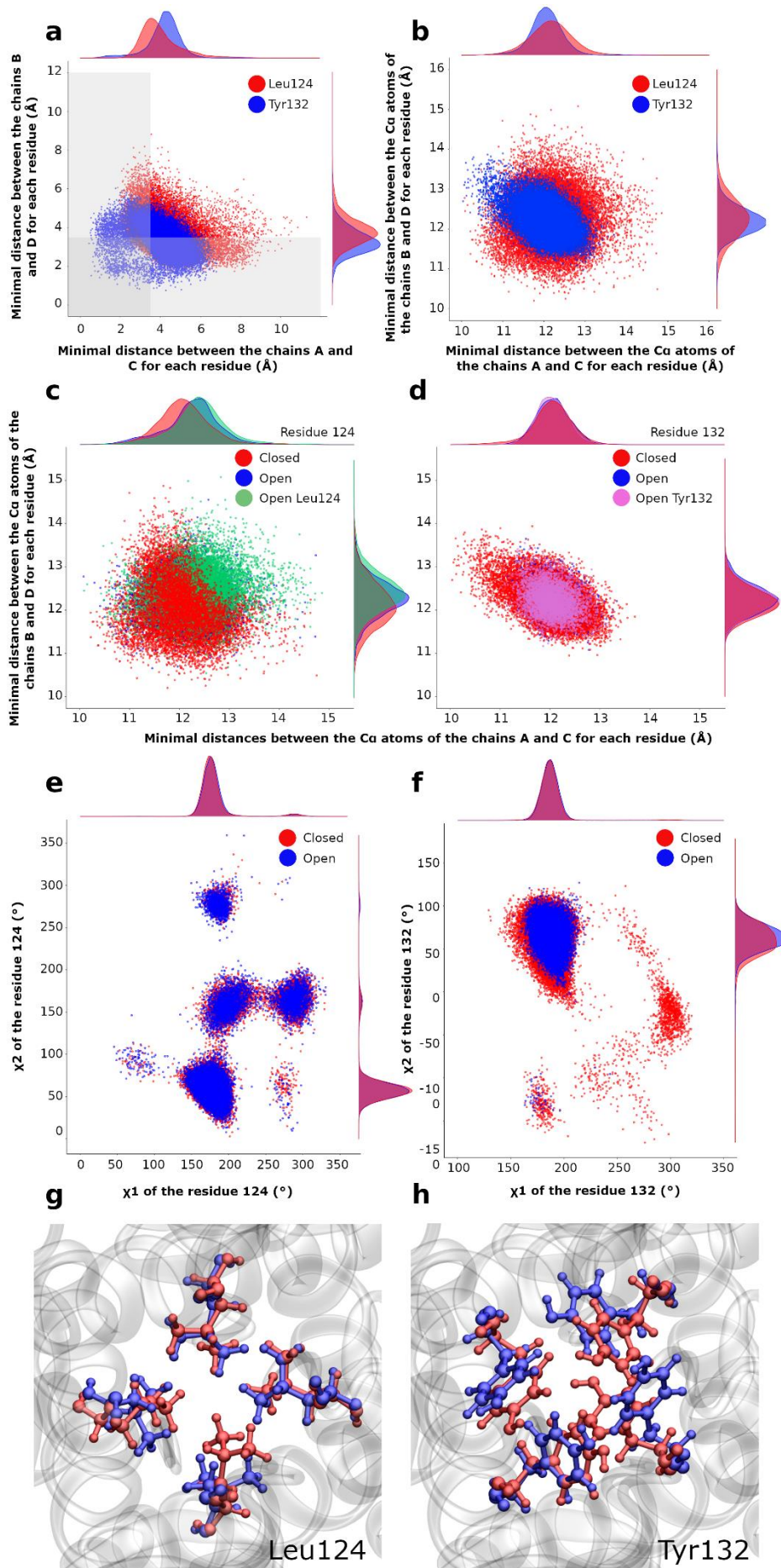


Figure 20 - Gating at the two constriction points Leu124 and Tyr132. (a) Scatter plots of the minimal distances between the chains B and D and between A and C. Red and blue points correspond to the residues Leu124 and Tyr132, respectively. The gray area delimits the region where the channel is closed. (b) Scatter plots of distances between C α atoms of the residues 124 (in red) and 132 (in blue) for chains AC and BD. (c-d) Scatter plots of C α -C α distances on X-Y plane between chains A and C (abscissa) and between chains B and D (ordinate) at the residue Leu124 (c), and at the residue Tyr132 (d). Each point is colored in function of its state: red for closed, blue for open, green for only open for the Leu124, purple for only open for Tyr132. Along each axis, the population density curve of the points is given for each state of the channel; (e-f) Scatter plots of χ_1 and χ_2 angles for all the chains for Leu124 (e) and Tyr132 (f); (g) Superposition of the most open structure (in blue) with the most closed structure (in red) for residue Leu124; (h) same as in (g) but for residue Tyr132.

As far as the gate at Tyr132 is concerned (**Fig. 20d**), the population distributions of open and closed states are very close to each other. However, extreme distances between the C α atoms of chains AC, or between chains BD, such as below 11 Å or above 13 Å, correspond mostly to closed states, depending solely on global motions. Note that due to the elliptical shape of the scatter plot at Tyr132 an increase in the distance between two opposite chains is associated with a decrease in the distance between the other two chains. The opening of the channel requires that the minimal distance between the C α atoms of opposite chains be in a certain range so that the side chain motions can intervene for opening and closing the channel (between 11 Å and 13 Å).

2.2.3.1.5 Side-chains rotational motions of residues at the constriction regions associated to gating

In order to better highlight the importance of side chain motions in the opening/closing of the channel at both constriction points, we analyze here the distribution of side chain rotational angles (χ_1 and χ_2) in the various open and closed subsets (**Fig.20e** and **20f**). For Leu124, all rotational conformations occur either in the open (blue) or closed (red) states with large variations of χ_1 and χ_2 angles, between 50° and 350°. χ_2 adopts all four isomeric rotational values, the most favored (χ_1, χ_2) combinations being (180°, 60°), (180°, 160°), (180°, 280°), and (280°, 160°) (**Fig. 20e**). However, a different rotational state in only one given chain could be sufficient to let K⁺ ions to go through the channel (**Fig. 20g**).

The (χ_1, χ_2) values of Tyr132 (**Fig. 20f**) display a major group around ($200^\circ, 75^\circ$) either in the closed or open states, and two minor ones around ($180^\circ, -150^\circ$) and ($300^\circ, -40^\circ$) in the closed state. In the major group slight variations of χ_1 and χ_2 rotations can be crucial for opening/closing of the channel without excluding the global motions as illustrated in the **Fig. 20h**.

2.2.3.1.6 Correlations between types of global motions and gating from the relaxed structures obtained following MDeNM simulations

Kink of the outer and inner helices

The correlations between kink angles of TM helices (**Fig. 21a**) and the minimal distances between them at the constriction points are presented in **Fig. 22a**. The gating (*g*) Leu124BD (*g124bd*) is correlated with the kink angles of the outer TM1 helices at Leu56 (*kox*, where *x* stands for the chain) of chains B (*kob*) and D (*kod*); see Materials and Methods for definition for the definition of the structural determinants. The gating Tyr132AC (*g132ac*) is correlated with the kink angles of the inner TM2 helices at Gly120 (*kix*) of chains A (*kia*) and D (*kid*) and the gating Tyr132BD (*g132bd*) is correlated with *kib* and *kic*.

These results highlight that the gating at Tyr132 is linked to the kink of the TM inner helices whereas the gating at Leu124 is linked to some extent to the kink of the outer TM helices.

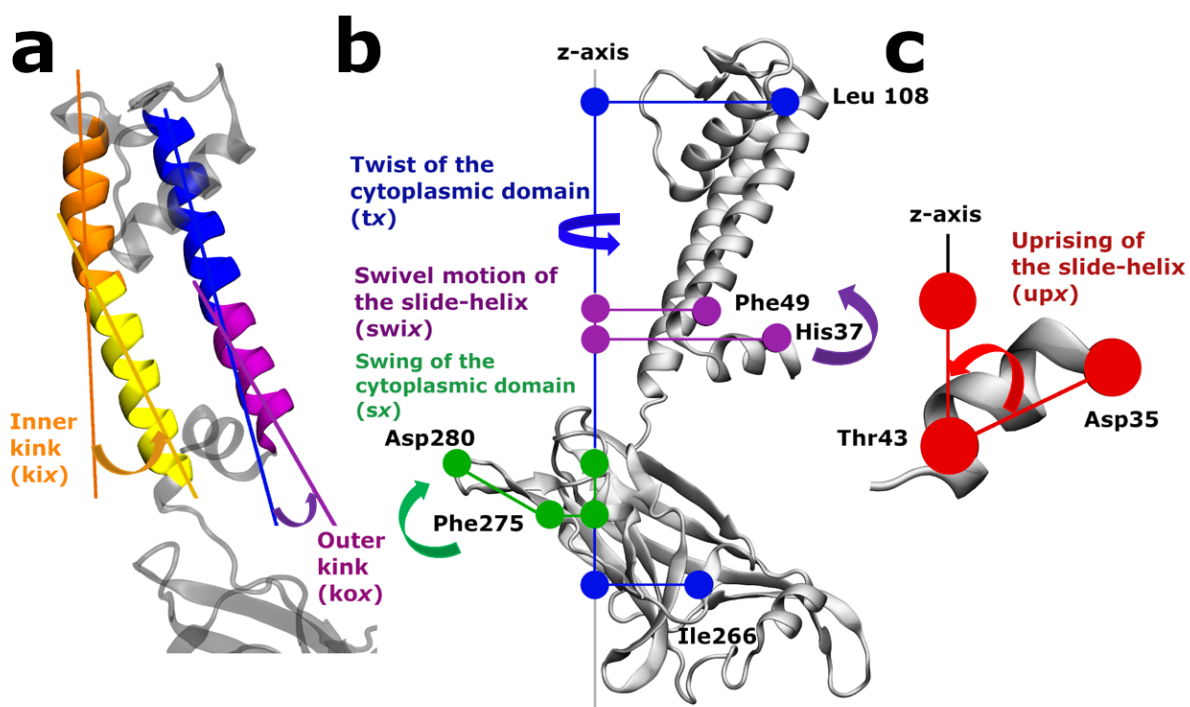


Figure 21 - Description of the structural determinants. (a) Kink angle of the inner helix (*kix*) defined by the two axes: Ala109 to Gly120 (in orange) and Gly120 to Phe135 (in yellow). Kink angle of the outer helices (*kox*) defined by the two axes: Cys71 to Leu56 (in blue) and Leu56 to Trp46 (in purple) (b) Swivel angle of the slide-helices (*swix*) in purple, the twist angle (*tx*) in blue and the swing angle *sx* in green of the cytoplasmic domain. (c) Uprising angle of the slide-helices (*upx*). *x* character in the naming of structure determinant stands for the chains A, B, C and D. (see supplementary data for the definition of the angles).

Slide-helices

The swivel (**Fig. 21b**, purple) and upward (**Fig. 21c**) motions of the slide helices are involved in the gating of the channel as shown in **Fig. 22b**. It may be observed that the swivel motion of the slide helices of chains B (*swib*) and D (*swid*) are inversely correlated with the minimal distance at Leu124AC (*g124ac*) and Leu124BD (*g124bd*) respectively. The swivel motions of the slide helices of chain C (*swic*) and D (*swid*) are correlated with the minimal distances at *g132ac*. The minimal distance at *g124bd* is correlated with the uprising motion of the slide-helix of chains C (*upc*). The simultaneous upward movement of all the slide-helices (*upa*, *upb*, *upc* and, more weakly, *upd*) favors the opening of *g132ac*. The upward movements of the slide helices in chains C (*upc*) and D (*upd*) are also correlated with *g132bd*.

Cytoplasmic domain

Fig. 22c describes the normalized correlations between the opening of the channel and the twist or swing angles of the cytoplasmic domain (**Fig. 21b** blue and green respectively). The minimal distance at *g124bd* is correlated with the twist angle of the cytoplasmic domain of the chains A (*ta*) and B (*tb*), however, the minimal distance of *g132ac* is inversely correlated with *ta* and *tb*.

As far as the swing motions of the cytoplasmic domain are considered, the minimal distance at Leu124AC (*g124ac*) is inversely correlated with the swing angles of chains A (*sa*) and D (*sd*), but that of Leu124BD (*g124bd*) is correlated with *sa* and *sd*. The minimal distance at Tyr132AC (*g132ac*) is inversely correlated with the swing angle of chains A (*sa*) and B (*sb*), and that of Tyr132BD (*g132bd*) is correlated with the swing angles of chains C (*sc*) and D (*sd*). Overall the gating at Leu124AC is influenced when the swing motions of chains A and D are

opposite to those of chains B and C, and the gating at Tyr132 is influenced when the swing motions of chains A and D are opposite to those of chains C and D.

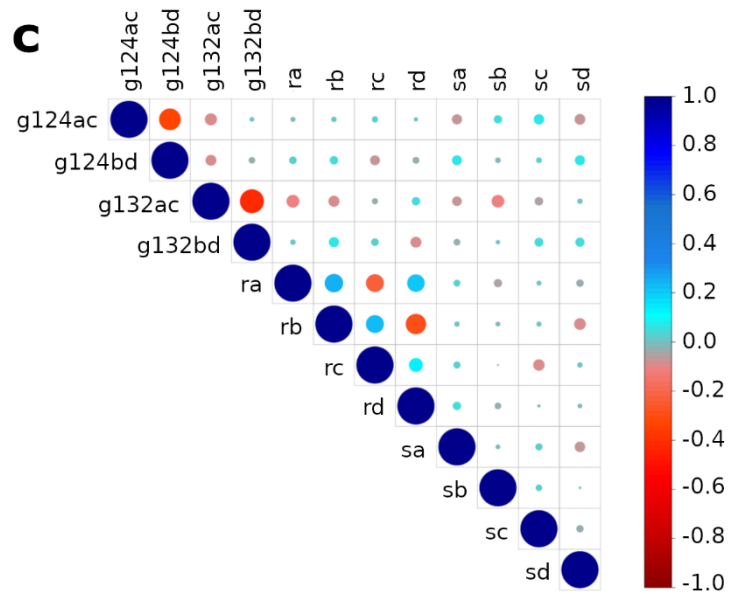
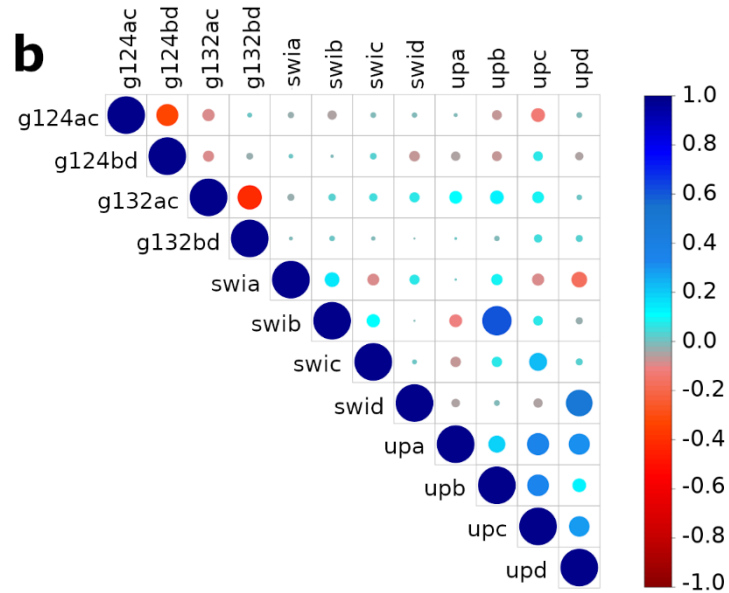
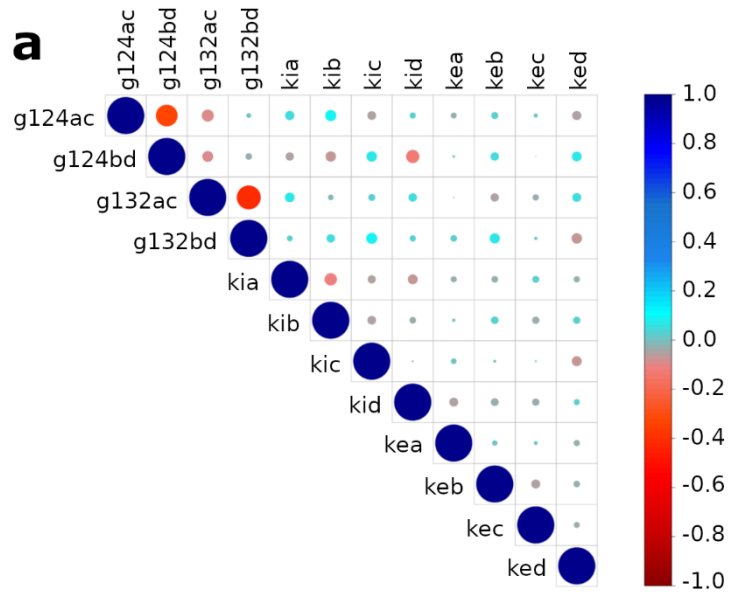


Figure 22 - Graphs of normalized correlations between the structural determinants within the ensemble of MDeNM relaxed structures. g124ac, and g124bd are the minimal distances at the residue Leu124 between the opposite chains A and C and between the chains B and D, respectively; g132ac and g132bd are those relative to the constriction point at residue Tyr132. The area of the circle is proportional to the correlation strength between two parameters, the blue color indicates a positive correlation, and the red one a negative one (inverse correlation). The correlation value is given by the color scale bar at the right of the figure. (a) Correlations between minimal distances between the chains at the constriction points and the kink angles of TM helices. kia, kib, kic, kid represent the kink of the inner helices of the chains A,B,C and D, respectively ; koa, kob, koc, kod represent the kink of the outer helices of the chains A,B,C and D, respectively (b) Correlations between minimal distances between chains at constriction points, the swivel (swia, swib, swic, swid) and uprising angles (upa, upb, upc, upd) of the slide-helices; (c) Correlation between minimal distances between chains, the twist and swing angles of the cytoplasmic domain. ta, tb, tc, td represent the twist angles of the cytoplasmic domain of the chains A, B, C and D respectively. sa, sb, sc, sd represent the swing angles of the cytoplasmic domain of the chains A, B, C and D respectively.

2.2.3.2 Experimental data

2.2.3.2.1 Hydrogen/Deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS)

Protein conformational dynamics of KirBac3.1 were investigated using HDX-MS, a method based on hydrogen/deuterium exchange at the amide backbone of a protein, reflecting its dynamical properties. While protein HDX occurs at any site containing labile hydrogen, amides on the peptide backbone are by far the most commonly measured exchanges in HDX experiments. HDX has been widely used on soluble proteins and also on membrane proteins^{22,23}. HDX was performed on the purified KirBac3.1 protein in detergent. We have established in earlier work that the presence of detergent does not affect the conformational changes of KirBac channel¹⁶. To achieve sequence coverage as large as possible, we tested various proteases. Optimized conditions led to sequence coverage of 60 % and 70 % using pepsin in solution and on column respectively, and a larger coverage of 86 % with nepenthesin (**Table 4** and **Fig. 28**). Deuterium incorporation was monitored as a function of time for each peptide generated from KirBac3.1 (**Fig. 29**).

The most flexible region of the protein (**Fig. 23a**) is located in the CTD, the stretch of residues (aa) 271-285, i.e. the loop between β 14 and β 15 with an HDX rate of 59.1 % (for secondary elements numbering refer to **Fig. 23b and Fig. 24**). The loop is subjected to the swinging movement taking place during the gating described earlier. The next, more flexible, domain is at the G gasket just below the CD-loop and the entire β 8, (**Fig. 23b**, aa 199-210, HDX rate of 57.9 %). A similar percentage (57.7 %) is shown for i) the stretch going from the end of the β 5 and the start of the β 6 including the CD loop in the middle (aa 162-174), and also ii) the stretch going from the end of β 6 and the start of β 7 including the loop in the middle facing down (aa 181-194). The stretch including the end of the G loop and the following β 11 also shows some flexibility (aa 250-260, HDX rate of 38 %). As a general characteristic, the center of the cytoplasmic domain is more rigid (**Fig. 23a**, blue) than the outer surface of the cytoplasmic domain (in red).

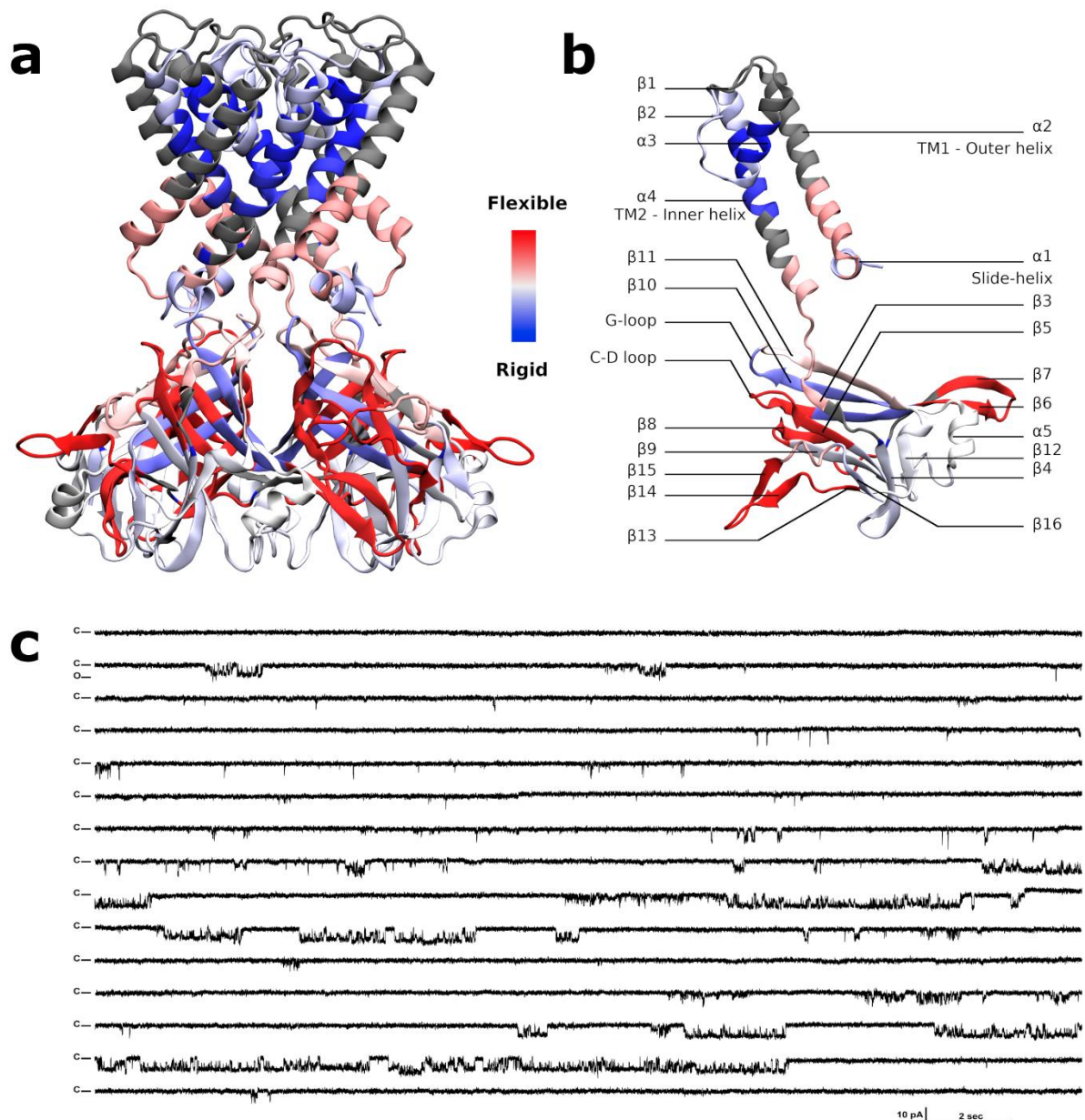


Figure 23 - HDX rates of peptides reported on the KirBac3.1 model (2WLJ) and functional studies on the channel. (a-b) Identified peptides are drawn with blue to red color according to their percentage of deuterium exchange after 1,200 s (scale of exchange shown between panel a and panel b). Gray color is used in regions where no data are available. (c) Single channel recordings from wild-type KirBac3.1 channels; example of traces for 6-min consecutive recordings at -80 mV holding potential. Closed level is labeled C, and O for open.

In the transmembrane domain, the very end of the slide helix and the bottom half of the TM1 are clearly more flexible (aa 43-56, HDX rate of 45.2%), note that the top half of the TM1 is not accessible using this method. The stretch at the bottom of TM2-loop and $\beta 3$ that includes

the restriction point Tyr132 shows some flexibility (aa 132-143, HDX rate of 42.5 %) unlike the top of the TM2, which is particularly rigid (**Fig. 23a in blue**). Note that the restriction point Leu124 is not detected in HDX-MS (**Fig. 30**). The slide helix shows some flexibility as well (aa 35-42 HDX rate of 21.4 %).

2.2.3.2.2 Current recordings of KirBac3.1 in planar lipid bilayers

KirBac3.1 channels exhibit significant gating heterogeneity states as current recordings at -80 mV show (**Fig. 23c**). Fits of Gaussian distributions of multiple histograms led to a single channel current level of 3.75 ± 0.027 pA at -80 mV corresponding to a 47 pS conductance (**Fig. 31a** revealed). Analysis of all events of the full 6-min recording at this potential the presence of multiple subconductance states of KirBac 3.1 (**Fig. 31b**). Subconductance states have also been reported for the KirBac 1.1²⁴ and KirBac3.1¹⁰ channels. Interestingly, the calculated mean open probability (P_o) at this potential was 9.9 % (± 1.3 , $n=1,803$). A close by value of ($P_o=12$ %) was obtained for the KirBac1.1 channel¹⁵ supporting the theoretical opening value of the channel of about 6.8%.

2.2.4 Discussion

In this paper, we examined the inherent motions of KirBac3.1, which are definitively associated with gating, i.e. the opening of constriction points of the channel, corresponding to residues Leu124 and Tyr132, with the constriction point at Tyr132 being more often closed. Theoretical data show an opening of the channel about 6.8%, this is supported by experimental data ($P_o=9.9$ %) and also by the comparison with the value obtained for the KirBac1.1 channel¹⁵. Two main subconductance states (13 pS and 25 pS) were observed (corresponding to 1.02 and 2.03 pA current levels at -80 mV), **Fig. 31b**. The multi-conductance behavior of the KirBac channel has been attributed to ion interactions with the pore²⁴ and could well explain several intermediate conformational states where the channel adopts two half open states.

The objective of this analysis was the study of the intrinsic movements of the channel in the absence of K^+ within the channel. The passage of K^+ ions through the channel depends on such movements, and the kinetics of the passage of the ion will certainly depend on its interaction with the pore and also to its hydration and dehydration states. As theoretical results carried out in the absence of K^+ ions and experimental electrophysiological results accounting

of these ions are very similar in the estimation of open state population. This fact tends to demonstrate that the intrinsic dynamical properties of the channel should play a major role in gating, and to suggest that the opening of the channel should not be mainly dependent on the presence of the K^+ ions.

For the first time, we report here that local motions of residues in constriction regions, Leu124 and Tyr132, have a determinant role when the $C\alpha$ - $C\alpha$ distances of opposite chains are between 11 Å to 13 Å. Such distance variations depend on the overall global movements of the protein that were observed through HDX-MS experiments. In addition, simulation data show that the individual side chain motion of a single residue of Leu124 or Tyr132 in the tetramer, independently of the others, can be sufficient to open the channel and favor the passage of K^+ .

Our studies show that there are multiple global motions that play an important role in gating as described below.

1) Kinks of the TM helices. Observation of relaxed structures shows that TM2 (the internal helix) and interestingly TM1 (the outer helix) undergo kink variation up to 25.2° around the amino acid Gly120 and Leu56 respectively with standard deviation (SD) of 4.5° during the opening/closing process. A significant flexibility of TM2 is also shown with the HDX-MS experiments in agreement with previous crystallographic work⁹. The widening of the channel in another Kir protein, Kir3.2 is also associated with the rotation and splaying apart of the inner transmembrane helices as reported published *in silico* work^{25,26}. Interestingly, the bottom of TM1 also shows flexibility as previously reported in published cryo-EM work (variation of the kink up to 20°)⁶. Note that this feature has not been observed in the crystallographic structure⁹.

2) Upward and swivel motion of the slide helix. This amphipathic slide helix is a ubiquitous structural motif of many K^+ channels. It has been described as a “belt”¹⁵ around the channel on the cytoplasmic face of the membrane and has been proposed to be a key lining element between ligand-binding or voltage-sensing gating domains and the pore gating^{27,28}. The slide helix shows a clear flexibility in our HDX measurements (**Fig. 23b**). More precisely, our theoretical data show that upon opening of the channel, the swivel (variation of 47.8° with a SD of 6.2°) and upward (variation of 21.4° with a SD of 3°) motions of this helix cause a movement toward the inside of the channel of the residue His35, at the extremity of the slide-helix. At the same time, Ser45, at the other end of the slide helix, moves towards the outside of the channel. A similar behavior of the four slide helices (strong correlation of the *upa*, *upb*, *upc*

and *upd* parameters) demonstrates that the slide helices undergo a concerted upward movement during channel movement. Considering that the slide helices are not in direct contact with each other, it might be explained by the proximity of the membrane.

3) Swing motion associated with a twist of the cytoplasmic domain. Motions of the cytoplasmic domain that couple ligand binding to the gating of the channel have been thoroughly investigated and two different models have been proposed: The “upward motion model,” suggested by the structure of Kir2.2¹¹, refers to an upward motion of the CTD, which translates towards and becomes tethered to the transmembrane domain. In addition, when the protein binds PIP₂, a small twist (5°) of the cytoplasmic domain is also involved in the gating²⁹. Another model, the “twist to open” model proposes that a twist movement (approximately 25°) of the CTD relative to the plane of the membrane is crucial to allow gating⁹. However, work from another group has shown that the cytosolic domain is relatively independent from the pore-forming domain¹⁰. Single-molecule FRET has revealed the structural dynamics and flexibility of the CTD, with tilting or twisting motions of the CTD coupled to the HBC-gate closure¹⁵. Swing motion has also been supported by AFM experimental evidence³⁰ and recent studies on GIRK2²⁶. Our data show that the swing movement of the CTD region (variation of 121.6° with SD of 13.6°) is determinant for the opening of the channel. Twists (variation of 33.8° with SD of 5.1°) of individual chains can be associated with this swing movement. Our work indicate that the modes describing a full rotation of the CTD (excluding twist movement) were uncoupled with the gating of the channel as suggested by recent *in silico* studies^{25,26} and consistent with the X-ray data on GIRK2 bound to PIP₂¹¹. HDX results show that the center of the cytoplasmic domain is more rigid than regions at its surface; in particular, the external loop between β 14 and β 15 is highly flexible and accessible to the solvent. This evidence supports the swing movement of the cytoplasmic domain during gating. Another observation is that the motions involved in the gating mechanism often show an elliptical trend. This feature clearly indicates a behavior of the tetramer that does not respect the C_4 symmetry of the crystal structure, but rather shows a C_2 symmetric movement, such as a dimer of dimer behavior.

Other movements make the channel fluctuate but are less important for the opening.

Rotation of TM1 and TM2 around their own helix axis was observed, although not involved in the opening of the channel.

Regarding the G-loop: our *in silico* study shows that it is very flexible. The minimum distance varies between 15 Å to 22 Å between the opposite chains A and C, and from 10 Å to 16 Å between the opposite chain B and D (**Fig. 32**). The flexibility of the G-loop has also been reported in molecular dynamics studies^{25,26} and X-ray data³¹. Interestingly our study shows that the distances between the opposite chains at this level (the distances between opposite residues from Glu248 to Ala251) are always greater than the diameter of the hydrated K⁺ and therefore the related region is not a gate. This finding is in contradiction with various published works^{25,26,32} which clearly show that the G-loop acts as a gate in eukaryotic Kir channel³³ and is associated with the binding of PIP₂³² and transduction. In the eukaryotic Kir channel, the key residues which are binding to PIP₂ are located in two short linker regions that connect the transmembrane (TM) pore-forming region of the Kir channel to the large cytoplasmic domain. Each of these linkers is three residues long in the eukaryotic Kir channels. Also, the second linker, between TM2 and the cytoplasmic domain, contains two charged residues which, when mutated, invariably cause loss of PIP₂ activation and loss of PIP₂ binding³⁴. In contrast, prokaryotic KirBac channels lack these residues and is specifically inhibited by PIP₂²⁴.

Concerning the selectivity filter, the variation of the minimum distances between the opposite chains (residues Ile97 to Lys101) indicates certain fluctuations. The minimum distances vary from 5 Å to 9 Å between the opposite chain A and C, and from 3 Å to 8 Å between the opposite chains B and D, **Fig. 33**. However the link between these fluctuations and the gating of the channel was not apparent in our study. Other simulation studies have shown that the highest energy barriers to the movement of K⁺ ion are found in the selectivity filter²⁵, in agreement with experimental data¹⁶.

2.2.5 Materials and Methods

2.2.5.1 Molecular Modeling and Dynamics

The simulations were carried out starting from the closed form of KirBac3.1 modeled from the structure with PDB code 2WLJ¹⁰ detailed at an atomic resolution of 2.6 Å. As the C-terminal and, more particularly, the N terminal segments of the protein were not fully resolved, the segments up to residue 34 and after residue 295 were ignored in the structural model considered in simulations. These regions of the protein are not likely to be involved in the gating process. Missing atoms were rebuilt using CHARMM program. The homotetramer was built using the “Protein Interface Surface and Assemblies” software through Pisa at EBI³⁵; the

ionization state of the protein residues was determined using PROPKA^{36,37}. The structure was oriented thanks to “Orientations of Proteins in Membranes” (OPM)³⁸ software before its integration in a DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) membrane in a box of 34,769 water molecules with 150 mM KCl built by the membrane builder module³⁹ of CHARMM-GUI^{40,41}. The box dimensions of the system are 116.2x116.8x133.3 Å³. TIP3P⁴² model was considered for water molecules together with the charmm36 force field²¹. We used periodic boundary conditions, and the PME algorithm to treat electrostatic interactions. The system was equilibrated during 600 ps at a constant temperature of 300 K using the Nose-Hoover thermostat and constant pressure of 1 atm using the Langevin piston. The Leapfrog Verlet algorithm was used for propagating the movement. The cut-on and cut-off distances for non-bonded interactions were set to 10 Å and 12 Å respectively, and between these values, the switching function was applied.

The MDeNM was carried out with CHARMM, and the free dynamics after MDeNM were carried out considering the same conditions but with NAMD⁴³ v2.10.

2.2.5.2 Normal Modes

The protein complex at the end of equilibration MD was energy minimized in order to compute the lowest frequency NMs with all the atoms taken into account. For NM computation we used the CHARMM program with the Charmm36 force field. A switching function was applied to the non-bonded interactions; setting a cut-on distance of 10 Å and a cut-off of 12 Å. A distance dependent dielectric constant of $2r$ (r being the interatomic distance) was used. The minimization was carried out under harmonic restraints applied to atomic positions that were progressively decreased and finally continued without restraints by carrying out 50,000 steps of CG and continued with the ABNR algorithm using a convergence criterion of 10^{-5} Kcal mol⁻¹ Å⁻² RMS energy gradient. 200 first lowest frequency modes ranged in ascending order of frequencies were computed using the iterative DIMB method^{44,45} within CHARMM.

2.2.5.3 Selection of a subset of most contributing normal modes to channel gating

To proceed with the MDeNM calculations, we decreased the number of modes by selecting those that are mostly related to gating, i.e. contributing importantly to the channel diameter variations. This was achieved by structurally displacing the initial minimized structure of 2WLJ along each individual mode at an rms distance of 2 Å and by analyzing the structural changes of the channel region defined between the residues Met121 and Ala133, after

superimposing them to this very region to compute a local rmsd. The larger local rmsd values were used as a criterion to detect the modes mostly affecting the region. We applied different filtering criteria to reduce the number of modes to a reasonable amount and to alleviate the combinatorial problem in MDeNM. The whole selection process resulted in 11 modes numbered 66, 74, 80, 114, 123, 135, 148, 169, 182, 192, and 197.

A visual inspection of the selected modes showed that they describe very satisfactorily the opening/closing of the channel, and can be considered as being very representative for the study of the channel dynamics. We give in **Table 5** the C α -C α distance variations of residues 124 and 132 where we structurally move 2 Å along each of these modes. It can be observed that some modes show large changes between the chains A and C, and others between chains B and D, at the residues 124 and 132, and in some cases both of them.

Modes 66, 114, 135, 192 and 197 play a dominant role for the variations of the distances at residue Leu124. Modes 74, 80, and 123 play a similar role at the gating Tyr132. Modes 114 and 169 show a greater variation between the chains A and C, while modes 182 and 192 a greater variation between the chains B and D. These modes describe different structural motions like the kink of the transmembrane helices (modes 66, 74, 80 and 182, **Movie S1**), the swivel and uprising of the slides helices (modes 80, 169, 182 and 197, **Movie S2**), and the swing of cytoplasmic domain (mode 169, **Movie S3**).

2.2.5.4 Molecular Dynamics using Excited Normal Modes (MDeNM).

The principle of the MDeNM²⁰ is based on the propagation of the structural changes along a combination of low frequency normal mode vectors within the framework of molecular dynamics simulation by regularly injecting kinetic energy along the propagation direction. Thus, large conformational changes are promoted within a relatively short period of time compared to standard dynamics. In order to cover the whole normal mode space, the simulations are repeated for different linear combinations of selected NM vectors, here those that are relevant for the opening/closing of the channel. To have a limited number of nearly isotropically distributed combinations of modes relevant to the channel opening, we generated a large number of randomly distributed vectors, from which a subset was selected based on a rmsd filtering procedure. The filtering consists in a first step of structural displacement of the overall initial structure by 1 Å rmsd distance along the vectors, and in a second step in which a subset of modes is selected according to local rmsds in the channel region, higher than a threshold

value. The vectors corresponding to this subset are considered in the MDeNM for their propagation. One advantage of having a filtering procedure is that we cover more completely the normal mode space generating a large set of different conformations. Another advantage of generating propagated structures along collective directions of motions is that local motions are coupled to global motions yielding energetically acceptable displaced structures. The period of time between two successive kinetic excitations is associated to the relaxation or adaptation of local motions to large-scale conformational changes. Every simulation pertaining to a given combination of NM vectors is independent of others, and is named here a “replica”. All the replica simulations are carried out in parallel by using a large number of CPU’s giving a significant computational speedup. In the present article, the channel region for which the rms filtering was performed covers the segment going from Met121 to Ala133 for all the four subunits. The rms threshold was fixed to 0.9 Å, yielding 62 collective motions to be excited. The kinetic excitation energy adopted corresponds to an increase of the temperature of the whole system of about 3 K, which represents a high kinetic input concentrated along a single direction at the start of the excitation. 10 kinetic excitations were performed along a given direction, a number sufficient for generating large conformational changes, and the period of time between subsequent excitations was about 1 ps. The parameters used in the MDeNM are given in **Table 6**.

Simulations were carried out with the CHARMM software using a specific script designed for MDeNM with the same MD parameters as used for the equilibration dynamics (the MDeNM script is available upon request).

2.2.5.5 Relaxation of the excited MDeNM structures.

The MDeNM simulations yielded 620 excited structures corresponding to the end of excitation periods. From this set we selected a lower number of structures that were almost equidistant between them, considering the local rmsds at the level of the channel so no biases are introduced and a given channel conformation is not being over represented. These structures were subjected to free MD simulations without any excitation to obtain a near Boltzmann equilibrium distribution from which open/closed state populations could be estimated and compared to the experimental data, and structural correlations be calculated.

To achieve this we applied the agglomerative hierarchical clustering tool of VMD⁴⁶ with an rmsd threshold of 0.7 Å that yielded about 114 clusters. The nearest structure to the average

structure in each cluster and the isolated structures not belonging to any of the clusters were considered as representative structures for starting free MD simulations (see **Table 6** for more details). The duration of each individual MD was of 0.4 ns. We considered in our analysis only the last 0.3 ns of each trajectory devoid of prior MDeNM excitations. The simulations provided an ensemble of 34,086 structures that were used in our statistical analysis.

2.2.5.6 Protein expression and purification

KirBac3.1 wild type was over-expressed and purified in *E.Coli* BL21 Codon Plus as outlined before⁶. Briefly, after cell disruption by French press, the protein was directly solubilized with 45 mM DM (Decyl β -D-maltopyranoside), centrifuged, and the supernatant was loaded onto a Co^{2+} affinity column. The protein was then purified promptly on a Superdex 200 column pre-equilibrated with 2mM TriDM (n-Tridecyl β -maltoside) buffer. Concentrated (1-2.5 mg/ml) preparations of purified proteins (>95% purity, judged by SDS-PAGE) were stored at -80°C in buffer containing 0.2 mM TriDM.

2.2.5.7 Pepsin Digestion

All protein digestions in solution were performed in an ice bath at 0 °C. Protease solutions were prepared in 500 mM glycine (pH 2.2). KirBac3.1 proteins were digested in the same buffer for 2–5 min using a protease/substrate ratio of 1:1 or 1:10 (wt/wt) for pepsin and nepenthesin, respectively, either in solution or immobilized on a resin. Increase in digestion time did not have any effect on the proteolysis.

2.2.5.8 Hydrogen/Deuterium exchange approach coupled to mass spectrometry (HDX-MS)

HDX-MS reactions were carried out on KirBac3.1 at a protein concentration of about 10 μM . The reaction was initiated by a 10x dilution of the protein samples (10 μL) into a deuterated buffer containing 50 mM KCl and 0.2 mM TriDM. Time course of the HDX was followed over a 20-min period by sequential withdrawing 120 μL of deuterated samples, which were immediately added to 26 μL of quenching buffer (8 M guanidium chloride, 500 mM glycine HCl, pH 2.2), rapidly mixed, and flash-frozen in liquid nitrogen.

2.2.5.9 HPLC Peptide Separation

After protease digestion in solution or on column in an ice bath at 0 °C, peptides were loaded onto a peptideMicroTrap (Michrom Bioresources) column and washed with 0.03 % TFA

in water (HPLC solution A). They were then separated on a reversed-phase C12 column (1 × 50 mm, Jupiter; Phenomenex) using a linear gradient of 15–45 % (vol/vol) of solution B (CH₃CN 95 % and TFA 0.03 %) during 26 min. The column was connected to the electrospray source of mass spectrometers until 30 % (vol/vol) B and then disconnected to avoid pollution of the electrospray source by the detergent. The valves, trap cartridge and column were cooled to 0 °C by immersion in an ice bath as previously described²².

2.2.5.10 Mass Spectrometric Analyses of Peptides

The tandem MS (mapping) analyses were performed on an ion trap mass spectrometer (Esquire 3000+; Bruker Daltonics) to enable the identification of the peptides after their separation on HPLC. Accurate mass measurements and the analysis of the local kinetics of deuteration were performed on a time-of-flight (TOF) mass spectrometer (6210; Agilent Technologies) equipped with an electrospray source. Each deuteration experiment was replicated in triplicate. Data were processed with MassHunter software (Agilent Technologies). Qualitative Analysis, and the deconvolution and calculation of the average masses were carried out in Magtran⁴⁷.

2.2.5.11 Electrophysiology

An Orbit mini was used (Nanion, Germany, horizontal planar lipid bilayer system), where two aqueous chambers (150 µL) are separated by a partition with a 100-µm hole where the lipid bilayer is formed by 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC, 15–30 pF). The lower chamber contained 150 mM KCl, 10 mM MOPS, pH 7.4. The upper chamber contained 150 mM KCl, 10 mM MOPS pH 8. 1 µL of purified KirBac3.1 (90 µg/mL) in DDM (n-DoDecyl-β-D-maltoside) detergent (0.015 %) was added to the upper chamber to a preformed bilayer. Currents were recorded using Elements Data Reader (Nanion, Germany) and analyzed using Clampfit (Axon Instrument Inc, USA) software, sampled at 100 µs and filtered at 1.25 kHz.

2.2.6 References

1. Hibino, H. *et al.* Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* **90**, 291–366 (2010).
2. Bichet, D., Haass, F. A. & Jan, L. Y. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 957–967 (2003).

3. Swartz, K. J. Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat Rev Neurosci* **5**, 905–16 (2004).
4. Hansen, S. B., Tao, X. & MacKinnon, R. Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature* **477**, 495–U152 (2011).
5. Kuo, A. L. *et al.* Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* **300**, 1922–1926 (2003).
6. De Zorzi, R., Nicholson, W. V., Guigner, J.-M., Erne-Brand, F. & Vénien-Bryan, C. Growth of large and highly ordered 2D crystals of a K⁺ channel, structural role of lipidic environment. *Biophys. J.* **105**, 398–408 (2013).
7. Kuo, A. L., Domene, C., Johnson, L. N., Doyle, D. A. & Venien-Bryan, C. Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography. *Structure* **13**, 1463–1472 (2005).
8. Enkvetchakul, D., Jeliaskova, I., Bhattacharyya, J. & Nichols, C. G. Control of inward rectifier K channel activity by lipid tethering of cytoplasmic domains. *J. Gen. Physiol.* **130**, 329–334 (2007).
9. Bavro, V. N. *et al.* Structure of a KirBac potassium channel with an open bundle crossing indicates a mechanism of channel gating. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 158–163 (2012).
10. Clarke, O. B. *et al.* Domain reorientation and rotation of an intracellular assembly regulate conduction in Kir Potassium Channels. *Cell* **141**, 1018–1029 (2010).
11. Whorton, M. R. & MacKinnon, R. Crystal Structure of the Mammalian GIRK2 K(+) Channel and Gating Regulation by G Proteins, PIP₂, and Sodium. *Cell* **147**, 199–208 (2011).
12. Berneche, S. & Roux, B. Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *NATURE* **414**, 73–77 (2001).
13. Zhou, M., Morais-Cabral, J., Mann, S. & MacKinnon, R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* **411**, 657–661 (2001).
14. Wang, S., Lee, S.-J., Heyman, S., Enkvetchakul, D. & Nichols, C. G. Structural rearrangements underlying ligand-gating in Kir channels. *Nat. Commun.* **3**, (2012).
15. Wang, S., Vafabakhsh, R., Borschell, W. F., Ha, T. & Nichols, C. G. Structural dynamics of potassium-channel gating revealed by single-molecule FRET. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 31–36 (2016).
16. Gupta, S. *et al.* Conformational changes during the gating of a potassium channel revealed by structural mass spectrometry. *Struct. Lond. Engl. 1993* **18**, 839–846 (2010).
17. Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M. & Perozo, E. Structural mechanism of C-type inactivation in K⁺ channels. *Nature* **466**, 203–U73 (2010).

18. Grottesi, A., Domene, C., Hall, B. & Sansom, M. Conformational dynamics of M2 helices in KirBac channels: Helix flexibility in relation to gating via molecular dynamics simulations. *Biochemistry* **44**, 14586–14594 (2005).
19. Meng, X.-Y., Liu, S., Cui, M., Zhou, R. & Logothetis, D. E. The Molecular Mechanism of Opening the Helix Bundle Crossing (HBC) Gate of a Kir Channel. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
20. Costa, M. G. S., Batista, P. R., Bisch, P. M. & Perahia, D. Exploring Free Energy Landscapes of Large Conformational Changes: Molecular Dynamics with Excited Normal Modes. *J. Chem. THEORY Comput.* **11**, 2755–2767 (2015).
21. Huang, J. & MacKerell, A. D., Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **34**, 2135–2145 (2013).
22. Mehmood, S., Domene, C., Forest, E. & Jault, J.-M. Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward- and outward-facing conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 10832–10836 (2012).
23. Giladi, M. *et al.* Asymmetric Preorganization of Inverted Pair Residues in the Sodium-Calcium Exchanger. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
24. Cheng, W., W. ,L., Enkvetchakul, D. & Nichols, C. G. KirBac1.1: It's an Inward Rectifying Potassium Channel. *J Gen Physiol* **133**, 295–305 (2009).
25. Bernsteiner, H., Zangerl-Plessl, E.-M., Chen, X. & Strydom, A. Conduction through a narrow inward-rectifier K⁺ channel pore. *J. Gen. Physiol.* **151**, 1231–1246 (2019).
26. Li, D., Jin, T., Gazgalis, D., Cui, M. & Logothetis, D. E. On the mechanism of GIRK2 channel gating by phosphatidylinositol bisphosphate, sodium, and the Gβγ dimer. *J. Biol. Chem.* **294**, 18934–18948 (2019).
27. Long, S., Campbell, E. & MacKinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897–903 (2005).
28. Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. & Catterall, W. A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**, 353–U104 (2011).
29. Whorton, M. R. & MacKinnon, R. X-ray structure of the mammalian GIRK2-beta gamma G-protein complex. *Nature* **498**, 190-+ (2013).
30. Jaroslowski, S., Zadek, B., Ashcroft, F., Venien-Bryan, C. & Scheuring, S. Direct visualization of KirBac3.1 potassium channel gating by atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* **374**, 500–505 (2007).
31. Pegan, S. *et al.* Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat. Neurosci.* **8**, 279–287 (2005).
32. Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Logothetis, D. E. & Cui, M. The Molecular Mechanism by which PIP2 Opens the Intracellular G-Loop Gate of a Kir3.1 Channel. *Biophys. J.* **102**, 2049–2059 (2012).

33. D'Avanzo, N., Cheng, W. W. L., Wang, S., Enkvetchakul, D. & Nichols, C. G. Lipids driving protein structure? Evolutionary adaptations in Kir channels. *Channels Austin Tex* **4**, 139–141 (2010).
34. Soom, M. *et al.* Multiple PIP2 binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS Lett.* **490**, 49–53 (2001).
35. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797 (2007).
36. Olsson, M. H. M., Sondergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pK(a) Predictions. *J. Chem. THEORY Comput.* **7**, 525–537 (2011).
37. Sondergaard, C. R., Olsson, M. H. M., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pK(a) Values. *J. Chem. THEORY Comput.* **7**, 2284–2295 (2011).
38. Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I. & Lomize, A. L. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* **40**, D370–D376 (2012).
39. Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I. & Lomize, A. L. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *NUCLEIC ACIDS Res.* **40**, D370–D376 (2012).
40. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. & Im, W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **29**, 1859–1865 (2008).
41. Lee, J. *et al.* CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jctc.5b00935> (2015)
doi:10.1021/acs.jctc.5b00935.
42. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983).
43. Phillips, J. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781–1802 (2005).
44. Mouawad, L. & Perahia, D. Diagonalization in a mixed basis: A method to compute low-frequency normal modes for large macromolecules. *Biopolymers* **33**, 599–611 (1993).
45. Perahia, D. & Mouhawad, L. Computation of low-frequency normal-modes in macromolecules- improvements to the method of diagonalization in a mixed basis and application to hemoglobin. *Comput. Chem.* **19**, 241–246 (1995).
46. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).

47. Zhang, Z. & Marshall, A. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J. Am. Soc. MASS Spectrom.* **9**, 225–233 (1998).

2.2.7 Acknowledgments

We would like to thank financial supports from SERVIER and ANR CACSICE (#11-EQPX-0008) (CVB); AFM grant (#19928) (SB) and PhD research funding, MRT (CF); and Dania Zuniga for reading the manuscript and making suggestions. This work was performed using HPC resources from the “Mésocentre” computing center of CentraleSupélec and ENS Paris-Saclay supported by CNRS and Région Île-de-France (<http://mesocentre.centralesupelec.fr/>). It was granted access to the HPC resources of IDRIS under the allocation 100512 made by GENCI/IDRIS (DP). We would like to thank Mauricio G.S. Costa for critical reading of the manuscript.

Author Contributions: DP, EF and CVB conceived and designed the research. CF performed the MDeNM experiments under the supervision of DP, AA and YM performed the initial model and simulation, RDZ, LB and IO expressed the protein. LB IO and EF performed the Hydrogen Deuterium Exchange Mass spectrometry (HDX-MS) experiments, SB performed the electrophysiology experiments. CF, DP and CVB wrote the manuscript with the help of comments from all authors.

Competing Interests: All authors declare no competing financial and non-financial interests in relation to the work described.

2.2.8 Supplementary

New Structural and functional insights into Kir channel gating from molecular simulations, HDX-MS and functional studies

Charline Fagnen^{1,2} Ludovic Bannwarth¹, Iman Oubella¹, Eric Forest³, Rita De Zorzi⁴, Aline de Araujo^{1,2}, Yasmina Mhoumadi^{1,2}, Saïd Bendahhou⁵, David Perahia² and Catherine Vénien-Bryan¹

¹Sorbonne Université, UMR 7590, CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Institut de Minéralogie, Physique des Matériaux et Cosmochimie, IMPMC, 75005 Paris, France.

²Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée, Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay, Centre National de la Recherche Scientifique, 91190 Gif-sur-Yvette, Franc.

³University Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France, CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France, CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France.

⁴Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Trieste, Via Licio Giorgeri 1, 34127, Trieste, Italy ⁵CNRS UMR7370, LP2M, Université Côte d'Azur, Nice Sophia-Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France.

2.2.8.1 Introduction

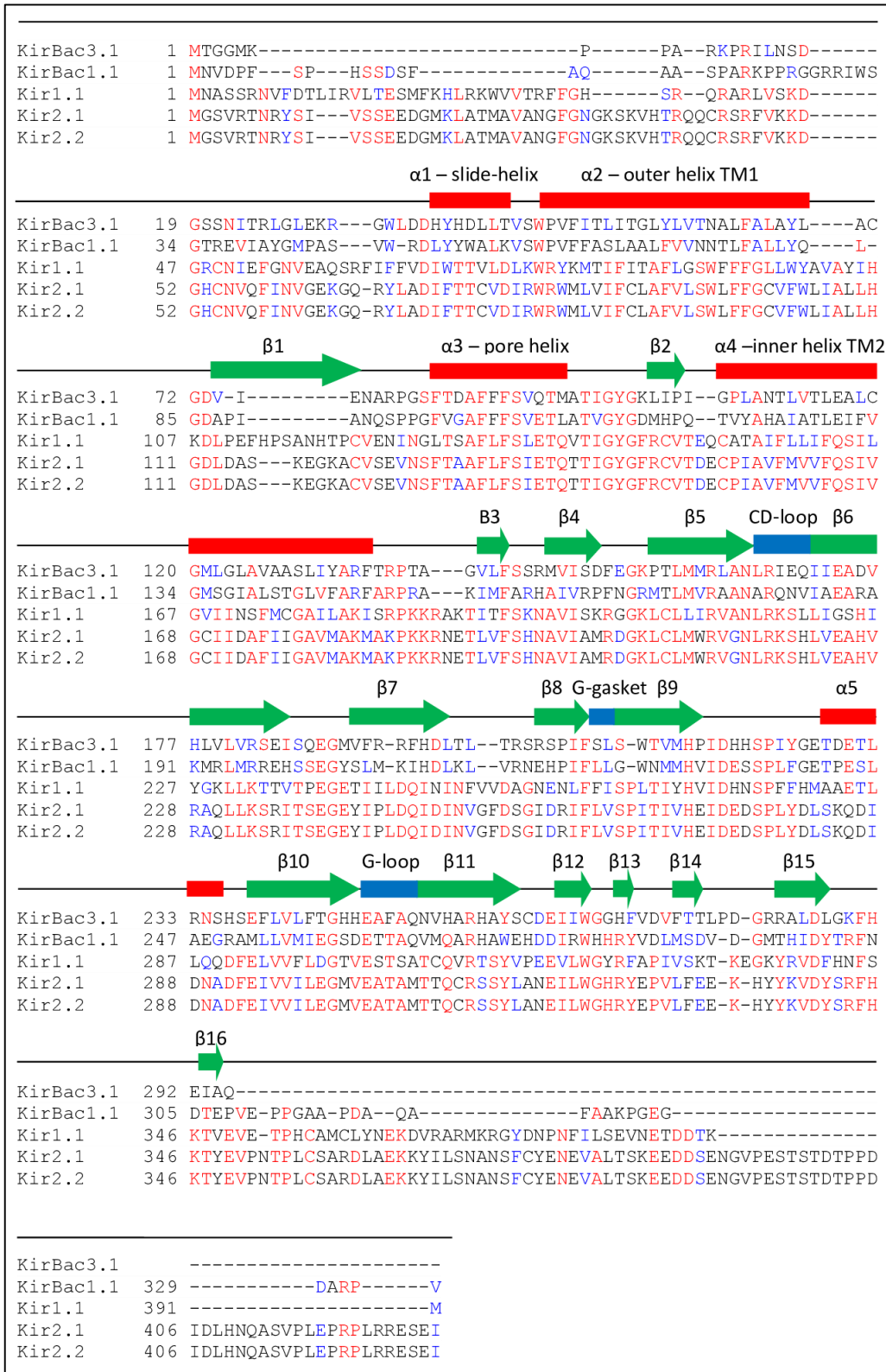


Figure 24 - Alignment of the sequences of the KirBac3.1, KirBac1.1, human Kir1, human Kir2.1 and chicken Kir2.2. In red are represented the identical residues between the sequences and in blue the residues of similar types between the sequences. α -helix and β -strand are represented with red squares and green arrows, respectively. G-loop, CD-loop and G-gasket are noticed with a blue square.

2.2.8.2 Results and Discussion

Selection of modes contributing to the gating

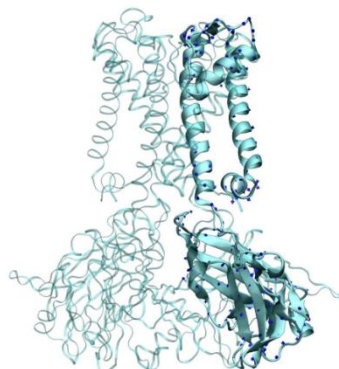
The following criteria were used successively for the selection of relevant modes for gating: 1) Selection of modes showing local rmsd values of the channel greater than 1.25 Å; 2) Analysis of $C\alpha$ - $C\alpha$ distance variations between opposite chains (d(AC) and d(BD)) of Ala125, located in the middle of the channel. The ratio of both distances (d(AC)/d(BD)) is indicative of the channel deformation, whether circular or elliptical. We selected the modes contributing to the most prominent deformation patterns: 2a) modes with a ratio between 0.8 and 1.2 (mostly radial) and with local rmsds values larger than 1.75 Å, and 2b) modes outside this range (mostly elliptical); 3) To further decrease the number of modes, a selection criterion was applied at the constriction points (residues 124 and 132) by selecting the ten modes showing the largest d(AC) or d(BD) values. The application of these successive criteria resulted in the selection of 23 modes; 4) In a final step, redundant modes displaying similar backbone motions were identified and only those with the lower frequency were kept, considering that the side chain motions are already taken into account in the MD simulations. The 11 selected normal modes are described in **Fig. 25**.



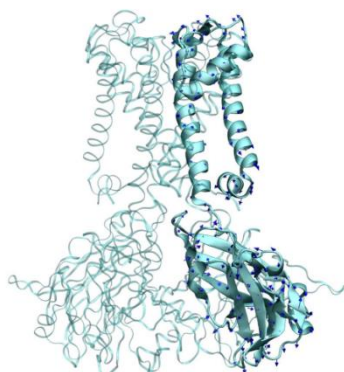
Normal Mode #66



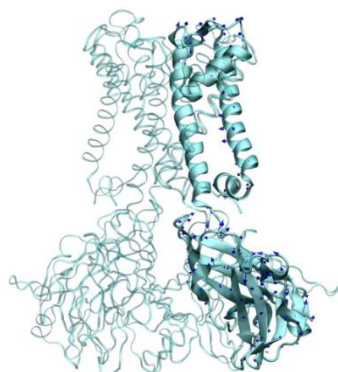
Normal Mode #74



Normal Mode #80



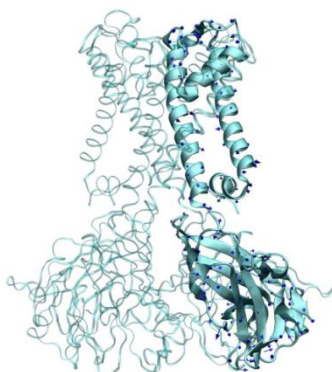
Normal Mode #114



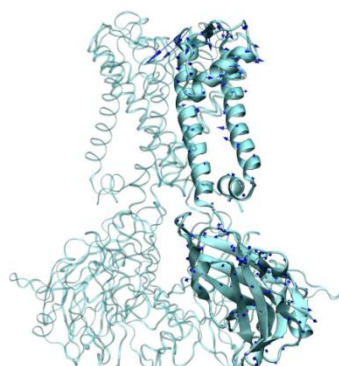
Normal Mode #123



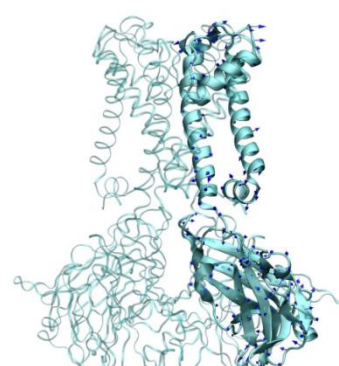
Normal Mode #135



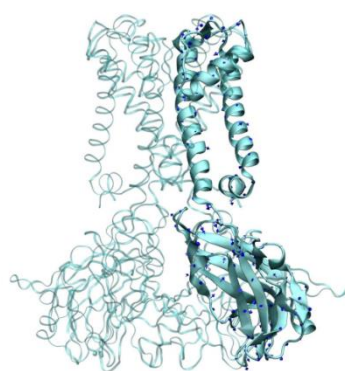
Normal Mode #148



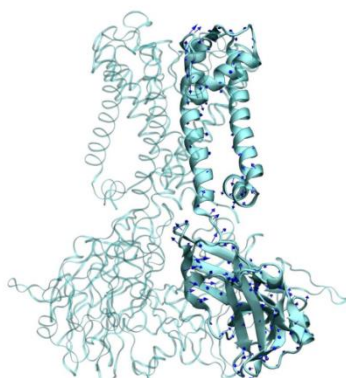
Normal Mode #169



Normal Mode #182



Normal Mode #192



Normal Mode #197

Figure 25 - Directions of motions of the 11 selected modes involved in the opening/closing of the KirBac3.1 channel, arrows show the direction followed by the C α atoms.

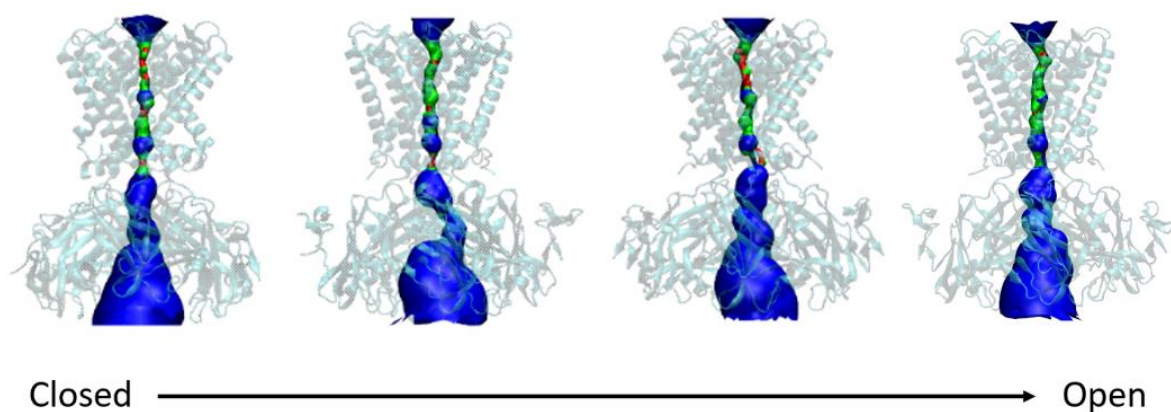


Figure 26 - Representation of the opening of the channel at four different states. From left to right are represented the most closed structure, the most open of the closed structures, the most closed of the open structures and the most open structure. The channel is computed with the Hole software v2.2.005. Areas in red indicate where one water molecule cannot go through, green the areas where only one water molecule can go through and blue where more than one water molecule can go through. To select the represented structures among the closed states, we calculated the average of the distances between the chains A and C, and between B and D at the level of Leu124 and Tyr132. From left to right: the minimal value obtained corresponds to the most closed structure (1st structure: radius at the level of Leu124: 1.04Å, radius at the level of Tyr132: 1.26Å), the maximal value represents the most open of the closed structures (2nd structure: radius at the level of Leu124: 1.53Å, radius at the level of Tyr132: 1.56Å). To select the open structures, we select the structures showing the lowest (3rd structure) and the highest values (4th structure) for each constriction points between all opposite chains. Radii of the third structure from Hole are 1.79Å at the level of Leu124 and 1.77Å at the level of Tyr132. Radii of the fourth structure from Hole are 2.39Å at the level of Leu124 and 2.15Å at the level of Tyr132. Considering the K⁺ radius is 1.76Å, the open states show radii greater than the radius of the K⁺ ion and closed states show lower radii.

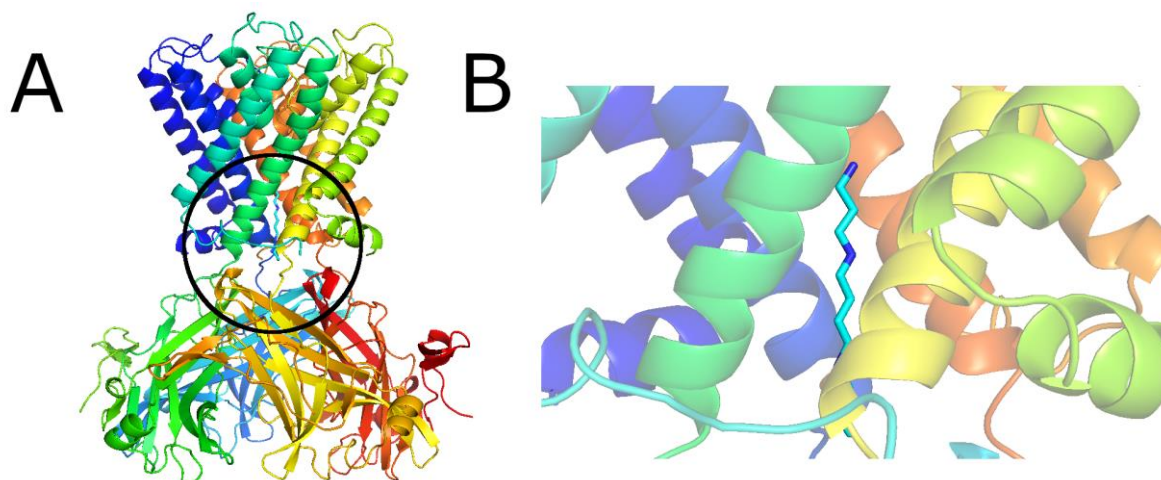


Figure 27 – A) Docking of the spermine molecule in one of our open structures of KirBac3.1 WT with the Autodock Vina software. B) Enlarged structure. The spermine is well docked inside the channel and its location is similar to the one seen in the X-Ray structure of KirBac3.1 complexed with spermine, PDB 1XL6.

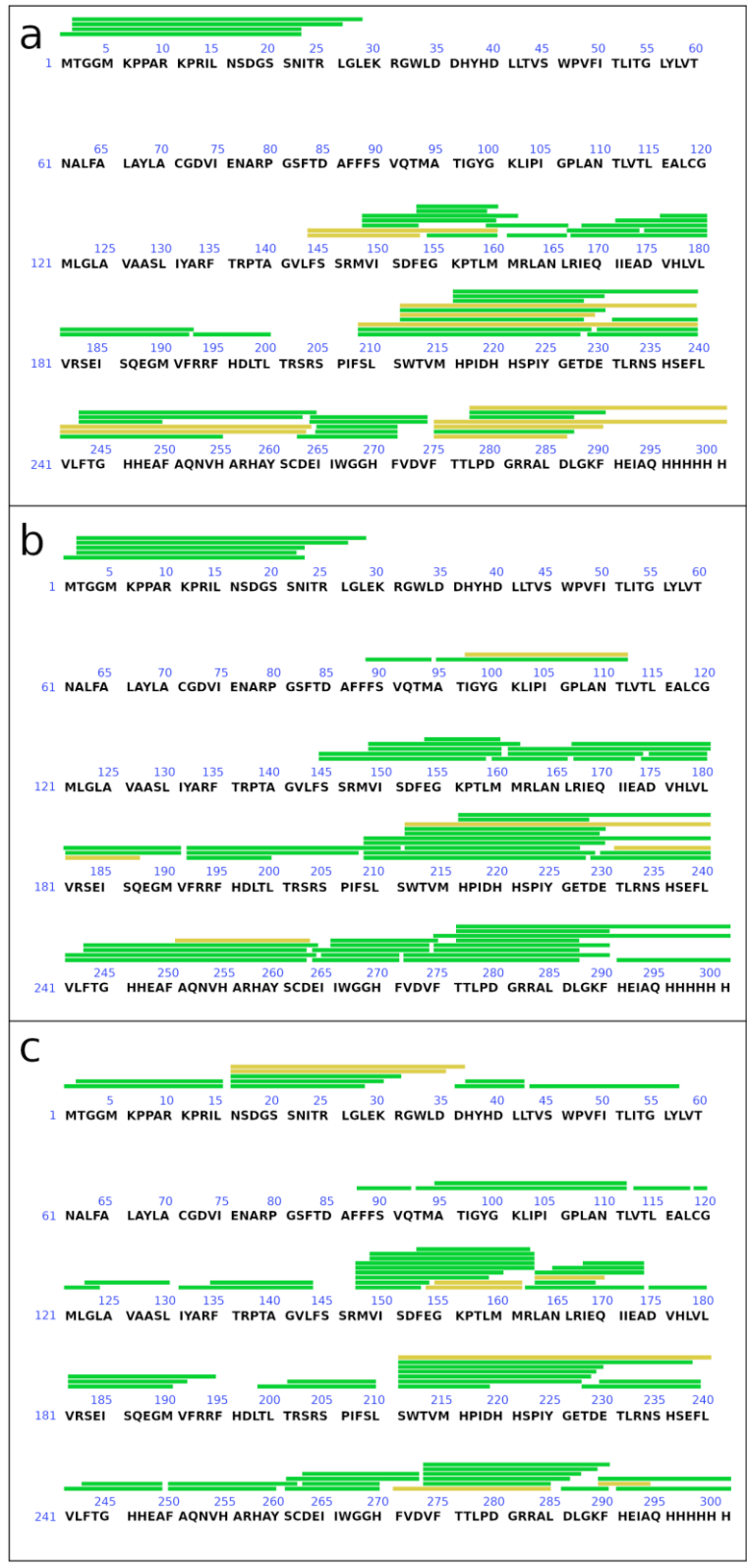


Figure 28 - Peptide mapping of KirBac3.1 using pepsin in solution (A), pepsin in column (B), and nepenthesin (C). The signal intensity of the peptides is shown in green (strong) and yellow (medium), see also Table. S1. We used nepenthesin because the coverage is larger.

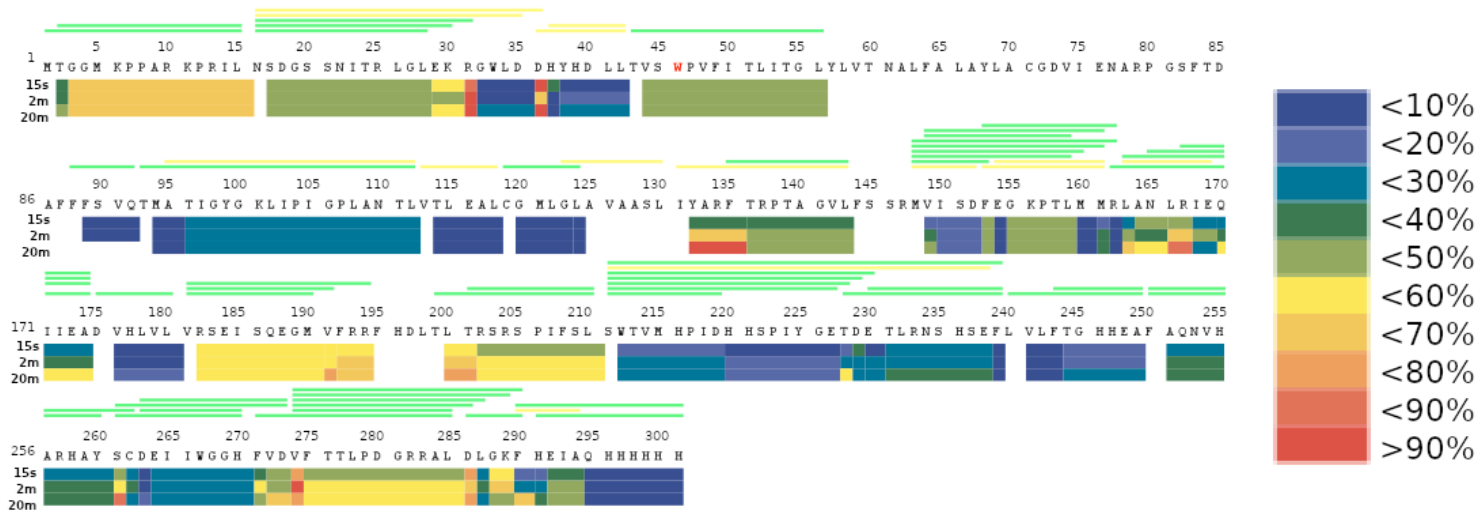


Figure 29 - Heat Map of the KirBac3.1. Deuteration maps of KirBac3.1 peptides at different times up to 20 minutes deuteration. The color key indicates the HDX level.

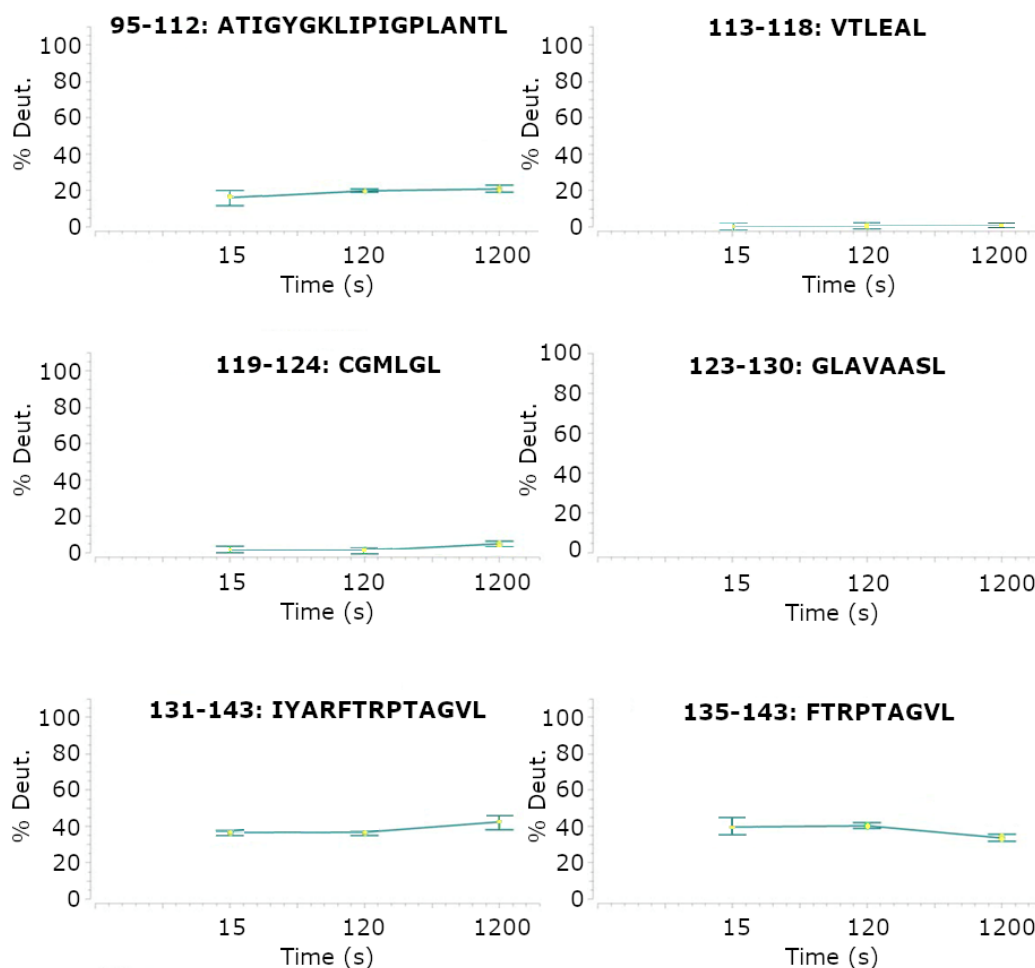


Figure 30 - Percentage of deuteration versus time (15s, 120s and 1200s) for regions 95-112, 113-118, 119-124, 123-130, 131-143 and 135-143. The stretch from 113-130 is not covered.

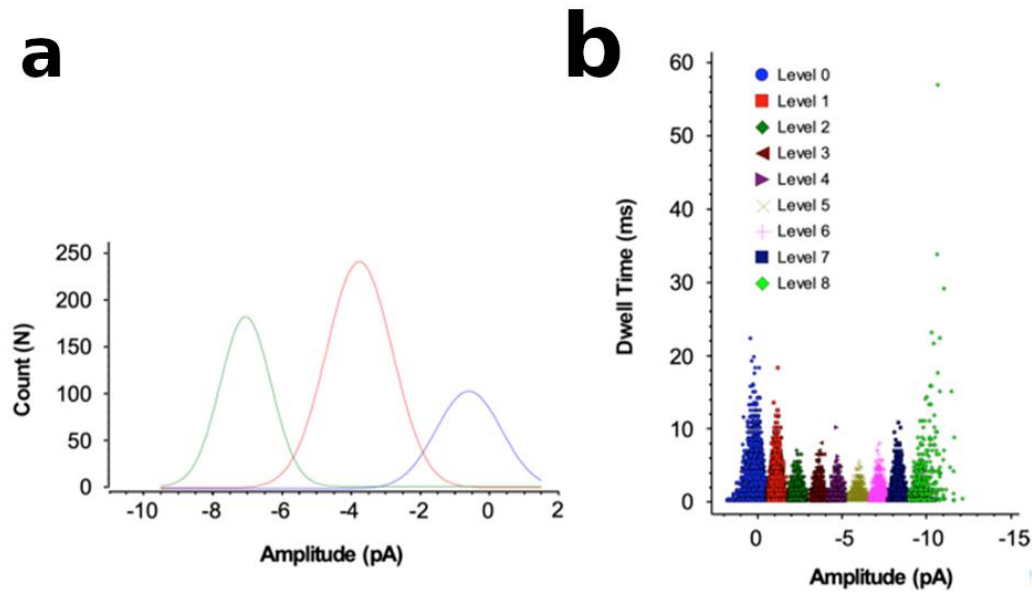


Figure 31 - Purified KirBac 3.1 channels are functionally active channels in planar lipid bilayers (a). Representative all point histograms of KirBac 3.1 WT from 6 minutes of continuous recording. Fits of Gaussian distributions of multiple histograms led to a single channel current level of 3.75 ± 0.027 pA at -80 mV (membrane bilayer contains two channels); (b) KirBac 3.1 channels has multiple subconductance states. Dwell time of the whole 6-min recording at -80 mV revealed channel subconductance levels. Fits of Gaussian distributions of multiple histograms showed current amplitudes (levels 1 to 8) at -1.02, -2.03, -3.6, -4.9, -6, -7.06, -8.1, and -9.5 pA.

2.2.8.3 Discussion

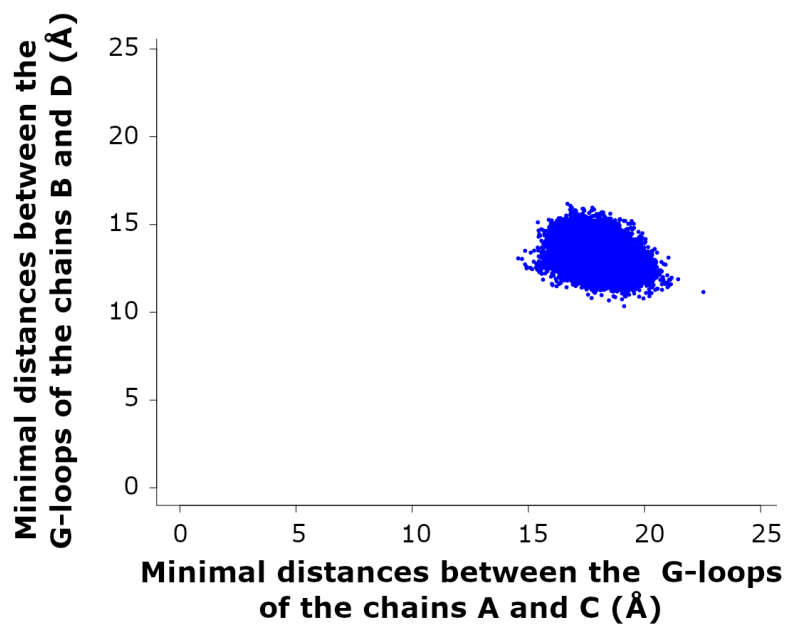


Figure 32 - Minimum distances of opposing G-loops. Scatter plot of the minimal distances between the chains B and D and between the chains A and C at the level of the residues of the G-loop (residues Glu248 to Ala251).

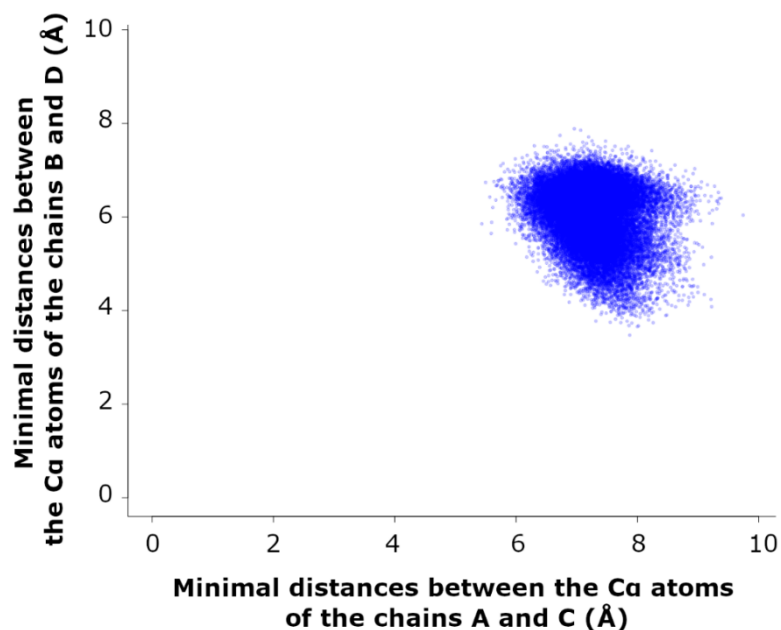


Figure 33 - Minimal distances at the level of opposite selective filter. Scatter plot of the minimal distances between the C α atoms of the chains B and D and between A and C at the level of the residues of the selective filter (residues Ile97 to Lys101).

2.2.8.4 Material and methods

Structural determinants in relation to gating

Several structural determinants related to gating were defined by analyzing the set of conformations generated by MDeNM and free MD simulations. These structural determinants are described in what follows:

1) Minimal distances between the residues in the constriction points along the channel

The closest (or minimal) distance between the atoms of the facing residues at the constriction points give a measure of the openness of the gate. As the same residues of different chains lie almost on the same plane parallel to the membrane, we considered only the projected distance on this plane. These variables are defined as g_{124ac} , g_{124bd} , g_{132ac} and g_{132bd} , and represent the minimal distance at the gating Leu124 between the chains A and C, and between the chains B and D, and at the gating Tyr132 between the chains A and C, and between the chains B and D, respectively.

2) Kink angle of TM helices

The kink of the inner TM helices is defined by the angle between the helical axes of the segments from Ala109 to Gly120 and from Gly120 to Phe135, as depicted in **Fig 21a**. For the outer helices, the axes of segments Cys71 to Leu56 and Leu56 to Trp46 were considered. Inner helix kink angles are named k_{ia} , k_{ib} , k_{ic} and k_{id} corresponding to chains A, B, C, and D, respectively. Similarly, outer helix kink angles are named k_{oa} , k_{ob} , k_{oc} , and k_{od} for chains A, B, C, and D, respectively

3) Swing angles of the CTD

The swing of the cytoplasmic domain of a given chain, related to its up/down motion with respect to the membrane, is described by a dihedral angle defined by four successive points linked by pseudo bonds (in green in **Fig. 21b**). The first two points are on the Z-axis (the symmetry axis of the molecule), corresponding to the projections of the C β atoms of Asp280 and of Phe275 on the axis, and the last two points are the C α atoms of Phe275 and Asp280. The swing angles are designated as s_a , s_b , s_c , and s_d , corresponding to chains A, B, C and D, respectively.

4) Twist angles of the CTD

The twist motion of each chain around the symmetry axis is described by the variation of the dihedral angle defined by four successive points: the C α atom of Leu108, the projection on the z-axis of atom C γ of Leu108, the projection on the z-axis of atom C γ 2 of Ile266 and the

$C\alpha$ atom of Ile266, as depicted in **Fig. 21b**. The twist angles are specified by t_a , t_b , t_c and t_d , referring to the corresponding chains.

5) Swivel angle of the slide-helix

The swivel motion of the slide helix describes how this helix displaces in a direction parallel to the membrane plane. It is described by a rotation about the symmetry axis. To calculate this parameter, we

considered the dihedral angle defined successfully by the $C\alpha$ atom of Phe49, the projections on the z- axis of $C\beta$ atoms of residues Phe49 and His37, and the $C\alpha$ atom of His37. This dihedral angle is depicted in **Fig. 21b** in purple. The swivel angles of the slide helices is designated by *swia*, *swib*, *swic*, and *swid*, referring to the corresponding chains.

6) Uprising angle of the slide helix

The uprising angle of the slide helix describes the degree to which this helix approaches the plane of the membrane. It is defined by the angle between the Z-axis and the axis of the slide helix, from residue Thr43 to Asp35, as depicted in **Fig. 21c**. The uprising angles are specified by u_{pa} , u_{pb} , u_{pc} , and u_{pd} for the four chains.

7) Side chain conformational changes

Dihedral angles χ_1 and χ_2 of residues Leu124 and Tyr132 considered are defined between atoms N- $C\alpha$ - $C\beta$ - $C\gamma$ and $C\alpha$ - $C\beta$ - $C\gamma$ - $C\delta_1$, the zero value corresponding to the cis configuration, and the positive value to an anti-clockwise rotation.

The correlations between the parameters were computed with the R software thanks to the module cor. This module estimates the Pearson coefficient between pairs of variables.

Movie S1: Kink of the inner and outer helices. The video represents the motion along the selected mode 182 of KirBac3.1. Each chain is represented in different color. A zoom on the chain A (blue) highlights the kink on the inner and outer helices at the level of Gly120 and Leu56 respectively.

Movie S2: Swivel and uprising motions of the slides helices. The video represents the motion along the selected mode 80 of KirBac3.1. Each chain is represented in different color. A zoom on the chain C (orange) highlights the swivel motion on the slide-helix, and another zoom on the chain A shows an uprising motion of the slide-helix.

Movie S3: Swing of the cytoplasmic domain. The video represents the motion along the selected mode 169 of KirBac3.1. Each chain is represented in different color. A zoom on the chain A (blue) highlights the swing motion of the cytoplasmic domain.

Tables

Tableau 4- Sequence coverage for KirBac3.1 obtained in different digestion conditions and after deuteration.

<i>Protease</i>	<i>Condition</i>	<i>Coverage</i>	<i>Observation</i>
<i>Pepsin</i>	In solution	60%	Regions 29-143 and 201-208 not covered
	column	70%	Regions 29-88 and 113-143 not covered
<i>Nepenthesin</i>	column	78%	Regions 57-87 (top half of TM1 + half of the pore helix), 143-147 (β 3 + loop between β 3- β 4) and 195-203 (second half of β 7) not covered

Tableau 5 - $C\alpha$ - $C\alpha$ distance variations (in Å) between opposite chains at the levels of the residues Leu124 and Tyr132 when displacing the energy minimized structure by 2 Å of rmsd along each of the 11 selected modes of WT.

<i>Modes</i>	<i>Leu124AC</i>	<i>Leu124BD</i>	<i>Tyr132AC</i>	<i>Tyr132BD</i>
66	1.62	2.07	0.38	1.28
74	0.57	0.19	6.28	5.97
80	0.77	0.45	6.82	6.52
114	2.82	1.98	2.08	1.40
123	0.70	0.65	4.91	2.82
135	3.81	5.31	0.49	1.15
148	1.65	1.15	0.11	0.94
169	1.60	0.47	2.63	0.22
182	1.05	3.42	0.73	2.99
192	5.57	5.90	1.01	1.92
197	3.55	5.39	1.07	0.71

Tableau 6 - Parameters used in the MDeNM.

<i>Properties</i>	<i>Parameters</i>
<i>Selected Modes</i>	66, 74, 80, 114, 123, 135, 148, 169, 182, 192, 197
<i>RMS cut-off MDeNM (Å)</i>	0.9
<i>Excitation temperature (K)</i>	3
<i>Number of excitations</i>	10
<i>Relaxation time (ps)</i>	1
<i>Number of replicas</i>	62
<i>RMS cut-off Clustering (Å)</i>	0.7

2.3 Chapitre 3 : Impact de la mutation W46R sur le mécanisme d'ouverture/fermeture du canal bactérien KirBac3.1

Ce chapitre est centré sur les conséquences de l'impact de la mutation W46R sur le mécanisme d'ouverture/fermeture du canal bactérien KirBac3.1. Nous nous sommes intéressés à cette mutation car dans le canal humain Kir6.2, la mutation W68R est la cause d'une maladie : l'hyperinsulinisme. W46R est la mutation correspondante à W68R chez son homologue bactérien KirBac3.1. Les résultats présentés dans ce chapitre répondent au deuxième objectif de la thèse.

Des simulations de MDeNM ont été lancées sur KirBac3.1 W46R afin d'étudier ses différentes conformations possibles. Ces dernières sont comparées à celles obtenues pour le KirBac3.1 WT (réalisé dans le chapitre précédent). Les réseaux d'interactions des deux protéines ont été investigués pour évaluer leurs différences.

Parallèlement, des études expérimentales ont été menées. La première est un résultat majeur puisqu'il s'agit de la résolution de la structure de KirBac3.1 W46R à la résolution de 2.8Å par cristallographie. Cette étude a été réalisée par les Dr. Bannworth et Dr. De Zorzi. J'ai participé à l'étape de raffinement de la structure cristalline. La seconde étude expérimentale concerne la flexibilité de la protéine par l'intermédiaire de la méthode HDX-MS, elle a été réalisée par Iman Oubella sous la direction du Pr. Vénien-Bryan et du Dr. Forest.

Le résidu W46 est orienté vers le centre du canal dans le KirBac3.1 WT, il s'agit de la configuration dite « flipped-in ». Le résidu W46 peut adopter une autre configuration dite « flipped-out » lorsque la chaîne latérale de ce dernier est dirigée vers l'extérieur du canal. La structure disposant de la mutation R46 modélisée à partir du sauvage ainsi que la structure résolue dans cette étude montrent toutes deux une conformation « flipped-out ». Ashcroft(137) a précédemment émis l'hypothèse que cette dernière conformation pourrait faciliter l'ouverture du canal.

L'étude des réseaux d'interactions des structures a permis de noter un éloignement des deux hélices transmembranaires au niveau du bas du canal ainsi qu'un rapprochement de

l'hélice externe de l'hélice de glissement. L'impact de ce changement d'interactions entraîné par la mutation est étudié par l'intermédiaire des structures MDeNM. Ces dernières vont permettre d'évaluer l'influence de ce mouvement local sur les mouvements globaux tels que le soulèvement de l'hélice de glissement. Les régions subissant ce changement d'interactions ont été identifiées et analysées par HDX-MS : les résultats de la MDeNM coïncident avec les résultats produit par l'HDX-MS. La MDeNM donne accès aux différents états du canal. La comparaison des tendances d'ouverture au niveau des deux points de constriction ainsi que de la mutation permet d'évaluer l'impact de la mutation sur l'ouverture du canal.

A highly conserved tryptophan at the membrane-water interface of Kir channel is involved in the gating mechanism

Charline Fagnen^{1,2}, Ludovic Bannwarth², Iman Oubella², Eric Forest³, Saïd Bendahhou⁴, Rita De Zorzi⁵, David Perahia² and Catherine Vénien-Bryan¹

¹Sorbonne Université, UMR 7590, CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Institut de Minéralogie, Physique des Matériaux et Cosmochimie, IMPMC, 75005 Paris, France

²Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée, Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay, Centre National de la Recherche Scientifique, Cachan, France,

³University Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France, CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France, CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France,

⁴CNRS UMR7370, LP2M, University Nice Sophia-Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France.

⁵Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Trieste, Via Licio Giorgeri 1, 34127, Trieste, Italy

CONDENSED RUNNING TITLE: Kir channel gating, DEND syndrome

KEYWORDS: atomic structure of KirBac3.1W46, HDX-Mass Spectrometry, electrophysiology Molecular Dynamics, Normal Modes.

2.3.2 Abstract

ATP-sensitive potassium (KATP) channels are protein complexes that couple cell energy levels to cell excitability. They ubiquitously expressed on the plasma membrane of cells in multiple organs, including the heart, pancreas and brain and they govern a wide range of physiological processes. In pancreatic β -cells, KATP channels composed of Kir6.2 and SUR1, encoded by KCNJ11 and ABCC8, respectively, play a key role in coupling blood glucose concentration to insulin secretion. Mutations in ABCC8 or KCNJ11 that diminish channel function result in congenital hyperinsulinism.

A tryptophan residue located at the cytosolic end of the transmembrane external helix is highly conserved in eukaryotes, mammalian and prokaryotes Kir channels and any mutation on this particular amino acid causes diseases such as DEND syndrome. In this study, we have shown that the mutation on this highly conserved tryptophan residue of a KirBac channel (a prokaryotic homolog of mammalian Kir6.2), is showing a gain in function. We have used X-ray crystallography to determine the structural changes that arise in this mutant. HDX-MS analysis presented in this paper provides a comprehensive view of the dynamics associated with the open/closed transition of this mutant Kir channel. Besides, the detailed dynamical view of the entire mutant channel during the gating was investigated using a recent *in silico* method, Molecular Dynamics with excited Normal Modes (MDeNM). A comparison of the structural important determinants for this mechanism between the KirBac wild type and mutant W46R (equivalent to W68 Kir6.2) shows how the control of the opening and closing is disrupted in the case of the mutant. These results provide a detailed structural and dynamical explanation for the activatory effect of this mutation, which causes disease such as neonatal diabetes.

2.3.3 Introduction

Gain-of-function mutations in the Inwardly rectifying potassium Kir6.2 or sulfonylurea receptor, SUR1 subunits of the ATP-sensitive potassium (KATP) channel are a common cause of neonatal diabetes, a rare inherited disorder characterized by the development of diabetes within the first 6 months of life called neonatal diabetes (DEND syndrome)(1–5). (Kir) channels regulate membrane electrical excitability and K⁺ transport in a wide range of cell types. Their activity controls many diverse processes such as heart rate, vascular tone, insulin secretion, and salt/fluid balance, and an increasing number of disease states are now known to be directly associated with abnormal Kir channel (6). Like many other types of ion channels, the activity of Kir channels is controlled by dynamic conformational changes that regulate the flow of K⁺ ions through the central pore of the channel (6, 7). This process is known as ‘gating’ and understanding the molecular mechanism of these dynamic changes in Kir channel structure is critical to our understanding of how these channels function in both health and disease.

Kir channel (Kir6.1 or Kir6.2) associated with SUR (SUR1 or SUR2) belonging to the ABC (ATP-Binding Cassette) transporter superfamily is forming the ATP-sensitive potassium (KATP) channel. KATP channels are expressed primarily in the pancreatic endocrine islets and the brain, the cardiac myocytes and skeletal muscle, vascular smooth muscle. ATP sensitive potassium channels (KATP) are so named because they open as cellular ATP levels fall. This leads to membrane hyperpolarization and thus links cellular metabolism to membrane excitability. They also respond to Mg-ADP and are regulated by several cell signaling pathways. KATP channels are made of the pore-forming subunits, Kir6.1 and Kir6.2, and a large auxiliary subunit, the sulfonylurea receptor (SUR1, SUR2A, and SUR2B). Four SURs and four Kir6.x form an octameric channel complex and the association of a particular SUR with a specific Kir6.x subunit constitutes the KATP current in a particular tissue. They have a variety of physiological roles including controlling the release of insulin from pancreatic β cells and regulating blood vessel tone and blood pressure. Furthermore, mutations in the genes underlie human diseases such as congenital diabetes and hyperinsulinism.

KATP channel function is governed mainly by intracellular ATP and ADP (6, 8, 9), the concentrations of which are determined by glucose levels. In a simplified scheme, ATP binds to Kir6.2 in an Mg²⁺-independent manner to close the channel, while Mg-ATP and Mg-ADP bind to the NBDs of SUR1, causing dimerization of the NBDs, which counteracts the inhibitory action of ATP on Kir6.2 and thereby stimulate channel activity. When blood glucose levels rise,

the intracellular ATP to ADP ratio increases as a result of glycolysis such that ATP inhibition dominates to suppress KATP channel activity. Conversely, when blood glucose levels fall, the ATP to ADP ratio decreases such that MgATP/MgADP stimulation prevails to increase channel activity.

Mutations in *ABCC8* and *KCNJ11*, the genes encoding SUR1 and Kir6.2, respectively, are linked to a range of insulin secretion and neurological disorders(10, 11) the pancreatic/neuronal Kir6.2/SUR1 subtype has been intensely studied. As seen above, KATP channels couple glucose stimulation to insulin secretion. In some cases, gain-of-function mutations cause developmental delay, epilepsy, in addition to neonatal diabetes, known as DEND syndrome.

Ashcroft (13) identified a novel heterozygous mutation, W68R, in the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive potassium (KATP) channel, in a patient with transient neonatal diabetes. The residue tryptophan at the cytosolic end of TM1 is very well conserved across the prokaryotic, eukaryotic and mammalian Kir family. The tryptophan is at the position W46 in KirBac3.1 and W68 in human Kir 6.2 human. A mutation on this very conserved tryptophan causes developmental delay, epilepsy, in addition to neonatal diabetes, known as DEND syndrome(13)

In this paper, we present the crystal structure of KirBac3.1 W46R mutant channel (homologous to the human channel Kir6.2) at 2.80 Å. The mutation, which replaces a tryptophan residue (highly conserved across the Kir family) to an arginine, disrupts the contacts between the TM1 and TM2 and creates new contacts as shown on our crystallographic data. The dynamical studies using HDX-MS shows an increase large difference in the conformational flexibility of the W46R mutant when compared with the KirBac3.1 WT. Besides, in silico molecular dynamics studies allows us to investigate in detail the influence of this mutated residue on the gating molecular mechanism of the channel. Here we present a sequence of molecular events which explain why the disruption of interaction between the two transmembrane helix TM1 and TM2 in W46R triggers the opening of the channel and explain the gain of function which is observed when the protein is mutated. This study is also crucial for explaining the molecular mechanism conductive to the DEND syndrome.

2.3.4 Results

2.3.4.1 Crystallographic Structure

The tryptophan at the position corresponding to Trp68 in Ki6.2 is absolutely conserved within the family of inward rectifying potassium channels (**Fig. 34C**), suggesting it has a critical role. We, therefore, created a pathological mutant of KiBac3.1 (a bacterial homologous of the human Kir 6.2 channel) W46R and investigated the structure at high resolution of this mutant. The Arg46 mutation replaces the hydrophobic tryptophan with a positively charged arginine.

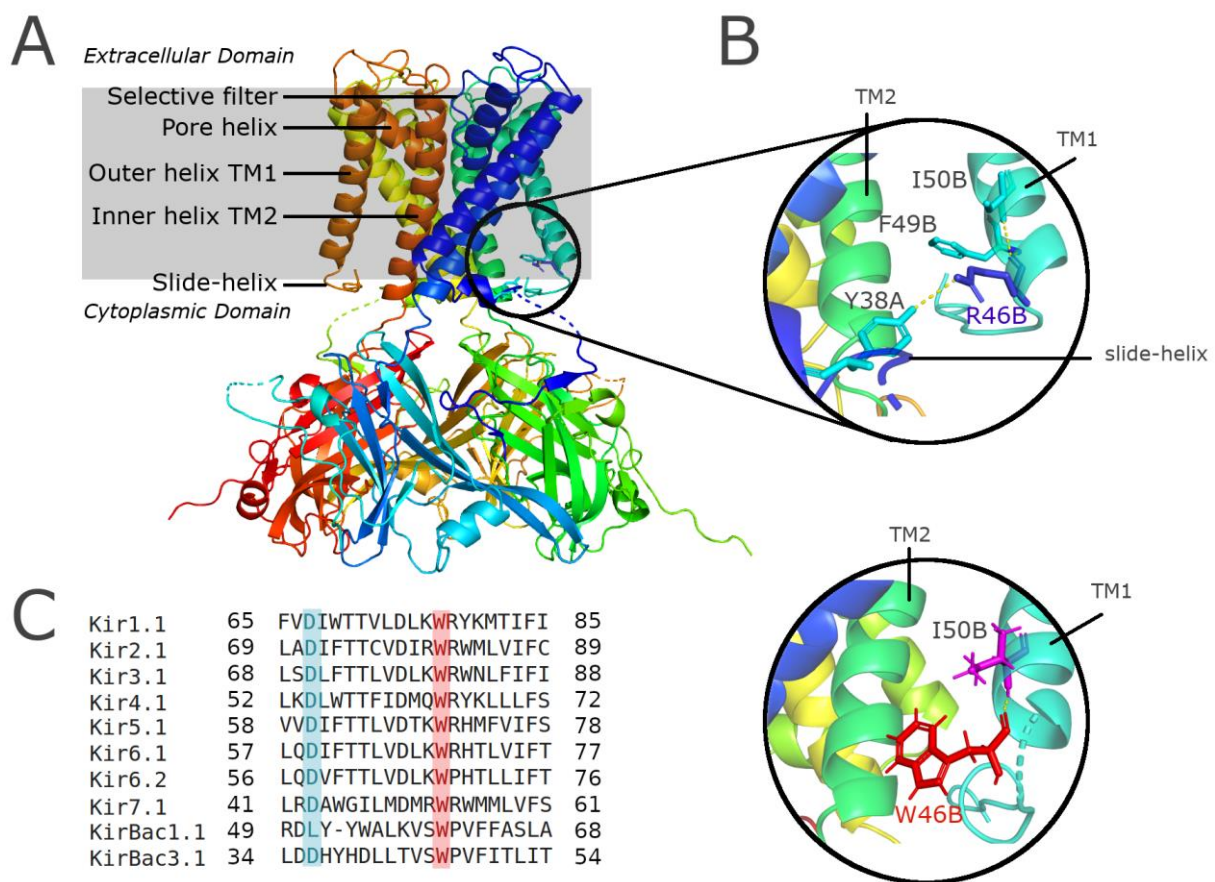


Figure 34 - Crystallographic structure of KirBac3.1 W46R. A) Structure of KirBac3.1 W46R showing the location of the mutant R46 in cyan at the bottom of TM1. Grey area represents the membrane, the various domains are indicated on the figure. B) Top: Zoom on the area around the mutation R46 at the bottom of TM1 from chain B (R46-B) interacting with Y38-A on the slide helix of the n-1 chain (chain A) Bottom: Same area as above with KirBac3.1 WT (PDB 2WL). W46-B (chainB) in the “flipped in” conformation packed against the C-terminal end of TM2 (chain A). Yellow dots show the polar contacts for Arg46 and Trp46. C) Alignment for Kir channels the tryptophan at the position corresponding to W68 in Kir 6.2, at

the bottom of TM2 is absolutely conserved (pink). The aspartate at the position corresponding to Asp58 in Kir6.2, on the slide helix is also highly conserved (cyan).

KirBac3.1 W46R mutant channel was expressed, purified and crystallized, and the structure resolved to 2.80 Å resolution. We grew crystals of the W46R mutant belonging to the P2₁2₁2 space group. The structure was solved by molecular replacement, and a final model containing 279 out of 301 residues of the construct was refined to an R-factor of 22.0% and an R-free of 27.8%, with 98.7% of the residues in the final model lying in the most favorable and additionally allowed regions of the Ramachandran plot. The full data collection and refinement statistics are shown in **Table 7** and the crystallographic structure is shown in **figure 34A**.

A backbone alignment with the structure of the KirBac3.1 WT (PDB 2WLJ)(12) showed that the two structures are very similar (RMSD = 0.471 Å). Both structures, WT and W46R are in the closed state. Interestingly, despite this overall similarity, important differences were evident in the vicinity of residue 46 (Trp or Arg). (**Figure 34A and B**).

As a consequence of the mutation, there is a series of changes in the inter and intra subunit interactions at the level of the bundle crossing at the bottom of the transmembrane helix compared with the Kirbac3.1 WT (**Fig. 34B**). In the majority of Kir WT channel X-ray structures, the residue equivalent to Trp68 in Kir6.2 is in the “flipped-in” conformation tightly packed against the C-terminal end of TM2 as seen in the crystal structure **figure 34B** (bottom, Trp46 in KirBac3.1 numbering). The Trp46 side-chain interacts with the Phe135 et Arg134 at the bottom of the TM2. More seldom, the tryptophan side-chain can also have another rotamer conformation (‘flipped-out’), pointing away from the channel pore where the interaction with the bottom of TM2 does not exist (Kir2.2 (3JYC)). The atomic structure of the W46R mutant shows that the side-chains of the four Arg46 are always pointing away from the channel pore and is engaged in intersubunit connections Trp38 and Asp36 on the slide helix of the n-1 subunit (**Fig. 34B** top).

2.3.4.2 HDX-MS measurements

We have investigated the protein conformational dynamics of the W46R mutant using HDX-MS. HDX is based on exchange at the amide backbone of a protein, which reflects its conformational dynamics. While protein HDX occurs at any site containing a labile hydrogen, amides on the peptide backbone are by far the most commonly measured exchanges in HDX

experiments for several reasons: First, amide backbone hydrogens are uniformly distributed along the polypeptide chain (except for Pro) and form critical hydrogen bonding networks within and between secondary structural elements of the protein. Thus, even relatively subtle perturbations in the higher-order structure of the protein will often affect the exchange rate of HDX at ‘backbone’ amides. Second, at neutral pH, backbone amide protons undergo exchange at a rate that is amenable to measurement. Third, the exchange at amide backbones is highly quenchable at low pH and low temperature allowing for monitoring of the dynamics at various time scale(14–16). HDX has been widely used on soluble proteins and also membrane proteins(17, 18). HDX was performed on the protein and KirBAC3.1 W46R mutant in detergent and compared with the purified Kirbac3.1 WT. We have established in earlier published work that the presence of detergent does not affect the conformational change of KirBac channel (19). To achieve sequence coverage as large as possible we tested various proteases Optimized conditions led to sequence coverage of 86% with nepenthesin (20). However, Nepenthesin did not cover the regions 57-87 (second half of the TM1 and the beginning of the pore helix), 143-147 (β 3) and 195-203 (second half of the β 7). Deuterium incorporation was monitored as a function of time for each peptide generated from the W46R mutant (**Fig. 43**).

Results (**Fig. 35B**) show that the most flexible regions are the loops in red extending outside the CTD (aa 271-285 between β 14 et β 15, see **Fig. 35C** for the nomenclature) with an HDX rate of 68.0 %. The next, more flexible, three domains are i) at the G gasket just below the CD-loop and the entire β 8, (aa 199-210, HDX rate of 66.0 %) ii) the stretch going from the end of the β 5 and the start of the β 6 including the CD loop in the middle (aa 162-174) HDX rate of 65,7% and iii) the stretch going from the end of β 6 and the start of β 7 including the loop in the middle facing down (aa 181-194) HDX rate of 64.1%.

Still, on the CTD, the stretch including the end of the G loop and the following β 11 shows also some flexibility (aa 250-260, HDX rate of 43.1 %)

In the transmembrane domain: The stretch at the bottom of TM2-loop and β 3 that includes the restriction point Tyr132 shows some flexibility (aa 132-143, HDX rate of 53.7 %) unlike the top of the TM2, which is particularly rigid, and the slide helix shows some flexibility as well (aa 36-42 HDX rate of 28.9 %).

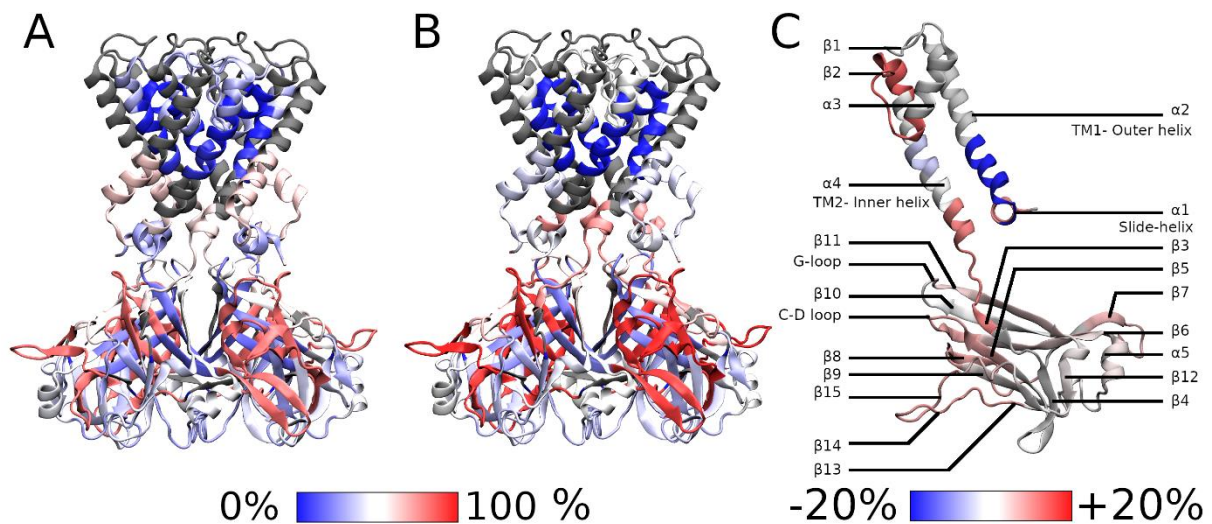


Figure 35 - HDX-MS rates. HDX-MS rates of peptides reported on the KirBac3.1 WT (from Fagnen et al. 2020) (A) and the mutant W46R (B). C) Rate difference between the mutant W46R and KirBac3.1 WT. Scale of exchange is shown at the bottom of the figures (Blue being low exchange and high rigidity, red being high exchange and high flexibility).

We compared the conformational dynamics of the mutant W46R with the Kirbac 3.1 WT (**Fig. 35A** (20) and **Fig. 35C**) blue being the W46R mutant domain less flexible and red the W46R mutant domain more flexible compared with the wild type. We first notice some differences around the Arg46 mutation. Interestingly, the stretch that includes the very end of the slide helix, the Arg46 mutation and the bottom half of the TM1, the external helix (aa 43-56), is not as flexible as the WT (normalized HDX rate of 37.9 % compared with 65.10 %). The network of interaction around the residue Arg46 is particularly stable. This stretch including Arg46 is also the only part of the mutant protein that is more rigid than the WT. The stretch of aa 36-42 before the mutation which includes the slide helix is more flexible than the WT (normalized HDX rate of 41.57% compared with 26.92%). This difference is the biggest in all the peptides analyzed.

More flexibility on the mutant protein was found i) on the stretch (aa 93-112) which starts from the bottom of the pore helix and includes the selectivity filter and the top of the external helix (normalized HDX rate of 50.04% for the mutant compared with 30.08% for the WT), ii) on the stretch (aa 131-143) which is at the bottom of the internal helix and includes a large loop just before the $\beta 3$, this increase of deuterium rate (77.32% compared with 61.26%) might be interpreted as a higher accessibility surface iii) stretch aa 162-174 (94.61% compared with 83.1%) including $\beta 5$ and $\beta 6$ in the cytoplasmic domain. This includes the CD loop (aa

166-170) and iv) The G-loop (aa 248-251) is slightly more flexible in the case of the mutant 62.05 % compared with 55.25% for the stretch aa 250-260)

2.3.5 Theoretical Results

The theoretical results presented in this section are based on MDeNM simulations in which a selected set of normal modes (NMs) related to opening/closing of the channel are excited within molecular dynamics (MD) simulations. Through a combination of MD and NMs, the MDeNM is a realistic exploration of the relevant normal mode space for the opening/closing processes taking into account the full environment (membrane, water, ions) of the protein at a given temperature. These simulations are completed by standard MD simulations carried out for a uniformly distributed set of structures that provide a fairly good estimation of the populations of the open/closed (and partially open) states.

2.3.5.1 Interaction Networks

Interaction network analyses were performed on the crystallographic structures of KirBac3.1 WT and on the KirBac3.1 W46R mutant modeled (see materials and methods) to understand the impact of the mutation W46R on the structure and dynamics properties of the protein. Trp46 in KirBac3.1 WT can adopt two conformations, called flipped-in (side-chain of Trp46 oriented towards the channel) and flipped-out (side-chain of Trp46 oriented towards the outside of the channel (**Fig. 36A**)). Note that the flipped in conformation is the most represented in the crystallographic data and the modeled Kir3.1 W46R (98.68% of the 25415 relaxed MDeNM structures).

The first analysis focused on the KirBac3.1 WT: we compare the interaction networks at the level of the residue Trp46 in flipped-in and flipped-out configurations. The details of the interaction networks around Trp46 for these two configurations are shown in **Fig. 36 D, E, F, G** for each chain separately: A, B, C, and D, respectively. In the flipped in conformation, Trp46 is tightly packed against the C-terminal end of TM2 of the same subunit, and interacts with Arg134 and Phe135 at the bottom of this inner helix, unlike in the flipped out conformation where these interactions do not exist, confirming that the Trp46 is moving away from the bottom of the inner helix and the center of the channel

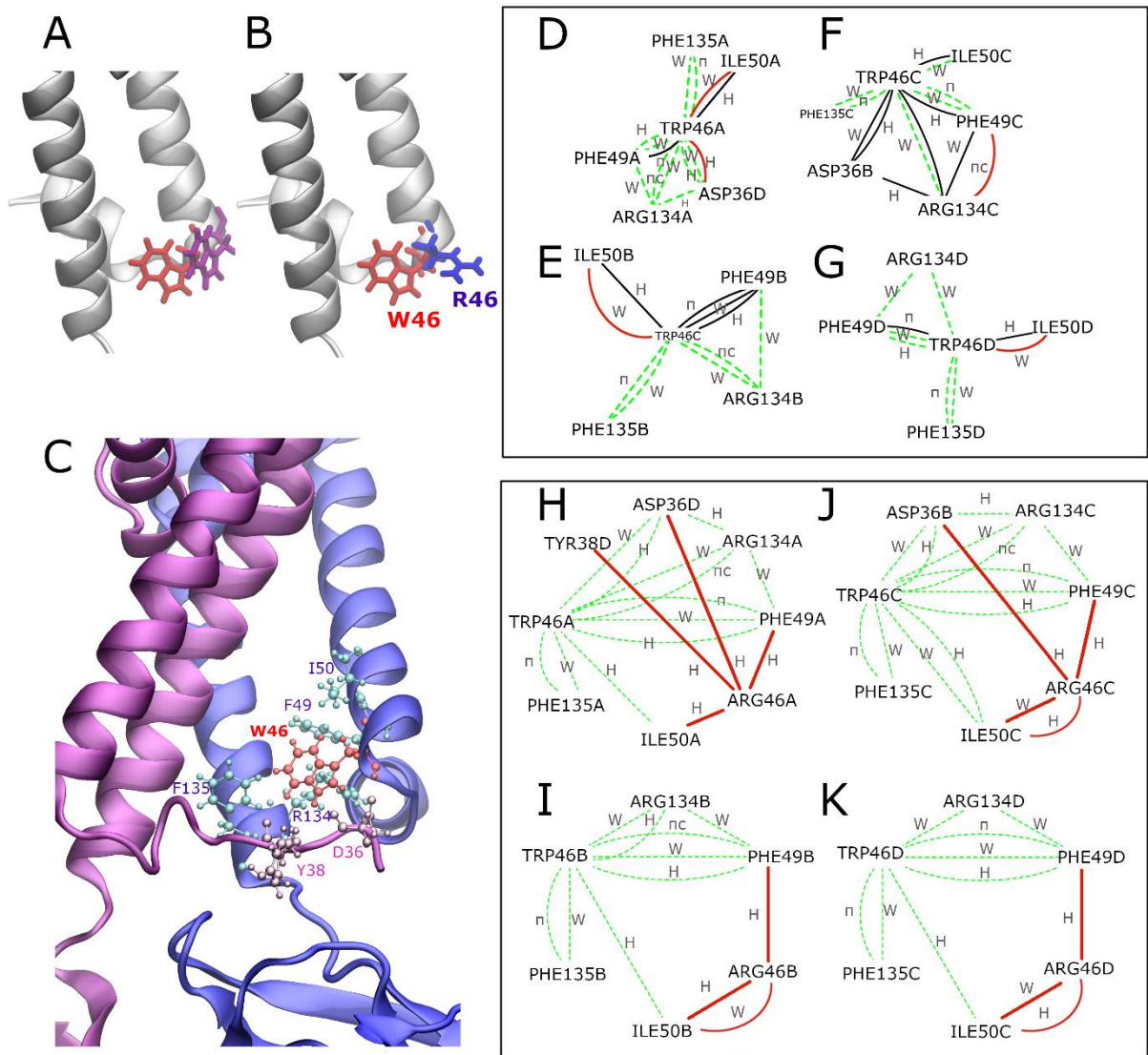


Figure 36 - Overview of the network of interactions around Trp46 (KirBac3.1 WT) and Arg46 (KirBac3.1 W46R). A) KirBac3.1 WT: representation of the Trp46 flipped-in (in red) and the flipped-out (in purple) B) Superimposition of the residue Trp46 (flipped in) in red and the mutation Arg46 in blue. C) Network of interaction around Arg46. The chains A and D are colored in blue and magenta respectively, and the residue Trp46 (flipped in) is superimposed in red. D, E, F and G) KirBac3.1 WT: Comparison of the interaction network of residue Trp46 in flipped in and flipped out conformation for the chains A (panel D), B (panel E), C (panel F), D (panel G). The green lines indicate the interactions present in the flipped-in configuration but absent in the flipped-out one and red lines those present in the flipped-out configuration but absent in flipped-in one. Black lines are common between the two conformers H, I, J and K) Comparison of the interaction network of residue Trp46 flipped in (KirBac3.1 WT) and of residue Arg46 (KirBac3.1 W46R) for the chains A (panel H), B (panel I), C (panel J), D (panel K). The green lines indicate the interactions present in KirBac3.1 WT but absent in W46R mutant, and the red lines the interactions present in the W46R mutant but absent in KirBac3.1 WT. The symbols along the edges indicate the interaction type: H for hydrogen bond, W for Van der Waals interaction, π for π - π interaction, and πc for π -cation interaction. The flipped-in configuration considered is from the X-ray structure, and the flipped-out one corresponds to a representative structure issued from MDnM simulations.

The second analysis focuses on the comparison between the interaction network around the residue Trp46, flipped in conformation (the most frequent conformation) in KirBac3.1 WT and the interaction network around Arg46 in the W46R mutant (**Fig. 36 H, I, J, K**). They are some similarities: both residues Trp46 and the mutated residue Arg46 interact with residues Ile50 and Phe49 on the same external helix TM1 (this is true for the four subunits, chains A, B, C, and D). However there are some clear differences: the interactions between Trp46 flipped in and the two residues Arg134 and Phe135 at the bottom of the TM2 are lost in the case of the W46R, this is explained by *the orientation of the mutated residue Arg46 toward the outside of the channel*. In parallel to this loss of interactions, a new set of network around Arg46 is established and interestingly with Asp36 and/or Trp38 at the level of the slide helix of the subunit n-1. Note that only the Arg46 from opposite chains A and C are interacting with the slide helix. It is less clear for the two other opposite chains, B and D. These observations suggest that the mutation Arg46 alter the interaction of the outer and inner helices at the level of the bundle crossing and promote the interaction of the bottom end of the outer external helix with the slide helix of the n-1 subunit. Arg46 is pointing towards the outside of the channel and show similarities with the flipped-out conformation of the W46 in the wild type.

2.3.5.2 Contacts between residues

Surface accessibility of the residues Trp46 and Arg46

We computed the accessible surface areas (ASAs) of residue 46 (Trp in WT or Arg in the W46R mutant) on the whole set of relaxed the 25415 MDcNM structures. They constitute a measure reflecting their interaction between them and the degree to which they are exposed to the solvent. The histograms of the ASA values given in **Fig. 37A** show that Arg46 in the mutant is more exposed than Trp46 in WT. The corresponding average value for the WT is 349.7 Å² with a standard deviation (SD) of 21.0 Å², and 632.3 Å² (SD =34.9 Å²) for the mutant. This supports our crystallographic data which shows that the Arg is pointed outside the channel.

Surface accessibility of the Arg134 and Phe135, contact with Ile131

In the closed “flipped in” state, the side-chain of W68 in Kir6.2 is directed towards the C-terminal end of TM2 and interacts hydrophobically with the residues I167, K170, and T171 in Kir6.2, PDB6JB1(21, 22). In the homologous KirBac3.1 channel W46 (W68 in Kir6.2) is also directed towards the C-terminal end of TM2 (**Fig. 34B** and **35C**) and are closed to the

Ile131 (Ile 167 in Kir6.2, identical residue), Arg 134 (K170 in Kir6.2, similar residue) and Phe135 (T171, similar residue).

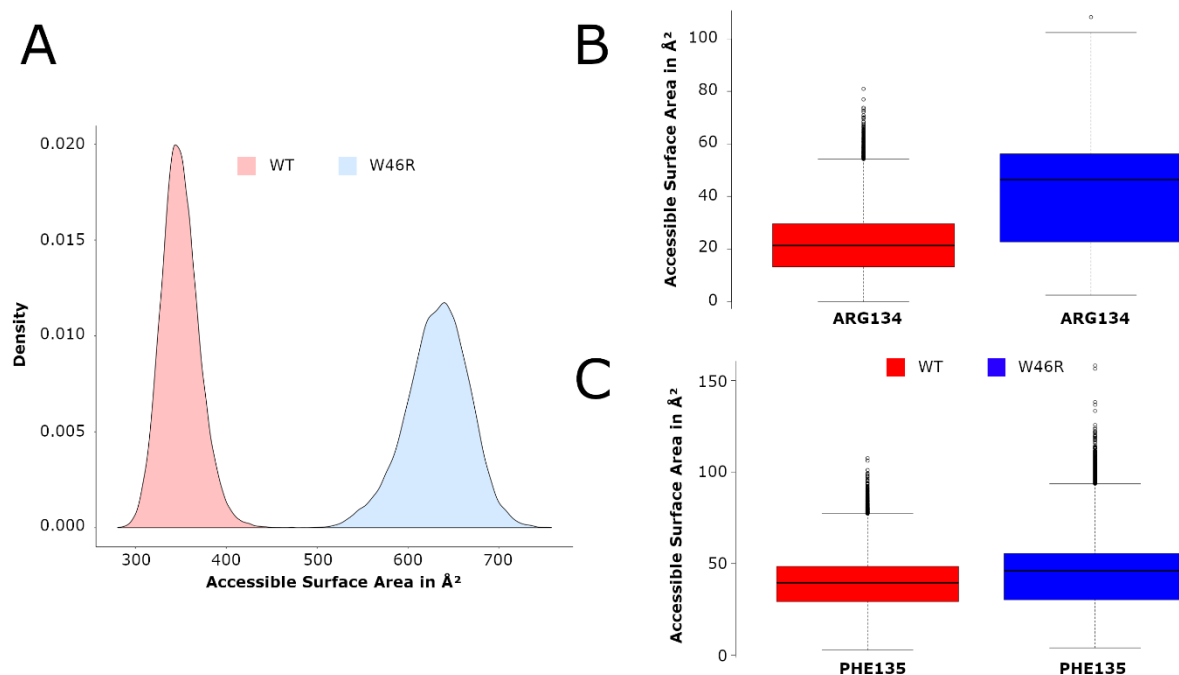


Figure 37 - Interactions of Trp/Arg46 in MDeNM study. A) Histogram of Accessible Surface Area (ASA) values of residue Trp46 in KirBac3.1 WT (in red) and Arg46 in KirBac3.1 W46R (in blue) obtained on the set of relaxed MDeNM structures. B) Boxplot of ASA values of Arg134 in KirBac3.1 WT (in red) and in KirBac3.1 W46R (in blue) over the same set of structures. C) Boxplot of ASA values of Phe135 in KirBac3.1 WT (in red) and in KirBac3.1 W46R (in blue) over the same set of structures.

The proximal residues Arg134 and Phe135 are more exposed to the solvent in the W46R mutant than in WT **Fig. 37BC**. This supports the loss of interaction with Arg46 in the mutant protein. Note the significant increase of the ASA value for Arg134 compared with Phe135. Arg134 shows average values of 21.77\AA^2 ($SD=10.96\text{\AA}^2$) in the KirBac3.1WT and 41.05\AA^2 ($SD =18.19\text{\AA}^2$) in the W46R mutant. Phe135 shows average value of 38.90\AA^2 ($SD = 13.87\text{\AA}^2$) and 44.27\AA^2 ($SD 17.59\text{\AA}^2$) in KirBac3.1WT and W46R mutant respectively. This is explained by the fact that Arg 134 is closer to the bottom end of the TM2, therefore, more accessible to the solvent. It is also worth noticing that Arg46 has a higher ASA value compared to Arg134, denoting the significant exposure and flexibility of the later.

The distribution of minimal distances between residue 46 and Ile131 computed on the MDeNM set of conformations shown that this minimal distance is higher (for all the chain) in

the case of the mutant (**Fig. 38**). The average values are 2.45 Å (SD 0.37 Å) and 6.20 Å (SD 0.9 Å) for the WT and the W46R mutant.

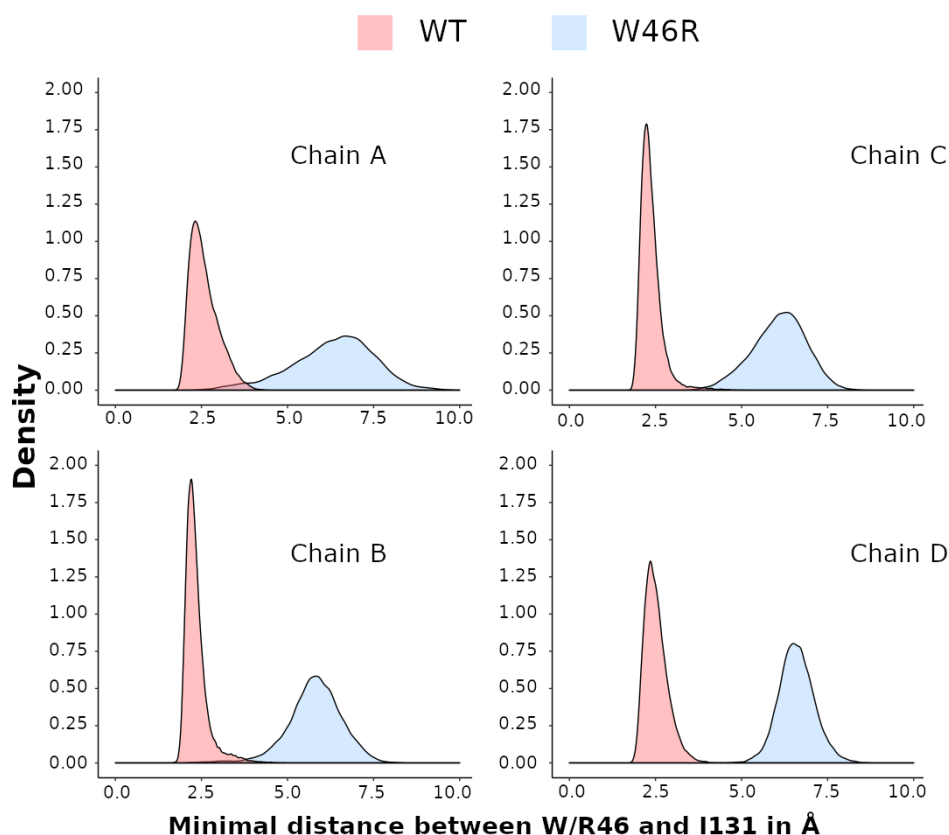


Figure 38 - Hydrophobic interaction. Histogram of the minimal distances between residue 46 and I131 in KirBac3.1 WT (in red) and KirBac3.1 W46R (in blue).

This study shows a clear disruption of these crucial interactions between TM1 and TM2 in the case of the W46R mutant.

2.3.5.3 Impact of the mutation on the gating

In this paragraph, we are investigating the knock-on effects of the mutation W46R on various dynamical components of the gating mechanism. Among the structural and dynamical characteristics that we have investigated there are i) the movement of the slide helix for each chain ii) the movement of the cytoplasmic domain iii) the movement of the transmembrane helices.

i) Movement of the slide helix (uprising of the slide helix)

We present here in more detail the impact of the mutation W46R on the motion of the slide-helix since Arg46 has been described as interacting with the slide helix (n-1). To this end, we computed the correlations between the uprising of the slide-helices (this movement has been shown previously as important in the gating of the channel (20) and the minimal distances between Arg46 at the extremity of TM2 and Asp36 located at the extremity of the slide helix, presented in **Fig. 39A** (Note that the blue circle correspond to positive correlation, while red one to negative correlation. The diameter and the colour intensity of a circle are proportional to the strength of the correlation). It is observed that most of the minimal distances between Arg46 and Asp36 of neighboring chains (n-1) are correlated with the uprising of slide helices, which means the smaller the distance between these two residues, the bigger is the movement of the uprising of the slide helix. More precisely (see the legend of the figure for the definitions) i) the minimal distances $d46a36d$, $d46b36a$, $d46c36b$ are correlated with the uprising of the chain A (*upa*); ii) the distances $d46c36b$, $d46d36c$ are correlated with the uprising of the chain B (*upb*); iii) the distances $d46d36c$, $d46a36b$, are correlated with the uprising of the chain C (*upc*). More precisely, the uprising of slide helices in the mutant is correlated with the minimal distance between Arg46 and Asp36 belonging the next chain or the previous one, while in WT (which is mostly in flipped-in conformation: 98.68% of the relaxed MDeNM structures) the correlations are mostly with the next chain (n+1).

ii) Movement of the cytoplasmic domain

The motion of the cytoplasmic domain constitutes an essential factor in the gating, we investigated its relation with the rising of slide helices. We used the minimal distance between Asp35, the first residue of the slide helix, and Arg167, located at the top of the cytoplasmic domain on the CD loop, as a measure of the proximity of these two structural regions, still we also considered the inter-chain distances as well. Significant correlations were obtained between these distances and the uprising of slide helices shown in **Fig. 39A**. It is worth noticing strong negative correlations between interchain distances and the uprising of the slide helices. That is when these distances decrease the slide helices approaches the membrane closely. In more detail, $d35a167b$ and $d35d167a$ are inversely correlated with the uprising of the chain A (*upa*), and $d35b167c$ and $d35c167d$ are inversely correlated with the uprising of the chain C (*upc*), the same so between $d35d167a$ and the uprising of the chain D (*upd*). WT structure displays the same type of correlations (**Fig. 39C**).

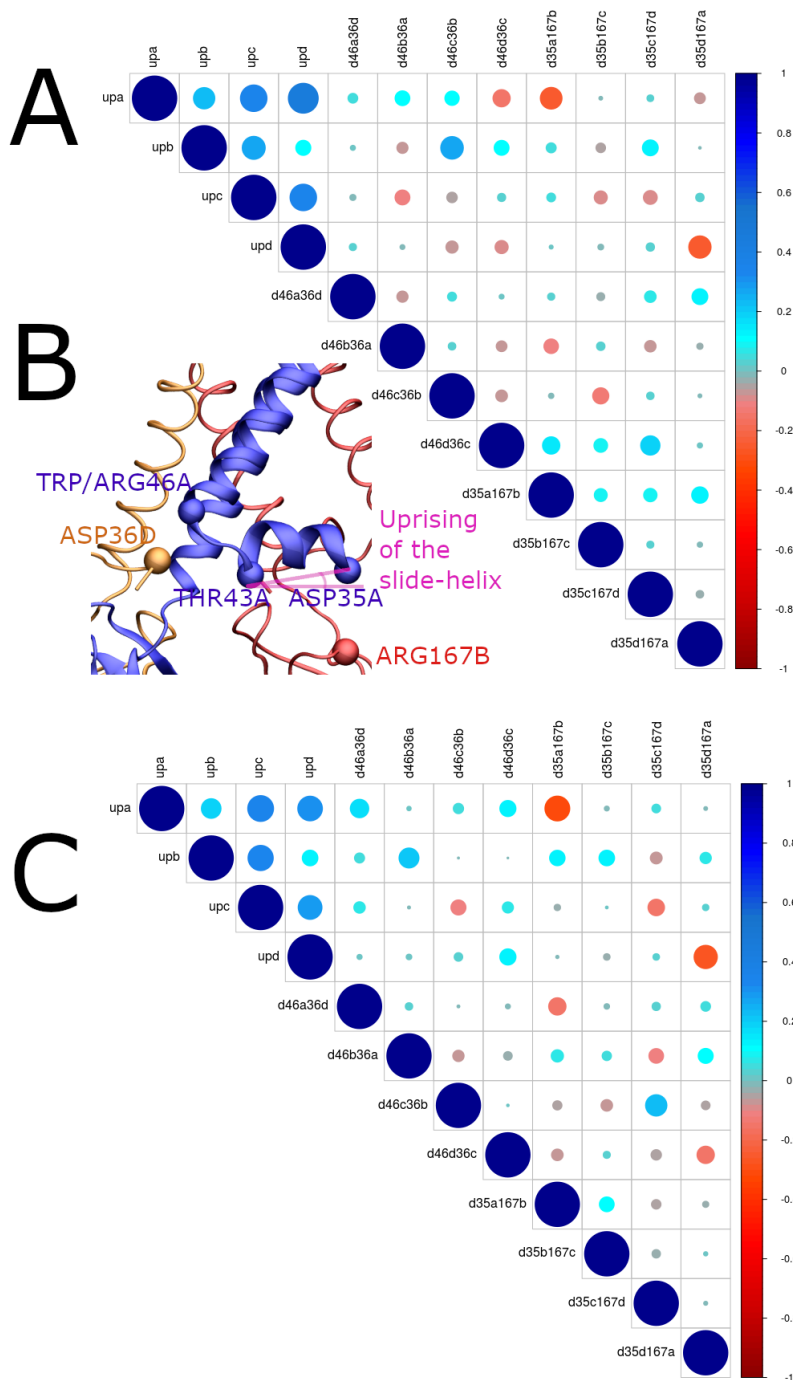


Figure 39 - Correlation between the interactions of the slide-helix and the uprising of the slide-helices in KirBac3.1 W46R and WT. A) Correlations in the case of the mutation W46R. The uprising of the slide-helix for the chains A, B, C and D are denoted by the uprising of the slide-helix upx where x is the letter of the chain. $d46n36n-1$ corresponds to the minimal distance between the residue Arg46 of the chain n and the residue Asp36 of the chain $n-1$, and $d35n167n+1$ to that between the residue Asp35 of the chain n and the residue Arg167 of the chain $n+1$. Blue circles correspond to positive correlations, while red ones to negative correlations. The diameter and the color intensity of a circle are proportional to the strength of the correlation. B) Representation of the measures taken into account to realize the correlations. C) Correlations in the case of the WT.

The comparison of the correlations between the distances $d_{46n36n-1}$ and $d_{35n167n+1}$ for KirBac3.1 WT and KirBac3.1 W46R are clearly different between the two cases. Indeed, these distances are correlated in the case of KirBac3.1 W46R but not in the case of the KirBac3.1 WT, this is the consequence of the interaction created by the mutation between Arg46 and Asp36 on the slide helix. While in the WT, the residue Asp35 interacts with Arg167, the mutation in Arg46 creates the interaction between Asp36 and Arg46. It causes the slide-helix to be in balance between these two interactions. In the case of the WT, the interaction Asp35-Arg167 promotes the orientation of the slide-helix towards the cytoplasmic domain so a decrease of the uprising of the slide-helix. This gain of interaction in the W46R favors the uprising of the slide-helices.

iii) Movement of the transmembrane helices

Here we analysed the correlation between the uprising of the slide helix and the tilts of the inner and outer transmembrane helices and how they affect the gating of the channel at the constriction points Leu124 and Tyr132. The correlations obtained on the MDeNM sets for the mutant between all these structural determinants are given in **Fig. 40A** (see the figure legend for their definition). One can observe very high correlations of the inner and outer helices tilt angles between them and with the uprising of the slide helices. Correlations obtained for the WT are similar, as shown in **Fig. 40C**.

In the center of the channel, there are two constriction points Leu124 and Tyr132 important for the gating, they control the passage of the potassium through the channel. In more detail, the gating at the level of Leu124 (g_{124ac}, g_{124bd}) is correlated with the uprising of the slide-helices (upa, b, c, d) and g_{124ac} is correlated with the tilt of the transmembrane helices ($tiltin, tilton$). The gating at the level of Tyr132 (g_{132ac}, g_{132bd}) is oppositely correlated with the uprising of the slide-helices (upa, b, c, d) and the tilt of the transmembrane helices ($tiltin, tilton$). In the case of KirBac3.1 WT, no clear correlation is revealed between the gating at the level of Leu124, while the gating at the level of the residue Tyr132 BD is mostly correlated with the uprising and the slide-helix and the tilts of the transmembrane helices (contrarily to KirBac3.1 W46R).

The upward motion of the slide-helix causes the tilt of both transmembrane helices in such a way that the top of the transmembrane helices moves away from the center of the channel (Leu124) and the bottom of the transmembrane helices get closer to the bottom of the channel

(Tyr132). This causes the increase of the opening of the channel at the level of Leu124 but a decrease of the opening of the channel at the level of Tyr132.

2.3.5.4 Population of open and closed states from the relaxed structures issued from MDeNM simulations

In order to get dynamic information from the selected normal modes described in Materials and Methods, we carried out MD simulation including the full environment (water, lipids, ions) using MDeNM. Four channel-gating states can be discriminated based on the open or closed conformation of the two main constriction points (Leu124 and Tyr132) observed in the ensemble of relaxed structures: 1) Fully open state, when the minimal distances at both the constriction points are greater than the ionic diameter of K^+ (diameter of K^+ ion : 3.5275\AA); 2) Fully closed state, when both distances are less than the ionic diameter of K^+ ; 3) Half-open state 1, when gating at Leu124 is open and gating at Tyr132 is closed; 4) Half-open state 2, when gating Tyr132 is open and gating at Leu124 is closed. Interestingly, the fully open state is populated of about 7.4 %, which is higher than for the KirBac3.1 WT (6.8% **Fig. 41C**). The knock on effect of the W46R mutation is an opening probability higher than for the WT.

It is worth noticing that the gating at Tyr132, closer to the cytoplasmic domain, is more often closed than the gating at Leu124 (32.5 % compared with 10.28 %, respectively). Tyr132 in both protein WT and the mutant W46R is the most restrictive amino acid

Figure 41A and **B** describes the amplitude of the gating of WT and the W46R mutant (**Fig. 41A** and **41B** respectively). The distance between the opposite chains at the level of the two constriction point is lower than 15\AA for the WT, and higher than 15\AA for the W46R mutant for a small population. Interestingly, for this small population, the channel is more open at the level of Tyr132 compared with Leu124.

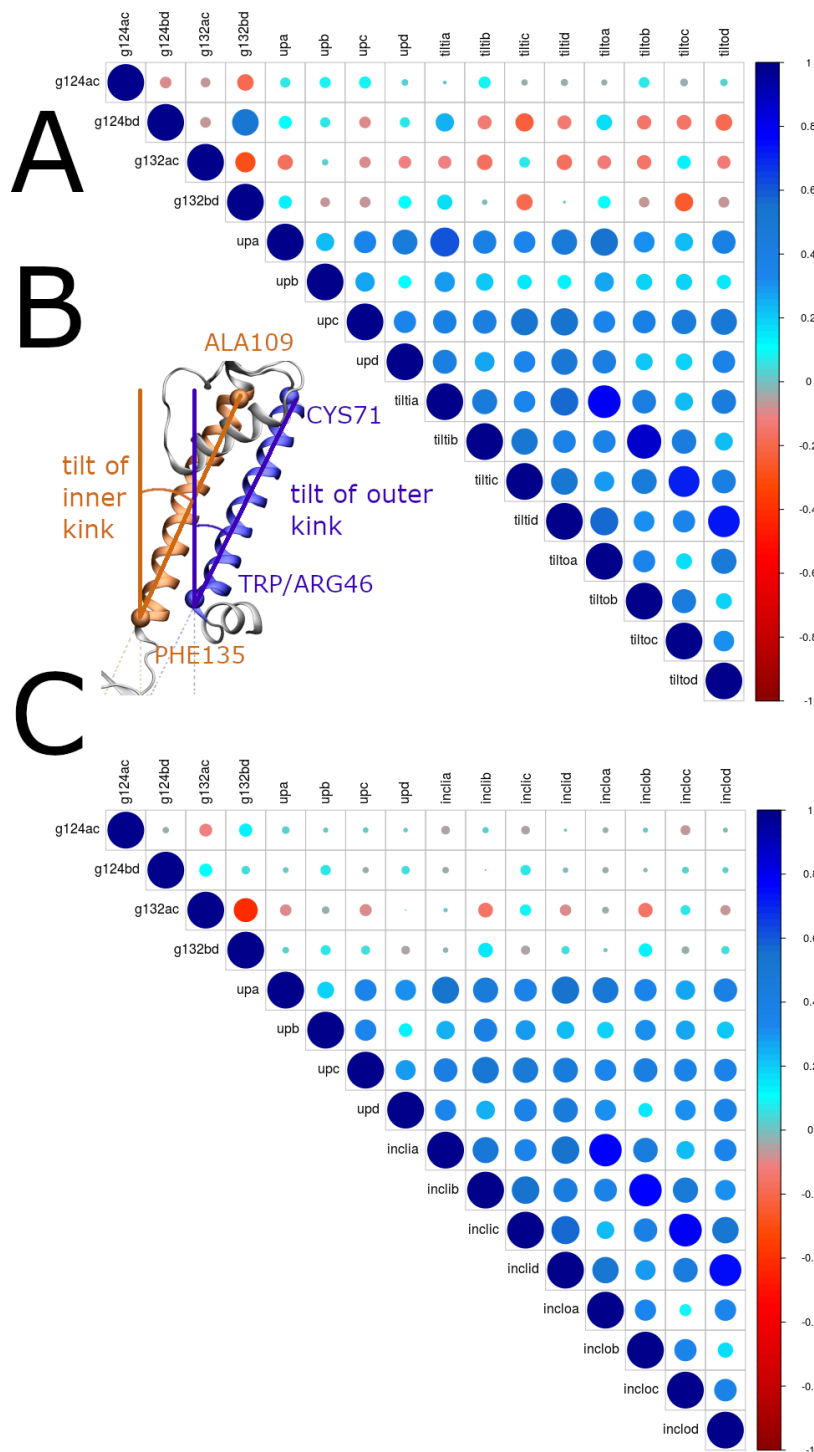


Figure 40 - Correlation between the gating and the uprising of the slide-helices and transmembrane helices inclinations in KirBac3.1 W46R. A) Correlations in the case of the mutation W46R. The minimal distance between the residues LEU124 belonging to the chains A and C defining the gating at this level is denoted *g124ac*, and similarly, for TYR132, it is designated *g132ac*. The uprising of the slide-helices of the chains A, B, C and D are denoted *upa*, *upb*, *upc*, *upd*, respectively. The tilt angle of the axes of the inner and outer helices from the perpendicular line to the membrane plane are denoted *tiltin* and *tilton*, respectively, where n is the name of the chain. Blue and red circles correspond to positive and negative correlations, respectively. The diameter and the color intensity of a circle are proportional to the strength of the correlation. B) Definition of the inner and outer tilts The uprising of the slide-helices is defined as in Figure 23B. C) Correlations in the case of the WT.

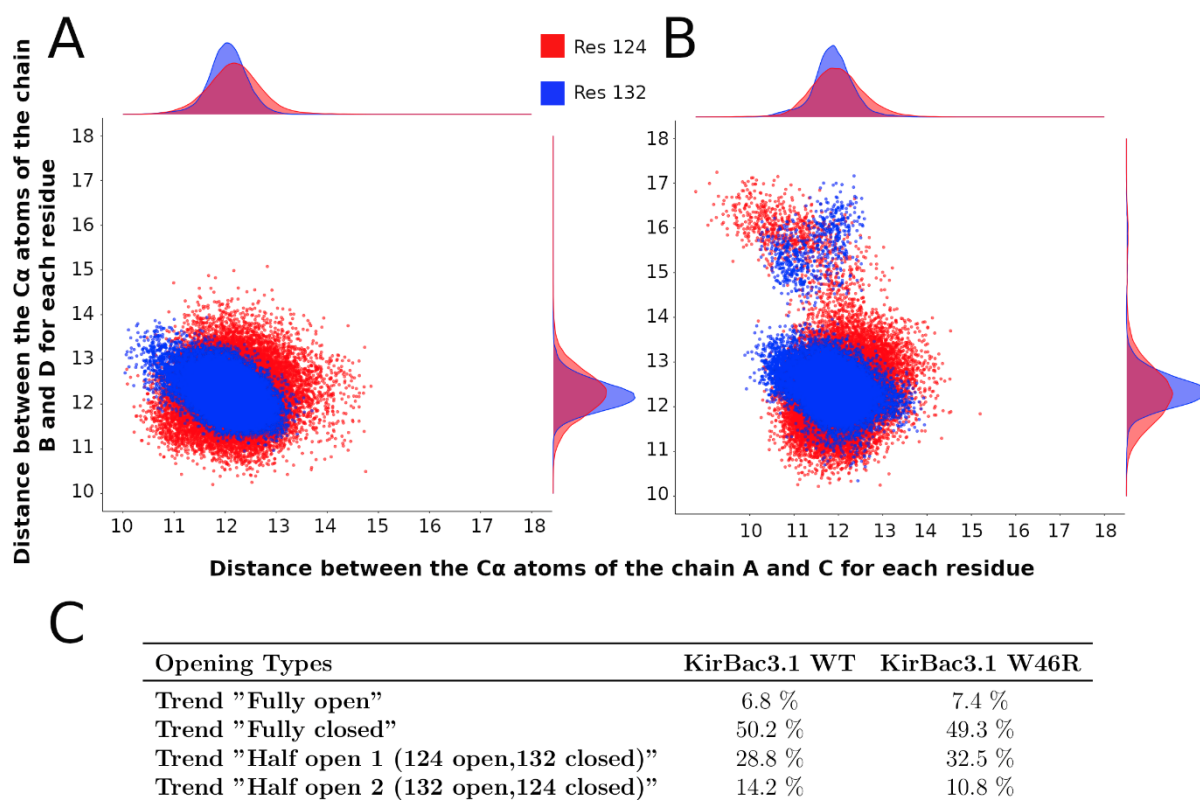


Figure 41 – Gating motions and statistics. A-B) Scatter plots of distances between $C\alpha$ atoms of the residues 124 (in red) and 132 (in blue) for chains AC and BD for KirBac3.1 WT (a) and KirBac3.1 W46R (b) . C) Statistics on the opening state of the channel realized on the relaxed MDeNM structures

2.3.6 Discussion

In all Kir crystal structures, the residue equivalent to W68 (W46 in KirBac3.1 numbering) lies at the N-terminal end of TM1, close to where the protein chain undergoes a 90° turn to form the slide helix. This particular residue is highly conserved and 98% is in the flipped in conformation. In this conformation, the residue tryptophan is pointing the center of the channel and is tightly packed against the C-terminal end of TM2. More precisely, the Trp46 side-chain interacts with Ile131 Phe135 and Arg134 at the bottom of the TM2. This interaction favors the closed state. It has been suggested that the ‘flipped-out’ state of Tryp68 has allowed TM2 to undergo the opening transition (13).

In the case of the mutant Arg46, the addition of a charge in this region is likely to have a destabilizing effect. Observation of the X-ray structure of KirBac3.1 W46R and the modeled

structure form 2WLJ (the rmsd between these structures is 1.712Å) show that the residue Arg46 is not pointing toward the center of the channel but resembles rather the flipped out conformation of Trp46 and is pointing the outside of the channel. As a consequence, the interaction with the bottom of the TM2 helices (described previously) is disrupted and the residue Arg46 is developing a new network interaction particularly with the slide helix of the n-1 subunit (Asp36 and Trp38). Note that the Asp36 is highly conserved among the Kir channel (Fig. 34).

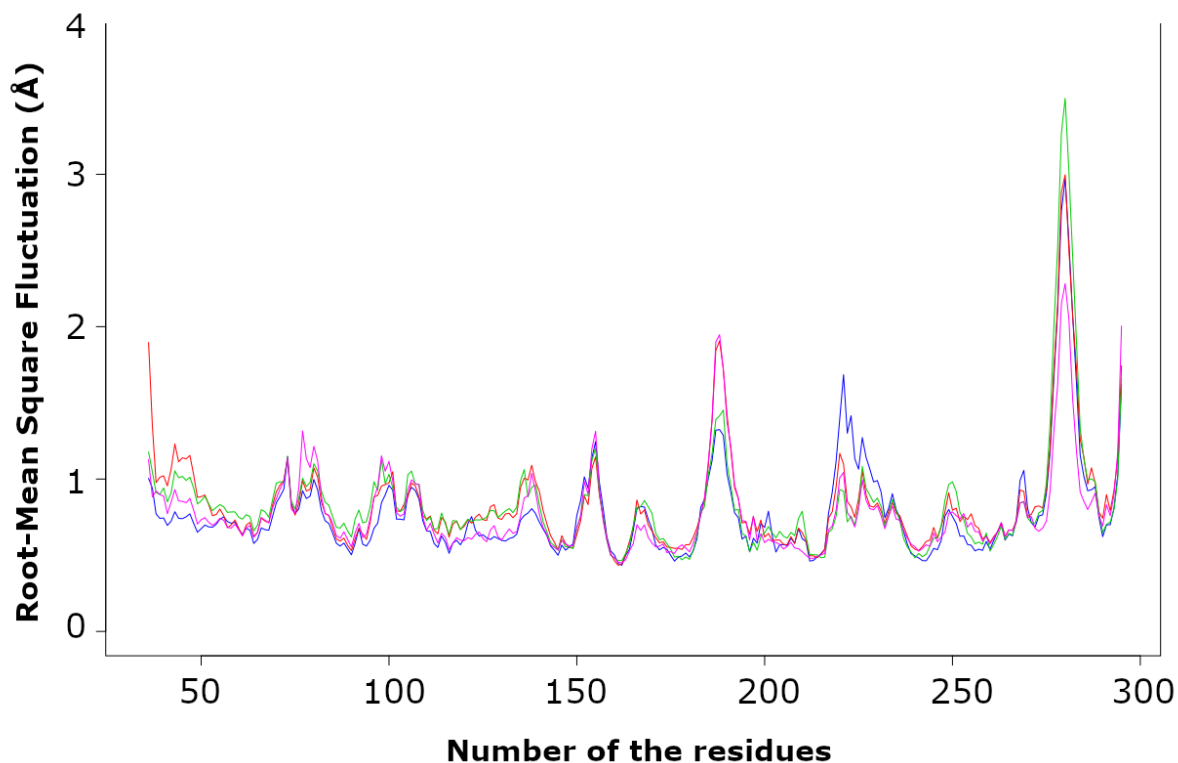


Figure 42- Root Mean Square Fluctuation by residue computed on all relaxed structures from MDeNM in blue, red, green and magenta for the chain A, B, C and D , respectively.

The disruption of these interactions destabilizes the closed state and facilitates the opening of the channel as described with our dynamical studies HDX-MS and *in silico*.

Our experimental studies with HDX-MS show clear dynamical differences between the two structures, W46R mutant gains in flexibility compared with KirBac3.1 WT. There is also a very good correlation between the experimental HDX-MS data and the calculated Root Mean Square Fluctuation of all the 24512 relaxed structures from MDeNM (Fig. 42). The peaks showing high fluctuation are also seen as flexible in HDX-MS experiment data for instance: the loop in the CTD (aa 271-273), which shows the highest fluctuation, is also the most flexible.

Other regions correlate: the regions around the constrictions point Leu124 and Tyr132 and the slide helix is more flexible. The only region that shows less flexibility compared with the WT structure is at the bottom of the TM1 where the Arg46 sits. The new network of interaction between the mutated residue Arg46 with the slide helix might explain this loss of flexibility.

This new interaction increases the probability of the channel opening (**Fig. 41**). How do these new interactions increase the probability of the channel opening?

Our in silico studies allow presenting a sequence of molecular events that explain why the lack of interaction with the TM1 triggers the opening of the channel (**Fig. 44**). In WT state, the tryptophan lies in a position that would impede the movement of transmembrane domain 2 (TM2) and the opening of the gate. In the W46R state, the Arg is flipped and enables movement of TM2 besides a new network of interaction with the slide helix n-1 could help also in the gating mechanism in such a succession of sequences: 1) Arg46 interacts with slide helix (Asp38) 2) The uprising of the slide helices, the bending of the TM1 and TM2 which causes increase of the opening of the channel at the level Leu124 but a decrease of the opening of the channel at the level Tyr132.

Clinical implications: Mutations of W68 in Kir6.2 causes a gain of function of the channel. Mutations of residues K170(K170T) and I167 (I167L) in Kir6.2 result in neonatal diabetes by reducing inhibition by ATP (23, 24). Many different mutations at T171 also cause a large increase in P_o (25). All these amino acids interact with W68. W68 and the network of interaction around it are crucial for the healthy activity of this channel. Most of the W68R mutants trigger a gain of function. In this study with the W46R mutant (KirBac3.1, homologous) we explain how the mutation destabilizes the closed state and causes a subtle succession of movements favorable to a slightly more opening probability.

2.3.7 Materials and methods

2.3.7.1 Protein expression purification

The W46R mutant was introduced using site-directed mutagenesis into a synthetic KirBac3.1 in pET30a, where the open reading frame had been codon-optimized for expression in *Escherichia coli*.

Protein expression and purification of this mutant channel was performed as outlined before (20, 26). Briefly, after cell disruption by French press, the protein was directly solubilized with 45 mM DM (Decyl β -D-maltopyranoside), centrifuged, and the supernatant was loaded onto a Co^{2+} affinity column. The protein was then purified promptly on a Superdex 200 column pre-equilibrated with 2mM TriDM buffer. Concentrated (1-2.5 mg/ml) preparations of purified proteins (>95% purity, judged by SDS-PAGE) were stored at -80°C in buffer containing 20 mM Tris, Ph7.4, 150 mM KCl and 0.2 mM TriDM.

Protein crystallization The triDM detergent was exchanged into 14 mM HEGA-10 using Vivaspin concentrators with a 100-kDa cutoff. The concentration of the protein was 10mg/ml.

Protein crystals were then grown using the sitting-drop method in 15% (v/v) glycerol, 100 mM MES 6.5, 15% PEG 5000 (w/v), MgCl_2 1M using $\sim 10\text{mg/ml}$ -1 protein concentration (in a 1 :1 protein : reservoir ratio). Crystals appeared after 3–4 days at 20°C and were cryo-cooled under liquid nitrogen before analysis

Data collection and structure determination. The Kirbac3.1 W46R crystals belong to the P21212 space group, with cell dimensions of 106.77\AA 113.98\AA 89.18\AA . The asymmetric unit has a solvent content of 69.4% and contains one molecule. Data were collected at 100K using a Pilatus 6M detector at the synchrotron SOLEIL (St Aubin, France), using a Dectris pixel-array PILATUS at a wavelength of $\lambda = 0.9778\text{\AA}$ to a resolution up to 2.80\AA . Data set statistics are provided in **Table 7**. Molecular replacement was carried out with Phaser (CCP4 suite)(27), using a search model derived from the structure of KirBac3.1 closed state at 2.85\AA (PDB 1XL6). Five percent of the reflections were set aside in the free R set. The model was refined in real space interactively using Coot(28) and refined using BUSTER-TNT(29), which included a final round of translation, vibration and screw-rotation (TLS) anisotropic refinement, as implemented in BUSTER-TNT. The final model contains 279 residues out of 301 (residues 11–29, 36–278 and 282–298, inclusive). The model also contains 31 solvent molecules and three ions (two K^+ and one Mg^{2+}). The final model was validated using MolProbity(31) 45 and presented very good stereochemistry, with over 98.7% of all residues in favored and additionally allowed regions of the Ramachandran plot.

Pepsin Digestion, Hydrogen/Deuterium exchange approach coupled to mass spectrometry (HDX-MS) and HPLC Peptide Separation of this mutant channel was performed as outlined before(20). Briefly, all protein digestions in solution were performed in an ice bath at 0 °C. Protease solutions were prepared in 500 mM glycine (pH 2.2). KirBac3.1 proteins were digested in the same buffer for 2–5 min using a protease/substrate ratio of 1:1 or 1:10 (wt/wt) for pepsin and nepenthesin, respectively, either in solution or immobilized on a resin. Increase in digestion time did not have any effect on the proteolysis.

HDX-MS reactions were carried out on KirBac3.1 W46R at a protein concentration of about 10 μM. The reaction was initiated by a 10x dilution of the protein samples (10 μL) into a deuterated buffer containing 50 mM KCl and 0.2 mM TriDM. Time course of the HDX was followed over a 20-min period by sequential withdrawing 120 μL of deuterated samples, which were immediately added to 26 μL of quenching buffer (8 M guanidium chloride, 500 mM glycine HCl, pH 2.2), rapidly mixed, and flash-frozen in liquid nitrogen. After protease digestion in solution or on column in an ice bath at 0 °C, peptides were loaded onto a peptideMicroTrap (Michrom Bioresources) column and washed with 0.03 % TFA in water (HPLC solution A). They were then separated on a reversed-phase C12 column (1 × 50 mm, Jupiter; Phenomenex) using a linear gradient of 15–45 % (vol/vol) of solution B (CH₃CN 95 % and TFA 0.03 %) during 26 min. The column was connected to the electrospray source of mass spectrometers until 30 % (vol/vol) B and then disconnected to avoid pollution of the electrospray source by the detergent. The valves, trap cartridge and column were cooled to 0 °C by immersion in an ice bath as previously described(18). The tandem MS (mapping) analyses were performed on an ion trap mass spectrometer (Esquire 3000+; Bruker Daltonics) to enable the identification of the peptides after their separation on HPLC. Accurate mass measurements and the analysis of the local kinetics of deuteration were performed on a time-of-flight (TOF) mass spectrometer (6210; Agilent Technologies) equipped with an electrospray source. Each deuteration experiment was replicated in triplicate. Data were processed with MassHunter software (Agilent Technologies). Qualitative Analysis, and the deconvolution and calculation of the average masses were carried out in Magtran(30).

2.3.7.2 Theoretical data

2.3.7.2.1 Modeling and Dynamics

The X-ray structure of KirBac3.1 with an atomic resolution of 2.6Å (pdb id: 2wlj)(12) was used to model the complete WT structure. As the first 34 residues were missing in the X-

ray structure, this segment was excluded in our model, and missing atoms were built using the CHARMM(32) program. Residues 1 to 34 of the protein are not likely to be involved in the gating process. The tetrameric complex was built by applying the specified symmetry $P 2_1 2_1 2$ for this structure using the “Protein Interface Surface an Assemblies” software through Pisa(33) at EBI. The mutation W46R was achieved with Chimera(34) considering the modeled WT structure. The ionization states of residues of both structures were established using PROPKA3 (35, 36). A complete system comprising a DOPC membrane, water molecules of type TIP3P (37) and KCl ions with 150 mM concentration within a box of dimensions $116.243 \text{ \AA} \times 116.243 \text{ \AA} \times 133.255 \text{ \AA}$ was built using the membrane-builder module of Charmm-Gui webserver (38, 39). This webserver uses the “Orientations of Proteins in Membranes” (OPM)(41) software to imbed the protein into the membrane. We used the charmm36 force field (40). The WT and mutant structures were first energy minimized, then equilibrated for 600 ps at a constant temperature of 300 K using the Nose-Hoover thermostat and constant pressure of 1 atm using the Langevin piston. The Leapfrog Verlet algorithm was used for propagating the movement. The cut-on and cut-off distances for non-bonded interactions were set to 10 \AA and 12 \AA respectively, and between these values, a switching function was applied (20).

2.3.7.2.2 Normal Modes

The first lowest 200 normal modes of the structure KirBac3.1 W46R were computed with the DIMB (42) method within CHARMM. A switching function was applied to the non-bonded interactions; setting a cut-on distance of 10 \AA and a cut-off of 12 \AA . A distance dependent dielectric constant of $2r$ (r being the interatomic distance) was used. The minimization was carried out under harmonic restraints applied to atomic positions that were progressively decreased and finally continued without restraints by carrying out 50,000 steps of CG and continued with the ABNR algorithm using a convergence criterion of $10^{-5} \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ RMS energy gradient. We selected among these modes those directly implicated to the gating of the channel to be used in MDeNM (Molecular Dynamics using excited Normal Modes), using the same procedure as for KirBac3.1 WT (20). 8 modes were selected, having the ranking numbers 85, 86 106, 150, 153, 154, 166, and 171 ordered in increasing frequencies.

2.3.7.2.3 Molecular Dynamics using excited Normal Modes

The MDeNM method (Molecular Dynamics using excited Normal Modes)(43) was applied to explore the large scale conformational changes of the protein. This method allows an extensive conformational exploration coupling motions in the normal mode space and local

ones with molecular dynamics. It consists at propagating the motions by kinetic excitations along different linear combinations of mode vectors during MD simulations, each one of these simulations constituting a replica. These vectors are chosen so that they point to different regions of the normal mode space allowing a large exploration. Substantial conformational changes could then be explored in a series of relatively short MD simulations of few nanosecond time length to get an ensemble of structures that would require at least ms time scale MD conventional simulations. In our study we considered 130 replicas for KirBac3.1 W46R that allowed an extensive sampling of the conformational space. A filtering procedure was used to determine the mode combinations allowing a uniform distribution of the vectors (See Supplementary Data). We considered a series of 7 kinetic energy excitations, each one lasting 1,5 ps, and corresponding to a 8 K temperature increase of the protein. These simulations were carried out with the Charmm program using a dedicated script (available upon request).

2.3.7.2.4 Relaxation of the excited MDeNM

MDeNM provided 910 (7 excitations for every 130 replicas) excited structures. This set of structures contained few similar structures despite the rms filtering. We proceeded to a clustering of the structures based on the rmsd of the channel (1.0Å for KirBac3.1 W46R), realized with the clustering tool of VMD. 85 cluster were obtained. Each cluster has an average structure. The average structure is compared to all the cluster's structures; then, the closest was chosen as the representative of the group. They were then relaxed during 0.4 ns standard molecular dynamics realized with NAMD using the same force field as before. We considered the last 0.3 ns of the trajectories in which the remaining excitation energy is substantially dissipated, providing a set of 25 415 structures that was used in our analysis.

2.3.7.2.5 Interaction networks

The interaction networks around the residue 46 in KirBac3.1 WT (flipped-in and flipped-out configurations) and the mutant KirBac3.1 W46R were determined using the University of Padova's Ring Web server(44) and Cytoscape(45) Nodes in the network corresponds to residues, and edges to physico-chemical interactions, hydrogen bonds, or Van der Waals interactions. Specific sub-networks are established by Cytoscape which reads the files created by Ring and extracts information relating to the residues of interest and their neighbors and the interactions between them.

2.3.7.2.6 Structural determinants

Accessible Surface Area was computed with a Tcl script in VMD(46). The minimal distance was calculated with the *coordmind* command of CHARMM (32) program. Correlations were calculated with the *cor* module of R (<https://www.R-project.org/>) software using the Pearson coefficient.

Uprising angle of the slide-helices

The uprising angle of a slide-helix covering the residues Thr43 to Asp35 and belonging to a given chain is defined as the angle between its axis and the membrane plane. It measures its proximity to the membrane; the larger the value and closer to the membrane. The uprising angles of the A, B, C, and D chains' slide-helices are denoted *upa*, *upb*, *upc*, and *upd*, respectively.

Tilt angle of the transmembrane helices

The tilt angle of a transmembrane helix is defined as the angle between its axis and the perpendicular to the membrane plane (Z-axis). The inner helix of each chain covers the residues from ALA109 to PHE135 and the outer helix from the residue 46 (in W/R46 or WT) to CYS71. The tilt angles of the inner transmembrane (TM) helices are named *inclia*, *inlib*, *inlic*, *inlid* for the chains A, B, C, and D, respectively, and similarly *incloa*, *inclob*, *incloc*, and *inclo*d concerning the outer TM helices.

Accession codes. The atomic coordinates of the KirBac3.1 W46R structure will be deposited in the Protein Data Bank.

Acknowledgements We acknowledge Ahmed Haouz and the crystallography facility at the Pasteur Institute, synchrotron SOLEIL (St Aubin, France) for provision of synchrotron beamtime and assistance for X-ray data collection; financial supports from SERVIER and ANR CACSICE (CVB); AFM grant (#19928) (SB) and PhD research funding, MRT (CF). This work was performed using HPC resources from the “Mésocentre” computing center of CentraleSupélec and ENS Paris-Saclay supported by CNRS and Région Île-de-France (<http://mesocentre.centralesupelec.fr/>). It was granted access to the HPC resources of IDRIS under the allocation 100512 made by GENCI/IDRIS (DP).

Tableau 7 - Data collection and structure refinement statistics for KiBac3.1 W46R

Data Collection	
Space group	P22 ₁ 2 ₁
Cell dimensions (Å)	106.77, 113.98, 89.18
Cell angles	90.00° 90.00° 90.00°
Resolution (Å)	33.36-2.80
Completeness (%)	99.8
I/σ (I)	1.54 (at 2.81Å)
Refinement with REFMAC 5.8.0258	
R, R free	0.224, 0.275
R free test set	1370 reflections (5%)
Wilson B-Factors (Å ²)	89.3
Total number of atoms	4341
Average B-factors, all atoms (Å ²)	106.0
r.m.s.d.	
Bond lengths (Å)	0.80
Angles	0.90

References

1. ASHCROFT, Frances M. ATP-sensitive K⁺ channels and disease: from molecule to malady. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. octobre 2007. Vol. 293, n° 4, pp. E880-E889. DOI 10.1152/ajpendo.00348.2007.
2. BABENKO, Andrey P., POLAK, Michel, CAVE, Helene, BUSIAH, Kanetee, CZERNICHOW, Paul, SCHARFMANN, Raphael, BRYAN, Joseph, AGUILAR-BRYAN, Lydia, VAXILLAIRE, Martine et FROGUEL, Philippe. Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*. 3 août 2006. Vol. 355, n° 5, pp. 456-466. DOI 10.1056/NEJMoa055068.
3. GLOYN, AL, PEARSON, ER, ANTCLIFF, JF, PROKS, P, BRUINING, GJ, SLINGERLAND, AS, HOWARD, N, SRINIVASAN, S, SILVA, JMCL, MOLNES, J, EDGHILL, EL, FRAYLING, TM, TEMPLE, IK, MACKAY, D, SHIELD, JPH, SUMNIK, Z, VAN RHIJN, A, WALES, JKH, CLARK, P, GORMAN, S, AISENBERG, J, ELLARD, S, NJOLSTAD, PR, ASHCROFT, FM et HATTERSLEY, AT. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *New England Journal of Medicine*. 29 avril 2004. Vol. 350, n° 18, pp. 1838-1849. DOI 10.1056/NEJMoa032922.
4. HATTERSLEY, AT et ASHCROFT, FM. Activating mutations in Kir6.2 and neonatal diabetes - New clinical syndromes, new scientific insights, and new therapy. *Diabetes*. septembre 2005. Vol. 54, n° 9, pp. 2503-2513. DOI 10.2337/diabetes.54.9.2503.

5. PROKS, P, ANTCLIFF, JF, GLOYN, AL, HATTERSLEY, AT et ASHCROFT, FM. Molecular basis of Kir6.2 mutations causing neonatal diabetes and neonatal diabetes with neurological features. *Biophysical Journal*. janvier 2005. Vol. 88, n° 1, 2, S, pp. 181A.
6. AGUILAR-BRYAN, L et BRYAN, J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrine Reviews*. avril 1999. Vol. 20, n° 2, pp. 101-135. DOI 10.1210/er.20.2.101.
7. ANTCLIFF, JF, HAIDER, S, PROKS, P, SANSOM, MSP et ASHCROFT, FM. Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the K-ATP channel Kir6.2 subunit. *EMBO Journal*. 26 janvier 2005. Vol. 24, n° 2, pp. 229-239. DOI 10.1038/sj.emboj.7600487.
8. NICHOLS, CG. K-ATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature*. 23 mars 2006. Vol. 440, n° 7083, pp. 470-476. DOI 10.1038/nature04711.
9. VEDOVATO, Natascia, ASHCROFT, Frances M. et PULJUNG, Michael C. The Nucleotide-Binding Sites of SUR1: A Mechanistic Model. *Biophysical Journal*. 15 décembre 2015. Vol. 109, n° 12, pp. 2452-2460. DOI 10.1016/j.bpj.2015.10.026.
10. ASHCROFT, F. M., ASHCROFT, S. J. et HARRISON, D. E. Properties of single potassium channels modulated by glucose in rat pancreatic beta-cells. *The Journal of Physiology*. juin 1988. Vol. 400, pp. 501-527. DOI 10.1113/jphysiol.1988.sp017134.
11. ASHCROFT, FM. ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHATE-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS. *Annual Review of Neuroscience*. 1988. Vol. 11, pp. 97–118. DOI 10.1146/annurev.ne.11.030188.000525.
12. CLARKE, O.B., CAPUTO, A, HILLS, A.P., VANDENBERG, J.I., SMITH, B.J. et GULBIS, J.M. Domain reorientation and rotation of an intracellular assembly regulate conduction in Kir Potassium Channels. *Cell*. 2010. Vol. 141, pp. 1018-1029.
13. MAENNIKKOE, Roope, STANSFELD, Phillip J., ASHCROFT, Alexandra S., HATTERSLEY, Andrew T., SANSOM, Mark S. P., ELLARD, Sian et ASHCROFT, Frances M. A conserved tryptophan at the membrane-water interface acts as a gatekeeper for Kir6.2/SUR1 channels and causes neonatal diabetes when mutated. *Journal of Physiology - London*. 1 juillet 2011. Vol. 589, n° 13, pp. 3071-3083. DOI 10.1113/jphysiol.2011.209700.
14. FOREST, Eric et MAN, Petr. Conformational Dynamics and Interactions of Membrane Proteins by Hydrogen/Deuterium Mass Spectrometry. In : MUSVETEAU, I (éd.), *Heterologous Expression of Membrane Proteins: Methods and Protocols, 2ND EDITION*. 2016. pp. 269-279. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-3637-3.
15. OGANESYAN, Irina, LENTO, Cristina et WILSON, Derek J. Contemporary hydrogen deuterium exchange mass spectrometry. *Methods*. 15 juillet 2018. Vol. 144, pp. 27-42. DOI 10.1016/j.ymeth.2018.04.023.
16. VADAS, O., JENKINS, M. L., DORNAN, G. L. et BURKE, J. E. Using Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry to Examine Protein-Membrane Interactions. In : GELB, MH (éd.), *Enzymology at the membrane interface: interfacial enzymology and protein-membrane binding*. 2017. pp. 143-172. Methods in Enzymology. ISBN 978-0-12-809695-6.

17. GILADI, Moshe, ALMAGOR, Lior, VAN DIJK, Liat, HILLER, Reuben, MAN, Petr, FOREST, Eric et KHANANSHVILI, Daniel. Asymmetric Preorganization of Inverted Pair Residues in the Sodium-Calcium Exchanger. *Scientific Reports*. 15 février 2016. Vol. 6. DOI 10.1038/srep20753.
18. MEHMOOD, Shahid, DOMENE, Carmen, FOREST, Eric et JAULT, Jean-Michel. Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward- and outward-facing conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 3 juillet 2012. Vol. 109, n° 27, pp. 10832-10836. DOI 10.1073/pnas.1204067109.
19. GUPTA, Sayan, BAVRO, Vassiliy N., D'MELLO, Rhijuta, TUCKER, Stephen J., VÉNIEN-BRYAN, Catherine et CHANCE, Mark R. Conformational changes during the gating of a potassium channel revealed by structural mass spectrometry. *Structure (London, England: 1993)*. 14 juillet 2010. Vol. 18, n° 7, pp. 839-846. DOI 10.1016/j.str.2010.04.012.
20. FAGNEN, charline, BANNWARTH, Ludovic, OUBELLA, Iman, FOREST, Eric, DE ZORZI, Rita, DE ARAUJO, Aline, MHOUMADI, Yasmina, BENDAHHOU, Saïd, PERAHIA, David et VÉNIEN-BRYAN, Catherine. New Structural and functional insights into Kir channel gating from molecular simulations, HDX-MS and functional studies. *submitted*. 2020.
21. ASHCROFT, F. M. *Ion channels and diseases*. New-York : Academic press, 2000.
22. DING, Dian, WANG, Mengmeng, WU, Jing-Xiang, KANG, Yunlu et CHEN, Lei. The Structural Basis for the Binding of Repaglinide to the Pancreatic K-ATP Channel. *CELL REPORTS*. 7 mai 2019. Vol. 27, n° 6, pp. 1848+. DOI 10.1016/j.celrep.2019.04.050.
23. SHIMOMURA, K., HOERSTER, F., DE WET, H., FLANAGAN, S. E., ELLARD, S., HATTERSLEY, A. T., WOLF, N. I., ASHCROFT, F. et EBINGER, F. A novel mutation causing DEND syndrome - A treatable channelopathy of pancreas and brain. *Neurobiology*. 25 septembre 2007. Vol. 69, n° 13, pp. 1342-1349. DOI 10.1212/01.wnl.0000268488.51776.53.
24. TARASOV, A. I., GIRARD, C. A., LARKIN, B., TAMMARO, P., FLANAGAN, S. E., ELLARD, S. et ASHCROFT, F. M. Functional analysis of two Kir6.2 (KCNJ11) mutations, K170T and E322K, causing neonatal diabetes. *Diabetes Obesity & Metabolism*. novembre 2007. Vol. 9, n° 2, pp. 46-55. DOI 10.1111/j.1463-1326.2007.00777.x.
25. DRAIN, P, GENG, XH et LI, LH. Concerted gating mechanism underlying K-ATP channel inhibition by ATP. *Biophysical Journal*. avril 2004. Vol. 86, n° 4, pp. 2101-2112. DOI 10.1016/S0006-3495(04)74269-1.
26. DE ZORZI, Rita, NICHOLSON, William V., GUIGNER, Jean-Michel, ERNE-BRAND, Françoise et VÉNIEN-BRYAN, Catherine. Growth of large and highly ordered 2D crystals of a K⁺ channel, structural role of lipidic environment. *Biophysical Journal*. 16 juillet 2013. Vol. 105, n° 2, pp. 398-408. DOI 10.1016/j.bpj.2013.05.054.
27. MCCOY, Airlie J., GROSSE-KUNSTLEVE, Ralf W., ADAMS, Paul D., WINN, Martyn D., STORONI, Laurent C. et READ, Randy J. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*. août 2007. Vol. 40, n° 4, pp. 658-674. DOI 10.1107/S0021889807021206.

28. EMSLEY, P. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*. 2004. Vol. 60, pp. 2126-2132. DOI 10.1107/s0907444904019158jissn. WOS:000225360500002
29. BLANC, E, ROVERSI, P, VONRHEIN, C, FLENSBURG, C, LEA, SM et BRICOGNE, G. Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallographica Section D- Structural Biology*. décembre 2004. Vol. 60, n° 12, 1, pp. 2210-2221. DOI 10.1107/S0907444904016427.
30. ZHANG, ZQ et MARSHALL, AG. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. mars 1998. Vol. 9, n° 3, pp. 225-233. DOI 10.1016/S1044-0305(97)00284-5.
31. CHEN, Vincent B., ARENDALL, W. Bryan, III, HEADD, Jeffrey J., KEEDY, Daniel A., IMMORMINO, Robert M., KAPRAL, Gary J., MURRAY, Laura W., RICHARDSON, Jane S. et RICHARDSON, David C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D - Structural Biology*. janvier 2010. Vol. 66, n° 1, pp. 12-21. DOI 10.1107/S0907444909042073.
32. BROOKS, BR, BRUCCOLERI, RE, OLAFSON, BD, STATES, DJ, SWAMINATHAN, S et KARPLUS, M. CHARMM - A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *Journal of Computational Chemistry*. 1983. Vol. 4, n° 2, pp. 187-217. DOI 10.1002/jcc.540040211.
33. KRISSINEL, Evgeny et HENRICK, Kim. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*. 21 septembre 2007. Vol. 372, n° 3, pp. 774-797. DOI 10.1016/j.jmb.2007.05.022.
34. PETERSEN, EF, GODDARD, TD, HUANG, CC, COUCH, GS, GREENBLATT, DM, MENG, EC et FERRIN, TE. UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. octobre 2004. Vol. 25, n° 13, pp. 1605-1612. DOI 10.1002/jcc.20084.
35. OLSSON, Mats H. M., SONDERGAARD, Chresten R., ROSTKOWSKI, Michal et JENSEN, Jan H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pK(a) Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*. février 2011. Vol. 7, n° 2, pp. 525-537. DOI 10.1021/ct100578z.
36. SONDERGAARD, Chresten R., OLSSON, Mats H. M., ROSTKOWSKI, Michal et JENSEN, Jan H. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pK(a) Values. *Journal of Chemical Theory of Chemical Theory and Computation*. juillet 2011. Vol. 7, n° 7, pp. 2284-2295. DOI 10.1021/ct200133y.
37. JORGENSEN, WL, CHANDRASEKHAR, J, MADURA, JD, IMPEY, RW et KLEIN, ML. Comparison of simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *Journal of Chemical Physics*. 1983. Vol. 79, n° 2, pp. 926-935. DOI 10.1063/1.445869.
38. JO, Sunhwan, KIM, Taehoon, IYER, Vidyashankara G. et IM, Wonpil. Software news and updates - CHARNIM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*. août 2008. Vol. 29, n° 11, pp. 1859-1865. DOI 10.1002/jcc.20945.

39. LEE, Jumin, CHENG, Xi, SWAILS, Jason M., YEOM, Min Sun, EASTMAN, Peter K., LEMKUL, Justin A., WEI, Shuai, BUCKNER, Joshua, JEONG, Jong Cheol, QI, Yifei, JO, Sunhwan, PANDE, Vijay S., CASE, David A., BROOKS, Charles L., III, MACKERELL, Alexander D., Jr., KLAUDA, Jeffery B. et IM, Wonpil. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*. janvier 2016. Vol. 12, n° 1, pp. 405-413. DOI 10.1021/acs.jctc.5b00935.
40. HUANG, Jing et MACKERELL, Alexander D., Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*. 30 septembre 2013. Vol. 34, n° 25, pp. 2135-2145. DOI 10.1002/jcc.23354.
41. LOMIZE, Mikhail A., POGOZHEVA, Irina D., JOO, Hyeon, MOSBERG, Henry I. et LOMIZE, Andrei L. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Research*. janvier 2012. Vol. 40, n° D1, pp. D370-D376. DOI 10.1093/nar/gkr703.
42. MOUAWAD, L et PERAHIA, D. Diagonalization in a mixed basis: A method to compute low-frequency normal modes for large macromolecules. *Biopolymers*. avril 1993. Vol. 33, n° 4, pp. 599-611. DOI 10.1002/bip.360330409.
43. COSTA, Mauricio G. S., BATISTA, Paulo R., BISCH, Paulo M. et PERAHIA, David. Exploring Free Energy Landscapes of Large Conformational Changes: Molecular Dynamics with Excited Normal Modes. *Journal of Chemical Theory and Computation*. juin 2015. Vol. 11, n° 6, pp. 2755-2767. DOI 10.1021/acs.jctc.5b00003.
44. PIOVESAN, Damiano, MINERVINI, Giovanni et TOSATTO, Silvio C. E. The RING 2.0 web server for high quality residue interaction networks. *Nucleic Acids Research*. 8 juillet 2016. Vol. 44, n° W1, pp. W367-W374. DOI 10.1093/nar/gkw315.
45. SHANNON, P, MARKIEL, A, OZIER, O, BALIGA, NS, WANG, JT, RAMAGE, D, AMIN, N, SCHWIKOWSKI, B et IDEKER, T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*. novembre 2003. Vol. 13, n° 11, pp. 2498-2504. DOI 10.1101/gr.1239303.
46. HUMPHREY, W, DALKE, A et SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*. février 1996. Vol. 14, n° 1, pp. 33-38. DOI 10.1016/0263-7855(96)00018-5.

A highly conserved tryptophan at the membrane-water interface of Kir channel is involved in the gating mechanism

Charline Fagnen^{1,2}, Ludovic Bannwarth², Iman Oubella², Eric Forest³, Saïd Bendahhou⁴, Rita De Zorzi⁵, David Perahia² and Catherine Vénien-Bryan¹

¹Sorbonne Université, UMR 7590, CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Institut de Minéralogie, Physique des Matériaux et Cosmochimie, IMPMC, 75005 Paris, France.

²Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée, Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay, Centre National de la Recherche Scientifique, Cachan, France.

³University Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France, CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France, CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France.

⁴Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Trieste, Via Licio Giorgeri 1, 34127, Trieste, Italy ⁵CNRS UMR7370, LP2M, University Nice Sophia-Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France.

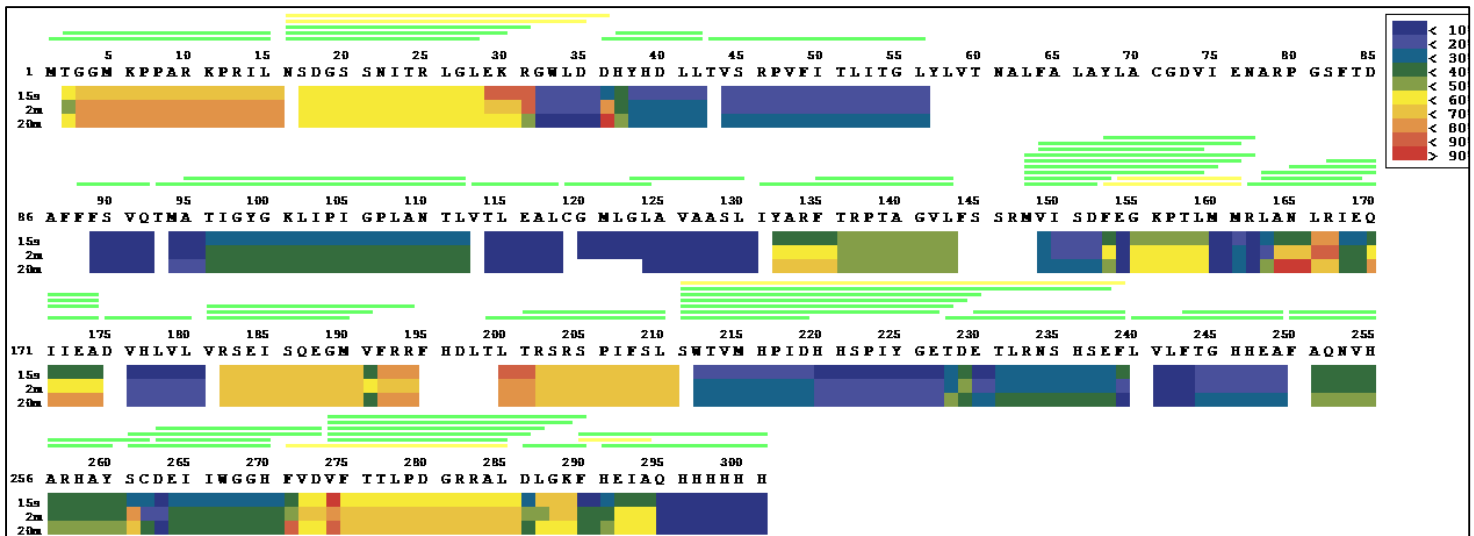


Figure 43 - Heat Map of the KirBac3.1 W46R mutant. Deuteration maps of KirBac3.1 peptides at different times up to 20 minutes deuteration. The color key indicates the HDX level.

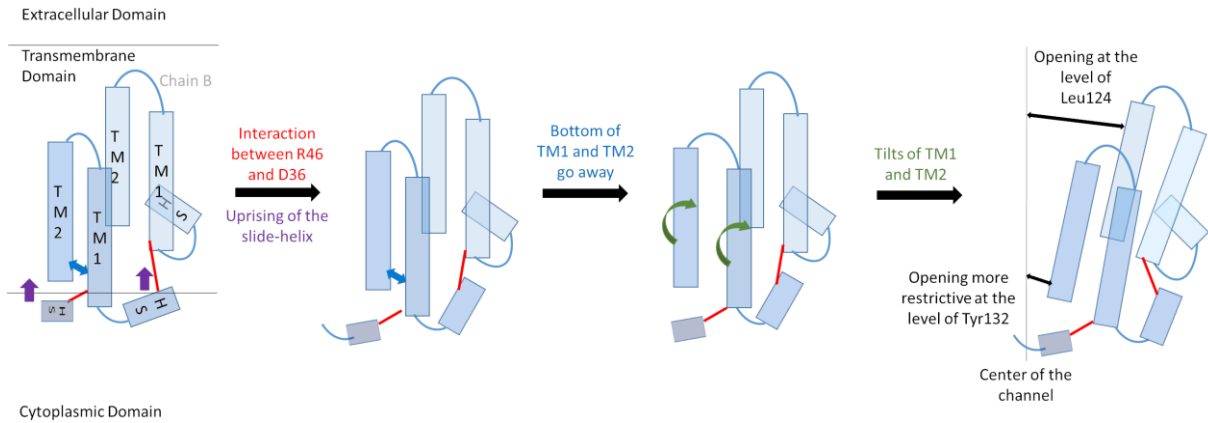


Figure 44 - Overview of the effect of the mutation on the channel gating.

2.4 Chapitre 4 : Impact de la mutation S129R sur mécanisme d'ouverture/fermeture du canal bactérien KirBac3.1

Ce chapitre est centré sur les conséquences de l'impact de la mutation S129R sur le mécanisme d'ouverture/fermeture du canal bactérien KirBac3.1. Cette mutation nous a semblé intéressante car ce mutant a été conçu pour stabiliser la conformation ouverte de KirBac3.1: la structure cristalline(224) (3ZRS) montre bien une forme ouverte. Les résultats présentés dans ce chapitre répondent au troisième objectif de la thèse.

Des simulations de MDeNM ont été lancées sur KirBac3.1 S129R afin d'étudier ses différentes conformations. Ces dernières sont comparées à celles obtenues pour le KirBac3.1 WT (réalisé dans le chapitre 2). Les réseaux d'interactions des deux protéines ont été investigués pour évaluer leurs différences.

Parallèlement, des études expérimentales ont été menées. Il s'agit d'étude expérimentale concernant la flexibilité de la protéine par l'intermédiaire de la méthode HDX-MS, elle a été réalisée par Iman Oubella sous la direction du Pr. Vénien-Bryan et du Dr. Forest.

Il a été souligné dans les résultats concernant le KirBac3.1 que ce canal disposait de deux points de constriction qui permettait ou non le passage des ions K^+ . Le résidu S/R129 est localisé juste au-dessus du point de constriction le plus restrictif : Tyr132. Cette analyse permet de comprendre l'influence du résidu muté S129R sur ce point de constriction et par de voie de conséquence son effet sur le mécanisme d'ouverture/fermeture du canal.

L'étude des mouvements des chaînes latérales des résidus S/R129 et Tyr132 ont été examinés avec attention pour jauger l'influence de S/R129 sur le comportement de ce point de constriction.

L'évaluation de l'ouverture au niveau des points de constriction du KirBac3.1 WT : Leu124 et Tyr132 ainsi qu'au niveau de la modélisation : S/R129 a été réalisée en s'appuyant sur les données issues de MDeNM chez le KirBac3.1 WT (réalisées dans le chapitre 2) et pour le KirBac3.1 S129R. Les changements conformationnels entre les deux ensembles de structures permettront d'identifier les différents changements conformationnels ayant eu lieu en raison de

la présence de la mutation. Deux zones ayant subi un changement de conformations ont été identifiées, il s'agit du domaine cytoplasmique ainsi que des hélices externes. Ces résultats ont été comparés aux résultats expérimentaux provenant de l'HDX-MS, les résultats provenant de la MDeNM sont en accord avec les résultats expérimentaux. La MDeNM permet de visualiser les différents états du canal. La comparaison des tendances d'ouverture au niveau des trois points (Leu124, Tyr132 et S/R129) permet d'évaluer l'impact de la mutation sur l'ouverture du canal.

Dynamical and structural studies of a Kir channel in an engineered open state KirBac3.1 S129R by MDeNM simulations and HDX-MS experiments

Charline Fagnen^{1,2}, Ludovic Bannwarth¹, Iman Oubella¹, Rita de Zorzi⁴, Eric Forest³, David Perahia² and Catherine Vénien-Bryan¹

¹Sorbonne Université, UMR 7590, CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Institut de Minéralogie, Physique des Matériaux et Cosmochimie, IMPMC, 75005 Paris, France.

²Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée, Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay, Centre National de la Recherche Scientifique, Cachan, France.

³University Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France, CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France, CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France.

⁴Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Trieste, Via Licio Giorgeri 1, 34127, Trieste, Italy

To whom correspondence is addressed: catherine.venien-bryan@upmc.fr

2.4.1 Abstract

In this study, we have investigated the dynamics and functional characteristics of the KirBac3.1 S129R mutant. In this mutant channel, the inner pore-lining helix (TM2) has been engineered so the bundle crossing is trapped in an open conformation. The structure of this channel was previously determined to 3.05 Å(272). We explored dynamical characteristics of this open state channel using the *in silico* method, MDeNM. Besides this, we investigated the gating for this channel (closure of the channel). We capture global and local motions at the level of the mutant and compare these data with HDX-MS experiments. In the S129R mutant, the mutation Arg129 releases the two points of constriction in the channel but interestingly this mutated amino acid creates another point of restriction, which is discussed.

2.4.2 Introduction

Most of the published structures of the Kir channel are in the closed state, the most stable state. In order to gain structural information on the open state, the KirBac3.1 S129R channel was engineered(2) so the channel is trapped in an open conformation. This channel is functionally open (3) . The first high-resolution structure of a KirBac channel with the bundle-crossing gate in an open conformation was determined at 3.5Å (pdb 3ZRS). Visualization of this structure and comparison to KirBac3.1 in the closed state revealed major structural changes. In the closed state structure of KirBac3.1 channel, there is a tight constriction of the pore at Tyr132 in TM2, which occludes the conductive pathway and acts as the gate at this position. However, in the S129R mutant, the Arg has trapped the bundle crossing in an apparently open conformation. By comparing the open and closed state crystallographic structures, some features of the open state were noticed. First, the KirBac3.1 WT has two points of constriction: Leu124 and Tyr132 that are not more restrictive in the opening of the channel in KirBac3.1 S129R (**Fig. 45A-D**). Second, the motions relative to the inner helix (TM2), two motions are observed: its bending at the level of the residue Gly120 about 20° (**Fig. 45E**) and the rotation on the inner helix on itself (25°) (**Fig. 45E**). These two motions are important because they are opening the channel at the level of the bundle crossing, pushing the constriction points Leu124 and Tyr132 towards the outside of the channel. Third, a rotation of the cytoplasmic domain is observed between the closed (2WLJ) and open (3ZRS) states about 30°(**Fig. 45F**).

2.4.3 Results and discussion

2.4.3.1 Theoretical data

2.4.3.1.1 Points of constrictions at the bottom of the channel in the KirBac3.1 WT and the mutant S129R

The region between the residues 121 and 133 defines the channel, in this region; the constriction points for the WT are at the level of Leu124 and Tyr132. In order to have a dynamical view of all the structures, we measured the minimal distances between opposite chain of residue Tyr132 (one of the constriction point) and residue S/R129 and for all the relaxed structures from MDeNM . This was done on the WT and the S129R mutant. **Figure 46A** describes the statistics for the minimal distance between residues 129 of opposite chains. The average minimal distance at the level of residue Ser129 in KirBac3.1 WT is 9.53Å (SD=0.47Å) (**Fig. 46A** red) and the minimal distance at the level of residue Arg129 is

surprisingly lower: 4.46\AA ($SD=1.28\text{\AA}$) (**Fig. 46A** blue) for the S129R mutant. There is a clear decrease of the channel diameter at the level of the mutation. Interestingly, the mutation at the level of the residue 129 introduces another constriction point in the channel, which does not allow the K^+ to go through the channel: **Fig. 46A** shows some distances situated in the grey zone which is indicative of the close state.

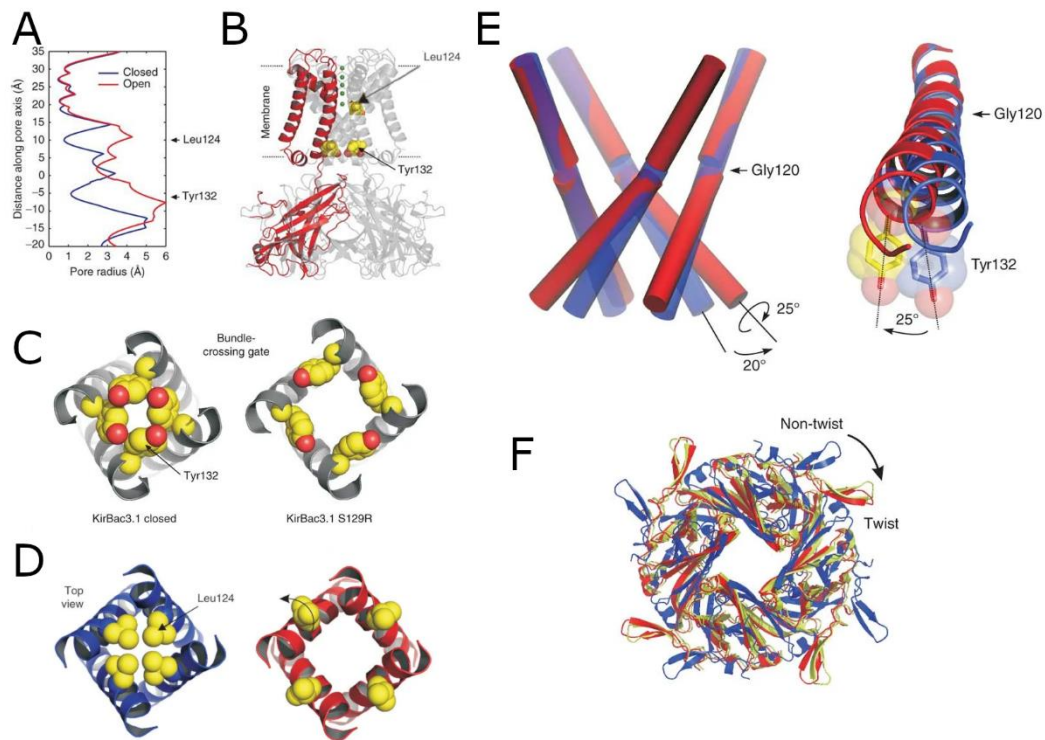


Figure 45 - Comparison of crystallographic structures between closed (2WLJ) and open (3ZRS) states (Figures from Bavro et al(2)). A) Pore-radius profile of the closed (2WLJ) and open (3ZRS) states. B) Location of the constriction points Leu124 and Tyr132 (in yellow). C) Top view of the closed (left) and open (right) states describing the Tyr132 conformation. D) Top view of the closed (left) and open (right) states describing the Leu124 conformation. E) Comparison of the bending (left) and the rotation (right) of the inner helices for closed (blue) and open (red) states. F) Observation of the rotation of the cytoplasmic domain between the closed (blue - non-twisted) and the open (red - twisted) states

Tyr132 has been described as a point of constriction in the KirBac3.1 WT (**Fig. 46B** in red). This is confirmed by our measures with an average minimal distance of 3.72\AA ($SD=0.87\text{\AA}$). In the case of the mutant S129R, there is an increase of the minimal distance: 5.75\AA

(SD 0.87Å), with a release of this point of constriction. Leu124 restriction point in the WT is in an open conformation in the S129R mutant. (**Tableau 8**).

2.4.3.1.2 π -Interaction between the side chain of Arg129 and the aromatic ring of Tyr132

We investigated the interaction of the mutation S129R from serine to arginine on the residue Tyr132, the most restrictive constriction point of the channel, on all the relaxed structures from MDeNM. In the closed state, the residue 132 is pointing towards the center of the channel and obstructs the passage of the K^+ **Fig. 46C** in red. In the S129R mutant, Tyr132 is pushed away from the center of the channel (**Fig. 46D** in dark blue) and interestingly, the side chain of the Arg (which replaces the Ser at position 129) is either pointing toward the center of the channel, and therefore block the passage of K^+ (**Fig. 46F**) or interacts with the aromatic ring of Tyr132 **Fig. 46D** in cyan. Closed observation of the relaxed structures from MDeNM show π -interactions between the aromatic ring of Tyr132 and the side chain of Arg129 belonging to the neighboring chain. Details on **Fig. 46E**.

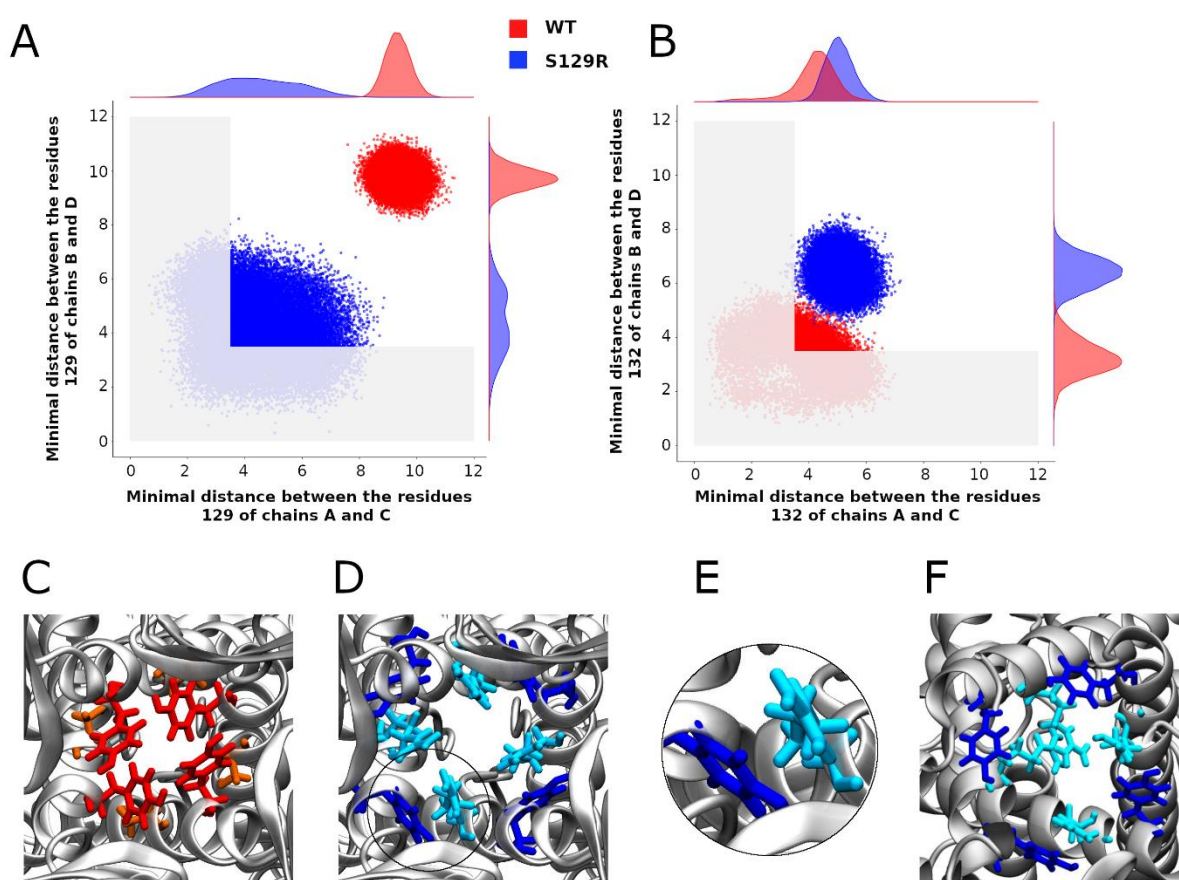


Figure 46 – Gating at the mutation S129R and at the constriction point Tyr132. A) Scatter plots of the minimal distances between the chains B and D and between A and C at the level of the residue 129. B) Scatter plots of the minimal distances between the chains B and D and between A and C at the level of the residue Tyr132. A-B) Red and blue points correspond to the KirBac3.1 WT and KirBac3.1 S129R, respectively. The gray area delimits the region where the channel is closed. C-E: representation of the equilibrated structures C) Locations of the residues Tyr132 (red) and Ser129 (orange) in KirBac3.1 WT. D) Locations of the residues Tyr132 (dark blue) and Arg129 (cyan) in KirBac3.1 S129R. E) Zoom on the π -interaction between Tyr132 and Arg129 in KirBac3.1 S129R. F) Locations of the residues Tyr132 (dark blue) and Arg129 (cyan) in KirBac3.1 S129R when the Arg129 is oriented toward the center of the channel.

2.4.3.1.3 State of gating at the level of the various constriction points

They are two main constriction points in KirBac3.1 WT (Leu124 and Tyr132) which lead to consider four channel gating states. 1) Fully open state, where the distances at the level of the two constriction points are greater than the ionic diameter of K⁺; 2) Fully closed state where both distances are less than the ionic diameter of K⁺; 3) Half open 1 state where gating at Leu124 is open and gating at Tyr132 is closed; 4) Half open 2 state where gating Tyr132 is open and gating Leu124 is closed. Taking into account the previous results showing that the side chain of the mutant Arg129 is pointing towards the center of the channel, we added a fifth state: channel closed at the level of Arg129. In order to have significant information on the populations of these states, 34 086 equilibrated structures issued from MDeNM simulations were analyzed for KirBac3.1 WT and 29 600 for KirBac3.1 S129R. The populations of the different states of WT and mutant are shown in **Table 8** indicating that the fully open state in KirBac3.1 WT is only populated of about 7%, such a low value being in conformity with the population obtained by the previous electrophysiological experiments (4). The S19R mutant is mainly open (53%)

We are describing a situation where the mutant Arg at the position 129 keeps the two restriction points Leu124 and Tyr132 always open. Interestingly, the Arg can adopt two conformations: one with the side chains interacting with the Tyr132 and the other one with the side chain pointing towards the center of the channel and obstructing the channel. Therefore, the closed state of the S129R mutant exists but depends only on the conformation of the Arg.

Ironically, the mutated residue, which have been introduced in the protein for forcing the channel to open is causing itself some obstruction of the passage of the K⁺.

Tableau 8 - States of the channels of KirBac3.1 and KirBac3.1 S129R.

Opening Types	KirBac3.1 WT	KirBac3.1 S129R
Fully open	6.8	52.8
Fully closed	50.2	0.0
Gating 124 open, Gating 132 closed	28.8	0.0
Gating 132 open, Gating 124 closed	14.2	0.0
Gating 129 closed	0.0	47.2
Total	100	100

2.4.3.1.4 Structural modifications between the closed (KirBac3.1 WT) and open states (KirBac3.1 S19R)

Kink of the outer helix TM1

In order to determine to what an extent the kink of the outer helices TM1 is involved in the opening of the channel, the values of the kink angle of the outer helices were computed. We compared the value of the kink for KirBac3.1 WT and S129R. (**Fig. 47**).

We have calculated the kink of the outer helix on all the relaxed structures. The average values of the kink of TM1 for the chains A, B, C and D of KirBac3.1 WT are respectively of 8.39° (SD=3.09°) , 6.51° (SD=3.12°) , 7.04° (SD =2.70°) and 4.97° (SD=2.39°) while the average values for KirBac3.1 S129R are 11.70° (SD = 3.03°), 13.33° (SD =3.18°) , 8.59° (SD=2.66°) and 13.308° (SD=3.18°). As a knock on effect of the bending of the TM2, the mutation S129R triggers a larger kink of the outer helix (TM1) (**Fig. 47**).

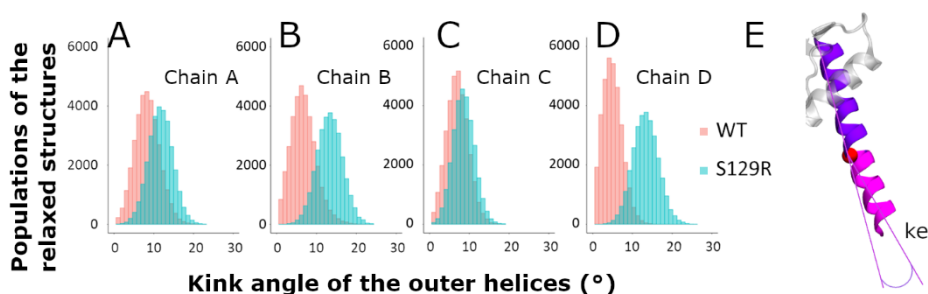


Figure 47 - Kink of the outer helices. Histograms of the values of the kink of the external helices during the relaxed simulations of molecular dynamics after MDeNM. The structures

populations of KirBac3.1 WT are represented in red and the structures of KirBac3.1 S129R in blue. A) Kink of the outer helix of the chain A. B) Kink of the outer helix of the chain B. C) Kink of the outer helix of the chain C. D) Kink of the outer helix of the chain D. E) Representation of the outer kink angle (θ).

Rotation of the cytoplasmic domain

Crystallographic structure of the mutant S129R shows a 30° rotation of the cytoplasmic between the KirBac3.1 WT (closed state) and KirBac3.1 S129R (open state) (1). We computed the values of this rotation for the KirBac3.1 WT and KirBac3.1 S129R to study the behaviour of the cytoplasmic domain in presence of the mutation. The average values of the cytoplasmic domain rotation are 97.95° (SD = 5.13°) and 131.78° (SD= 5.41°) for KirBac3.1 WT and KirBac3.1 S129R, respectively **Fig. 48**. An average difference of 33° is observed between the two systems that corresponds to the structural analysis (1). Structures obtained by MDeNM look very stable with very small variations.

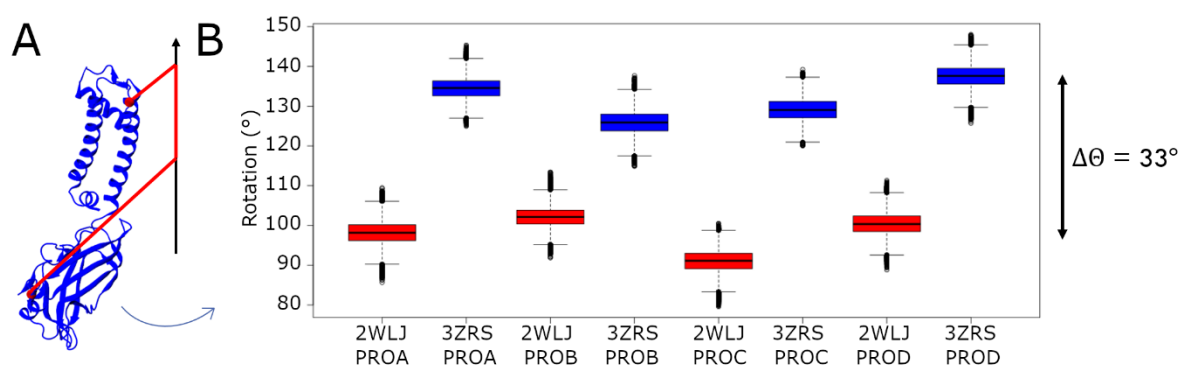


Figure 48 - Rotation of the cytoplasmic domain. A) Representation of the cytoplasmic domain rotation. B) Boxplots of the values of rotation of the cytoplasmic domain for each chain, in red for KirBac3.1 WT and in blue for KirBac3.1 S129R.

In order to study the effect of the mutation S129R on the interaction between these domains, we measured two distances i) one between the residues His35 on the slide helix and Arg167 (CD-loop on the CTD) ii) the other between the Pro138 (the linker between the transmembrane and the cytoplasmic domain) and Phe250 (G-loop on the CTD). G loop has been described as being mobile during the gating. The location of residues are **Fig. 49C**.

Structures issued from dynamics highlight differences between WT and the S129R mutant. **Figure 49A** shows that the interaction between residue Pro138 and Phe250 (chain B)

is stronger in the case of the S129R mutant compared with the WT. The distance between the amino acids are from 1.91 Å to 5.06 Å in the case of the S129R mutant in blue and from 1.82Å to 7.70Å in the case of KirBac3.1 WT (in red) mostly closed (93.2% of the structures). **Figure 49B** shows the same comparison but for another chain D: the distance between the residue His35 Chain C and Phe167 Chain D is also stronger in the case of S129R it does not exceed 2.34 Å while the range of values concerning then WT extends over 9.58 Å

The S129R mutant shows a stronger interaction and greater stability between the cytoplasmic domain (G loop and C loop) and the membrane interface.

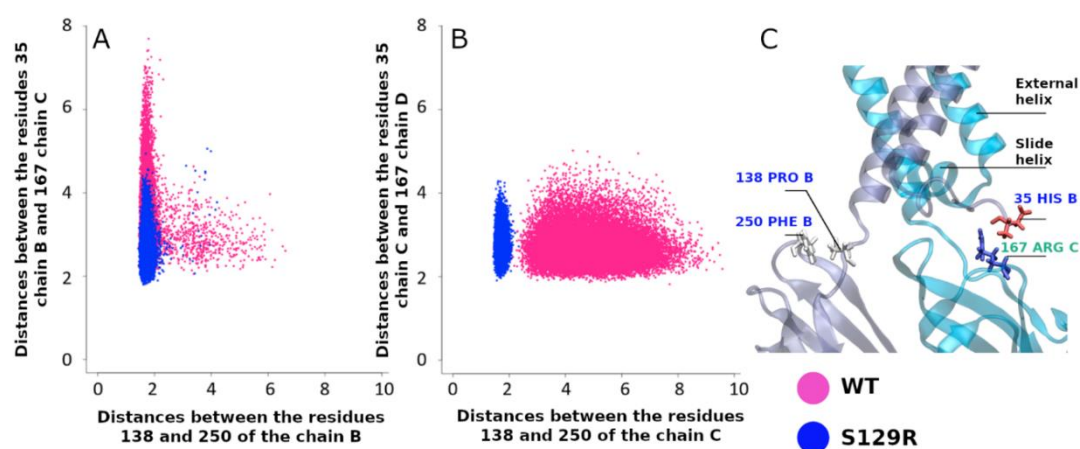


Figure 49 - Interaction between the cytoplasmic and the membrane interface. Pink points are for KirBac3.1 WT, blue points for the S129R mutant. A) Minimal distance between the slide-helix (residue Asp35 Chain B) and the CD-loop (residue Arg167 Chain C) versus the minimal distance between the linker (residue Pro138 Chain B) and the G-Loop (residue Phe250 Chain B). B) Minimal distance between the slide-helix (residue Asp35 Chain C) and the CD-loop (residue Arg167 Chain D) versus the distances between the linker (residue Pro138 Chain C) and the G-Loop (residue Phe250 Chain C). C) Location of the interactions.

2.4.3.2 Experimental data

2.4.3.2.1 Hydrogen/Deuterium exchange approach coupled to mass spectrometry (HDX-MS)

We used the same method as described in the previous manuscript for the WT and W46R.

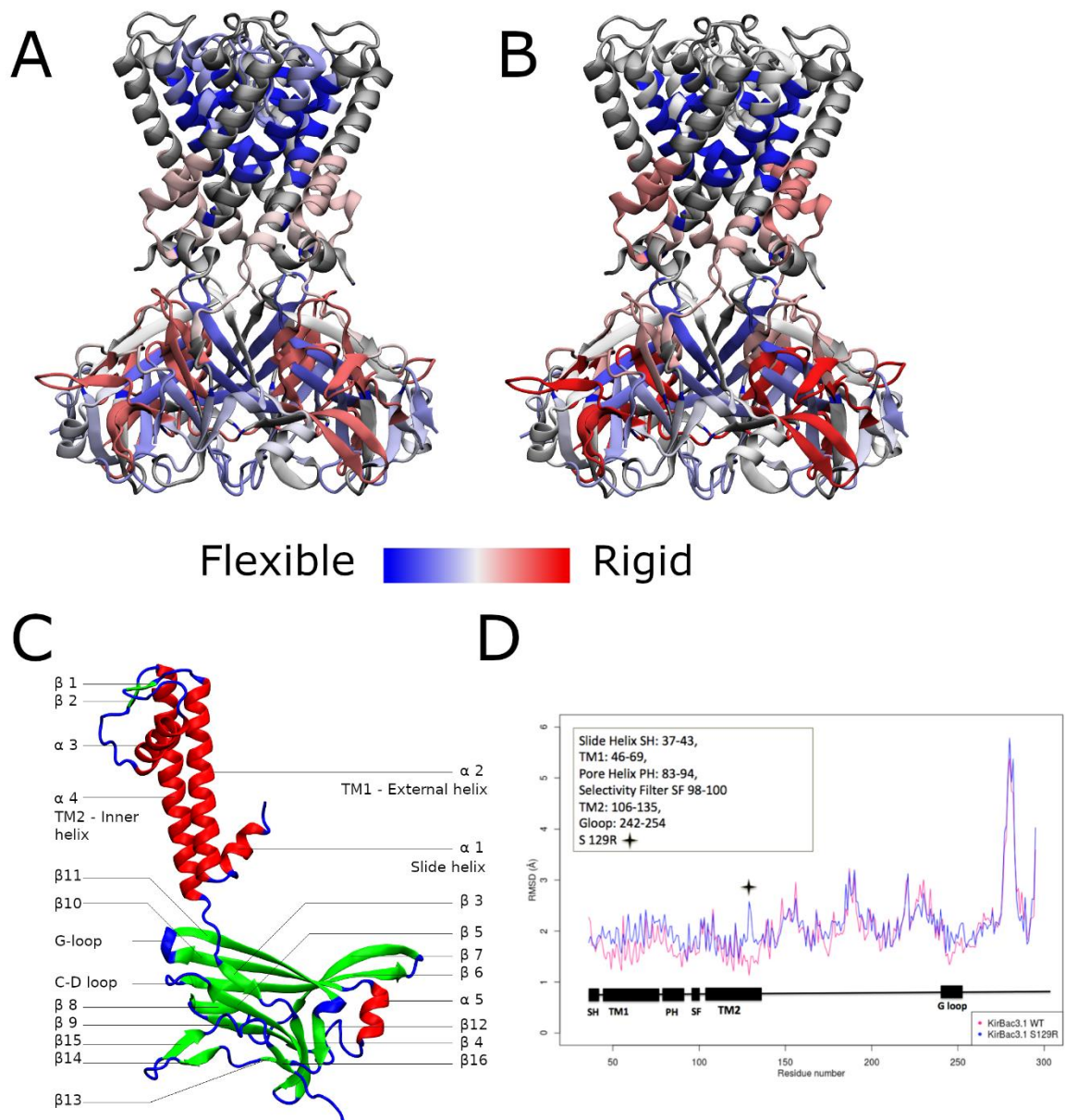


Figure 50 – HDX-MS. A-B) The gradient of color from blue to red corresponds to regions from rigid to flexible, respectively. Grey area represent areas without data. A) Projection of the HDX-MS results of KirBac3.1 WT. B) Projection of the HDX-MS results for the mutant S129R. C) Nomenclature. D) RMSD of KirBac3.1 WT (red) and KirBac3.1 S129R (blue)

We present below a comparison between the close and the open state.

2.4.3.2.2 Structural flexibility in the transmembrane during the gating

The largest change in percentage of deuteration from the close to the open state is seen for peptides Thr93-Leu112 (35% compared with 21%) this feature was described in (5). This includes the M94. This residue is located towards the base of the pore-loop helix and packs closely with the Gly120 in TM2. In the open state, the inner helix is less flexible than in the close state. At the level of the TM1, there is an increase in deuteration, particularly at the bottom of the external helix 53.7% compared with 45.2%.

2.4.3.2.3 Cytoplasmic domain

These domains do not remain static during the gating and conformational changes must occur as the channel opens and closes. For both closed and open state, the highest flexibility are found at the level of the external loop (**Fig. 45**). The KirBac3.1 cytoplasmic domain consists of two major β -sheets, one (which we refer to β I, includes the large β F, β J and β K) that is tilted about 45° relative to the membrane plane, and a second (β II, includes the shorter β C, β E and β I) that is approximately parallel with the pore axis as described in (6). Our flexibility measurement shows for both closed and open state that the major BI sheet is more rigid than the other major BII sheet. The inside of the cytoplasmic domain is more rigid than the outside with highest values of flexibility for the open state.

On the contrary the G-loop, located next to the CD loop is less flexible in the open state (9% compared with 12% in the close state) This result is agreement with the theoretical studies above paragraph: Interactions between the cytoplasmic domain (G loop and C loop) and the membrane interface (slide helix and linker). G-loop has been described as a gate which required to be in an open conformation to permit the flow of K^+ ions (7–10). The five amino acids, 162 to 174 of the CD-loop is also more rigid in the open state compared with the closed state (49% compared with 58%). The decrease in deuteration in these two loops show that there are involved in a network of interaction with neighboring amino acids therefore less flexible, this was also found in (5).

To further assess the flexibility of these two conformations in the 3D structure, molecular dynamics simulations of about 30 ns were performed on the two structures 2WLJ and 3ZRS. After reaching a plateau for the rmsd of the $C\alpha$ for each conformation, the fluctuation of the position of the $C\alpha$ atoms were calculated for the last three-quarters of the trajectories, and the results are shown in **Fig. 50D**. Slightly minor fluctuation was observed in

the closed conformation particularly in the transmembrane region. For both structures, the lowest fluctuations (below 2.8Å) are in the transmembrane region, open state shows slightly higher fluctuations particularly in the region of the TM1, pore helix and bottom of the TM2 with a high value at the position of the mutation S129R. The CD shows higher fluctuation particularly the external loop which reaches 5.8 Å and 5.2 Å respectively for the open and closed state. This is in agreement with the HDX-MS data for which the highest flexibility is in this region.

2.4.3.3 Conclusion

The mutation on the Arg 129 on the channel shows a larger opening probability of the S129R mutant 52.8 % compared with 6.8% in the WT. The presence of the mutation Arg triggers the release of the two points of constriction but at the same time this Arg can block the passage of the K⁺ through the channel. Indeed the Arg can adopt two conformations: the side chain can point toward the center of the channel or interact in a π -interaction with Tyr132. This explains why the opening probability is 52.8% and not 100%. TM1 the external helices are showing a more pronounced kink in the case of the mutant S129R in agreement with our HDX-MS. Moreover, the contacts between the Pro138 and PHE250 (G-loop), then the inter-chain contact between the His35 (slide-helix) and Arg167 (CD-loop) are stabilized

2.4.3.4 Materials and Methods

2.4.3.4.1 Molecular Modelling.

KirBac3.1 was modelled in two different states: the wild-type closed from the PDB structure 2WLJ(11) (2,60Å) and S129R mutant open from the PDB structure 3ZRS(1) (3,05Å).

2.4.3.4.2 Normal Modes.

The structures were minimized using the steepest descent (SD) and conjugate-gradient (CG) methods followed by Adopted Basis Newton Raphson (ABNR) algorithm. Harmonic restraints were applied during SD step that were progressively decreased. Then the system had been minimized without restraints by carrying out 50000 steps of CG and then applied the ABNR algorithm using a convergence criterion of 10^{-5} Kcal mol⁻¹ Å⁻² RMS energy gradient. The 203 first lowest frequency ranged in ascending order of frequencies with all the atoms taken into account were computed using a CHARMM module : the iterative DIMB method(12).

To proceed with the MDeNM calculations, it was necessary to select the modes contributing the most to the gating. For this the conformational structural changes of the channel were analyzed to select the modes of interest. All along this study, the channel is defined from residues 121 to 133. Root-Mean-Square Deviation (RMSD) compared to minimized structure had been calculated for all the modes for the residues of the channel. Higher RMSD values were associated to higher mobility at this level of the channel, and were used as a clue to reveal the modes contributing the most to opening of the channel. The modes contributing to the 15 % highest RMSD values were individually analyzed and visualized to confirm the opening motion. This protocol allowed us to select 11 modes (66, 74, 80, 114, 123, 135, 148, 169, 182, 192, 197) for the WT KirBac3.1 and 4 modes (128, 161, 169, 185) for the S129R.

2.4.3.4.3 Molecular Dynamics using Excited Normal Modes.

Simulations were launched by following the Molecular Dynamics using excited Normal Modes method (13) that permits to share the advantages of the molecular dynamics (vibrational motions) and of the normal modes (global motions). This method was chosen to have access to a larger conformational space so a large range of different structures at lower cost of calculation.

The first step of the MDeNM is to select the normal modes of interest that is to say the modes describing the researched motion or the most involved modes in the studied protein area. One combination of these selected normal modes are realized giving a structure named replica. The user chooses this number. In order to obtain very different replica, a RMS filtering is put in place to evaluate the structure compared to the previous replica, if it is too close from each other they are erased and a new combination is tested giving a new replica following the same evaluation process. It is to the user to define the RMS cut-off that determines the level below the structures are denied. In the case studied here, the RMS is calculated on the residues of the channel only: residues Met121 to Ala133. The second step consists in the excitation of the structures obtained by the injection of kinetic energy in the system by an increase of the temperature. The user has to determinate the elevation of temperature called the excitation temperature, the number of excitations as well as the time between each excitation (called relaxation time) to avoid excessive structural change (break of secondary structures) or in the opposite way structures showing not enough changes compared to the equilibrated structure. Our investigation carries on the gating mechanism of the channel so the normal modes describing an opening/closing of the channel have been selected.

2.4.3.4.4 Clustering of the excited (MDeNM) structures.

MDeNM give hundreds of structures, it is not possible to run an enough long molecular dynamic simulations for all. A clustering of the excited structures had been realized to choose the best representatives. To do it, the Clustering tool of VMD (14) had been used to determinate clusters. It has been asked to the software to find at least 100 different clusters away from other greater than the RMS cut-off clustering. Some structures did not belong to the found clusters. To not lose their information of this alone structures, each one is considered like a representative cluster. For others clusters, it remains to find which of the structures composing the cluster is the more representative. For each cluster, an average structure is built then compared to the structures belonging to the cluster. The structure corresponding on the lowest RMSD is the closest from the average, so it was taken like representative of cluster. This structure is the start point for the molecular dynamics simulations. 114 and 99 clusters are created for KirBac3.1 WT and KirBac3.1 S129R, respectively.

2.4.3.4.5 Molecular Dynamics Simulations.

Were performed using the same method as for the Kirbac3.1 WT

2.4.3.4.6 Analysis of Molecular Dynamics simulations.

The following analysis were performed on the excited structures. On other hand, they were also launched on the structures from the MD simulations but without considering the first quarter of the MD to let the protein much time to equilibrate.

Root Mean-Square Deviation of the modes are calculated compared to the minimized structure by the Charmm software.

The minimal distances concerning the gating represent the projections of the coordinates of the atoms of the protein on the axis x and y. In the case of the determination of the states of the protein, all the distances of residues Leu124 and Tyr132 are computed and the minimal distance is retained like the diameter of the channel at this level. Other minimal distances are computed with Chamm.

The kink of the outer helices is defined by the angle between the vector representing the residues Leu56 to Asp80 and the one representing the residues Trp46 to Leu56.

The rotation of the cytoplasmic domain represents the dihedral angle taking into account the residue Leu108, the projections of residues Leu108 and Ile266 on the z-axis then the coordinates of the residues Ile266. The kink and the dihedral angles measures are performed by the software Charmm.

Protein expression and purification, Pepsin Digestion, Hydrogen/Deuterium exchange approach coupled to mass spectrometry (HDX-MS) HDX , HPLC Peptide Separation, Mass Spectrometric Analyses of Peptides were performed the same way as for the KirBac3.1 WT (4).

2.4.4 Acknowledgments

We would like to thank financial supports from SERVIER and ANR CACSICE (#11-EQPX-0008) (CVB); AFM grant (#19928) (SB) and PhD research funding, MRT (CF). This work was performed using HPC resources from the “Mésocentre” computing center of CentraleSupélec and ENS Paris-Saclay supported by CNRS and Région Île-de-France (<http://mesocentre.centralesupelec.fr/>). It was granted access to the HPC resources of IDRIS under the allocation 100512 made by GENCI/IDRIS (DP).

Author Contributions: DP, EF and CVB conceived and designed the research. CF performed the MDenM experiments under the supervision of DP, RDZ, LB and IO expressed the protein. LB, IO and EF performed the Hydrogen Deuterium Exchange Mass spectrometry (HDX-MS) experiments. CF, DP and CVB wrote the manuscript with the help of comments from all authors.

Competing Interests: All authors declare no competing interests.

2.4.5 References

1. BAVRO, Vassiliy N., DE ZORZI, Rita, SCHMIDT, Matthias R., MUNIZ, João R. C., ZUBCEVIC, Lejla, SANSOM, Mark S. P., VÉNIEN-BRYAN, Catherine et TUCKER, Stephen J. Structure of a KirBac potassium channel with an open bundle crossing indicates a mechanism of channel gating. *Nature Structural & Molecular Biology*. février 2012. Vol. 19, n° 2, pp. 158-163. DOI 10.1038/nsmb.2208.
2. BAVRO, Vassiliy N., ZORZI, Rita De, SCHMIDT, Matthias R., MUNIZ, João R. C., ZUBCEVIC, Lejla, SANSOM, Mark S. P., VÉNIEN-BRYAN, Catherine et TUCKER, Stephen J. Structure of a KirBac potassium channel with an open bundle crossing indicates a

mechanism of channel gating. *Nature Structural & Molecular Biology*. février 2012. Vol. 19, n° 2, pp. 158-163. DOI 10.1038/nsmb.2208.

3. PAYNTER, Jennifer J., ANDRES-ENGUUX, Isabelle, FOWLER, Philip W., TOTTEY, Stephen, CHENG, Wayland, ENKVETCHAKUL, Decha, BAVRO, Vassiliy N., KUSAKABE, Yoshio, SANSOM, Mark S. P., ROBINSON, Nigel J., NICHOLS, Colin G. et TUCKER, Stephen J. Functional Complementation and Genetic Deletion Studies of KirBac Channels Activatory Mutations highlight Gating-Sensitive Domains. *Journal of Biological Chemistry*. 24 décembre 2010. Vol. 285, n° 52, pp. 40754-40761. DOI 10.1074/jbc.M110.175687.

4. FAGNEN, charline, BANNWARTH, Ludovic, OUBELLA, Iman, FOREST, Eric, DE ZORZI, Rita, DE ARAUJO, Aline, MHOUMADI, Yasmina, BENDAHOU, Saïd, PERAHIA, David et VÉNIEN-BRYAN, Catherine. New Structural and functional insights into Kir channel gating from molecular simulations, HDX-MS and functional studies. *submitted*. 2020.

5. GUPTA, Sayan, BAVRO, Vassiliy N., D'MELLO, Rhijuta, TUCKER, Stephen J., VÉNIEN-BRYAN, Catherine et CHANCE, Mark R. Conformational changes during the gating of a potassium channel revealed by structural mass spectrometry. *Structure (London, England: 1993)*. 14 juillet 2010. Vol. 18, n° 7, pp. 839-846. DOI 10.1016/j.str.2010.04.012.

6. WANG, Shizhen, LEE, Sun-Joo, HEYMAN, Sarah, ENKVETCHAKUL, Decha et NICHOLS, Colin G. Structural rearrangements underlying ligand-gating in Kir channels. *Nature Communications*. janvier 2012. Vol. 3. DOI 10.1038/ncomms1625.

7. BICHET, D., HAASS, F. A. et JAN, L. Y. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003. Vol. 4, n° 12, pp. 957-967. ISI:000186790700015

8. DE ZORZI, Rita, NICHOLSON, William V., GUIGNER, Jean-Michel, ERNE-BRAND, Françoise et VÉNIEN-BRYAN, Catherine. Growth of large and highly ordered 2D crystals of a K⁺ channel, structural role of lipidic environment. *Biophysical Journal*. 16 juillet 2013. Vol. 105, n° 2, pp. 398-408. DOI 10.1016/j.bpj.2013.05.054.

9. NISHIDA, M., CADENE, M., CHAIT, BT et MACKINNON, R. Crystals structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *Embo Journal*. 2007. Vol. 26, n° 17, pp. 4005-4015.

10. PEGAN, S, ARRABIT, C, ZHOU, W, KWIATKOWSKI, W, COLLINS, A, SLESINGER, PA et CHOE, S. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nature Neuroscience*. mars 2005. Vol. 8, n° 3, pp. 279-287. DOI 10.1038/nn1411.

11. CLARKE, Oliver B., CAPUTO, Alessandro T., HILL, Adam P., VANDENBERG, Jamie I., SMITH, Brian J. et GULBIS, Jacqueline M. Domain Reorientation and Rotation of an Intracellular Assembly Regulate Conduction in Kir Potassium Channels. *Cell*. 11 juin 2010. Vol. 141, n° 6, pp. 1018-1029. DOI 10.1016/j.cell.2010.05.003.

12. MOUAWAD, Liliane et PERAHIA, David. Diagonalization in a mixed basis: A method to compute low-frequency normal modes for large macromolecules. *Biopolymers*. 1 avril 1993. Vol. 33, n° 4, pp. 599-611. DOI 10.1002/bip.360330409.

13. COSTA, Mauricio G. S., BATISTA, Paulo R., BISCH, Paulo M. et PERAHIA, David. Exploring Free Energy Landscapes of Large Conformational Changes: Molecular Dynamics with Excited Normal Modes. *Journal of Chemical Theory and Computation*. juin 2015. Vol. 11, n° 6, pp. 2755-2767. DOI 10.1021/acs.jctc.5b00003.
14. HUMPHREY, W, DALKE, A et SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. février 1996. Vol. 14, n° 1, pp. 33-38. DOI 10.1016/0263-7855(96)00018-5.

3 Partie 3 : Cryo-microscopie électronique, Méthodologie et Détermination de la structure 3D du canal Kir2.1

3.1 Chapitre 1 : Analyses d'images issues de cryo-microscopie électronique

Comme indiqué précédemment, la structure du canal Kir2.1 humain n'est pas encore connue. En effet, la base de données de la PDB ne répertorie que deux structures relatives au canal Kir2.1 à résolution acceptable ($<4\text{\AA}$), cependant toutes deux ne décrivent que le domaine cytoplasmique de la protéine. En conséquence, parallèlement aux études théoriques de KirBac3.1, nous avons entrepris de déterminer la structure de Kir2.1 humain par cryo-microscopie électronique combinée à l'analyse d'images de particules isolées.

3.1.1 Cryo-microscopie

La cryo-microscopie(348–351) fait ses débuts dans les années 1980(352). Il est mis en évidence que la congélation rapide à très basse température ($< -185^{\circ}\text{C}$) est déterminante car elle évite la cristallisation et la formation de glace à l'état vitreux(353). Cette température préserve les échantillons du vide (pas des dommages d'irradiation). La cryo-EM est plus adaptée aux systèmes de grande taille car ces derniers sont plus aisés à observer. La limite inférieure de poids moléculaire adapté au traitement par cryo-microscopie se situe entre 200 et 250 kDa. Cependant, certaines études de systèmes de taille inférieure ont abouti à des structures de très bonne résolution(354).

La cryo-microscopie est de plus en plus utilisée et les résolutions atteintes sont de plus en plus prometteuses et comparatives aux résolutions obtenues par cristallographie (Figure 51). Elle est en constante évolution pour améliorer son faible rapport signal/bruit des images, la prise en compte du mouvement de l'échantillon lors de la prise d'images, l'amélioration des technologies comme les nouvelles caméras permettant la prise de plusieurs images par seconde.

Cette méthode est une bonne alternative à la cristallographie car cette dernière montre l'état figé de la protéine dans son état le plus stable qui n'est pas forcément le plus fréquent ou représentatif de la protéine dans les conditions physiologiques. De plus des contraintes existent dans le cristal 3D qui peuvent déformer la structure. La cryo-microscopie évite cet inconvénient.

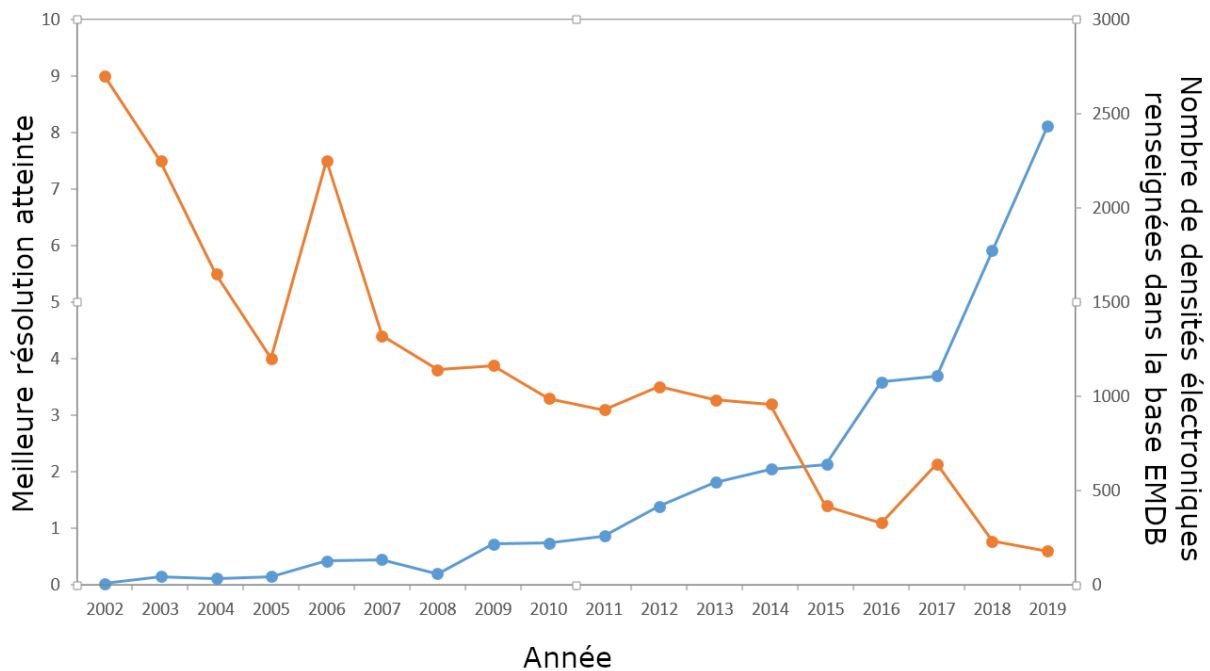


Figure 51 – Statistiques sur le développement et l’amélioration de la cryo-microscopie. Les données sont issues de la base de données EMDB. En bleu est représenté le nombre de densités électroniques renseignées par année. En orange est indiquée la meilleure résolution atteinte par année.

L’usage de la microscopie électronique se déroule en plusieurs étapes : la construction par génie génétique de la protéine, son expression, sa purification, l’optimisation des conditions de congélation, la prise d’images, et dans un dernier temps l’analyse de ces images dans le but de reconstruire une densité électronique de la protéine en trois dimensions.

3.1.2 Prise d’images

3.1.2.1 Préparation de l’échantillon

Une fois la protéine exprimée, purifiée et homogène, la préparation de l’échantillon peut avoir lieu. L’étape de préparation de l’échantillon est cruciale car le but est d’obtenir une particule biologique homogène. Pour une préparation optimale de l’échantillon pour une prise d’image en cryo-microscopie, trois paramètres importants sont à considérer : les grilles, l’ionisation des grilles ainsi que la vitrification des échantillons.

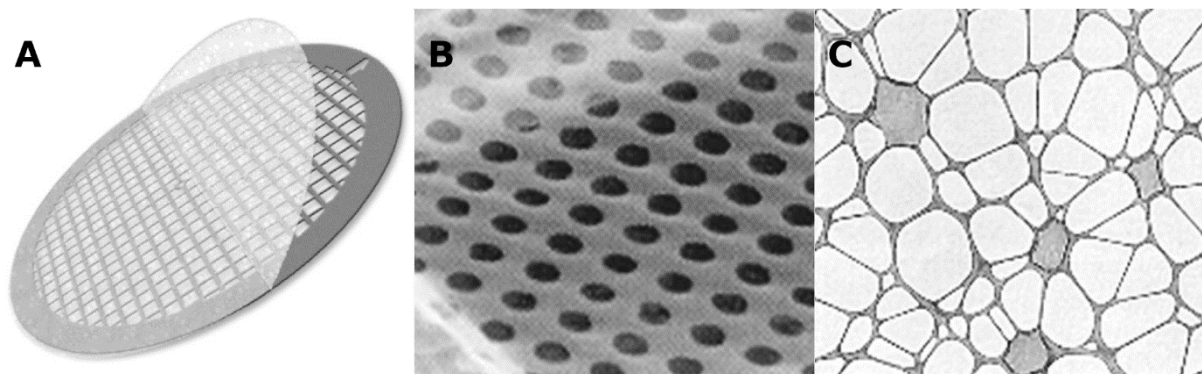


Figure 52 - Grilles. A) Support de grilles, image issue du site emresolutions.com. B) Grille industrielle. C) Grille réalisée en laboratoire.

Les grilles, sur lesquelles se trouve l'échantillon, sont recouvertes d'une fine couche de carbone trouée. Ces grilles (Fig. 52) sont disponibles dans le commerce ou réalisées manuellement en laboratoire. Ces deux méthodes montrent des avantages et des inconvénients. L'avantage des grilles dites industrielles est la régularité des trous dans le film de carbone. Concernant les grilles réalisées par le laboratoire, elles sont certes irrégulières mais la taille des trous peuvent être adaptée à la taille de l'échantillon. Parfois avant le dépôt de l'échantillon une très fine couche de carbone supplémentaire (sans trou) peut être déposée, ceci peut permettre dans certain cas une meilleure répartition de l'échantillon sur la grille de microscopie électronique.

En amont du dépôt de l'échantillon, la grille doit être ionisée, ce procédé est appelée *glow discharge* en anglais. Cette étape donne un caractère hydrophile à la grille et permet à l'échantillon de se répartir de manière homogène sur l'ensemble de sa surface. Le temps moyen entre l'ionisation de la grille et le dépôt de l'échantillon est de l'ordre d'une vingtaine de minutes. Il est important de réaliser le dépôt dans les quatre heures suivant l'ionisation de la grille car son effet s'estompe avec le temps.

Pour conserver les échantillons dans des conditions optimales pour une prise d'images par cryo-microscopie, il est nécessaire de les congeler dans l'éthane liquide à la température de l'azote liquide (-196°C) : la température ne doit en aucun cas dépasser les -170°C. La congélation doit être réalisée très rapidement pour l'obtention d'une glace vitreuse(349, 355). En effet lorsque la congélation est lente, l'eau a le temps de s'organiser et de former des cristaux (glace cubique ou hexagonale) opaques aux électrons ce qui empêche l'observation et

endommage la structure des objets biologiques. En respectant cette étape, l'échantillon est conservé dans ses conditions physiologiques dans une glace amorphe ou vitreuse.

Pour visualiser le système étudié de façon cohérente, il est important que le système soit stable d'où l'importance d'une préparation biologique homogène. La microscopie électronique permet ainsi de conserver l'intégrité du système biologique étudié dans son état natif.

3.1.2.2 Microscopie électronique à transmission

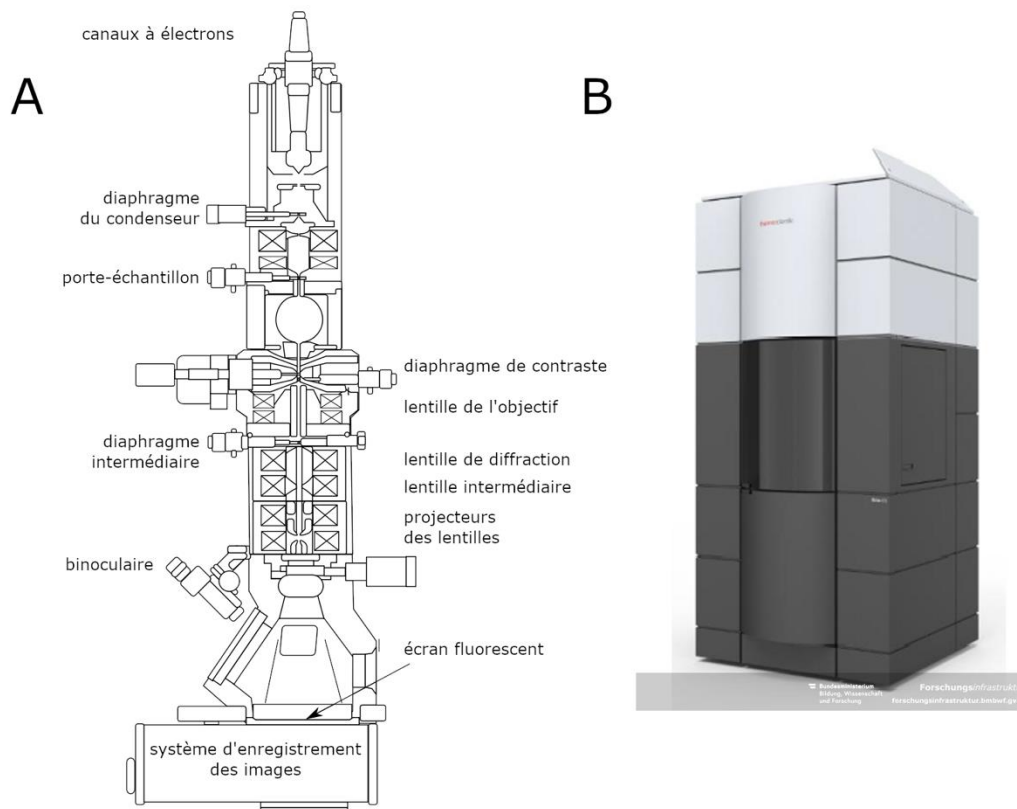


Figure 53 - Microscope. A) Schéma représentant l'organisation d'un microscope à transmission électronique. B) Microscope Krios Titan, image issue de forschungsinfrastruktur.bmbwf.gv.at.

Le microscope (Figure 53) est composé d'un canon à électrons qui produit le faisceau électronique ; de lentilles électromagnétiques employées pour focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon ; le système de détecteur d'électrons qui analyse uniquement les électrons transmis. Le faisceau d'électrons est soumis à des tensions d'accélération élevées de 60 à 300 keV. L'ensemble du microscope est sous vide permettant ainsi que les seules interactions existantes se déroulent entre les électrons et l'échantillon.

3.1.2.3 Aberrations et astigmatisme

L'aberration de sphéricité est due à des défauts au niveau des lentilles. Il s'agit d'un des principaux critères contraignant la résolution du microscope. Ce phénomène apparaît lorsque les rayons proches du centre de la lentille subissent une déviation moins élevée que celle des rayons à proximité du bord de la lentille. En conséquence, les électrons vont converger à différentes distances focales. Cette aberration est décrite par le paramètre C_s et dépend de la configuration du champ magnétique au sein du microscope. Lors du traitement d'images, pour pallier ce problème, lors du calcul de la fonction de transfert de contraste (CTF) une correction est effectuée pour corriger l'image en conséquence.

L'aberration chromatique est causée par les différentes vitesses des électrons au sein du faisceau, ainsi leurs énergies cinétiques diffèrent, créant un faisceau d'électrons de différentes longueurs d'onde. Les électrons ne vont pas être focalisés sur le même plan par les lentilles électromagnétiques, les moins rapides étant déviés. Les microscopes de dernière génération possèdent une technologie qui permet de produire des faisceaux de plus en plus cohérents qui permettent de pallier ce problème.

L'astigmatisme est la conséquence d'une différence de convergence selon les axes de la lentille. La contamination des diaphragmes peut influencer sur l'amplitude de ce phénomène. L'opérateur peut corriger l'astigmatisme en agissant sur les courants dans les lentilles électromagnétiques. L'astigmatisme se traduit par la représentation d'un point par une ellipse au lieu d'un cercle. Un second procédé de correction de l'astigmatisme prend place lors du calcul de la fonction de transfert de contraste (CTF) qui corrigera l'image en conséquence.

3.1.3 L'image

3.1.3.1 Formation de l'image

Le principe de formation d'une image se réalise grâce à l'interaction entre les électrons et l'échantillon. La dualité onde-particule permet d'étudier cette interaction comme un ensemble de corpuscules ou un ensemble d'ondes planes.

D'un point de vue corpusculaire, en interagissant avec l'échantillon, deux types de diffusion vont avoir lieu : la diffusion élastique ou inélastique. Dans le premier cas, les électrons du faisceau ne montrent pas de perte d'énergie lors de leur déviation. Dans le second cas, la diffusion inélastique est réalisée lorsqu'un électron du faisceau communique son énergie à un

électron appartenant à un atome de l'échantillon. L'électron peut alors évoluer de deux façons différentes : soit il est éjecté, soit il atteint un niveau d'énergie supérieur libérant un photon qui détruit l'échantillon. Ces électrons ne peuvent être filtrés par le diaphragme de l'objectif et sont intégrés à l'analyse d'image, ils forment le bruit de fond.

D'un point de vue ondulatoire, la diffusion élastique crée un décalage de phase appelé contraste de phase. Ce contraste ne tient pas compte de la diffusion inélastique bien qu'elle soit considérée lors de la formation de l'image. Cette dernière est d'ailleurs comparée à une superposition de deux images : l'image élastique décrivant le signal (haute résolution) et une image inélastique correspondant au bruit de fond (basse résolution).

3.1.3.2 Fonction de transfert de contraste: CTF

La fonction de transfert de contraste(355–357) illustre le lien entre la fonction d'onde après interaction avec l'échantillon et le contraste de l'image finale(355, 357–360). Elle concerne les objets à faible contraste (phase faible) telles que les molécules biologiques et détermine la qualité de l'image. L'équation définissant cette fonction est la suivante(361) :

$$H(k) = 2[\sin \gamma(k) - W \cos \gamma(k)]$$

$$\text{Avec } \gamma(k) = 2\pi(0.25C_s\lambda^3k^4 - 0.5\lambda\Delta z k^2)$$

Où W est le pourcentage de contraste d'amplitude, k la fréquence spatiale, C_s le coefficient d'aberration sphérique de la lentille, λ la longueur d'onde des électrons, Δz la valeur de défocalisation lors de la prise de vue.

Une version simplifiée est employée(355) :

$$H'(k) = \sin \gamma(k) - Q_0 \cos \gamma(k)$$

Il est possible de déterminer la constante Q_0 (pourcentage de contraste d'amplitude) en enregistrant une série de valeurs de défocalisation puis en mesurant la distance aux zéros de $H'(k)$. Sa valeur se trouve aux environs de 0.1(362, 363).

Cette fonction considère les défauts du microscope ainsi que la valeur de la défocalisation de l'image. Le faisceau d'électrons n'est jamais parfait cohérent, il est important

de prendre en compte la fonction d'enveloppe (Figure 54) qui permet de décrire l'instabilité de la source d'électrons, l'aberration chromatique ainsi que les mouvements de l'échantillon.

La fonction CTF joue un rôle fondamental sur la résolution de l'image. On peut l'évaluer en déterminant la fréquence spatiale pour laquelle la fonction est nulle. Plus la fréquence spatiale correspondant à une CTF est élevée, plus l'image est de haute résolution (Figure 55).

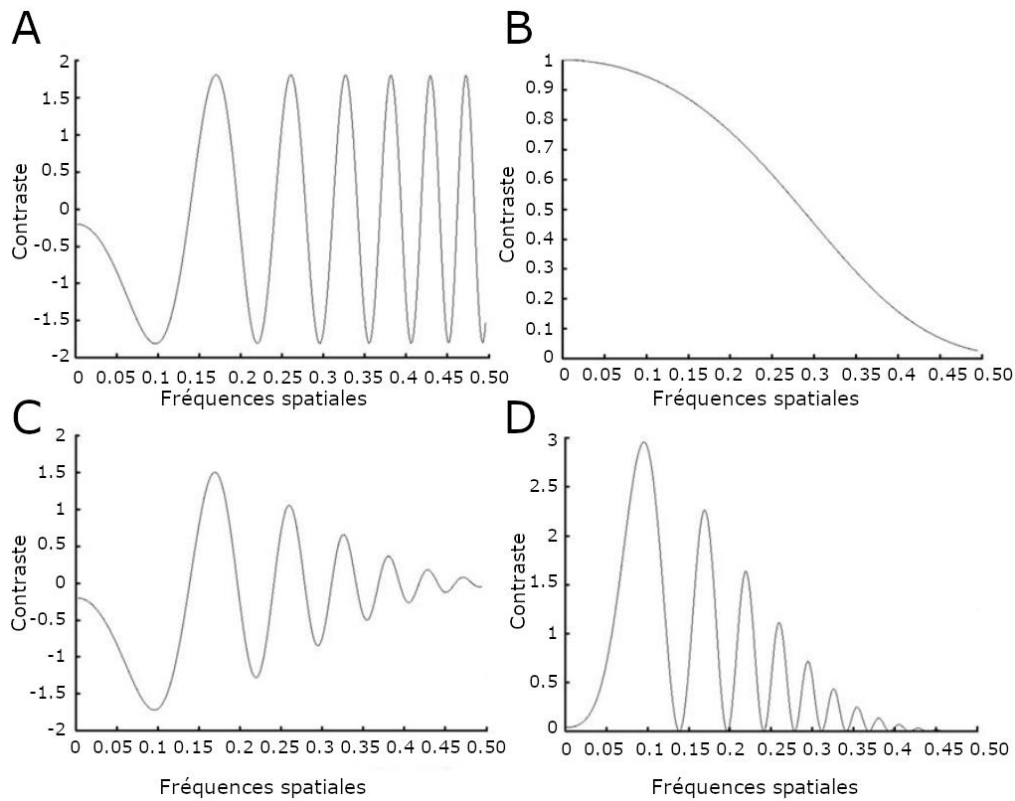


Figure 54- Représentation de la CTF et de son enveloppe. Données réalisées par Nicolas Boisset. A) Représentation de la CTF sans son enveloppe. B) Représentation de la fonction d'enveloppe. C) Représentation du produit de la CTF et de la fonction d'enveloppe. D) Représentation du produit de la CTF et de la fonction d'enveloppe au carré.

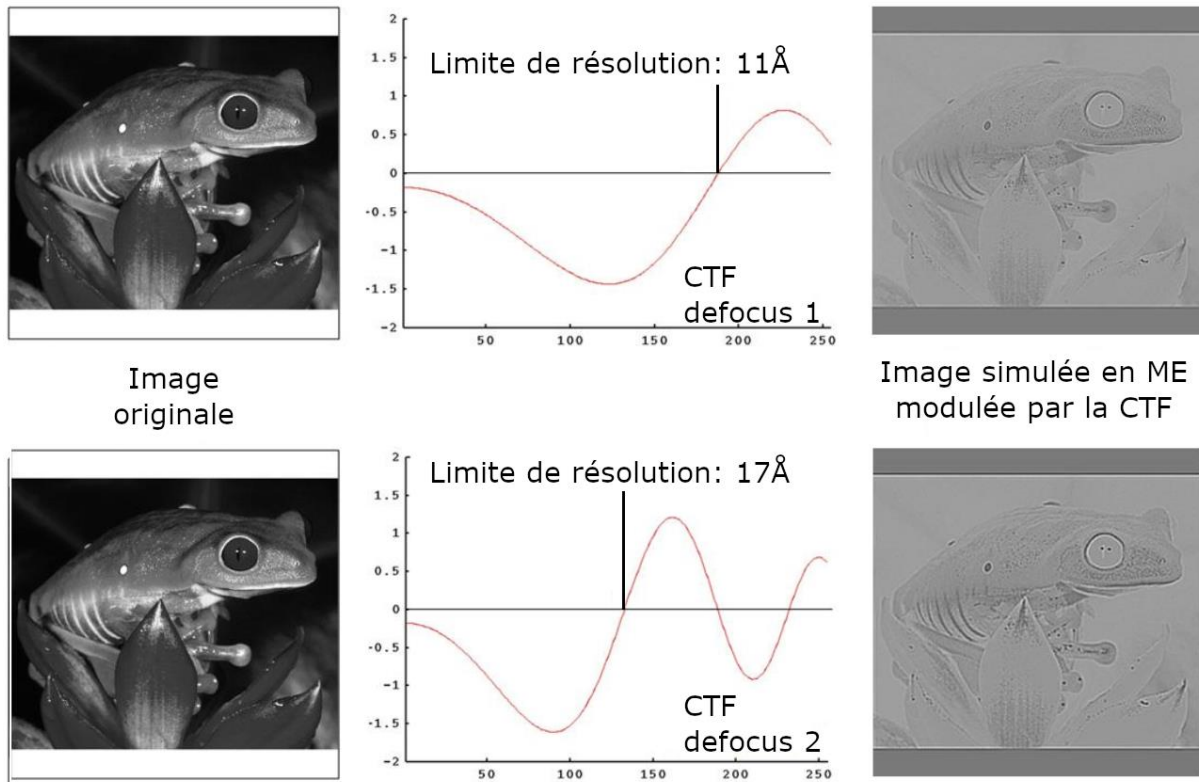


Figure 55 - Effet de la CTF sur la résolution et le contraste des images. Ici, pour observer l'effet de la CTF sur l'image, la transformée de Fourier a été multipliée par une CTF modélisée à deux valeurs de défocalisation différentes. Haut: défocalisation proche du point focal Bas: défocalisation plus loin du point focal.

3.1.3.3 Correction de la CTF

Plusieurs méthodes automatiques sont actuellement disponibles pour corriger la CTF(361, 364–371, 371–377). L'une des méthodes les plus utilisées est celle du filtre de Wiener(378) (Figure 56) , il corrige l'amplitude de la CTF ainsi que sa phase pour lui faire acquérir une valeur constante proche de 1 tout en évitant d'ajouter ou d'amplifier le bruit de fond. En conséquence, la résolution augmente puisque la fréquence déterminant le premier zéro de la CTF est maximale.

En considérant la transformée de Fourier d'une image :

$$I(k) = F(k)H(k) + N(k)$$

Où $F(k)$ est la transformée de Fourier de l'objet, $H(k)$ la CTF comprenant l'enveloppe, $N(k)$ le bruit de fond. Le filtre de Wiener appliqué est le suivant(355) :

$$S(k) = \frac{H^*(k)}{|H(k)|^2 + \frac{P_N(k)}{P_F(k)}}$$

Où $H^*(k)$ le complexe conjugué de $H(k)$, $P_N(k)$ et $P_F(k)$ respectivement les spectres de puissance du bruit et de l'objet. Le rapport des spectres de puissance évite une valeur nulle au dénominateur lorsque la CTF est nulle. La CTF est alors corrigée en amplitude et en phase excepté pour $H(k)=0$.

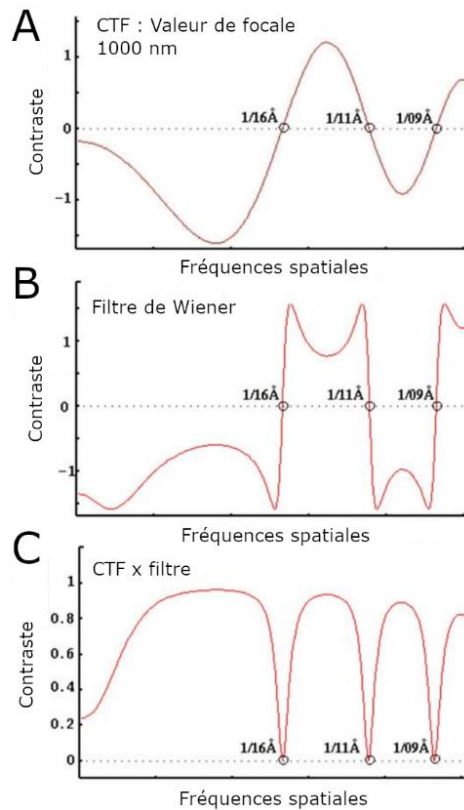


Figure 56 - Correction de la CTF par le filtre de Wiener. A) Représentation de la CTF à une valeur de défocalisation aux alentours de 1000 nm. B) Filtre de Wiener. C) Correction de la CTF par le filtre de Wiener. Lorsque $CTF=0$, aucune correction n'est réalisée.

Plus il y a d'images (avec des valeurs de défocalisation différentes) sur lesquelles le filtre est appliqué, plus l'espace de Fourier est recouvert (Figure 57). Dans ce cas on se trouve dans le cas où :

$$\sum_n H_n(k) W_n(k) = 1$$

Où : $H_n(k)$ la CTF de l'image n , $W_n(k)$ le filtre de Wiener appliqué sur l'image n avec :

$$W_n(k) = \frac{H_n^*(k)}{\sum_{n=1}^N |H_n(k)|^2 + \frac{1}{SNR}}$$

Le SNR représente le ratio signal sur bruit. En combinant les CTF, les valeurs auxquelles la fréquence s'annule sont possibles à déterminer puisque la CTF s'annule pour une valeur de défocalisation donnée.

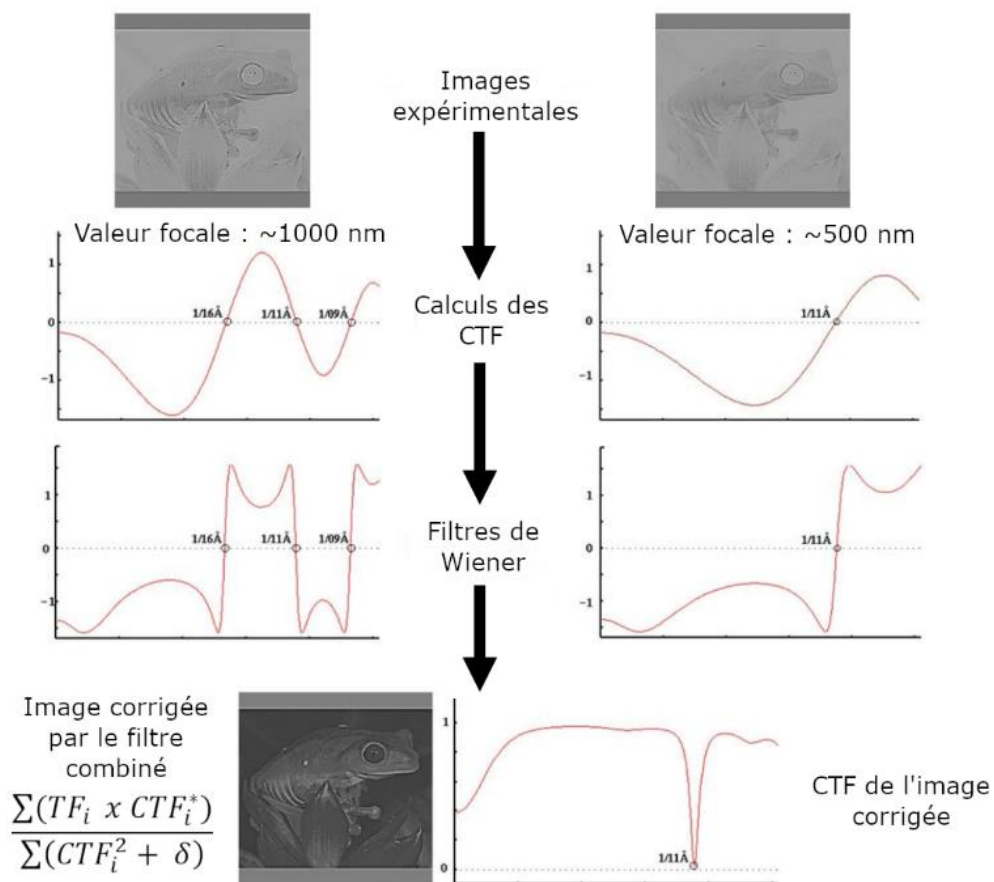


Figure 57 - Filtre de Wiener appliqué sur deux images dont les valeurs de défocalisation sont différentes. La CTF s'annule à 11 \AA , il s'agit de la limite de résolution, c'est le cas pour les deux images. Lorsque les images sont considérées individuellement, la CTF s'annule pour les valeurs de 16 et 9 \AA , les filtres utilisent alors la figure 2 pour récupérer les données de fréquences.

La probabilité d'annulation des zéros de la CTF à des valeurs identiques diminue lorsque le nombre de valeurs de défocalisation différentes s'accroît. Pour cette raison, afin d'atteindre

des données à haute résolution, on cherchera à étudier un maximum de groupes de valeurs de défocalisations différentes. Lors de la prise d'images il est important d'enregistrer les images à différentes valeurs de défocalisation. C'est à l'opérateur de décider de ces valeurs de défocalisation nominale (en générale de $-0.8 \mu\text{m}$ à $-4 \mu\text{m}$). Ces valeurs sont ensuite déterminées précisément pour chaque image et chaque particule avant l'analyse d'images.

3.1.3.4 Estimation de la CTF

Il est possible de déterminer la CTF à la main en mesurant les positions des zéros avant de les faire correspondre à une courbe CTF caractéristique, mais il existe aussi des méthodes automatiques. Les méthodes automatiques se découpent en deux étapes : l'estimation du spectre de puissance et l'estimation des paramètres de CTF. Le spectre de puissance quantifie l'énergie présente à chaque fréquence spectrale, sa modélisation peut être réalisée par le carré du produit de la CTF et de la fonction d'enveloppe. Ce modèle intègre aussi le bruit de fond.

Deux types de méthodes permettent d'estimer le spectre de puissance : les méthodes classiques comme la méthode du périodogramme moyenné(361, 379, 380), ainsi que les méthodes paramétriques tels que AR et ARMA(380, 381). Les méthodes paramétriques sont plus complexes et coûteuses en ressources informatiques mais semblent plus précises(381, 382). La méthode du périodogramme moyenné est plus simple et rapide mais manque de précision(382).

Comme évoqué précédemment, une fois le spectre de puissance estimé, il est possible de déterminer les paramètres de CTF relatifs à ce spectre. Ceci est réalisé en minimisant les mesures de dissemblance entre les spectres de puissance expérimentaux et théoriques (Figure 58) déterminés à partir des valeurs prédites des paramètres de CTF(361, 370–372, 375, 381, 383–385).

Ctffind4(376) est un des programmes les plus utilisés pour estimer la CTF dans le domaine de la microscopie électronique. Il indique deux valeurs de défocalisation (dans les deux directions principales), l'astigmatisme ainsi que l'inclinaison ; cependant il n'inclut pas le calcul de l'enveloppe de CTF.

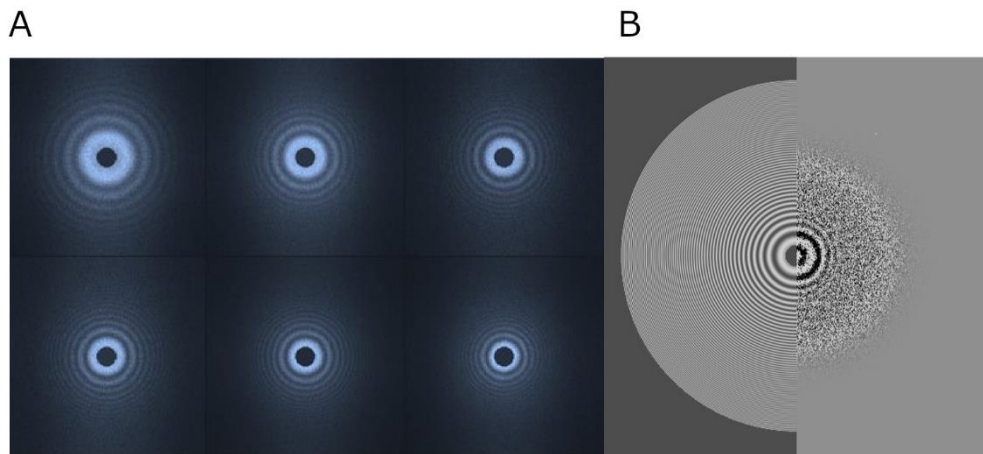


Figure 58 - Spectre de puissance. A) Spectre de puissance pour un ensemble de micrographes montrant des valeurs de défocalisation entre -1.2 et $-3.9 \mu\text{m}$, adapté de Frank(355) (2006). B) Comparaison des spectres de puissance modélisés (hémisphère gauche) et expérimental (hémisphère droit).

La valeur de l'astigmatisme des images est calculée de la façon suivante :

$$\text{Astigmatisme} = \text{Defocalisation}_{max} - \frac{\text{Defocalisation}_{min}}{\text{Defocalisation}_{moy}}$$

La correction des phases se réalise dans l'espace réciproque en multipliant par -1 les valeurs négatives et par $+1$ les valeurs positives. Ce procédé est appelé l'effet de renversement ou *flipping*.

3.1.3.5 Caméra

Pendant très longtemps les prises d'images se faisaient sur des films photographiques argentiques. Puis les caméras numériques sont apparues:

La prise d'image a évolué durant ces dernières années. Les premières caméras digitales ont été inventées en 1970(386) par Boyle et Smith ce qui leur fera gagner le Prix Nobel de Physique en 2009. Ce prix Nobel concernait l'invention des caméras Charge-Coupled Device (CCD). La puce des CCD est sensible aux photons et non aux électrons. Pour cette raison, une couche supplémentaire sur le dessus de la puce est utilisée pour convertir les électrons en photons. Malheureusement, cette conversion est une source majeure de bruit dans les images de cryo-microscopie(387) A noter aussi que les films argentiques apportent des informations bien plus fiables à hautes fréquences.

La nouvelle génération de caméras digitales appelées détecteurs directs d'électrons a constitué une vraie révolution dans le domaine de la microscopie électronique car elles peuvent détecter directement les électrons contrairement aux caméras CCD qui nécessitaient une conversion des électrons en photons. Cette conversion était source de détérioration de la résolution de l'image. Pour évaluer la qualité de ces caméras, un coefficient appelé DQE (Detective Quantum Efficiency) a été mis en place(388). Ce coefficient représente le quotient entre le SNR de l'image obtenue sur le SNR de l'image originale :

$$DQE = \frac{SNR_{out}^2}{SNR_{in}^2}$$

Dans le cas d'un détecteur idéal, l'image obtenue devrait être identique à l'image de départ (DQE=1).

3.1.4 Analyse d'images

3.1.4.1 Alignement des micrographes enregistrés par la caméra

Lors de la prise de vue, du fait de l'interaction du faisceau d'électron (température élevée) avec l'échantillon qui lui est à la température de l'azote liquide, le système biologique va bouger légèrement. Ce mouvement contribue à la détérioration de la qualité de l'image et à la perte d'information à haute résolution. Il faut donc corriger pour ces mouvements pour chaque image prise. Les images sont donc prises en mode "movie" ou mode film de la façon suivante: les caméras utilisées sur les microscopes les plus performants enregistrent plusieurs images (appelées "frame") par seconde créant ainsi un film. Ces derniers doivent être traités en raison du mouvement du système étudié décrit ci-dessus au cours de la prise d'image, il est ainsi nécessaire de corriger les mouvements observés. Pour ce faire, la méthode la plus répandue consiste à superposer les deux dernières images du film, soit pour un film comportant x images : superposer les images x et x-1. Une fois superposées, ces deux images sont sommées. La somme de ces images est ensuite à son tour alignée avec l'image précédente (l'image x-2) et sommée avec cette nouvelle image. Ce processus se déroule jusqu'à atteindre la première image du film. Cette méthode aide à l'amélioration du SNR de la référence et à la qualité de l'alignement. Il existe des logiciels(389–393) qui permettent de réaliser cet alignement d'images comme par exemple MotionCor(391).

3.1.4.2 Détection des particules

Une fois les micrographes obtenus, afin de déterminer la structure du système, il est nécessaire de localiser les particules au sein des micrographes, cette procédure est appelée sélection ou "picking". Naturellement, la détection manuelle est la plus précise et mène aux meilleurs résultats. Cependant, plus la technologie de la cryo-microscopie évolue, plus les données obtenues sont volumineuses, ainsi il est temporellement contraignant de procéder de la sorte sur de grands jeux de données (les jeux de données pouvant avoisiner le million de particules).

Des alternatives ont été mises en place afin de faciliter la détection des particules de façon automatique. Les logiciels comme Gautomatch proposent un picking automatique qui permet de sélectionner les particules automatiquement. Ce picking est relativement rapide mais peu précis. Le tri des particules est réalisé dans la suite du processus, notamment par l'intermédiaire des classifications 2D.

Afin de conjuguer qualité et rapidité, un système de picking dit semi-automatique a été créé par certains logiciels comme EMAN(368), Relion(394) ou encore Cryolo(395). Ce dernier notamment demande à l'utilisateur de détecter entre 2000 et 2500 particules décrivant un maximum d'orientations. A partir de ce modèle de picking, Cryolo va réaliser un picking automatique basé sur la technologie des réseaux de neurones pour retrouver les particules similaires à celles préalablement détectées par l'utilisateur. Il est aussi possible pour ce dernier de notifier un taux acceptable d'homologie au-dessus duquel les particules sont sélectionnées. Il est intéressant de voir que des logiciels comme Relion permettent d'utiliser un modèle en 3D pour trouver les particules cohérentes avec les projections 2D de ce modèle.

3.1.4.3 Génération d'un modèle initial

Différents types de modèles initiaux peuvent être créés en vue d'être utilisés comme modèle initial pour la reconstruction en trois dimensions du système. Des logiciels de traitement d'images tels qu'Eman(368) ou encore Relion(396) proposent de construire le modèle initial à partir des particules sélectionnées après la classification 2D. Relion quant à lui s'inspire d'un logiciel nommé Cryosparc(397). Ce dernier emploie la méthode Stochastic Gradient Descent dite SGD(398). Il s'agit d'une méthode bien décrite utilisant des méthodes d'apprentissage pour optimiser des fonctions non convexes.

3.1.4.4 Normalisation des données

Il a été mis précédemment en évidence que le contraste et l'intensité peuvent varier d'une image à l'autre au cours de la prise d'images. Il s'agit d'une conséquence des épaisseurs du film de carbone, de la glace mais aussi de l'orientation des particules, d'images moyennées à partir d'images provenant de différentes sessions d'acquisition de données. La normalisation de l'image procède à deux modifications : la première standardise les densités en donnant la même valeur moyenne du pixel gris à chaque image (0) ; la seconde consiste à modifier l'échelle des images pour obtenir une même déviation standard pour chacune. Sans cette procédure, l'alignement des particules risque d'être biaisé par les parties les plus sombres et brillantes des images. La normalisation est réalisée en appliquant la formule suivante :

$$\rho_{i,j}^{norm} = \frac{(\rho_{i,j} - \rho_{moy})}{\sigma_{old}} \sigma_{new}$$

Où σ_{old} et σ_{new} sont les déviations standard des images originale et ciblée respectivement, et $\rho_{i,j}$ la densité du pixel pour une image donnée.

3.1.4.5 Alignement des particules

Un des éléments clés pour aboutir à une reconstruction 3D de qualité est de réduire le bruit des images et augmenter la force du signal. Malheureusement plusieurs facteurs peuvent causer une baisse de ce signal et l'augmentation du bruit: un faisceau d'électrons à multiples vitesses, la qualité de la glace ou encore l'enregistrement par les caméras. Pour contrer l'effet des phénomènes cités, une solution a émergé : moyenner pour augmenter le SNR. Pour mettre en place ce procédé, les images moyennées doivent être dans la même orientation(355). Il s'avère nécessaire de regrouper les particules en fonction de leur orientation. Pour ce faire, les particules sont habituellement alignées sur une particule de référence. D'autres méthodes ont montré leur efficacité dans ce domaine.

Il est possible d'aligner les particules sur une particule représentant la moyenne de la totalité des particules (où aucun alignement n'aura été réalisé en amont). Une analyse statistique multivariée (MSA) est lancée sur chaque image centrée sur la particule moyennée pour obtenir plusieurs particules moyennées alignées par translation. Les images moyennées de qualité représentent celles montrant le moins de variation entre la particule moyennée et les particules attribuées à son groupe. Les images moyennées remplissant ce critère sont sélectionnées et les

particules sont attribuées à l'image moyennée pour laquelle elles montrent le moins de variations.

Une autre méthode d'alignement sans référence consiste à procéder à un alignement dans l'espace de Fourier(399), c'est le cas des logiciels tels qu'Eman(400) ou encore Spider(401).

3.1.4.6 Classifications 2D et 3D

Les classifications 2D et 3D s'inscrivent dans la continuité de l'alignement des images puisque leur objectif est de regrouper les particules en cluster en fonction de leur ressemblance. Il existe plusieurs méthodes pour réaliser ces regroupements. La méthode la plus employée est la méthode dite Maximum Likelihood estimation (ML). Elle est implémentée dans le logiciel Relion aussi bien pour réaliser sa classification 2D que 3D. Pour classer les particules, cette méthode évalue les différents paramètres pour sélectionner ceux pouvant contribuer à la mise en place d'un modèle statistique. En effet, ML va tester différents paramètres pour retenir ceux qui contribuent à se rapprocher du modèle initial. Le désavantage de cette méthode est sa dépendance à son modèle ; ainsi pour être assuré de la qualité de la classification non biaisée par un modèle initial, il est nécessaire de recommencer le processus avec différents modèles et comparer les résultats obtenus.

D'autres méthodes peuvent être employées pour procéder à cette classification :

- ✓ l'analyse des composantes principales qui réduit le nombre de variables pour se focaliser sur les variations les plus importantes(355, 402)
- ✓ l'analyse de facteurs(355) employée seulement si l'utilisateur indique les différents facteurs significatifs pouvant contribuer à la classification
- ✓ la classification par l'intermédiaire de l'algorithme des k-moyennes employée par EMAN(403). L'utilisateur précise le nombre de classes souhaitées. Les classes de la première itération sont réalisées aléatoirement et forment des centroïdes. Dès la seconde itération, les particules sont comparées aux centroïdes créés lors de l'itération précédente et sont assignées à celui dont elles sont le plus proche.
- ✓ la classification hiérarchique qui permet aux particules de s'assembler en paires avec la particule la plus proche pour former un groupe. Les nouveaux groupes formés

s'assemblent à leur tour en paires avec le groupe le plus proche créant un nouveau rang de groupe. Ce processus se poursuit avec les groupes nouvellement créés.

3.1.4.7 Principe de la reconstruction 3D

Pour réaliser la reconstruction en trois dimensions, les logiciels s'appuient sur les projections 2D du modèle initial utilisé. La première étape consiste à aligner les particules obtenues et de les classer en fonction de leur orientation 3D.

Pour déterminer l'orientation 3D d'une particule, il faut aligner cette dernière avec les projections du modèle initial en employant un ensemble connu de directions de projections.

Pour définir cette orientation, on fait appel aux angles d'Euler. Il faut tout d'abord identifier la direction de propagation qui est la plus proche de l'image expérimentale. L'identification de cette direction permettra de déterminer deux angles d'Euler. Le troisième angle est retrouvé en observant l'orientation de la particule dans le plan de l'image.

3.1.4.8 Reconstruction 3D

Chaque particule représente une projection du système étudié. Il est nécessaire avant de commencer la reconstruction 3D que la correction de CTF ainsi que la détermination de toutes les valeurs des angles d'Euler des particules soient déterminées.

Ces dernières années, les logiciels développés pour le traitement d'image tente d'automatiser autant que possible le traitement d'images afin que le résultat obtenu soit moins biaisé et la procédure plus reproductible. Deux méthodes de reconstruction sont disponibles.

- ✓ La reconstruction 3D dans l'espace réel (Figure 59). Celle-ci repose sur la méthode dite de back-projection(404). Cette dernière consiste à placer chaque particule le long de la direction définie lors de la détermination de ses paramètres d'orientation. Une fois que toutes les particules ont été organisées dans l'espace en fonction de ces paramètres, elles sont sommées pour former la densité électronique. Plus le nombre de projections employées est important, plus la densité électronique gagne en précision. Pour mener à bien ce procédé et obtenir la densité la plus détaillée possible, il faudrait idéalement que toute la surface de la sphère d'Euler soit recouverte des projections(405). Un filtre pour laisser passer les hautes fréquences sur les classifications 2D permet de corriger une surreprésentation des données de basses fréquences.

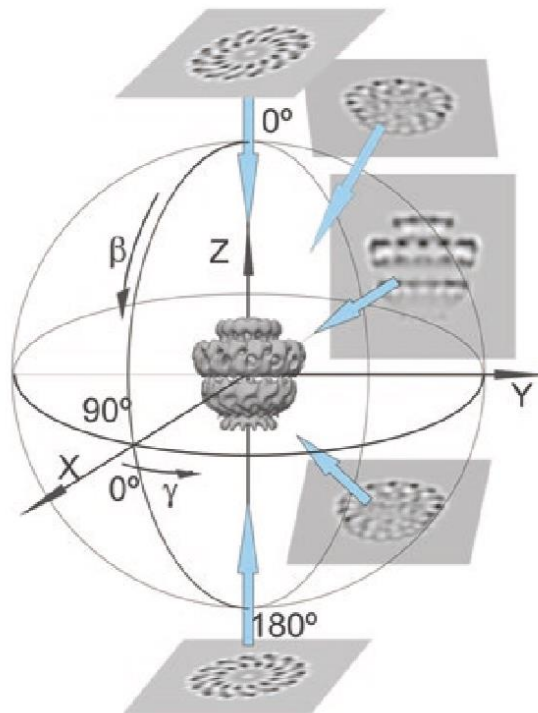


Figure 59 – Reconstruction 3D dans l'espace réel. A la surface de la sphère d'Euler, sont représentées les différentes classes moyennes d'un objet étudié. Chacune est rétro-projetée selon son angle d'Euler dans l'espace réel. Les densités de chaque moyenne des classes 2D sont étirées sous forme de rayons à travers l'espace 3D et les points où se rencontrent les rayons seront sommés pour définir la densité électronique 3D de l'objet dans sa globalité.

- ✓ La reconstruction 3D dans l'espace de Fourier (Figure 60). Cette méthode repose sur le théorème de la section centrale. Lors de l'application de ce théorème, il est établi que :
 - i) chaque projection 2D d'un système correspond à une section centrale dans la transformée de Fourier 3D du système ;
 - ii) l'orientation de chaque section correspond à celle de sa projection la plus proche. Cela signifie qu'à partir des projections et des orientations d'un objet, il est possible de reconstruire ce même objet en 3D en complétant l'espace de Fourier avec les différentes sections 2D calculées à partir des images. Il est important de notifier que la résolution est en lien direct avec le nombre de vues angulaires différentes : plus elles sont nombreuses, plus la résolution sera de qualité.

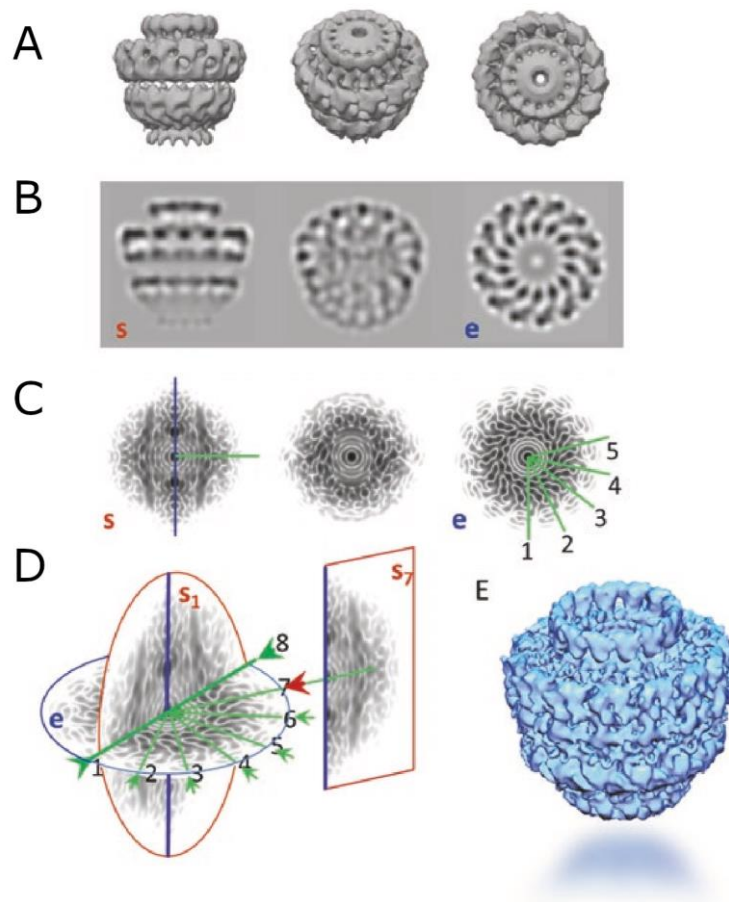


Figure 60 - Reconstruction 3D dans l'espace de Fourier. A) Différentes vues de l'objet étudié partageant au moins une ligne commune. B) Projections équivalentes à la vue proposée en A. C) Transformée de Fourier des projections B. D) Représentation de deux transformées de Fourier partageant au moins une ligne commune dans l'espace réciproque. En vert sont indiquées les lignes communes à la vue latérale (s) et la vue du haut (e). En violet est indiquée la ligne commune entre les vues de côté s1 et s7. L'angle entre deux lignes communes détermine l'angle d'orientation d'Euler relatif. E) La transformée de Fourier inverse des transformées 2D combinées forme une structure améliorée de l'espace réel vue comme une densité électronique.

3.1.4.9 Affinement de la densité électronique

Tous les logiciels emploient la même méthodologie de base pour traiter l'affinement de la densité électronique. Dans un premier temps, les particules sont réalignées en fonction des nouvelles valeurs dépendant de la densité électronique créée à partir du modèle initial. Au cours de la même étape, un affinement des valeurs angulaires des particules se réalise(406). Cet affinement angulaire mène à une nouvelle projection du nouveau modèle qui peut être utilisé comme référence pour affiner l'orientation des différentes classes. A partir des nouvelles classes obtenues, un nouvel alignement des particules a lieu en diminuant l'incrémention entre

chaque valeur d'angles afin que l'association entre la particule et son angle de vue soit optimale. Suite à ces étapes, de nouvelles classes et de nouvelles valeurs d'angles d'Euler sont disponibles pour une nouvelle reconstruction 3D. L'affinement recommence ces opérations jusqu'à obtenir une convergence.

3.1.4.10 Fourier Shell Correlation : FSC

Lors de l'affinement de la structure, dès le début du processus : l'ensemble des particules est séparé en deux groupes de même taille et de manière aléatoire. Deux transformées de Fourier ont ainsi été calculées. Ces dernières sont comparées : lorsque leur corrélation est inférieure à 0.5 alors les densités électroniques sont considérées comme considérablement différentes. La résolution de la densité électronique obtenue est déterminée par FSC. Afin de déterminer la résolution de la densité électronique, une valeur seuil de FSC a été fixée. La fréquence spatiale correspondant à une $FSC = 0.1432$ permet d'avoir accès à la résolution de la densité électronique (407, 408). L'inconvénient de cette méthode est de devoir séparer en deux l'ensemble de particules, ce qui diminue les données disponibles pour la reconstruction. Cette méthode montre néanmoins l'avantage d'éviter un biais quant aux résultats puisque deux modèles sont affinés au lieu d'un.

3.1.5 Fitting de la structure 3D

Cet article est une extension d'un article précédent qui présentait la méthode MDeNM, méthode que j'ai employée lors de ma thèse. Voici en quelques mots la philosophie de MDeNM

M. Costa et D. Perahia ont mis en place la méthode (252) dans le but d'explorer le plus vaste espace conformationnel d'un système biologique étudié. Leur méthode génère des milliers de structures d'un même système. L'idée a été d'adapter la MDeNM pour trouver la structure atomique la plus en accord avec la densité électronique expérimentale. Cette nouvelle application de la méthode MDeNM s'appelle MDeNM-EMFit (409). Le principe de cette méthode est d'échantillonner l'espace conformationnel en direction de la structure ayant la plus haute corrélation avec la densité électronique expérimentale.

Pour ce faire, à partir d'un modèle atomique équilibré, les modes normaux sont calculés, les modes de plus basse fréquence sont sélectionnés et combinés en un vecteur. Des simulations de dynamique moléculaire sont réalisées, à intervalle de temps régulier, de l'énergie cinétique est injectée dans le système afin de donner au système étudié l'énergie nécessaire pour explorer

l'espace conformationnel. A la fin de ce processus, des centaines de structures ont été générées. Toutes sont comparées à la densité électronique expérimentale, la structure MDeNM montrant la plus haute corrélation est sélectionnée, puis à partir de cette dernière le procédé est relancé jusqu'à convergence de la corrélation entre la structure MDeNM et la densité électronique.

Le but maintenant est d'étendre cette méthode à l'étape de « fitting » ou recalage dans les structures déterminées par cryo-microscopie électronique.

Une fois la densité électronique du système biologique étudié obtenue, il est nécessaire de déterminer les coordonnées x,y,z dans l'espace du système. Cette étape s'appelle le fitting et consiste à superposer un modèle atomique du système (déterminé par d'autres méthodes expérimentales ou modélisées comme i-Tasser ou autre....) sur la densité électronique expérimentale déterminée par l'analyse d'images. Une fois superposés, le modèle atomique est modifié pour se soumettre aux contraintes imposées par la densité. Le fitting rigide consiste à l'optimisation de l'alignement de la densité électronique avec le modèle sans modifier ce dernier. Le fitting dit flexible, quant à lui, va modifier les angles, les distances entre atomes et les dièdres du modèle atomique afin qu'il corresponde au mieux à la densité électronique.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à la création de cette nouvelle stratégie pour réaliser le fitting. L'article découlant de ce travail est présenté dans les pages suivantes.

Ma participation à ce travail a été de faire le lien entre les structures générées par MDeNM-EMfit et les densités électroniques de cryo-microscopie. J'ai réalisé les scripts (appelant des logiciels existants) pour permettre : i) la conversion d'une structure atomique en densité électronique à la résolution de la densité expérimentale de référence, ii) le calcul de la corrélation entre la densité électronique et la structure atomique.

A New Strategy for Atomic Flexible Fitting in Cryo-EM Maps by Molecular Dynamics with Excited Normal Modes (MDeNM-EMfit)

Mauricio G. S. Costa,* Charline Fagnen, Catherine Vénien-Bryan, and David Perahia*

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01148>

Read Online

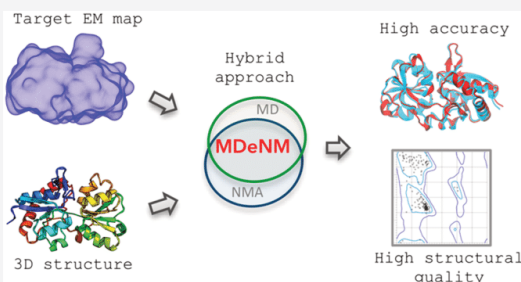
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Previous studies demonstrated the efficiency of the Molecular Dynamics with excited Normal Modes (MDeNM) method on the characterization of large structural changes at a low computational cost. We present here MDeNM-EMfit, an extension of the original method designed to the flexible fit of structures into cryo-EM maps. Here, instead of a uniform exploration of the collective motions described by normal modes, sampling is directed toward conformations with increased correlations with the experimental map. Future perspectives to improve the accuracy of fitting and speed of calculations are discussed in light of the results.



The recent progress in single-particle electron cryo-microscopy (cryo-EM) has allowed the determination of structures of biological macromolecules at a resolution that rivals X-ray crystallography. However, there are still challenges for structural biologists to overcome technical limitations that prevent cryo-EM from reaching its ultimate potential in order to attain even better resolution. This progress will lead to a substantial increase in the number of cryo-EM structures that can be interpreted with atomic models. Note that at resolutions above 3 Å, automatic de novo model-building programs typically result in incomplete solutions. Many structures are of medium resolution, therefore being more challenging to interpret. In that case, the generation of initial 3D models through homology modeling can be very helpful. Recent methods combine sequence alignments, prediction of secondary structures, and template-based modeling to generate new structures. Several softwares are available to generate homology models.^{1,2} I-TASSER,³ a de novo modeling method, is also successfully used. The initial 3D models built by these softwares can later be fitted into electron microscopy maps.

EM maps released in the EMDB (Electron Microscopy Data Base)⁴ between 2002 and 2018 show that of 8203 entries, 1687 (21%) and 240 (3%) have a resolution better than 4 and 3 Å, respectively. In 2018, within 2109 released maps, 838 (40%) and 146 (7%) achieved a resolution better than 4 and 3 Å, respectively. Interpretation of cryo-EM maps is crucial, especially for small domains or regions where the technique does not lead to high enough resolution; consequently, achieving the fitting of atomic structures into electron microscopy maps remains a major issue.

The first EM maps into which atomic structures were fitted include actomyosin filaments and icosahedral viruses (see a

review on rigid-body docking methods⁵ that Baker and Johnson illustrated in 1996 by fitting a Fab structure into the cryo-EM map of the human rhinovirus complexed to Fabs (HRV14/Fab-17IA).⁶ Initial fitting attempts were based on rigid-body docking techniques where no internal flexibility of the atomic structure was considered. Baker and Johnson also highlighted that cryo-EM could give access to several conformations (indicating different functional states) for the same system. Indeed, improvements in the resolution of cryo-EM structures motivated the development of methods enabling the flexible fitting of atomic structures into density maps. In these methods, many degrees of freedom are considered in the fit, allowing the atomic structures to undergo conformational changes that improve their correspondence to the EM map. One of the first attempts to introduce flexibility in the fitting process, still in use today, consists of dividing a macromolecule into “rigid bodies” and fitting them independently.⁷ Alternatively, an optimal fitting may be obtained upon structural deformations, usually performed using Molecular Dynamics (MD) simulations or Normal Mode Analysis (NMA).

Significant limitations arise when each of these methods is used separately for flexible fitting. The available current computational resources preclude unbiased MD simulations from reaching time scales beyond a few microseconds for systems composed of approximately half a million atoms.^{8,9}

Special Issue: Frontiers in Cryo-EM Modeling

Received: December 12, 2019

Published: January 16, 2020

Although different enhanced sampling methods have been developed to overcome this limitation,¹⁰ the choice of an adequate algorithm is not trivial, and the quality of the results strongly depends on a proper choice of the parameters. Thus, sampling of large conformational changes is still a challenging point that should be properly addressed to enable a correct interpretation of diverse biological phenomena.¹¹ Hence, MD-based flexible fitting relies on the addition of extra biasing potentials aiming to overcome the sampling limitations.¹² Indeed, the cross-correlation (c.c.) between the simulated and experimental density maps is maximized during the simulations. Still, in practice, additional arbitrary constraints or regularization steps are usually required due to the large forces introduced to direct sampling.^{13,14}

NMA-based fitting is based on the observation that low-frequency modes describe collective motions frequently associated with biological functions.¹⁵ To date, several tools are available to fit structures into maps by successive deformations along normal modes, also leading to the maximization of the c.c.^{16–18} Contrary to MD-based fitting, the effects of fast degrees of freedom are often neglected. Nevertheless, these methods are highly efficient, but the structural quality of the generated structures is low due to geometric distortions that might arise from the displacements. The calculation of NMs in internal coordinates was shown to alleviate this issue.¹⁷ However, the lack of fast motions (e.g., side chain and loop motions) renders the NMA-based methods not very effective to fit structures at high EM resolution (below 7 Å).

Distinct authors agree that hybrid approaches combining NMA and MD exhibit the potential to overcome the essential limitations of the current flexible fitting procedures.^{13,17} In this context, we recently proposed the Molecular Dynamics with excited Normal Modes (MDeNM) method to explore the free energy landscapes of large conformational changes.¹⁹ This method is a multireplica scheme consisting of successive kinetic excitations of combinations of normal modes during short MD simulations, thus coupling fast and slow degrees of freedom. In the original MDeNM procedure, the excitation directions were obtained upon random combinations of normal modes, leading to a uniform exploration of the collective coordinate space. As the excess of kinetic energy is quickly dissipated (at approximately 1 ps) and the relaxation time between the successive excitations is sufficiently large, MDeNM simulations provide an efficient way to obtain near equilibrium populations.^{19,20} The MDeNM outcomes were shown to correlate with predictions from other more expensive computationally enhanced sampling methods, as well as with experimental data from different sources.^{19,20}

Considering the advantages presented above, we propose here an MDeNM-based procedure to work as an efficient cryo-EM flexible fitting tool, named MDeNM-EMfit. The rationale of our strategy is that sampling is progressively directed toward a set of conformations with the highest c.c. with the EM map. Figure 1 depicts a schematic representation of the new strategy.

Briefly, each replica starts from an equilibrated structure. Initially, normal modes are calculated, and a selection of k lowest frequency modes is combined into a single trial vector. Due to the complexity of the conformational space and the very large number of possible combinations, we designed a filtering step to only retrieve those leading to an increase of the c.c. against the experimental map. To this end, a 1 Å root-

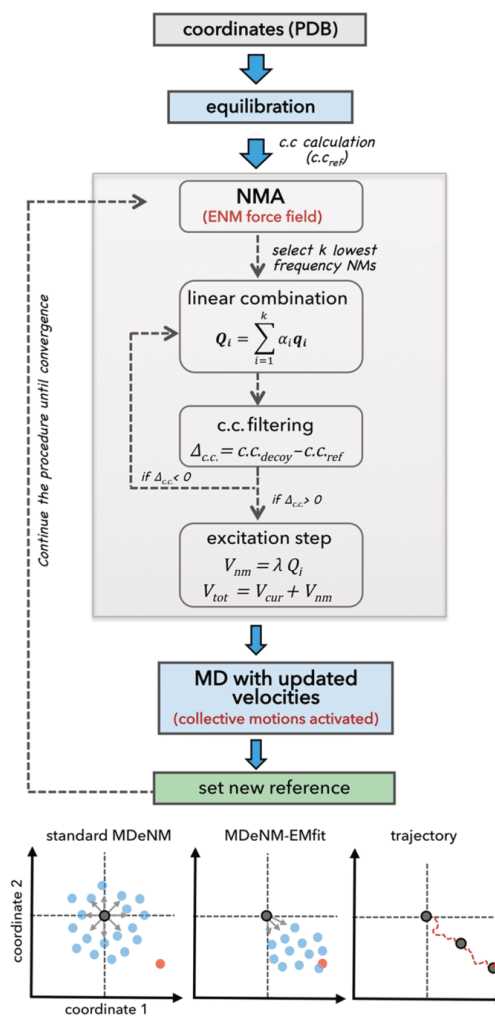


Figure 1. MDeNM-EMfit flowchart of the flexible fitting procedure. (Top) Steps in blue boxes are conducted with CHARMM.²¹ and all c.c. calculations are carried out with Chimera.²² All other steps (gray and green boxes) are carried out with R/bio3D.^{23–25} (Bottom) 2D representation of the approach: standard MDeNM yields a uniform exploration of the conformational space generating a pool of displaced structures (blue circles) from the equilibrated structure (gray circle). MDeNM-EMfit is based on the filtering of linear combinations that contributes to increase the c.c. with the target map (red circle), thus restricting the conformational search. At the end of the simulations, a trajectory for each replica is recovered, thus providing details about the intermediate sampled structures.

mean-square (RMSD) deformation along the trial combination vector is performed, producing a decoy structure. The correlation between a simulated map calculated from this structure and the target map is compared to the initial c.c. The trial vector is accepted if it contributes to an increase in the correlation with the EM map; otherwise, new combinations are

B

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01148>
J. Chem. Inf. Model. XXXX, XXX, XXX–XXX

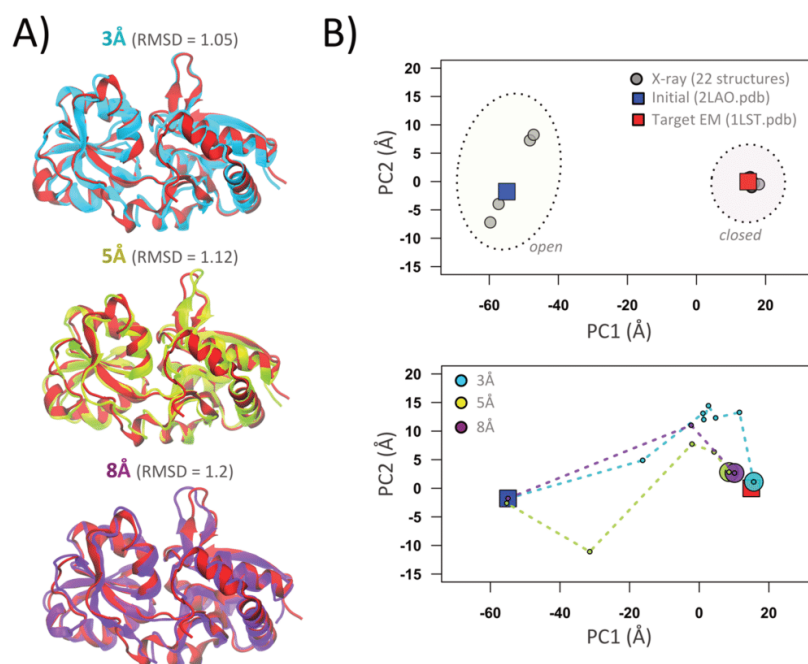


Figure 2. Flexible fitting results obtained with MDeNM-EMfit. (A) Cartoon representation of the LAO structures exhibiting the highest c.c. with target maps in different resolutions. The closed structure (PDB ID: 1LST) used to build the theoretical maps is displayed in red. (B, top) Projection of the crystallographic structures onto the first two PCs calculated from the ensemble of 22 experimental X-ray structures. (B, bottom) Projections of the best-fit structures obtained after the calculations (big circles). The small circles depict the intermediate structures sampled.

tested until this criterion is satisfied. Subsequently, the magnitude of the accepted vector is scaled to add the desired extra kinetic energy to the current velocities (see [Supporting Information](#) for additional methodological details), followed by an excited short MD (here 2 ps) starting with updated velocities. The above procedures are repeated until convergence of the c.c. against the target map, considering as the initial structure the one obtained at the end of the previous MD simulation.

We initially applied our approach to the flexible fitting of the LAO binding protein (lysine–arginine–ornithine-binding periplasmic protein), for which a substantial conformational change is experimentally observed.²⁶ Target EM maps were generated at 3, 5, and 8 Å resolution (additional details are given in the [Supporting Information](#)). As previously discussed, the structure of the target state is usually unknown, and it is unlikely that it shares the same orientation as the starting conformation.¹⁴ Therefore, a preliminary rigid-body fitting of the initial state onto each EM map was performed.

The inspection of [Figure 2A](#) reveals that our approach accurately generates solutions close to the target structure in all resolutions considered. Rather than producing unique solutions, MDeNM-EMfit generates an ensemble of structures that can be ranked based on the c.c. with the target map. [Figure S1](#) shows the evolution of the c.c. during the calculations. We noticed that the lower the resolution is, the faster is the convergence. Indeed, at 8 Å, the best-fit solution was obtained after only three cycles (2 ps each), while at 5 and 3 Å more cycles were required (6 and 10, respectively). Although the solution exhibiting the lowest RMSD was obtained at 3 Å (c.c. = 0.82), the correlation values obtained

for several replicas did not converge to the same range ([Figure S1](#)). This fact may be explained by the wells found in high-resolution densities that ultimately increase the ratio of the structures trapped in the wrong low energy minima.²⁷ To overcome this issue, we believe that initial MDeNM-EMfit steps adopting a smoothed density would allow a faster approximation to the target, followed by a final refinement using the original high-resolution map.

[Figure S2](#) displays the superposition of the 10 best-ranked structures. Although these structures are similar, local variations are observed at flexible regions in agreement with the ensemble of the LAO structures deposited in the Protein Data Bank ([Figure S3](#)). Given the recent advances in cryo-EM enabling the characterization of diverse conformational states from high-resolution maps, we anticipate that MDeNM-EMfit could be used as a tool for the interpretation of conformational variability from experiments.²⁸

As normal modes need to be recalculated at the beginning of each cycle, we adopted an elastic network model, previously shown to properly describe large amplitude motions in proteins.²⁹ Besides decreasing the computational time required to obtain the mode directions, the energy minimization step is no longer required. The recalculation of normal modes during the time course of the simulations ensures that excitation directions are continually reflecting the intrinsic motions of the intermediate structures. This strategy underlies other NMA-based approaches, such as iMODFIT and NMFF.^{16,17} Nevertheless, instead of only generating successive geometric deformations along normal modes, the entire conformational exploration provided by MDeNM-EMfit is accomplished using a physical atomic force field (e.g., CHARMM36³⁰). Indeed, as

C

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01148>
J. Chem. Inf. Model. XXXX, XXX, XXX–XXX

shown in Table 1, the best solutions generated by MDeNM-EMfit at high EM resolution exhibit geometric quality even

Table 1. Structural Quality Assessment of Results

Structure	Clashscore ^a	MolProbity score ^b
Target (1LST)	2.53	1.55
Best fit 3 Å	0	1.21
Best fit 5 Å	0.56	1.63
Best fit 8 Å	0.84	1.76

^aClashscore is defined as the number of clashes per 1000 contacts. ^bMolProbity score combines the Clashscore, rotamer, and Ramachandran evaluations into a single score. Lower values are related to higher structural quality.³¹

better than the structure considered to generate the target EM map. We also noticed fewer clashes as well as a better MolProbity³¹ score, which also accounts for rotamer and Ramachandran evaluations. This feature reveals an essential advantage of our strategy, given that previous studies report that other NMA-based approaches return structures with additional clashes and distortions in bond lengths and angles.^{14,17}

MDeNM-EMfit outcomes presented slightly higher RMSD values compared to other MD-based flexible fitting methods. This observation may be due to the lack of a biasing potential guiding our simulations. However, the addition of such potential is associated with the introduction of strong forces potentially leading to overfitting.^{14,27} Indeed, fitting simulations with MDFF usually require the addition of secondary structure restraints to prevent this effect.²⁷ On the other hand, MDeNM-EMfit simulations do not require any additional restraint since the extra kinetic energy is applied onto degrees of freedom corresponding to intrinsic motions encoded on the protein fold.³² We wonder whether the accuracy of simulations could be increased using a weak biasing potential, as the conformational search is performed following relaxed directions of motion. Therefore, we believe that the generation of deformed structures would decrease if the already available NMA- and MD-based fitting methods include the ideas proposed in this paper within their procedures.

The results presented in this paper demonstrate that MDeNM-EMfit has a high potential to work as a useful flexible fitting tool. This method can be applied to any protein with a known structure, including high-quality theoretical models. In this paper, all MD simulations were performed with the CHARMM program. The average computation time was 26 min per replica. The efficiency of the approach can still be increased upon optimizations on the current code. Moreover, the final version of the method will be adapted to work with other simulation programs as well as to take advantage of calculations in Graphical Processing Units (GPU). All simulations presented here were conducted in a single workstation using no more than 10 CPU cores. Each independent replica is executed in a single CPU core, therefore ensuring the multitasking nature of the method that is *per se* adapted to computer clusters.

If more computational resources are available (e.g., hundreds of processors), the number of replicas can be therefore readily increased. The accuracy of our predictions can also be improved upon MDeNM-EMfit simulations under more realistic representations of the environment (i.e., simulations in explicit solvent). Considering that increasing the complexity

of the system would require more intensive calculations, future studies will be essential to evaluate the trade-off between improved accuracy and speed of calculations.

Finally, there is plenty of room for testing modifications of the simulation parameters aiming to increase the accuracy and speed of the calculations. In this context, we expect that the quality of the results will be profoundly affected by the number of MD steps per cycle and the temperature of the simulations. Other important variables to be tested are related to the subspace defined by the normal modes, such as the number of directions considered for building linear combinations and the amount of kinetic energy injected per cycle. Thus, given the promising outcomes generated by the MDeNM-EMfit initial tests, our future studies will include optimization of simulation parameters and performance evaluations for larger systems.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.9b01148>.

Figure S1: Evolution of the cross-correlations with the target EM maps. Figure S2: Superposition of the 10 best solutions returned by MDeNM-EMfit. Figure S3: Superposition of the LAO experimental structures deposited in the PDB. Additional details of simulation protocols and list of PDB identifiers of the LAO structures considered in the experimental ensemble. (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Mauricio G. S. Costa – Programa de Computação Científica, Vice-Presidência de Educação, Informação e Comunicação, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; Museum National d'Histoire Naturelle, Institut de Minéralogie, Physique des Matériaux et Cosmochimie, IMPMC, Sorbonne Université, UMR 7590, CNRS, Paris 75005, France; Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée 61 Av du Président Wilson, École Normale Supérieure Paris-Saclay, UMR 8113, CNRS, Cachan 94235, France; orcid.org/0000-0001-5443-286X; Email: mauricio.costa@fiocruz.br

David Perahia – Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée 61 Av du Président Wilson, École Normale Supérieure Paris-Saclay, UMR 8113, CNRS, Cachan 94235, France; Email: david.perahia@ens-paris-saclay.fr

Authors

Charline Fagnen – Museum National d'Histoire Naturelle, Institut de Minéralogie, Physique des Matériaux et Cosmochimie, IMPMC, Sorbonne Université, UMR 7590, CNRS, Paris 75005, France; Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée 61 Av du Président Wilson, École Normale Supérieure Paris-Saclay, UMR 8113, CNRS, Cachan 94235, France

Catherine Vénien-Bryan – Museum National d'Histoire Naturelle, Institut de Minéralogie, Physique des Matériaux et Cosmochimie, IMPMC, Sorbonne Université, UMR 7590, CNRS, Paris 75005, France

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.9b01148>

D

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01148>
J. Chem. Inf. Model. XXXX, XXX, XXX–XXX

Author Contributions

M.G.S.C. designed and performed the research, analyzed data, and wrote the paper. C.F. performed the research, analyzed data, and wrote the paper. C.V.-B. designed the research, analyzed data, and wrote the paper. D.P. designed the research, analyzed data, and wrote the paper.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

M.G.S.C. and D.P. are thankful for the Brazilian-French collaborative project CAPES/COFECUB (Project 873/2017). M.G.S.C., C.F., and C.V.-B. would like to thank the French agency funding Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR-18-CE11-0008).

REFERENCES

- (1) Parida, B. K.; Panda, P. K.; Misra, N.; Mishra, B. K. MaxMod: a hidden Markov model based novel interface to MODELLER for improved prediction of protein 3D models. *J. Mol. Model.* **2015**, *21*, 30.
- (2) Kelley, L. A.; Mezulis, S.; Yates, C. M.; Wass, M. N.; Sternberg, M. J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 845–858.
- (3) Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 725–738.
- (4) Lawson, C. L.; Baker, M. L.; Best, C.; Bi, C.; Dougherty, M.; Feng, P.; van Ginkel, G.; Devkota, B.; Lagerstedt, I.; Ludtke, S. J.; Newman, R. H.; Oldfield, T. J.; Rees, L.; Sahni, G.; Sala, R.; Velankar, S.; Warren, J.; Westbrook, J. D.; Henrick, K.; Kleywegt, G. J.; Berman, H. M.; Chiu, W. EMDataBank.org: unified data resource for CryoEM. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D456–464.
- (5) Wriggers, W.; Chacon, P. Modeling tricks and fitting techniques for multiresolution structures. *Structure* **2001**, *9*, 779–788.
- (6) Baker, T. S.; Johnson, J. E. Low resolution meets high: towards a resolution continuum from cells to atoms. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 585–594.
- (7) Volkman, N.; Hanein, D.; Ouyang, G.; Trybus, K. M.; DeRosier, D. J.; Lowey, S. Evidence for cleft closure in actomyosin upon ADP release. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 1147–1155.
- (8) Perilla, J. R.; Goh, B. C.; Cassidy, C. K.; Liu, B.; Bernardi, R. C.; Rudack, T.; Yu, H.; Wu, Z.; Schulten, K. Molecular dynamics simulations of large macromolecular complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2015**, *31*, 64–74.
- (9) Maximova, T.; Moffatt, R.; Ma, B.; Nussinov, R.; Shehu, A. Principles and Overview of Sampling Methods for Modeling Macromolecular Structure and Dynamics. *PLoS Comput. Biol.* **2016**, *12*, No. e1004619.
- (10) Bernardi, R. C.; Melo, M. C. R.; Schulten, K. Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2015**, *1850*, 872–877.
- (11) Ho, B. K.; Perahia, D.; Buckle, A. M. Hybrid approaches to molecular simulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 386–393.
- (12) Goh, B. C.; Hadden, J. A.; Bernardi, R. C.; Singharoy, A.; McGreevy, R.; Rudack, T.; Cassidy, C. K.; Schulten, K. Computational Methodologies for Real-Space Structural Refinement of Large Macromolecular Complexes. *Annu. Rev. Biophys.* **2016**, *45*, 253–278.
- (13) Trabuco, L. G.; Villa, E.; Mitra, K.; Frank, J.; Schulten, K. Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics. *Structure* **2008**, *16*, 673–683.
- (14) Orzechowski, M.; Tama, F. Flexible fitting of high-resolution x-ray structures into cryoelectron microscopy maps using biased molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **2008**, *95*, S692–S705.
- (15) Cui, Q.; Bahar, I. *Normal Mode Analysis: Theory and Applications to Biological and Chemical Systems*; Taylor & Francis, 2005.
- (16) Tama, F.; Miyashita, O.; Brooks, C. L., 3rd Normal mode based flexible fitting of high-resolution structure into low-resolution experimental data from cryo-EM. *J. Struct. Biol.* **2004**, *147*, 315–326.
- (17) Lopez-Blanco, J. R.; Chacon, P. iMODFIT: efficient and robust flexible fitting based on vibrational analysis in internal coordinates. *J. Struct. Biol.* **2013**, *184*, 261–270.
- (18) Suhre, K.; Navaza, J.; Sanejouand, Y.-H. NORMA: a tool for flexible fitting of high-resolution protein structures into low-resolution electron-microscopy-derived density maps. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 1098–1100.
- (19) Costa, M. G.; Batista, P. R.; Bisch, P. M.; Perahia, D. Exploring free energy landscapes of large conformational changes: molecular dynamics with excited normal modes. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 2755–2767.
- (20) Floquet, N.; Costa, M. G.; Batista, P. R.; Renault, P.; Bisch, P. M.; Raussin, F.; Martinez, J.; Morris, M. C.; Perahia, D. Conformational Equilibrium of CDK/Cyclin Complexes by Molecular Dynamics with Excited Normal Modes. *Biophys. J.* **2015**, *109*, 1179–1189.
- (21) Brooks, B. R.; Brooks, C. L., 3rd; Mackerell, A. D., Jr.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoscek, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 1545–1614.
- (22) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- (23) Skjaerven, L.; Yao, X. Q.; Scarabelli, G.; Grant, B. J. Integrating protein structural dynamics and evolutionary analysis with Bio3D. *BMC Bioinf.* **2014**, *15*, 399.
- (24) R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015.
- (25) Grant, B. J.; Rodrigues, A. P.; ElSawy, K. M.; McCammon, J. A.; Caves, L. S. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 2695–2696.
- (26) Oh, B. H.; Pandit, J.; Kang, C. H.; Nikaido, K.; Gokcen, S.; Ames, G. F.; Kim, S. H. Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11348–11355.
- (27) McGreevy, R.; Teo, I.; Singharoy, A.; Schulten, K. Advances in the molecular dynamics flexible fitting method for cryo-EM modeling. *Methods* **2016**, *100*, 50–60.
- (28) Murata, K.; Wolf, M. Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2018**, *1862*, 324–334.
- (29) Yao, X. Q.; Skjaerven, L.; Grant, B. J. Rapid Characterization of Allosteric Networks with Ensemble Normal Mode Analysis. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 8276–8288.
- (30) Huang, J.; Rauscher, S.; Nawrocki, G.; Ran, T.; Feig, M.; de Groot, B. L.; Grubmuller, H.; MacKerell, A. D., Jr. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 71–73.
- (31) Williams, C. J.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Prisant, M. G.; Videau, L. L.; Deis, L. N.; Verma, V.; Keedy, D. A.; Hintze, B. J.; Chen, V. B.; Jain, S.; Lewis, S. M.; Arendall, W. B., 3rd; Snoeyink, J.; Adams, P. D.; Lovell, S. C.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci.* **2018**, *27*, 293–315.
- (32) Bahar, I.; Cheng, M. H.; Lee, J. Y.; Kaya, C.; Zhang, S. Structure-Encoded Global Motions and Their Role in Mediating Protein-Substrate Interactions. *Biophys. J.* **2015**, *109*, 1101–1109.

E

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01148>
J. Chem. Inf. Model. XXXX, XXX, XXX–XXX

Supporting Information

A New Strategy for Atomic Flexible Fitting in Cryo-EM Maps by Molecular Dynamics With Excited Normal Modes (MDeNM-EMfit)

Mauricio G.S Costa^{1, 2,3*}, Charline Fagnen^{2,3}, Catherine Vénien-Bryan² & David Perahia^{3*}

¹ Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Computação Científica, Vice-Presidência de Educação, Informação e Comunicação. Av. Brasil 4365, Residência Oficial, Manguinhos. 21040-900, Rio de Janeiro, Brazil.

² Sorbonne Université, UMR 7590, CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Institut de Minéralogie, Physique des Matériaux et Cosmochimie, IMPMC. 4 place Jussieu, 75005, Paris, France.

³ École Normale Supérieure Paris-Saclay, UMR 8113, CNRS, Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée, 61 Av du Président Wilson, 94235, Cachan, France

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: mauricio.costa@fiocruz.br & david.perahia@ens-paris-saclay.fr

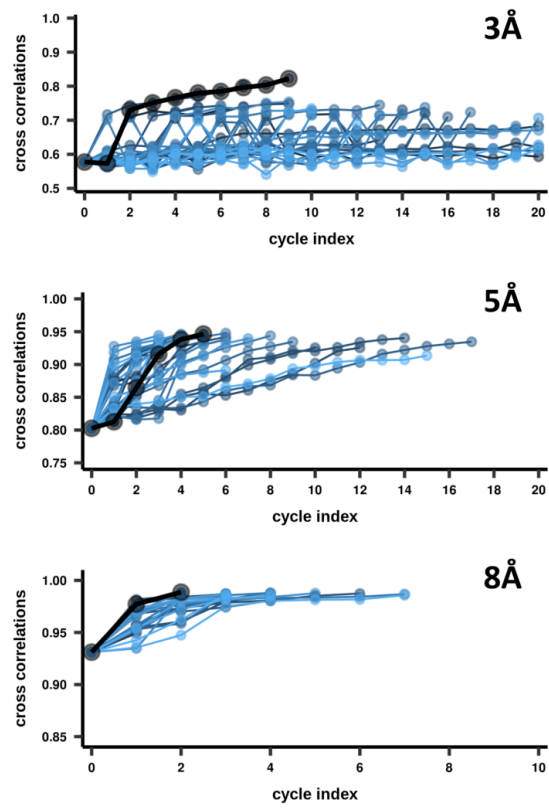


Figure S1: Evolution of the cross-correlations with the target EM maps calculated in different resolutions. Each plot displays the results from 30 independent replicas. The simulations leading to higher c.c values are represented in black for each resolution considered.

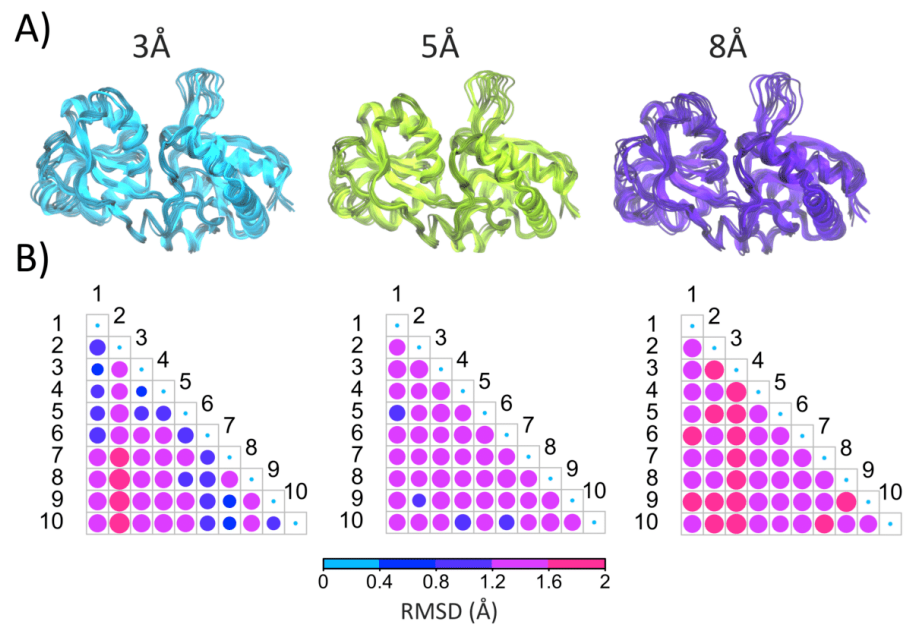


Figure S2: (A) Superposition of the 10 best solutions returned by MDeNM-EMfit in different resolutions. (B) Matrices of pairwise RMSD calculated for the best solutions. Colored as indicated in the legend.

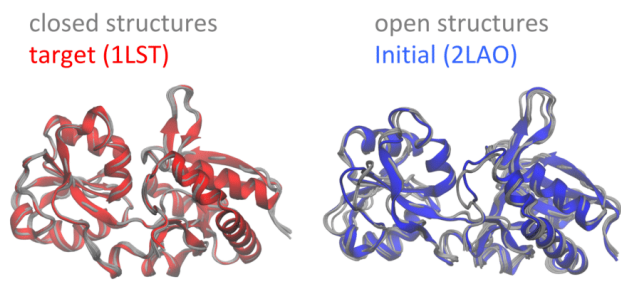


Figure S3: Superposition of the LAO experimental structures deposited in the PDB (according to the list given in this supplementary material) onto the closed and open states (gray tubes). The initial and target structures considered in this study are represented in blue and red, respectively.

Additional details of the MDeNM-EMfit protocol

Atomic coordinates and experimental dataset

The LAO atomic coordinates selected for the calculations performed in this study were downloaded in the Protein Data Bank ¹. The entry 2LAO corresponding to the open state was taken as the starting structure and the entry 1LST (closed state) was selected for generation of theoretical EM maps ². The ensemble of experimental conformations was obtained using ProDy v.1.9.3 ³. First, we carried out a blast search against the PDB to retrieve structures sharing at least 90% sequence identity with the reference structure 2LAO. A list of the PDB IDs of this experimental data set is provided after this section. Then, the C_α atoms from these structures were superposed using the Kabsch algorithm. The most relevant structural variations found in the dataset were identified with a principal component analysis (PCA). Briefly, PCA is based on the diagonalization of the covariance matrix, C_(i,j), of atomic positions whose elements are represented by

$$C_{(i,j)} = \langle \Delta r_i \cdot \Delta r_j \rangle$$

where Δr_i and Δr_j indicate the displacement vectors of atoms i and j, respectively, from their average positions. Brackets indicate ensemble averages. Then, an eigenvalue problem is solved, resulting in 3N PCs that can be sorted according to their fractional contributions to the overall variance. In our case, the cumulative contribution provided by the first two PCs was approximately 98 %.

Generation of simulated maps

Simulated maps were generated with the EMAN2 software ⁴. The atomic structures considered were treated with the pdb2mrc routine to generate a Gaussian for each atom, taking into account their number of electron and their coordinates. It is possible to specify the resolution of the map to produce the density corresponding to the resolution of the target map used as reference. No symmetry was applied.

Fitting and cross-correlations between simulated and experimental maps

Fitting of atomic structures into the reference maps was performed with the fitmap module of Chimera ⁵. This program optimizes the overlap of the simulated and reference maps then computes a correlation score to evaluate the similarity between

them. The correlation between the two maps represents the sum of the common map grid points determined by trilinear interpolation. The score corresponds to the inner product of the vectors (that contains the values of the simulated map) and the vector (that contains the corresponding values of the reference map). A score named cross-correlation (c.c) is defined with values between 0 and 1. According to this analysis, the maximum value corresponds to a perfect correlation.

$$c.c = \langle \vec{u}, \vec{v} \rangle$$

Equilibration of the starting structure

The MD simulation steps were performed using CHARMM v.42b1⁶. Initially, hydrogen atoms were added to the reference structure using the HBUILD routine and topologies were generated using the parameter set 36m⁷. Van der Waals interactions were calculated up to 10 Å, being approximated until 12 Å by using a switching function. Electrostatic interactions were calculated using a distance-dependent dielectric constant ($\epsilon = 2r_{ij}$). The SHAKE algorithm⁸ was used to fix the bonds within protein hydrogen atoms, allowing an integration time step of 2 fs.

The starting conformation was initially subjected to an energy minimization procedure using the conjugate-gradient algorithm, keeping protein heavy atoms harmonically restrained with a force constant of 10 kcal mol⁻¹Å⁻² to avoid artificial structural distortions. These restraints were progressively decreased to 2.5 during 500 ps of heating MD in which velocities were assigned accordingly to a Maxwell Boltzmann distribution corresponding to 50 K and then slowly increased to 300 K. Then, during the equilibration phase, the positional restraints were progressively decreased to zero during the first half of a 1 ns constant temperature MD, while in the remaining part, all restraints were removed. The coordinates and velocities obtained at the end of the equilibration were taken as starting conditions for the first MDeNM cycle.

MDeNM simulations

All simulations were carried out following the description presented in the Figure 1 of the manuscript. Apart from the MD simulation steps and c.c calculation, all procedures were conducted using R v.3.5.1⁹ in conjunction with the Bio3D package v.

2.3.3^{10, 11}. Normal modes calculations were performed using the AAENM atomistic elastic network model with the rotation-translation blocks (RTB) approximation¹² (one residue per block), as included in the Bio3D package¹³.

Each MDeNM cycle starts with NM calculation on the reference structure followed by c.c evaluation compared to the target map. Subsequently a linear combination of the selected modes is built defining a trial vector ($\mathbf{Q}_i = \sum_{i=1}^n \alpha_i \mathbf{q}_i$). Here, we adopted the empirical observation previously reported that 5% of the low-frequency modes yield the best results¹⁴. Subsequently, a 1Å root mean square (RMS) deformation along each vector was performed, producing a decoy structure. The correlation between a simulated map calculated from this structure and the target map is compared to the initial c.c:

$$\Delta_{c.c} = c.c_{decoy} - c.c_{ref}$$

Positive $\Delta_{c.c}$ values indicate that the trial vector contributes to increasing the accordance with the EM map. In this case the vector is accepted; otherwise, new combinations are tested until this criterion is satisfied. Subsequently, each accepted unit vector is mass-weighted and ($Q_i = Q \cdot \frac{1}{M_i}$) and scaled by the λ parameter to add the desired the extra kinetic energy (here $\Delta K_{nm} = 5kcal/mol$) to the system:

$$\lambda = \frac{2\Delta K_{nm}^{1/2}}{MQ_i^2}$$

In the excitation step, the cartesian atomic velocities related to the NM space ($v_{nm} = \lambda Q_i$) are added to the velocities of the last step of the previous simulation defining a new set of initial velocities ($v_{tot} = v_{curr} + v_{nm}$).

These steps are repeated throughout the following cycles, taken as initial structures those obtained at the end of the previous one. Then a simulated EM map is generated from the structures obtained at the end of each cycle and c.c calculation is performed. This procedure is repeated until convergence of the c.c values.

List of PDB identifiers considered in the LAO ensemble

2LAO 5OWF 6FT2 6MKW 6MKU 6MKX 1LAF 6ML0
1LAH 6ML9 1LAG 1LST 6MLG 6MLE 6MLD 6MLA
6MLO 6MLN 6MLJ 6MLI 6MLV 6MLP

Additional references

1. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E., The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **2000**, *28*, 235-242.
2. Oh, B. H.; Pandit, J.; Kang, C. H.; Nikaido, K.; Gokcen, S.; Ames, G. F.; Kim, S. H., Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 11348-11355.
3. Bakan, A.; Bahar, I., The intrinsic dynamics of enzymes plays a dominant role in determining the structural changes induced upon inhibitor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 14349-14354.
4. Tang, G.; Peng, L.; Baldwin, P. R.; Mann, D. S.; Jiang, W.; Rees, I.; Ludtke, S. J., EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol* **2007**, *157*, 38-46.
5. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E., UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **2004**, *25*, 1605-1612.
6. Brooks, B. R.; Brooks, C. L., 3rd; Mackerell, A. D., Jr.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoseck, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M., CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* **2009**, *30*, 1545-1614.
7. Huang, J.; Rauscher, S.; Nawrocki, G.; Ran, T.; Feig, M.; de Groot, B. L.; Grubmuller, H.; MacKerell, A. D., Jr., CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods* **2017**, *14*, 71-73.
8. Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C., Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* **1977**, *23*, 327-341.
9. R Core Team *R: A language and environment for statistical computing.*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2015.
10. Grant, B. J.; Rodrigues, A. P.; ElSawy, K. M.; McCammon, J. A.; Caves, L. S., Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 2695-2696.
11. Skjaerven, L.; Yao, X. Q.; Scarabelli, G.; Grant, B. J., Integrating protein structural dynamics and evolutionary analysis with Bio3D. *BMC Bioinformatics* **2014**, *15*, 399.
12. Durand, P.; Trinquier, G.; Sanejouand, Y.-H., A new approach for determining low-frequency normal modes in macromolecules. *Biopolymers* **1994**, *34*, 759-771.
13. Yao, X. Q.; Skjaerven, L.; Grant, B. J., Rapid Characterization of Allosteric Networks with Ensemble Normal Mode Analysis. *J Phys Chem B* **2016**, *120*, 8276-8288.
14. Lopez-Blanco, J. R.; Chacon, P., iMODFIT: efficient and robust flexible fitting based on vibrational analysis in internal coordinates. *J Struct Biol* **2013**, *184*, 261-270.

3.2 Chapitre 2: Détermination de la structure de Kir2.1 par Cryo-Microscopie

3.2.1.1 Introduction

Despite an increasing number of structures, Kir2.1 human is not resolved today. The best result in the resolution of this structure is the work of Pegan from 2005 with the PDB ID 1U4F(410). Unfortunately, this latter describes only the cytoplasmic domain. To better understand the mechanism of this channel, scientists need access to the globality of the channel. It is why our laboratory has expressed, purified and characterized the protein Kir2.1. Our goal is to reach the structure of Kir2.1 at an atomic level. Here are presented our preliminary results.

3.2.1.2 Results

3.2.1.2.1 Expression, purification and biochemical characterization of the human Kir2.1 channel

The protein Kir2.1 was expressed and purified according to the material and methods.

The electrophoresis of the purified protein in denatured conditions (Figure 61A) shows the monomer at the expected MW of approximately 51.1 KDa.

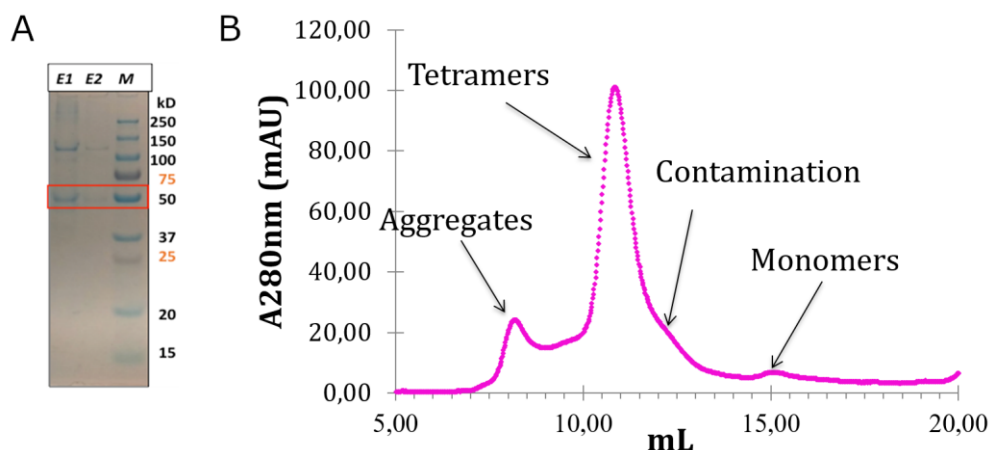


Figure 61 - A) Denaturing gels 12% of Kir2.1 WT. Visible red band on the left corresponding to the monomer of Kir2.1 after purification. B) Profile of the size exclusion chromatography of Kir2.1 WT, the tetramer is eluted at 11 mL.

The profile of the gel exclusion of human Kir2.1 is shown in figure 61B. The protein is collected at a fraction corresponding to the Kir tetramer.

Mass spectrometry (Matrix Science) from LC-MS/MS data following in-gel tryptic digest of each carefully dissected band confirmed that the band shown Figure 61A is the human Kir2.1 channel experiments were done at the Mass Spectrometry at the Pasteur Institute.

3.2.1.2.2 Image Analysis

This work was realized with Leonardo Feletto a student in Master 2 internship that I have co-supervised with the Pr. Vénien-Bryan.

The images were collected at the Pasteur Institute by Gérard Pehau-Arnaudet. He used the microscope FEI Tecnai F20 TEM and the detector: Falcon II DED. The grids were carbon-coated. The pictures were obtained using an electron beam accelerated at 200kV, the spherical aberration of the microscope is 2.0 mm and the amplitude contrast of 0.1. The size of the pixel is 1.99 Å/pix. To perform this analysis, EMAN2 was used for all the steps of the analysis.

Manual picking was realized with EMAN2: 36 927 particles with a box size of 128 pixels were extracted from 40 micrographs and 7 movies (Figure 62A). We proceeded to a 2D classification with EMAN that allow the deletion of bad particles. After the selection of particles following the 2D classification (Figure 62B), it remains 16 396 particles.

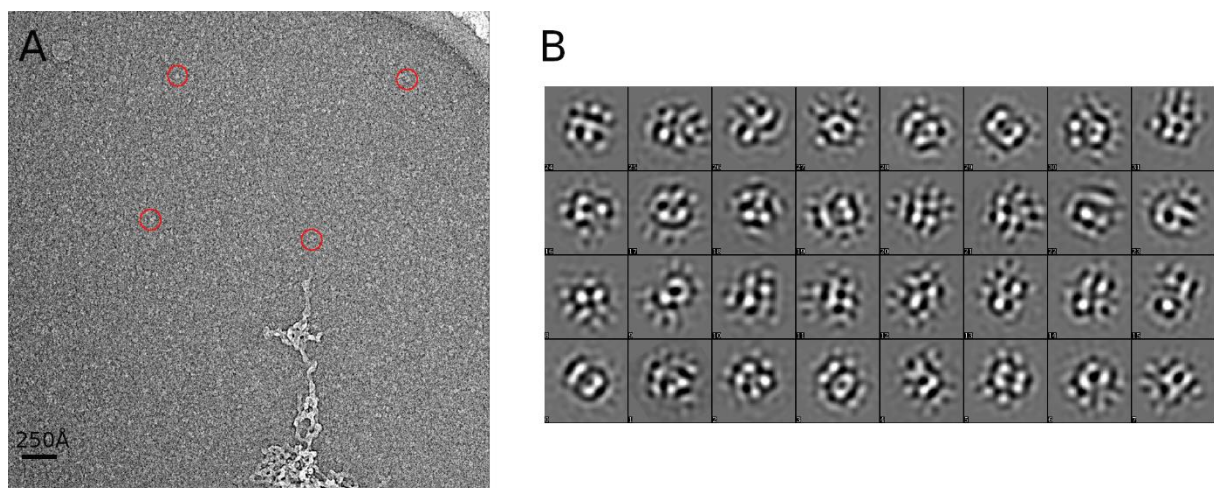


Figure 62 - Picking and 2D classification. A) Example of micrographs of cryo-EM to pick. In red, four examples of particles detected. B) 2D classification of the particles.

The initial model used in the refinement is the modelling of Kir2.1 build with i-Tasser from the sequence and filtered at 40Å (Figure 63A). Several other models were tested like the pdb id 3JYC representing the Kir2.2 chicken filtered at 40Å to evaluate the bias of the model in the 3D refinement. A C₄ symmetry is applied to the system.

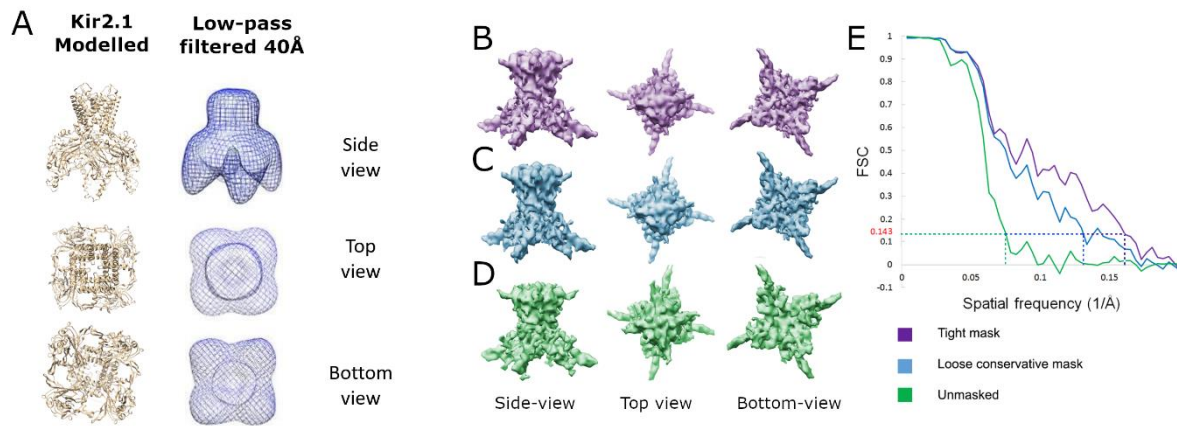


Figure 63 - Refinement 3D of human Kir2.1. A) Initial modelled structure of Kir2.1 used for the refinement (i-Tasser). The structure is low-passed to 40Å to be used as model. B and E) Final result with the application of a tight mask: 13.4Å. C and E) Final result with the application of a conservative masked: 7.7Å. D and E) Final result without mask: 6.2Å.

The final structure is obtained at 6.2Å resolution (Figure 63E). We analysed the populations of the orientations of the particles. We do not cover all the orientations. To obtain a better resolution it is necessary to pick other orientations of the protein: lateral/side views are missing (Figure 63). However, it is possible to distinguish the slides-helices and the outer helices on the Figure 63.

We need many more particles, taken from state-of-the-art microscope such as the Krios Titan 300 Kv and a camera in movie-mode. This is planned in the very near future.

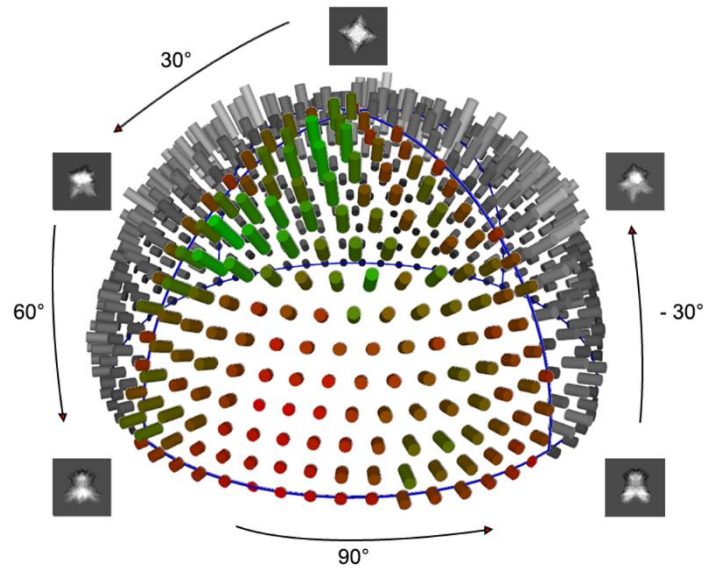


Figure 64 - Distribution of orientations of the final structure composing particles. A) Graphical representation of particles orientations as they are distributed on the structure. Every peak on the Euler sphere surface represents an orientation of particles generated during the final 3D refinement. More the peak is high and green, more the orientation is populated. Around the Euler sphere, projection of the final structure corresponding to the orientation of the classes are shown.

3.2.1.2.3 Functional studies

Functional studies confirms that the protein synthesized is active: the open probability of human Kir2.1 WT is 12%. The Ba^{2+} plays its inhibitor role.

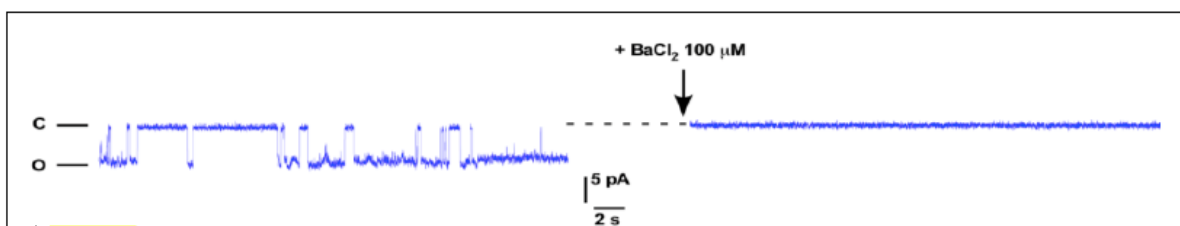


Figure 65 - Functional reconstitution of the purified Kir2.1 protein in black lipid membranes. Recording of reconstituted Kir2.1 in lipid bilayers in presence of 1% PIP, at -100 mV. A cluster of 3 channels is gating between open (O) and closed states. Channel activity was completely silenced by application of 100 μM BaCl_2 .

3.2.1.3 Methods

3.2.1.3.1 Expression of the human Kir2.1 channel

Expression was performed in *Pichia pastoris*. As a eukaryote, *Pichia pastoris* has many of the advantages of higher eukaryotic expression systems such as protein processing, protein folding, and post-translational modification, while being nearly as easy to manipulate as *E. coli* or *Saccharomyces cerevisiae*. It is faster, easier, and less expensive to use than other eukaryotic expression systems such as baculovirus or mammalian tissue culture. *Pichia pastoris* is a methylotrophic yeast, capable of metabolizing methanol as its sole carbon source.

In collaboration with Dr R. Wagner at the IMPReSs facility in Strasbourg we have engineered the clone for the human Kir2.1 (*KCNJ2*) which was introduced in *Pichia pastoris* SMD1163 strain.

For expression, small cultures grown from the best expressing colony were diluted into Buffered Glycerol-complex Medium (BMGY) and grown at 30°C overnight until OD₆₀₀ reached about 3. Cells were then pelleted, resuspended in Buffered Methanol-complex Medium (BBM) and expressed overnight at 19°C. Cells were harvested, and stored at -80 °C until needed.

3.2.1.3.2 Purification of the human Kir2.1 channel

For purification, yeast cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 150mM KCl, complete-EDTA free protease inhibitor and PMSF 1mM) and lysed at high pressure (6 passes at high pressure, 40 kPSI) using a Constant System Cell Disrupter. Cell debris was removed by a 5 min centrifugation at 500g. The supernatant was collected and centrifuged for 30 min at 100,000g to collect crude membranes and homogenized in resuspension buffer (50 mM Tris 7.4, KCl 150 mM, Complete EDTA-free protease inhibitor) to about 4 to 8 mg/mL total protein and then solubilized by the addition of 1.5 % DDM for 2 h at room temperature. Solubilized membranes were clarified by centrifugation at 100,000g, 30 min at 4°C.

HisPur Cobalt Resin was added to the supernatant and spun slowly on a wheel for 1 h at 4 °C. The resin was packed into a drip column, washed with wash buffer with progressively reduced detergent concentrations to 0.03% DDM and eluted with 90 mM, 110mM, 350 mM and 450 mM Imidazole. Elution fractions were combined, concentrated using a 100,000

molecular weight cut-off concentrator (Vivaspin), and separated by gel filtration on a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) pre-equilibrated in 20 mM Tris 7.4, 150 mM KCl, 2 mM DTT, 1mM EDRA and 0.03% DDM.

3.2.1.3.3 SDS/PAGE and Western blotting

Standard techniques were used for protein electrophoresis on 10% SDS/PAGE gel. Gels were stained with Instant Blue Coomassie reagent. For Western blots, 1 µg purified protein were run on an SDS/PAGE gel and transferred onto a PVDF membrane. Membranes were blocked for 1 h at room temperature with TBST + 2% BSA, and blotted with an anti-HIS antibody (1:750) in TBST + 2% BSA. Secondary anti-rabbit antibodies coupled to horseradish peroxidase (HRP)1 were used at a 1:5000 dilution and the bands visualized by incubation in ECL Western blotting detection reagents.

3.2.1.3.4 Functional activity of the channel

This activity test on our purified protein Kir2.1 was done by Dr Said Bendahhou our collaborator at Nice University. An Orbit mini was used (Nanion, Germany, horizontal planar lipid bilayer system), where two aqueous chambers (150 µL) are separated by a partition with a 100-µm hole where the lipid bilayer is formed by 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC, 15–30 pF). The lower chamber contained 150 mM KCl, 10 mM MOPS, pH 7.4. The upper chamber contained 150 mM KCl, 10 mM MOPS pH 8. 1 µL of purified Kir2.1 (90 µg/mL) in DDM detergent (0.015 %) was added to the upper chamber to a preformed bilayer. Currents were recorded using Elements Data Reader (Nanion, Germany) and analysed using Clampfit (Axon Instrument Inc, USA) software, sampled at 100 µs and filtered at 1.25 kHz.

4 Conclusions et Perspectives

La raison d'être de cette thèse est d'approfondir nos connaissances sur les canaux Kir d'un point de vue structural - par cristallographie des rayons X, et cryo-microscopie combinée à l'analyse d'images - mais aussi dynamique - par des simulations de dynamique moléculaire. A travers les collaborations de l'équipe, nous avons pu enrichir notre recherche en combinant nos données théoriques à des données expérimentales et appréhender les canaux Kir sous différents points de vue.

Nous avons pu compter sur les données de HDX-MS du Dr. Éric Forest donnant accès à la flexibilité expérimentale; les données du Dr. Saïd Bendahhou qui a pu nous éclairer sur la fonction du canal et des données de cristallographie des rayons X du laboratoire. Ceci nous a permis de confronter nos résultats ainsi que nos hypothèses à la réalité du vivant.

Ce projet visait quatre objectifs :

- ✓ Comprendre le mécanisme général d'ouverture/fermeture des canaux Kir en étudiant son homologue bactérien KirBac3.1.
- ✓ Comprendre l'effet de la mutation W68R sur les canaux Kir6.2 par l'intermédiaire de la mutation W46R du KirBac3.1: pourquoi cette mutation cause-t-elle un changement d'activité du canal en entraînant une pathologie : l'hyperinsulinisme ?
- ✓ Comprendre l'effet de la mutation S129R chez le KirBac3.1, pourquoi cette mutation entraîne une structure ouverte en cristallographie alors que ce canal sous forme sauvage est plus stable à l'état fermé?
- ✓ Résoudre la structure du canal Kir2.1 chez l'humain afin de faire un pas en avant dans la compréhension de son mécanisme et ainsi, avoir une meilleure chance de traiter les maladies en découlant comme le syndrome d'Andersen.

Pour réaliser les trois premiers points, nous nous sommes majoritairement appuyés sur une nouvelle méthode mis au point en 2015 par l'équipe du Dr. Perahia : la MDeNM(252). L'intérêt de cette méthode est d'accéder à des structures en quelques nanosecondes de simulations alors qu'en employant une dynamique classique, nous aurions dû simuler des microsecondes pour aboutir à ce résultat. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'HDX-MS du Dr. Forest et aux données d'électrophysiologie du Dr. Bendahhou. Pour l'ensemble des

résultats obtenus par la MDeNM, il est important de préciser que les résultats de cette méthode théorique ont été en accord avec les données expérimentales à notre disposition.

Concernant l'étude du canal KirBac3.1 WT, des mouvements majeurs ont été répertoriés comme jouant un rôle dans l'ouverture du canal. Ces derniers correspondent au balancement du domaine cytoplasmique, aux mouvements de pivot et de soulèvement de l'hélice de glissement ainsi que les coudes des hélices transmembranaires. Ces mouvements ont montré une corrélation avec l'ouverture du canal. Nous n'avons malheureusement pas pu extraire de chronologie des événements. Cependant ce travail a permis de mettre en évidence le rôle de l'hélice de glissement dans l'ouverture du canal ainsi que le mouvement de balancement du domaine cytoplasmique.

Cette étude ne suffit pas pour expliquer le mécanisme d'ouverture des canaux de la famille Kir. Le but étant de comprendre le mécanisme des canaux Kir2.1 et Kir6.2 humains, certaines améliorations de l'étude pourraient être mises en place. Il a été montré dans la littérature qu'un lipide : le PIP2 était impliqué dans l'ouverture du canal Kir2.1(69, 411, 412). Ainsi, il pourrait être envisagé de réaliser une étude par dynamique moléculaire à gros grains de la protéine Kir2.1 avec ce lipide. Ce protocole pourrait permettre de comprendre : i) comment et où va se fixer le PIP2 sur le canal, 2) son impact sur l'ouverture du canal.

Dans un second temps, nous avons travaillé sur le KirBac3.1 W46R, il s'agit d'une mutation très proche de l'hélice de glissement, situé tout en bas de l'hélice externe (vers le domaine cytoplasmique). Nous avons étudié cette mutation car sur le Kir6.2 humain, cette dernière cause des pathologies liées au diabète : l'hyperinsulinisme. Nous avons déterminé qu'il y avait un changement du réseau d'interactions au niveau de la mutation. En effet, les bas des hélices transmembranaires s'éloignent les uns des autres et privilégient un rapprochement entre le bas des hélices transmembranaires et l'hélice de glissement. Ces mouvements facilitent l'ouverture du canal.

Pour prolonger cette étude, il serait intéressant de prendre en compte une spécificité du canal Kir6.2 humain. En effet, le canal Kir6.2 humain est entouré de 4 protéines récepteurs dites SUR. Les prendre en compte dans la modélisation permettrait une vue plus précise de ce qui se passe au sein de la protéine. D'ailleurs des structures récentes ont mené à la résolution du complexe canal Kir6.2/SUR à haute résolution(105). Ces structures pourraient servir de point

de départ à cette étude. Le complexe étant assez lourd, une modélisation gros grains serait plus désirable.

Dans un troisième temps, nous avons procédé à la comparaison du canal KirBac3.1 WT sous forme fermée et du canal KirBac3.1 S129R sous forme ouverte. Cette étude nous a permis de comparer et de détecter des changements conformationnels tels que : le coude au niveau de l'hélice externe et la rotation du domaine cytoplasmique.

Cependant, il est assez difficile de distinguer les spécificités conformationnelles caractéristiques de la mutation et celles de l'état ouvert. Nous avons étudié ici la forme du KirBac3.1 S129R telle qu'elle est présentée dans la base de données des PDB. Le backbone de ce modèle est très différent de celui à l'état sauvage, ainsi nous sommes actuellement en train de réaliser une étude sur le canal KirBac3.1 sauvage et avons réalisé nous-même la mutation S129R par Chimera. L'objectif de cette investigation est de savoir si les changements conformationnels observés alors correspondent à ceux obtenus dans notre étude.

Dans un dernier temps, nous avons travaillé à la résolution de structure du Kir2.1 humain par cryo-microscopie électronique combinée à l'analyse d'images. Ce canal est actuellement indisponible dans la base de données PDB. Le canal Kir2.1 montre des différences structurales avec le KirBac3.1 comme : une plus grande séquence d'acides aminés localisée entre le domaine cytoplasmique et le bas du canal, l'influence de ce domaine permettrait une meilleure compréhension du mécanisme du canal. Notre meilleur résultat montre une résolution à 7Å.

La proximité du microscope à haute performance, le Krios Titan 300kV FEG à l'institut Pasteur, permettra la collecte de plusieurs centaines de milliers d'images avec une caméra à détection directe d'électrons en mode « movie ». Ceci contribuera à l'obtention d'une meilleure résolution, avec un meilleur échantillonnage 2D et plus d'orientations différentes de la protéine.

Cette thèse a apporté des précisions sur les différents changements conformationnels opérant dans le mécanisme d'ouverture/fermeture du canal. Elle a aussi étudié l'impact de deux mutations sur le canal en proposant un mécanisme pour une d'elle (W46R) et une explication pour la seconde(S129R). Un premier modèle du canal Kir2.1 a été réalisé par cryo-microscopie à une résolution autour de 7 Å, une amélioration de ce dernier est en cours.

5 Bibliographie

1. MACKINNON, Roderick. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. 20 août 2004. Vol. 43, n° 33, pp. 4265-4277. DOI 10.1002/anie.200400662.
2. GARDOS, G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta*. décembre 1958. Vol. 30, n° 3, pp. 653-654. DOI 10.1016/0006-3002(58)90124-0.
3. GRUBE, Sabrina, GERCHEN, Martin F., ADAMCIO, Bartosz, PARDO, Luis A., MARTIN, Sabine, MALZAHN, Dörthe, PAPIOL, Sergi, BEGEMANN, Martin, RIBBE, Katja, FRIEDRICHS, Heidi, RADYUSHKIN, Konstantin A., MÜLLER, Michael, BENSELER, Fritz, RIGGERT, Joachim, FALKAI, Peter, BICKEBÖLLER, Heike, NAVE, Klaus-Armin, BROSE, Nils, STÜHMER, Walter et EHRENREICH, Hannelore. A CAG repeat polymorphism of KCNN3 predicts SK3 channel function and cognitive performance in schizophrenia. *EMBO molecular medicine*. juin 2011. Vol. 3, n° 6, pp. 309-319. DOI 10.1002/emmm.201100135.
4. POTIER, Marie, JOULIN, Virginie, ROGER, Sébastien, BESSON, Pierre, JOURDAN, Marie-Lise, LEGUENNEC, Jean-Yves, BOUGNOUX, Philippe et VANDIER, Christophe. Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Molecular Cancer Therapeutics*. novembre 2006. Vol. 5, n° 11, pp. 2946-2953. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-06-0194.
5. DINESS, Jonas Goldin, SØRENSEN, Ulrik S., NISSEN, Jakob Dahl, AL-SHAHIB, Baha, JESPERSEN, Thomas, GRUNNET, Morten et HANSEN, Rie Schultz. Inhibition of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels terminates and protects against atrial fibrillation. *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology*. août 2010. Vol. 3, n° 4, pp. 380-390. DOI 10.1161/CIRCEP.110.957407.
6. KETCHUM, K. A., JOINER, W. J., SELLERS, A. J., KACZMAREK, L. K. et GOLDSTEIN, S. A. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*. 24 août 1995. Vol. 376, n° 6542, pp. 690-695. DOI 10.1038/376690a0.
7. HODGKIN, A. L. et HUXLEY, A. F. Movement of sodium and potassium ions during nervous activity. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1952. Vol. 17, pp. 43-52. DOI 10.1101/sqb.1952.017.01.007.
8. LESAGE, F., REYES, R., FINK, M., DUPRAT, F., GUILLEMARE, E. et LAZDUNSKI, M. Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *The EMBO journal*. 2 décembre 1996. Vol. 15, n° 23, pp. 6400-6407.
9. MA, Lijiang, ROMAN-CAMPOS, Danilo, AUSTIN, Eric D., EYRIES, Mélanie, SAMPSON, Kevin S., SOUBRIER, Florent, GERMAIN, Marine, TRÉGOUËT, David-Alexandre, BORCZUK, Alain, ROSENZWEIG, Erika Berman, GIRERD, Barbara, MONTANI, David, HUMBERT, Marc, LOYD, James E., KASS, Robert S. et CHUNG, Wendy K. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 25 juillet 2013. Vol. 369, n° 4, pp. 351-361. DOI 10.1056/NEJMoa1211097.

10. LAFRENIÈRE, Ronald G., CADER, M. Zameel, POULIN, Jean-François, ANDRES-ENGUIX, Isabelle, SIMONEAU, Maryse, GUPTA, Namrata, BOISVERT, Karine, LAFRENIÈRE, François, MCLAUGHLAN, Shannon, DUBÉ, Marie-Pierre, MARCINKIEWICZ, Martin M., RAMAGOPALAN, Sreeram, ANSORGE, Olaf, BRAIS, Bernard, SEQUEIROS, Jorge, PEREIRA-MONTEIRO, Jose Maria, GRIFFITHS, Lyn R., TUCKER, Stephen J., EBERS, George et ROULEAU, Guy A. A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nature Medicine*. octobre 2010. Vol. 16, n° 10, pp. 1157-1160. DOI 10.1038/nm.2216.
11. BAREL, Ortal, SHALEV, Staviv A., OFIR, Rivka, COHEN, Asi, ZLOTOGORA, Joel, SHORER, Zamir, MAZOR, Galia, FINER, Gal, KHATEEB, Shareef, ZILBERBERG, Noam et BIRK, Ohad S. Maternally inherited Birk Barel mental retardation dysmorphism syndrome caused by a mutation in the genomically imprinted potassium channel KCNK9. *American Journal of Human Genetics*. août 2008. Vol. 83, n° 2, pp. 193-199. DOI 10.1016/j.ajhg.2008.07.010.
12. FRIEDRICH, Corinna, RINNÉ, Susanne, ZUMHAGEN, Sven, KIPER, Aytug K., SILBERNAGEL, Nicole, NETTER, Michael F., STALLMEYER, Birgit, SCHULZE-BAHR, Eric et DECHER, Niels. Gain-of-function mutation in TASK-4 channels and severe cardiac conduction disorder. *EMBO molecular medicine*. juillet 2014. Vol. 6, n° 7, pp. 937-951. DOI 10.15252/emmm.201303783.
13. WILLIAMS, Sarah, BATEMAN, Andrew et O'KELLY, Ita. Altered expression of two-pore domain potassium (K2P) channels in cancer. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, n° 10, pp. e74589. DOI 10.1371/journal.pone.0074589.
14. BEZANILLA, Francisco. The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. *Physiological Reviews*. 4 janvier 2000. Vol. 80, n° 2, pp. 555-592. DOI 10.1152/physrev.2000.80.2.555.
15. SIGWORTH, F. J. Voltage gating of ion channels. *Quarterly Reviews of Biophysics*. février 1994. Vol. 27, n° 1, pp. 1-40. DOI 10.1017/S0033583500002894.
16. CHEN, Xiaorui, WANG, Qinghua, NI, Fengyun et MA, Jianpeng. Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 22 juin 2010. Vol. 107, n° 25, pp. 11352-11357. DOI 10.1073/pnas.1000142107.
17. SWARTZ, Kenton J. Sensing voltage across lipid membranes. *Nature*. 18 décembre 2008. Vol. 456, n° 7224, pp. 891-897. DOI 10.1038/nature07620.
18. LONG, Stephen B., TAO, Xiao, CAMPBELL, Ernest B. et MACKINNON, Roderick. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*. 15 novembre 2007. Vol. 450, n° 7168, pp. 376-382. DOI 10.1038/nature06265.
19. HILLE, B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophysical Journal*. mai 1978. Vol. 22, n° 2, pp. 283-294.
20. SERRATRICE, Georges, PELLISSIER, Jean-François, SERRATRICE, Jacques et WEILLER, Pierre-Jean. Les canalopathies potassiques, autour du syndrome de Morvan. *Académie*

nationale de médecine | Une institution dans son temps [en ligne]. 8 février 2010. Disponible à l'adresse : <http://www.academie-medecine.fr/les-canalopathies-potassiques-autour-du-syndrome-de-morvan/>

21. DEHGHANI-SAMANI, Amir, MADRESEH-GHAHFAROKHI, Samin et DEHGHANI-SAMANI, Azam. Mutations of Voltage-Gated Ionic Channels and Risk of Severe Cardiac Arrhythmias. *Acta Cardiologica Sinica*. mars 2019. Vol. 35, n° 2, pp. 99-110. DOI 10.6515/ACS.201903_35(2).20181028A.
22. NOBLE, Denis. Electrical properties of cardiac muscle attributable to inward going (anomalous) rectification. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 1965. Vol. 66, n° S2, pp. 127-135. DOI 10.1002/jcp.1030660520.
23. ROUGIER, O., VASSORT, G. et STÄMPFLI, R. Voltage clamp experiments on frog atrial heart muscle fibres with the sucrose gap technique. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*. 1 juin 1968. Vol. 301, n° 2, pp. 91-108. DOI 10.1007/BF00362729.
24. BEELER, G. W. et REUTER, H. Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. *The Journal of Physiology*. mars 1970. Vol. 207, n° 1, pp. 165-190. DOI 10.1113/jphysiol.1970.sp009055.
25. KURACHI, Y. Voltage-dependent activation of the inward-rectifier potassium channel in the ventricular cell membrane of guinea-pig heart. *The Journal of Physiology*. septembre 1985. Vol. 366, pp. 365-385. DOI 10.1113/jphysiol.1985.sp015803.
26. MCALLISTER, R. E. et NOBLE, D. The time and voltage dependence of the slow outward current in cardiac Purkinje fibres. *The Journal of Physiology*. octobre 1966. Vol. 186, n° 3, pp. 632-662. DOI 10.1113/jphysiol.1966.sp008060.
27. BROWN, D. A., GÄHWILER, B. H., GRIFFITH, W. H. et HALLIWELL, J. V. Membrane currents in hippocampal neurons. *Progress in Brain Research*. 1990. Vol. 83, pp. 141-160. DOI 10.1016/s0079-6123(08)61247-9.
28. GÄHWILER, B. H. et BROWN, D. A. GABAB-receptor-activated K⁺ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. mars 1985. Vol. 82, n° 5, pp. 1558-1562. DOI 10.1073/pnas.82.5.1558.
29. LACEY, M. G., MERCURI, N. B. et NORTH, R. A. On the potassium conductance increase activated by GABAB and dopamine D2 receptors in rat substantia nigra neurones. *The Journal of Physiology*. juillet 1988. Vol. 401, pp. 437-453. DOI 10.1113/jphysiol.1988.sp017171.
30. NORTH, R. A., WILLIAMS, J. T., SURPRENANT, A. et CHRISTIE, M. J. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. août 1987. Vol. 84, n° 15, pp. 5487-5491. DOI 10.1073/pnas.84.15.5487.

31. TAKAHASHI, T. Inward rectification in neonatal rat spinal motoneurons. *The Journal of Physiology*. avril 1990. Vol. 423, pp. 47-62. DOI 10.1113/jphysiol.1990.sp018010.
32. LEWIS, D. L., IKEDA, S. R., ARYEE, D. et JOHO, R. H. Expression of an inwardly rectifying K⁺ channel from rat basophilic leukemia cell mRNA in *Xenopus* oocytes. *FEBS letters*. 23 septembre 1991. Vol. 290, n° 1-2, pp. 17-21. DOI 10.1016/0014-5793(91)81215-t.
33. MCKINNEY, L. C. et GALLIN, E. K. Inwardly rectifying whole-cell and single-channel K currents in the murine macrophage cell line J774.1. *The Journal of Membrane Biology*. juillet 1988. Vol. 103, n° 1, pp. 41-53. DOI 10.1007/bf01871931.
34. SIMS, S. M. et DIXON, S. J. Inwardly rectifying K⁺ current in osteoclasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* [en ligne]. 1 juin 1989. Disponible à l'adresse : <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpcell.1989.256.6.C1277>
35. SILVER, M. R. et DECOURSEY, T. E. Intrinsic gating of inward rectifier in bovine pulmonary artery endothelial cells in the presence or absence of internal Mg²⁺. *The Journal of General Physiology*. juillet 1990. Vol. 96, n° 1, pp. 109-133. DOI 10.1085/jgp.96.1.109.
36. KUFFLER, S. W. et NICHOLLS, J. G. The physiology of neuroglial cells. *Ergebnisse Der Physiologie, Biologischen Chemie Und Experimentellen Pharmakologie*. 1966. Vol. 57, pp. 1-90.
37. NEWMAN, E. A. Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature*. 10 mai 1984. Vol. 309, n° 5964, pp. 155-157. DOI 10.1038/309155a0.
38. HAGIWARA, S., MIYAZAKI, S., MOODY, W. et PATLAK, J. Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg. *The Journal of Physiology*. juin 1978. Vol. 279, pp. 167-185. DOI 10.1113/jphysiol.1978.sp012338.
39. HAGIWARA, S., MIYAZAKI, S. et ROSENTHAL, N. P. Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. *The Journal of General Physiology*. juin 1976. Vol. 67, n° 6, pp. 621-638. DOI 10.1085/jgp.67.6.621.
40. HAGIWARA, S. et TAKAHASHI, K. The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell. *The Journal of Membrane Biology*. 1974. Vol. 18, n° 1, pp. 61-80. DOI 10.1007/bf01870103.
41. HAGIWARA, S. et STRICHARTZ, G. Membrane Potential-Dependent Ion Channels in Cell Membrane: Phylogenetic and Developmental Approaches. *The Quarterly Review of Biology*. 1 décembre 1984. Vol. 59, n° 4, pp. 464-464. DOI 10.1086/414075.
42. KUO, Anling, GULBIS, Jacqueline M., ANTCLIFF, Jennifer F., RAHMAN, Tahmina, LOWE, Edward D., ZIMMER, Jochen, CUTHBERTSON, Jonathan, ASHCROFT, Frances M., EZAKI, Takayuki et DOYLE, Declan A. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science (New York, N.Y.)*. 20 juin 2003. Vol. 300, n° 5627, pp. 1922-1926. DOI 10.1126/science.1085028.

43. MIYAZAKI, S. I., TAKAHASHI, K., TSUDA, K. et YOSHII, M. Analysis of non-linearity observed in the current-voltage relation of the tunicate embryo. *The Journal of Physiology*. avril 1974. Vol. 238, n° 1, pp. 55-77. DOI 10.1113/jphysiol.1974.sp010510.
44. SAKMANN, B. et TRUBE, G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *The Journal of Physiology*. février 1984. Vol. 347, pp. 641-657. DOI 10.1113/jphysiol.1984.sp015088.
45. DAVIES, N. P., IMBRICI, P., FIALHO, D., HERD, C., BILSLAND, L. G., WEBER, A., MUELLER, R., HILTON-JONES, D., EALING, J., BOOTHMAN, B. R., GIUNTI, P., PARSONS, L. M., THOMAS, M., MANZUR, A. Y., JURKAT-ROTT, K., LEHMANN-HORN, F., CHINNERY, P. F., ROSE, M., KULLMANN, D. M. et HANNA, M. G. Andersen-Tawil syndrome: new potassium channel mutations and possible phenotypic variation. *Neurology*. 11 octobre 2005. Vol. 65, n° 7, pp. 1083-1089. DOI 10.1212/01.wnl.0000178888.03767.74.
46. SANSONE, Valeria et TAWIL, Rabi. Management and treatment of Andersen-Tawil syndrome (ATS). *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. avril 2007. Vol. 4, n° 2, pp. 233-237. DOI 10.1016/j.nurt.2007.01.005.
47. PARTRIDGE, C. J., BEECH, D. J. et SIVAPRASADARAO, A. Identification and pharmacological correction of a membrane trafficking defect associated with a mutation in the sulfonylurea receptor causing familial hyperinsulinism. *The Journal of Biological Chemistry*. 21 septembre 2001. Vol. 276, n° 38, pp. 35947-35952. DOI 10.1074/jbc.M104762200.
48. TASCHEBERGER, Grit, MOUGEY, Adam, SHEN, Shu, LESTER, Linda B., LAFRANCHI, Stephen et SHYNG, Show-Ling. Identification of a familial hyperinsulinism-causing mutation in the sulfonylurea receptor 1 that prevents normal trafficking and function of KATP channels. *The Journal of Biological Chemistry*. 10 mai 2002. Vol. 277, n° 19, pp. 17139-17146. DOI 10.1074/jbc.M200363200.
49. YAN, Feifei, LIN, Chia-Wei, WEISIGER, Elizabeth, CARTIER, Etienne A., TASCHEBERGER, Grit et SHYNG, Show-Ling. Sulfonylureas correct trafficking defects of ATP-sensitive potassium channels caused by mutations in the sulfonylurea receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 19 mars 2004. Vol. 279, n° 12, pp. 11096-11105. DOI 10.1074/jbc.M312810200.
50. DUNNE, Mark J., COSGROVE, Karen E., SHEPHERD, Ruth M., AYNSLEY-GREEN, Albert et LINDLEY, Keith J. Hyperinsulinism in Infancy: From Basic Science to Clinical Disease. *Physiological Reviews*. 1 janvier 2004. Vol. 84, n° 1, pp. 239-275. DOI 10.1152/physrev.00022.2003.
51. HIBINO, Hiroshi, INANOBE, Atsushi, FURUTANI, Kazuharu, MURAKAMI, Shingo, FINDLAY, Ian et KURACHI, Yoshihisa. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiological Reviews*. 1 janvier 2010. Vol. 90, n° 1, pp. 291-366. DOI 10.1152/physrev.00021.2009.
52. PREISIG-MÜLLER, Regina, SCHLICHTHÖRL, Günter, GOERGE, Tobias, HEINEN, Steffen, BRÜGGEMANN, Andrea, RAJAN, Sindhu, DERST, Christian, VEH, Rüdiger W. et DAUT, Jürgen.

Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 28 mai 2002. Vol. 99, n° 11, pp. 7774-7779. DOI 10.1073/pnas.102609499.

53. ARMSTRONG, Clay M et HILLE, Bertil. Voltage-Gated Ion Channels and Electrical Excitability. *Neuron*. 1 mars 1998. Vol. 20, n° 3, pp. 371-380. DOI 10.1016/S0896-6273(00)80981-2.

54. BEAN, Bruce P. The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*. juin 2007. Vol. 8, n° 6, pp. 451-465. DOI 10.1038/nrn2148.

55. LOPATIN, A. N., MAKHINA, E. N. et NICHOLS, C. G. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*. 24 novembre 1994. Vol. 372, n° 6504, pp. 366-369. DOI 10.1038/372366a0.

56. MATSUDA, H., SAIGUSA, A. et IRISAWA, H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature*. 8 janvier 1987. Vol. 325, n° 7000, pp. 156-159. DOI 10.1038/325156a0.

57. BICHET, Delphine, HAASS, Friederike A. et JAN, Lily Yeh. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nature Reviews Neuroscience*. décembre 2003. Vol. 4, n° 12, pp. 957-967. DOI 10.1038/nrn1244.

58. ISHIHARA, K., MITSUIYE, T., NOMA, A. et TAKANO, M. The Mg²⁺ block and intrinsic gating underlying inward rectification of the K⁺ current in guinea-pig cardiac myocytes. *The Journal of Physiology*. décembre 1989. Vol. 419, pp. 297-320. DOI 10.1113/jphysiol.1989.sp017874.

59. FAKLER, B., BRÄNDLE, U., GLOWATZKI, E., WEIDEMANN, S., ZENNER, H. P. et RUPPERSBERG, J. P. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell*. 13 janvier 1995. Vol. 80, n° 1, pp. 149-154. DOI 10.1016/0092-8674(95)90459-x.

60. FICKER, E., TAGLIALATELA, M., WIBLE, B. A., HENLEY, C. M. et BROWN, A. M. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science (New York, N.Y.)*. 11 novembre 1994. Vol. 266, n° 5187, pp. 1068-1072. DOI 10.1126/science.7973666.

61. YAMADA, M. et KURACHI, Y. Spermine gates inward-rectifying muscarinic but not ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit atrial myocytes. Intracellular substance-mediated mechanism of inward rectification. *The Journal of Biological Chemistry*. 21 avril 1995. Vol. 270, n° 16, pp. 9289-9294. DOI 10.1074/jbc.270.16.9289.

62. LOPATIN, A. N., MAKHINA, E. N. et NICHOLS, C. G. The mechanism of inward rectification of potassium channels: « long-pore plugging » by cytoplasmic polyamines. *The Journal of General Physiology*. novembre 1995. Vol. 106, n° 5, pp. 923-955. DOI 10.1085/jgp.106.5.923.

63. YAMASHITA, T., HORIO, Y., YAMADA, M., TAKAHASHI, N., KONDO, C. et KURACHI, Y. Competition between Mg²⁺ and spermine for a cloned IRK2 channel expressed in a human cell line. *The Journal of Physiology*. 15 mai 1996. Vol. 493 (Pt 1), pp. 143-156. DOI 10.1113/jphysiol.1996.sp021370.
64. LOPATIN, A. N. et NICHOLS, C. G. [K⁺] dependence of open-channel conductance in cloned inward rectifier potassium channels (IRK1, Kir2.1). *Biophysical Journal*. août 1996. Vol. 71, n° 2, pp. 682-694. DOI 10.1016/S0006-3495(96)79268-8.
65. HILGEMANN, D. W. et BALL, R. Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP2. *Science (New York, N.Y.)*. 16 août 1996. Vol. 273, n° 5277, pp. 956-959. DOI 10.1126/science.273.5277.956.
66. HILGEMANN, D. W., FENG, S. et NASUHOGLU, C. The complex and intriguing lives of PIP2 with ion channels and transporters. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*. 4 décembre 2001. Vol. 2001, n° 111, pp. re19. DOI 10.1126/stke.2001.111.re19.
67. HUANG, C. L., FENG, S. et HILGEMANN, D. W. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature*. 19 février 1998. Vol. 391, n° 6669, pp. 803-806. DOI 10.1038/35882.
68. TAKANO, Makoto et KURATOMI, Shinobu. Regulation of cardiac inwardly rectifying potassium channels by membrane lipid metabolism. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. janvier 2003. Vol. 81, n° 1, pp. 67-79. DOI 10.1016/s0079-6107(02)00048-2.
69. LOPES, Coeli M. B., ZHANG, Hailin, ROHACS, Tibor, JIN, Taihao, YANG, Jian et LOGOTHETIS, Diomedes E. Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron*. 13 juin 2002. Vol. 34, n° 6, pp. 933-944. DOI 10.1016/s0896-6273(02)00725-0.
70. HANSEN, Scott B., TAO, Xiao et MACKINNON, Roderick. Structural basis of PIP2 activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature*. 28 août 2011. Vol. 477, n° 7365, pp. 495-498. DOI 10.1038/nature10370.
71. HO, I. H. et MURRELL-LAGNADO, R. D. Molecular determinants for sodium-dependent activation of G protein-gated K⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry*. 26 mars 1999. Vol. 274, n° 13, pp. 8639-8648. DOI 10.1074/jbc.274.13.8639.
72. PETIT-JACQUES, J., SUI, J. L. et LOGOTHETIS, D. E. Synergistic activation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channels by the betagamma subunits of G proteins and Na⁽⁺⁾ and Mg⁽²⁺⁾ ions. *The Journal of General Physiology*. novembre 1999. Vol. 114, n° 5, pp. 673-684. DOI 10.1085/jgp.114.5.673.
73. ANTCLIFF, Jennifer F., HAIDER, Shozeb, PROKS, Peter, SANSOM, Mark S. P. et ASHCROFT, Frances M. Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. *The EMBO journal*. 26 janvier 2005. Vol. 24, n° 2, pp. 229-239. DOI 10.1038/sj.emboj.7600487.

74. CUKRAS, C. A., JELIAZKOVA, I. et NICHOLS, C. G. The role of NH₂-terminal positive charges in the activity of inward rectifier KATP channels. *The Journal of General Physiology*. septembre 2002. Vol. 120, n° 3, pp. 437-446. DOI 10.1085/jgp.20028621.
75. JOHN, Scott A., WEISS, James N., XIE, Lai-Hua et RIBALET, Bernard. Molecular mechanism for ATP-dependent closure of the K⁺ channel Kir6.2. *The Journal of Physiology*. 1 octobre 2003. Vol. 552, n° Pt 1, pp. 23-34. DOI 10.1113/jphysiol.2003.048843.
76. LI, L., WANG, J. et DRAIN, P. The I182 region of k(ir)6.2 is closely associated with ligand binding in K(ATP) channel inhibition by ATP. *Biophysical Journal*. août 2000. Vol. 79, n° 2, pp. 841-852. DOI 10.1016/S0006-3495(00)76340-5.
77. PROKS, P., GRIBBLE, F. M., ADHIKARI, R., TUCKER, S. J. et ASHCROFT, F. M. Involvement of the N-terminus of Kir6.2 in the inhibition of the KATP channel by ATP. *The Journal of Physiology*. 1 janvier 1999. Vol. 514 (Pt 1), pp. 19-25. DOI 10.1111/j.1469-7793.1999.019af.x.
78. REIMANN, F., RYDER, T. J., TUCKER, S. J. et ASHCROFT, F. M. The role of lysine 185 in the kir6.2 subunit of the ATP-sensitive channel in channel inhibition by ATP. *The Journal of Physiology*. 1 novembre 1999. Vol. 520 Pt 3, pp. 661-669. DOI 10.1111/j.1469-7793.1999.00661.x.
79. TSUBOI, Takashi, LIPPIAT, Jonathan D., ASHCROFT, Frances M. et RUTTER, Guy A. ATP-dependent interaction of the cytosolic domains of the inwardly rectifying K⁺ channel Kir6.2 revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 6 janvier 2004. Vol. 101, n° 1, pp. 76-81. DOI 10.1073/pnas.0306347101.
80. TUCKER, S. J., GRIBBLE, F. M., ZHAO, C., TRAPP, S. et ASHCROFT, F. M. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature*. 8 mai 1997. Vol. 387, n° 6629, pp. 179-183. DOI 10.1038/387179a0.
81. TUCKER, S. J., GRIBBLE, F. M., PROKS, P., TRAPP, S., RYDER, T. J., HAUG, T., REIMANN, F. et ASHCROFT, F. M. Molecular determinants of KATP channel inhibition by ATP. *The EMBO journal*. 15 juin 1998. Vol. 17, n° 12, pp. 3290-3296. DOI 10.1093/emboj/17.12.3290.
82. BABENKO, A. P., GONZALEZ, G. et BRYAN, J. Pharmacology of sulphonylurea receptors. Separate domains of the regulatory subunits of K(ATP) channel isoforms are required for selective interaction with K(+) channel openers. *The Journal of Biological Chemistry*. 14 janvier 2000. Vol. 275, n° 2, pp. 717-720. DOI 10.1074/jbc.275.2.717.
83. D'HAHAN, N., MOREAU, C., PROST, A. L., JACQUET, H., ALEKSEEV, A. E., TERZIC, A. et VIVAUDOU, M. Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 12 octobre 1999. Vol. 96, n° 21, pp. 12162-12167. DOI 10.1073/pnas.96.21.12162.

84. GRIBBLE, F. M., TUCKER, S. J. et ASHCROFT, F. M. The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *The EMBO journal*. 17 mars 1997. Vol. 16, n° 6, pp. 1145-1152. DOI 10.1093/emboj/16.6.1145.
85. MATSUOKA, T., MATSUSHITA, K., KATAYAMA, Y., FUJITA, A., INAGEDA, K., TANEMOTO, M., INANOBE, A., YAMASHITA, S., MATSUZAWA, Y. et KURACHI, Y. C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K(+) channels. *Circulation Research*. 10 novembre 2000. Vol. 87, n° 10, pp. 873-880. DOI 10.1161/01.res.87.10.873.
86. SHYNG, S., FERRIGNI, T. et NICHOLS, C. G. Regulation of KATP channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *The Journal of General Physiology*. décembre 1997. Vol. 110, n° 6, pp. 643-654. DOI 10.1085/jgp.110.6.643.
87. UEDA, K., INAGAKI, N. et SEINO, S. MgADP antagonism to Mg²⁺-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. *The Journal of Biological Chemistry*. 12 septembre 1997. Vol. 272, n° 37, pp. 22983-22986. DOI 10.1074/jbc.272.37.22983.
88. QUINN, Kathryn V., GIBLIN, Jonathan P. et TINKER, Andrew. Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channel. *Circulation Research*. 28 mai 2004. Vol. 94, n° 10, pp. 1359-1366. DOI 10.1161/01.RES.0000128513.34817.c4.
89. SHI, Yun, WU, Zhongying, CUI, Ningren, SHI, Weiwei, YANG, Yang, ZHANG, Xiaoli, ROJAS, Asheebo, HA, Binh T. et JIANG, Chun. PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular K_{ATP} channel activation by beta-adrenergic receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. septembre 2007. Vol. 293, n° 3, pp. R1205-R1214. DOI 10.1152/ajpregu.00337.2007.
90. BABENKO, Andrey P. et BRYAN, Joseph. SUR-dependent modulation of KATP channels by an N-terminal KIR6.2 peptide. Defining intersubunit gating interactions. *The Journal of Biological Chemistry*. 15 novembre 2002. Vol. 277, n° 46, pp. 43997-44004. DOI 10.1074/jbc.M208085200.
91. HEGINBOTHAM, L., ABRAMSON, T. et MACKINNON, R. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science (New York, N.Y.)*. 13 novembre 1992. Vol. 258, n° 5085, pp. 1152-1155. DOI 10.1126/science.1279807.
92. ZHOU, Y., MORAIS-CABRAL, J. H., KAUFMAN, A. et MACKINNON, R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*. 1 novembre 2001. Vol. 414, n° 6859, pp. 43-48. DOI 10.1038/35102009.
93. DOYLE, D. A., MORAIS CABRAL, J., PFUETZNER, R. A., KUO, A., GULBIS, J. M., COHEN, S. L., CHAIT, B. T. et MACKINNON, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science (New York, N.Y.)*. 3 avril 1998. Vol. 280, n° 5360, pp. 69-77. DOI 10.1126/science.280.5360.69.

94. KUBO, Y., BALDWIN, T. J., JAN, Y. N. et JAN, L. Y. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*. 11 mars 1993. Vol. 362, n° 6416, pp. 127-133. DOI 10.1038/362127a0.
95. FAKLER, B., BRÄNDLE, U., GLOWATZKI, E., ZENNER, H. P. et RUPPERSBERG, J. P. Kir2.1 inward rectifier K⁺ channels are regulated independently by protein kinases and ATP hydrolysis. *Neuron*. décembre 1994. Vol. 13, n° 6, pp. 1413-1420. DOI 10.1016/0896-6273(94)90426-x.
96. SOOM, M., SCHÖNHERR, R., KUBO, Y., KIRSCH, C., KLINGER, R. et HEINEMANN, S. H. Multiple PIP₂ binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS letters*. 9 février 2001. Vol. 490, n° 1-2, pp. 49-53. DOI 10.1016/s0014-5793(01)02136-6.
97. ABRAMS, C. J., DAVIES, N. W., SHELTON, P. A. et STANFIELD, P. R. The role of a single aspartate residue in ionic selectivity and block of a murine inward rectifier K⁺ channel Kir2.1. *The Journal of Physiology*. 15 juin 1996. Vol. 493 (Pt 3), pp. 643-649. DOI 10.1113/jphysiol.1996.sp021411.
98. ALAGEM, N., DVIR, M. et REUVENY, E. Mechanism of Ba(2⁺) block of a mouse inwardly rectifying K⁺ channel: differential contribution by two discrete residues. *The Journal of Physiology*. 15 juillet 2001. Vol. 534, n° Pt. 2, pp. 381-393. DOI 10.1111/j.1469-7793.2001.00381.x.
99. YANG, J., JAN, Y. N. et JAN, L. Y. Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier K⁺ channel. *Neuron*. mai 1995. Vol. 14, n° 5, pp. 1047-1054. DOI 10.1016/0896-6273(95)90343-7.
100. MIKI, T., NAGASHIMA, K., TASHIRO, F., KOTAKE, K., YOSHITOMI, H., TAMAMOTO, A., GONOI, T., IWANAGA, T., MIYAZAKI, J. et SEINO, S. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1 septembre 1998. Vol. 95, n° 18, pp. 10402-10406. DOI 10.1073/pnas.95.18.10402.
101. MIKI, T., LISS, B., MINAMI, K., SHIUCHI, T., SARAYA, A., KASHIMA, Y., HORIUCHI, M., ASHCROFT, F., MINOKOSHI, Y., ROEPER, J. et SEINO, S. ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nature Neuroscience*. mai 2001. Vol. 4, n° 5, pp. 507-512. DOI 10.1038/87455.
102. SUZUKI, Masashi, SASAKI, Norihito, MIKI, Takashi, SAKAMOTO, Naoya, OHMOTO-SEKINE, Yuki, TAMAGAWA, Masaji, SEINO, Susumu, MARBÁN, Eduardo et NAKAYA, Haruaki. Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. février 2002. Vol. 109, n° 4, pp. 509-516. DOI 10.1172/JCI14270.
103. YAMADA, K., JI, J. J., YUAN, H., MIKI, T., SATO, S., HORIMOTO, N., SHIMIZU, T., SEINO, S. et INAGAKI, N. Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science (New York, N.Y.)*. 25 mai 2001. Vol. 292, n° 5521, pp. 1543-1546. DOI 10.1126/science.1059829.

104. MIKI, Takashi, MINAMI, Kohtaro, ZHANG, Li, MORITA, Mizuo, GONOI, Tohru, SHIUCHI, Tetsuya, MINOKOSHI, Yasuhiko, RENAUD, Jean-Marc et SEINO, Susumu. ATP-sensitive potassium channels participate in glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. décembre 2002. Vol. 283, n° 6, pp. E1178-1184. DOI 10.1152/ajpendo.00313.2002.
105. DING, Dian, WANG, Mengmeng, WU, Jing-Xiang, KANG, Yunlu et CHEN, Lei. The Structural Basis for the Binding of Repaglinide to the Pancreatic KATP Channel. *Cell Reports*. 07 2019. Vol. 27, n° 6, pp. 1848- 1857.e4. DOI 10.1016/j.celrep.2019.04.050.
106. CLARKE, Oliver B., CAPUTO, Alessandro T., HILL, Adam P., VANDENBERG, Jamie I., SMITH, Brian J. et GULBIS, Jacqueline M. Domain reorientation and rotation of an intracellular assembly regulate conduction in Kir potassium channels. *Cell*. 11 juin 2010. Vol. 141, n° 6, pp. 1018-1029. DOI 10.1016/j.cell.2010.05.003.
107. BAVRO, Vassiliy N., ZORZI, Rita De, SCHMIDT, Matthias R., MUNIZ, João R. C., ZUBCEVIC, Lejla, SANSOM, Mark S. P., VÉNIEN-BRYAN, Catherine et TUCKER, Stephen J. Structure of a KirBac potassium channel with an open bundle crossing indicates a mechanism of channel gating. *Nature Structural & Molecular Biology*. février 2012. Vol. 19, n° 2, pp. 158-163. DOI 10.1038/nsmb.2208.
108. WHORTON, M. R. et MACKINNON, R. Crystal Structure of the Mammalian GIRK2 K(+) Channel and Gating Regulation by G Proteins, PIP(2), and Sodium. *Cell*. 2011. Vol. 147, n° 1, pp. 199–208. DOI 10.1016/j.cell.2011.07.046.
109. KUO, Anling, DOMENE, Carmen, JOHNSON, Louise N., DOYLE, Declan A. et VÉNIEN-BRYAN, Catherine. Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography. *Structure (London, England: 1993)*. octobre 2005. Vol. 13, n° 10, pp. 1463-1472. DOI 10.1016/j.str.2005.07.011.
110. KLEIN, R., GANELIN, R., MARKS, J. F., USHER, P. et RICHARDS, C. J Periodic paralysis with cardiac arrhythmia. *The Journal of Pediatrics*. mars 1963. Vol. 62, pp. 371-385. DOI 10.1016/s0022-3476(63)80134-1.
111. PLASTER, N. M., TAWIL, R., TRISTANI-FIROUZI, M., CANÚN, S., BENDAHHOU, S., TSUNODA, A., DONALDSON, M. R., IANNACCONE, S. T., BRUNT, E., BAROHN, R., CLARK, J., DEYMEER, F., GEORGE, A. L., FISH, F. A., HAHN, A., NITU, A., OZDEMIR, C., SERDAROGLU, P., SUBRAMONY, S. H., WOLFE, G., FU, Y. H. et PTÁČEK, L. J. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell*. 18 mai 2001. Vol. 105, n° 4, pp. 511-519. DOI 10.1016/s0092-8674(01)00342-7.
112. ANDERSEN, E. D., KRASILNIKOFF, P. A. et OVERVAD, H. Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies. A new syndrome? *Acta Paediatrica Scandinavica*. septembre 1971. Vol. 60, n° 5, pp. 559-564. DOI 10.1111/j.1651-2227.1971.tb06990.x.
113. BÖKENKAMP, Regina, WILDE, Arthur A., SCHALIJ, Martin J. et BLOM, Nico A. Flecainide for recurrent malignant ventricular arrhythmias in two siblings with Andersen-

Tawil syndrome. *Heart Rhythm*. avril 2007. Vol. 4, n° 4, pp. 508-511.
DOI 10.1016/j.hrthm.2006.12.031.

114. PELLIZZÓN, Oscar A., KALAIZICH, Luis, PTÁČEK, Louis J., TRISTANI-FIROUZI, Martin et GONZALEZ, Mario D. Flecainide suppresses bidirectional ventricular tachycardia and reverses tachycardia-induced cardiomyopathy in Andersen-Tawil syndrome. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. janvier 2008. Vol. 19, n° 1, pp. 95-97. DOI 10.1111/j.1540-8167.2007.00910.x.

115. KANNANKERIL, Prince J., RODEN, Dan M. et FISH, Frank A. Suppression of bidirectional ventricular tachycardia and unmasking of prolonged QT interval with verapamil in Andersen's syndrome. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. janvier 2004. Vol. 15, n° 1, pp. 119. DOI 10.1046/j.1540-8167.2004.03369.x.

116. WANG, Z., YUE, L., WHITE, M., PELLETIER, G. et NATTEL, S. Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation*. 1 décembre 1998. Vol. 98, n° 22, pp. 2422-2428. DOI 10.1161/01.cir.98.22.2422.

117. ZOBEL, Carsten, CHO, Hee Cheol, NGUYEN, The-Tin, PEKHLETSKI, Roman, DIAZ, Roberto J., WILSON, Gregory J. et BACKX, Peter H. Molecular dissection of the inward rectifier potassium current (IK1) in rabbit cardiomyocytes: evidence for heteromeric co-assembly of Kir2.1 and Kir2.2. *The Journal of Physiology*. 15 juillet 2003. Vol. 550, n° Pt 2, pp. 365-372. DOI 10.1113/jphysiol.2002.036400.

118. SÁNCHEZ-CHAPULA, J. A., SALINAS-STEFANON, E., TORRES-JÁCOME, J., BENAVIDES-HARO, D. E. et NAVARRO-POLANCO, R. A. Blockade of currents by the antimalarial drug chloroquine in feline ventricular myocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. avril 2001. Vol. 297, n° 1, pp. 437-445.

119. TRISTANI-FIROUZI, Martin et ETHERIDGE, Susan P. Kir 2.1 channelopathies: the Andersen-Tawil syndrome. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 1 juillet 2010. Vol. 460, n° 2, pp. 289-294. DOI 10.1007/s00424-010-0820-6.

120. FUKUMURA, Shinobu, YAMAUCHI, Kosuke, KAWANABE, Akira, YAMAMOTO, Akiyo, NAKAZA, Maki, KUBOTA, Tomoya, KATO, Shinsuke, SASAKI, Ryogen, OKAMURA, Yasushi et TAKAHASHI, Masanori P. Functional analysis of a double-point mutation in the KCNJ2 gene identified in a family with Andersen-Tawil syndrome. *Journal of the Neurological Sciences*. 15 décembre 2019. Vol. 407, pp. 116521. DOI 10.1016/j.jns.2019.116521.

121. KOSTERA-PRUSZCZYK, Anna, POTULSKA-CHROMIK, Anna, PRUSZCZYK, Piotr, BIEGANOWSKA, Katarzyna, MISZCZAK-KNECHT, Maria, BIENIAS, Piotr, SZCZAŁUBA, Krzysztof, LEE, Hsien-Yang, QUINN, Emily, PLOSKI, Rafal, KAMINSKA, Anna et PTÁČEK, Louis J. Andersen-Tawil syndrome: report of 3 novel mutations and high risk of symptomatic cardiac involvement. *Muscle & Nerve*. février 2015. Vol. 51, n° 2, pp. 192-196.
DOI 10.1002/mus.24293.

122. EDGHILL, Emma L., GLOYN, Anna L., GILLESPIE, Kathleen M., LAMBERT, A. Paul, RAYMOND, Neil T., SWIFT, Peter G., ELLARD, Sian, GALE, Edwin A. M. et HATTERSLEY, Andrew T. Activating mutations in the KCNJ11 gene encoding the ATP-sensitive K⁺ channel

subunit Kir6.2 are rare in clinically defined type 1 diabetes diagnosed before 2 years. *Diabetes*. novembre 2004. Vol. 53, n° 11, pp. 2998-3001. DOI 10.2337/diabetes.53.11.2998.

123. GLOYN, Anna L., CUMMINGS, Elizabeth A., EDGHILL, Emma L., HARRIES, Lorna W., SCOTT, Rachel, COSTA, Teresa, TEMPLE, I. Karen, HATTERSLEY, Andrew T. et ELLARD, Sian. Permanent neonatal diabetes due to paternal germline mosaicism for an activating mutation of the KCNJ11 Gene encoding the Kir6.2 subunit of the beta-cell potassium adenosine triphosphate channel. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. août 2004. Vol. 89, n° 8, pp. 3932-3935. DOI 10.1210/jc.2004-0568.

124. GLOYN, Anna L., PEARSON, Ewan R., ANTCLIFF, Jennifer F., PROKS, Peter, BRUINING, G. Jan, SLINGERLAND, Annabelle S., HOWARD, Neville, SRINIVASAN, Shubha, SILVA, José M. C. L., MOLNES, Janne, EDGHILL, Emma L., FRAYLING, Timothy M., TEMPLE, I. Karen, MACKAY, Deborah, SHIELD, Julian P. H., SUMNIK, Zdenek, VAN RHIJN, Adrian, WALES, Jerry K. H., CLARK, Penelope, GORMAN, Shaun, AISENBERG, Javier, ELLARD, Sian, NJØLSTAD, Pål R., ASHCROFT, Frances M. et HATTERSLEY, Andrew T. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *The New England Journal of Medicine*. 29 avril 2004. Vol. 350, n° 18, pp. 1838-1849. DOI 10.1056/NEJMoa032922.

125. GLOYN, Anna L., REIMANN, Frank, GIRARD, Christophe, EDGHILL, Emma L., PROKS, Peter, PEARSON, Ewan R., TEMPLE, I. Karen, MACKAY, Deborah J. G., SHIELD, Julian P. H., FREEDENBERG, Debra, NOYES, Kathryn, ELLARD, Sian, ASHCROFT, Frances M., GRIBBLE, Fiona M. et HATTERSLEY, Andrew T. Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in KCNJ11. *Human Molecular Genetics*. 1 avril 2005. Vol. 14, n° 7, pp. 925-934. DOI 10.1093/hmg/ddi086.

126. MASSA, Ornella, IAFUSCO, Dario, D'AMATO, Elena, GLOYN, Anna L., HATTERSLEY, Andrew T., PASQUINO, Bruno, TONINI, Giorgio, DAMMACCO, Francesco, ZANETTE, Giorgio, MESCHI, Franco, PORZIO, Ottavia, BOTTAZZO, Gianfranco, CRINÓ, Antonino, LORINI, Renata, CERUTTI, Franco, VANELLI, Maurizio, BARBETTI, Fabrizio et EARLY ONSET DIABETES STUDY GROUP OF THE ITALIAN SOCIETY OF PEDIATRIC ENDOCRINOLOGY AND DIABETOLOGY. KCNJ11 activating mutations in Italian patients with permanent neonatal diabetes. *Human Mutation*. janvier 2005. Vol. 25, n° 1, pp. 22-27. DOI 10.1002/humu.20124.

127. SAGEN, Jørn V., RAEDER, Helge, HATHOUT, Eba, SHEHADEH, Naim, GUDMUNDSSON, Kolbeinn, BAEVRE, Halvor, ABUELO, Dianne, PHORNPHTKUL, Chanika, MOLNES, Janne, BELL, Graeme I., GLOYN, Anna L., HATTERSLEY, Andrew T., MOLVEN, Anders, SØVIK, Oddmund et NJØLSTAD, Pål R. Permanent neonatal diabetes due to mutations in KCNJ11 encoding Kir6.2: patient characteristics and initial response to sulfonylurea therapy. *Diabetes*. octobre 2004. Vol. 53, n° 10, pp. 2713-2718. DOI 10.2337/diabetes.53.10.2713.

128. VAXILLAIRE, Martine, POPULAIRE, Céline, BUSIAH, Kanetee, CAVÉ, Hélène, GLOYN, Anna L., HATTERSLEY, Andrew T., CZERNICHOW, Paul, FROGUEL, Philippe et POLAK, Michel. Kir6.2 mutations are a common cause of permanent neonatal diabetes in a large cohort of French patients. *Diabetes*. octobre 2004. Vol. 53, n° 10, pp. 2719-2722. DOI 10.2337/diabetes.53.10.2719.

129. PROKS, Peter, ANTCLIFF, Jennifer F., LIPPIAT, Jon, GLOYN, Anna L., HATTERSLEY, Andrew T. et ASHCROFT, Frances M. Molecular basis of Kir6.2 mutations associated with neonatal diabetes or neonatal diabetes plus neurological features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 14 décembre 2004. Vol. 101, n° 50, pp. 17539-17544. DOI 10.1073/pnas.0404756101.
130. PROKS, Peter, GIRARD, Christophe, HAIDER, Shozeb, GLOYN, Anna L., HATTERSLEY, Andrew T., SANSOM, Mark S. P. et ASHCROFT, Frances M. A gating mutation at the internal mouth of the Kir6.2 pore is associated with DEND syndrome. *EMBO reports*. mai 2005. Vol. 6, n° 5, pp. 470-475. DOI 10.1038/sj.embor.7400393.
131. ASHCROFT, Frances M. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *The Journal of Clinical Investigation*. août 2005. Vol. 115, n° 8, pp. 2047-2058. DOI 10.1172/JCI25495.
132. TRAPP, S., PROKS, P., TUCKER, S. J. et ASHCROFT, F. M. Molecular analysis of ATP-sensitive K channel gating and implications for channel inhibition by ATP. *The Journal of General Physiology*. septembre 1998. Vol. 112, n° 3, pp. 333-349. DOI 10.1085/jgp.112.3.333.
133. HATTERSLEY, Andrew T. et ASHCROFT, Frances M. Activating Mutations in Kir6.2 and Neonatal Diabetes: New Clinical Syndromes, New Scientific Insights, and New Therapy. *Diabetes*. 1 septembre 2005. Vol. 54, n° 9, pp. 2503-2513. DOI 10.2337/diabetes.54.9.2503.
134. FLANAGAN, S. E., EDGHILL, E. L., GLOYN, A. L., ELLARD, S. et HATTERSLEY, A. T. Mutations in KCNJ11, which encodes Kir6.2, are a common cause of diabetes diagnosed in the first 6 months of life, with the phenotype determined by genotype. *Diabetologia*. juin 2006. Vol. 49, n° 6, pp. 1190-1197. DOI 10.1007/s00125-006-0246-z.
135. STANIK, Juraj, GASPERIKOVA, Daniela, PASKOVA, Magdalena, BARAK, Lubomir, JAVORKOVA, Jana, JANCOVA, Emilia, CILJAKOVA, Miriam, HLAVA, Peter, MICHALEK, Jozef, FLANAGAN, Sarah E., PEARSON, Ewan, HATTERSLEY, Andrew T., ELLARD, Sian et KLIMES, Iwar. Prevalence of permanent neonatal diabetes in Slovakia and successful replacement of insulin with sulfonylurea therapy in KCNJ11 and ABCC8 mutation carriers. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. avril 2007. Vol. 92, n° 4, pp. 1276-1282. DOI 10.1210/jc.2006-2490.
136. SHIMOMURA, Kenju, GIRARD, Christophe A. J., PROKS, Peter, NAZIM, Joanna, LIPPIAT, Jonathan D., CERUTTI, Franco, LORINI, Renata, ELLARD, Sian, HATTERSLEY, Andrew T., BARBETTI, Fabrizio et ASHCROFT, Frances M. Mutations at the same residue (R50) of Kir6.2 (KCNJ11) that cause neonatal diabetes produce different functional effects. *Diabetes*. juin 2006. Vol. 55, n° 6, pp. 1705-1712. DOI 10.2337/db05-1640.
137. MÄNNIKKÖ, Roope, JEFFERIES, Craig, FLANAGAN, Sarah E., HATTERSLEY, Andrew, ELLARD, Sian et ASHCROFT, Frances M. Interaction between mutations in the slide helix of Kir6.2 associated with neonatal diabetes and neurological symptoms. *Human Molecular Genetics*. 15 mars 2010. Vol. 19, n° 6, pp. 963-972. DOI 10.1093/hmg/ddp554.

138. COOPER, Paige E., MCCLENAGHAN, Conor, CHEN, Xingyu, STARY-WEINZINGER, Anna et NICHOLS, Colin G. Conserved functional consequences of disease-associated mutations in the slide helix of Kir6.1 and Kir6.2 subunits of the ATP-sensitive potassium channel. *The Journal of Biological Chemistry*. 20 2017. Vol. 292, n° 42, pp. 17387-17398. DOI 10.1074/jbc.M117.804971.
139. SHIMOMURA, K., HÖRSTER, F., DE WET, H., FLANAGAN, S. E., ELLARD, S., HATTERSLEY, A. T., WOLF, N. I., ASHCROFT, F. et EBINGER, F. A novel mutation causing DEND syndrome: a treatable channelopathy of pancreas and brain. *Neurology*. 25 septembre 2007. Vol. 69, n° 13, pp. 1342-1349. DOI 10.1212/01.wnl.0000268488.51776.53.
140. TAMMARO, Paolo et ASHCROFT, Frances M. A mutation in the ATP-binding site of the Kir6.2 subunit of the KATP channel alters coupling with the SUR2A subunit. *The Journal of Physiology*. 1 novembre 2007. Vol. 584, n° Pt 3, pp. 743-753. DOI 10.1113/jphysiol.2007.143149.
141. DORN, Márcio, E SILVA, Mariel Barbachan, BURIOL, Luciana S. et LAMB, Luis C. Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies. *Computational Biology and Chemistry*. 1 décembre 2014. Vol. 53, pp. 251-276. DOI 10.1016/j.compbiolchem.2014.10.001.
142. BRANDEN, Carl Ivar et TOOZE, John. Introduction to Protein Structure. *CRC Press* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.crcpress.com/Introduction-to-Protein-Structure/Branden-Tooze/p/book/9780815323051>
143. LASKOWSKI, Roman A., WATSON, James D. et THORNTON, Janet M. ProFunc: a server for predicting protein function from 3D structure. *Nucleic Acids Research*. 1 juillet 2005. Vol. 33, n° suppl_2, pp. W89-W93. DOI 10.1093/nar/gki414.
144. LASKOWSKI, Roman A., WATSON, James D. et THORNTON, Janet M. Protein Function Prediction Using Local 3D Templates. *Journal of Molecular Biology*. 19 août 2005. Vol. 351, n° 3, pp. 614-626. DOI 10.1016/j.jmb.2005.05.067.
145. LESK, Arthur. *Introduction to Bioinformatics*. New Edition, Fifth Edition. Oxford, New York : Oxford University Press, 2019. ISBN 978-0-19-879414-1.
146. THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*. 8 janvier 2019. Vol. 47, n° D1, pp. D506-D515. DOI 10.1093/nar/gky1049.
147. BERMAN, Helen M., WESTBROOK, John, FENG, Zukang, GILLILAND, Gary, BHAT, T. N., WEISSIG, Helge, SHINDYALOV, Ilya N. et BOURNE, Philip E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 1 janvier 2000. Vol. 28, n° 1, pp. 235-242. DOI 10.1093/nar/28.1.235.
148. MOULT, John, PEDERSEN, Jan T., JUDSON, Richard et FIDELIS, Krzysztof. A large-scale experiment to assess protein structure prediction methods. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1995. Vol. 23, n° 3, pp. ii-iv. DOI 10.1002/prot.340230303.
149. RICHARDSON, Jane S. The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure. In : ANFINSEN, C. B., EDSALL, John T. et RICHARDS, Frederic M. (éd.), *Advances in Protein*

Chemistry [en ligne]. Academic Press, 1981. pp. 167-339. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065323308605203>

150. LI, Hao, HELLING, Robert, TANG, Chao et WINGREEN, Ned. Emergence of Preferred Structures in a Simple Model of Protein Folding. *Science*. 2 août 1996. Vol. 273, n° 5275, pp. 666-669. DOI 10.1126/science.273.5275.666.
151. WANG, Z. X. A re-estimation for the total numbers of protein folds and superfamilies. *Protein Engineering, Design and Selection*. 1 août 1998. Vol. 11, n° 8, pp. 621-626. DOI 10.1093/protein/11.8.621.
152. ANDREEVA, Antonina, HOWORTH, Dave, CHOTHIA, Cyrus, KULESHA, Eugene et MURZIN, Alexey G. SCOP2 prototype: a new approach to protein structure mining. *Nucleic Acids Research*. 1 janvier 2014. Vol. 42, n° D1, pp. D310-D314. DOI 10.1093/nar/gkt1242.
153. ANFINSEN, C. B., HABER, E., SELA, M. et WHITE, F. H. The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease During Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 septembre 1961. Vol. 47, n° 9, pp. 1309-1314. DOI 10.1073/pnas.47.9.1309.
154. ANFINSEN, Christian B. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science*. 20 juillet 1973. Vol. 181, n° 4096, pp. 223-230. DOI 10.1126/science.181.4096.223.
155. BONNEAU, Richard et BAKER, David. Ab Initio Protein Structure Prediction: Progress and Prospects. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2001. Vol. 30, n° 1, pp. 173-189. DOI 10.1146/annurev.biophys.30.1.173.
156. CHIVIAN, Dylan, ROBERTSON, Timothy, BONNEAU, Richard et BAKER, David. Ab initio methods. *Methods of Biochemical Analysis*. 2003. Vol. 44, pp. 547-557. DOI 10.1002/0471721204.ch27.
157. OSGUTHORPE, David J. Ab initio protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*. 1 avril 2000. Vol. 10, n° 2, pp. 146-152. DOI 10.1016/S0959-440X(00)00067-1.
158. LEVY, Ronald M. et GALLICCHIO, Emilio. Computer Simulations with explicit solvent: Recent Progress in the Thermodynamic Decomposition of Free Energies and in Modeling Electrostatic Effects. *Annual Review of Physical Chemistry*. 1998. Vol. 49, n° 1, pp. 531-567. DOI 10.1146/annurev.physchem.49.1.531.
159. SKYNER, R. E., MCDONAGH, J. L., GROOM, C. R., MOURIK, T. van et MITCHELL, J. B. O. A review of methods for the calculation of solution free energies and the modelling of systems in solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 18 février 2015. Vol. 17, n° 9, pp. 6174-6191. DOI 10.1039/C5CP00288E.
160. BORN, M. et OPPENHEIMER, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Annalen der Physik*. 1927. Vol. 389, n° 20, pp. 457-484. DOI 10.1002/andp.19273892002.
161. PONDER, Jay W. et CASE, David A. Force Fields for Protein Simulations. In : *Advances in Protein Chemistry* [en ligne]. Academic Press, 2003. pp. 27-85. Protein Simulations.

Disponible à l'adresse :

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006532330366002X>

162. BERENDSEN, H. J. C., VAN DER SPOEL, D. et VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*. 2 septembre 1995. Vol. 91, n° 1, pp. 43-56. DOI 10.1016/0010-4655(95)00042-E.

163. TRAMONTANO, Anna. Protein Structure Prediction: Concepts and Applications. *Wiley.com* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.wiley.com/en-us/Protein+Structure+Prediction%3A+Concepts+and+Applications-p-9783527311675>

164. CHIANG, Yih-Shien, GELFAND, Tatiana I., KISTER, Alexander E. et GELFAND, Israel M. New classification of supersecondary structures of sandwich-like proteins uncovers strict patterns of strand assemblage. *Proteins*. 1 septembre 2007. Vol. 68, n° 4, pp. 915-921. DOI 10.1002/prot.21473.

165. JONES, David T. Successful ab initio prediction of the tertiary structure of NK-lysin using multiple sequences and recognized supersecondary structural motifs. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1997. Vol. 29, n° S1, pp. 185-191. DOI 10.1002/(SICI)1097-0134(1997)1+<185::AID-PROT24>3.0.CO;2-J.

166. SIMONS, Kim T., KOOPERBERG, Charles, HUANG, Enoch et BAKER, David. Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and bayesian scoring functions. *Journal of Molecular Biology*. 25 avril 1997. Vol. 268, n° 1, pp. 209-225. DOI 10.1006/jmbi.1997.0959.

167. ZHANG, Yang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 23 janvier 2008. Vol. 9, n° 1, pp. 40. DOI 10.1186/1471-2105-9-40.

168. SIMONS, Kim T., BONNEAU, Rich, RUCZINSKI, Ingo et BAKER, David. Ab initio protein structure prediction of CASP III targets using ROSETTA. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1999. Vol. 37, n° S3, pp. 171-176. DOI 10.1002/(SICI)1097-0134(1999)37:3+<171::AID-PROT21>3.0.CO;2-Z.

169. LEVITT, Michael et CHOTHIA, Cyrus. Structural patterns in globular proteins. *Nature*. juin 1976. Vol. 261, n° 5561, pp. 552-558. DOI 10.1038/261552a0.

170. FINKELSTEIN, Alexey V. et PTITSYN, Oleg B. Why do globular proteins fit the limited set of foldin patterns? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1 janvier 1987. Vol. 50, n° 3, pp. 171-190. DOI 10.1016/0079-6107(87)90013-7.

171. SETUBAL, Carlos et MEIDANIS, Joao. Introduction Computational Molecular Biology by Joao Meidanis Carlos Setubal. [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.abebooks.com/book-search/title/introduction-computational-molecular-biology/author/joao-meidanis-carlos-setubal/>

172. FLOUDAS, C. A., FUNG, H. K., MCALLISTER, S. R., MÖNNIGMANN, M. et RAJGARIA, R. Advances in protein structure prediction and de novo protein design: A review. *Chemical*

Engineering Science. 1 février 2006. Vol. 61, n° 3, pp. 966-988.
DOI 10.1016/j.ces.2005.04.009.

173. FISCHER, Daniel et EISENBERG, David. Protein fold recognition using sequence-derived predictions. *Protein Science*. 1996. Vol. 5, n° 5, pp. 947-955.
DOI 10.1002/pro.5560050516.

174. RICE, Danny W. et EISENBERG, David. A 3D-1D substitution matrix for protein fold recognition that includes predicted secondary structure of the sequence¹¹Edited by B. Honig. *Journal of Molecular Biology*. 11 avril 1997. Vol. 267, n° 4, pp. 1026-1038.
DOI 10.1006/jmbi.1997.0924.

175. ROST, Burkhard, SCHNEIDER, Reinhard et SANDER, Chris. Protein fold recognition by prediction-based threading. *Journal of Molecular Biology*. 18 juillet 1997. Vol. 270, n° 3, pp. 471-480. DOI 10.1006/jmbi.1997.1101.

176. RUSSELL, Robert B., COPLEY, Richard R. et BARTON, Geoffrey J. Protein Fold Recognition by Mapping Predicted Secondary Structures. *Journal of Molecular Biology*. 14 juin 1996. Vol. 259, n° 3, pp. 349-365. DOI 10.1006/jmbi.1996.0325.

177. BRYANT, Stephen H. et LAWRENCE, Charles E. An empirical energy function for threading protein sequence through the folding motif. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1993. Vol. 16, n° 1, pp. 92-112. DOI 10.1002/prot.340160110.

178. GODZIK, Adam, KOLINSKI, Andrzej et SKOLNICK, Jeffrey. Topology fingerprint approach to the inverse protein folding problem. *Journal of Molecular Biology*. 5 septembre 1992. Vol. 227, n° 1, pp. 227-238. DOI 10.1016/0022-2836(92)90693-E.

179. JONES, D. T., TAYLOR, W. R. et THORNTON, J. M. A new approach to protein fold recognition. *Nature*. juillet 1992. Vol. 358, n° 6381, pp. 86-89. DOI 10.1038/358086a0.

180. TAYLOR, William R. Multiple sequence threading: an analysis of alignment quality and stability¹¹Edited by B.Honig. *Journal of Molecular Biology*. 27 juillet 1997. Vol. 269, n° 5, pp. 902-943. DOI 10.1006/jmbi.1997.1008.

181. SIPPL, Manfred J. Knowledge-based potentials for proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 1 avril 1995. Vol. 5, n° 2, pp. 229-235. DOI 10.1016/0959-440X(95)80081-6.

182. HUANG, Enoch S., SUBBIAH, S., TSAI, Jerry et LEVITT, Michael. Using a Hydrophobic Contact Potential to Evaluate Native and Near-native Folds Generated by Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Molecular Biology*. 5 avril 1996. Vol. 257, n° 3, pp. 716-725. DOI 10.1006/jmbi.1996.0196.

183. WHITE, J. V., MUCHNIK, I. et SMITH, T. F. Modeling protein cores with Markov random fields. *Mathematical Biosciences*. 1 décembre 1994. Vol. 124, n° 2, pp. 149-179. DOI 10.1016/0025-5564(94)90041-8.

184. CASARI, Georg et SIPPL, Manfred J. Structure-derived hydrophobic potential: Hydrophobic potential derived from X-ray structures of globular proteins is able to identify native folds. *Journal of Molecular Biology*. 5 avril 1992. Vol. 224, n° 3, pp. 725-732. DOI 10.1016/0022-2836(92)90556-Y.
185. SIPPL, Manfred J., HENDLICH, Manfred et LACKNER, Peter. Assembly of polypeptide and protein backbone conformations from low energy ensembles of short fragments: Development of strategies and construction of models for myoglobin, lysozyme, and thymosin β 4. *Protein Science*. 1992. Vol. 1, n° 5, pp. 625-640. DOI 10.1002/pro.5560010509.
186. HENDLICH, Manfred, LACKNER, Peter, WEITCKUS, Sabine, FLOECKNER, Hannes, FROSCHAUER, Rosina, GOTTSBACHER, Karl, CASARI, Georg et SIPPL, Manfred J. Identification of native protein folds amongst a large number of incorrect models: The calculation of low energy conformations from potentials of mean force. *Journal of Molecular Biology*. 5 novembre 1990. Vol. 216, n° 1, pp. 167-180. DOI 10.1016/S0022-2836(05)80068-3.
187. BOWIE, J. U., LUTHY, R. et EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*. 12 juillet 1991. Vol. 253, n° 5016, pp. 164-170. DOI 10.1126/science.1853201.
188. LÜTHY, Roland, BOWIE, James U. et EISENBERG, David. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. mars 1992. Vol. 356, n° 6364, pp. 83-85. DOI 10.1038/356083a0.
189. ALEXANDROV, N. N., NUSSINOV, R. et ZIMMER, R. M. Fast protein fold recognition via sequence to structure alignment and contact capacity potentials. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*. 1996. pp. 53-72.
190. KELLEY, Lawrence A, MACCALLUM, Robert M et STERNBERG, Michael J. E. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM11 Edited by J. Thornton. *Journal of Molecular Biology*. 2 juin 2000. Vol. 299, n° 2, pp. 501-522. DOI 10.1006/jmbi.2000.3741.
191. SHI, Jiye, BLUNDELL, Tom L et MIZUGUCHI, Kenji. FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties11 Edited by B. Honig. *Journal of Molecular Biology*. 29 juin 2001. Vol. 310, n° 1, pp. 243-257. DOI 10.1006/jmbi.2001.4762.
192. YANG, Yuedong, FARAGGI, Eshel, ZHAO, Huiying et ZHOU, Yaoqi. Improving protein fold recognition and template-based modeling by employing probabilistic-based matching between predicted one-dimensional structural properties of query and corresponding native properties of templates. *Bioinformatics*. 1 août 2011. Vol. 27, n° 15, pp. 2076-2082. DOI 10.1093/bioinformatics/btr350.
193. KIM, Dongsup, XU, Dong, GUO, Jun-tao, ELLROTT, Kyle et XU, Ying. PROSPECT II: protein structure prediction program for genome-scale applications. *Protein Engineering, Design and Selection*. 1 septembre 2003. Vol. 16, n° 9, pp. 641-650. DOI 10.1093/protein/gzg081.

194. XU, Ying et XU, Dong. Protein threading using PROSPECT: Design and evaluation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2000. Vol. 40, n° 3, pp. 343-354. DOI 10.1002/1097-0134(20000815)40:3<343::AID-PROT10>3.0.CO;2-S.
195. MCLACHLAN, A. D. Rapid comparison of protein structures. *Acta Crystallographica Section A*. 1982. Vol. 38, n° 6, pp. 871-873. DOI 10.1107/S0567739482001806.
196. BAJORATH, Jürgen, STENKAMP, Ronald et ARUFFO, Alejandro. Knowledge-based model building of proteins: Concepts and examples. *Protein Science*. 1993. Vol. 2, n° 11, pp. 1798-1810. DOI 10.1002/pro.5560021103.
197. BLUNDELL, T. L., SIBANDA, B. L., STERNBERG, M. J. E. et THORNTON, J. M. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*. mars 1987. Vol. 326, n° 6111, pp. 347-352. DOI 10.1038/326347a0.
198. JOHNSON, M. S., SRINIVASAN, N., SOWDHAMINI, R. et BLUNDELL, T. L. Knowledge-based protein modeling. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1994. Vol. 29, n° 1, pp. 1-68. DOI 10.3109/10409239409086797.
199. ŠALI, Andrej. Modelling mutations and homologous proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. 1 janvier 1995. Vol. 6, n° 4, pp. 437-451. DOI 10.1016/0958-1669(95)80074-3.
200. SÁNCHEZ, Roberto et ŠALI, Andrej. Advances in comparative protein-structure modelling. *Current Opinion in Structural Biology*. 1 avril 1997. Vol. 7, n° 2, pp. 206-214. DOI 10.1016/S0959-440X(97)80027-9.
201. PEITSCH, M. C. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochemical Society Transactions*. 1 février 1996. Vol. 24, n° 1, pp. 274-279. DOI 10.1042/bst0240274.
202. MARTÍ-RENOM, M. A., STUART, A. C., FISER, A., SÁNCHEZ, R., MELO, F. et SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2000. Vol. 29, pp. 291-325. DOI 10.1146/annurev.biophys.29.1.291.
203. KOPP, Jurgen et SCHWEDE, Torsten. Automated protein structure homology modeling: a progress report. *Pharmacogenomics*. juin 2004. Vol. 5, n° 4, pp. 405-416. DOI 10.1517/14622416.5.4.405.
204. APOSTOLICO, Alberto et GIANCARLO, Raffaele. Sequence Alignment in Molecular Biology. *Journal of Computational Biology*. 1 janvier 1998. Vol. 5, n° 2, pp. 173-196. DOI 10.1089/cmb.1998.5.173.
205. NOTREDAME, Cédric. Recent progress in multiple sequence alignment: a survey. *Pharmacogenomics*. janvier 2002. Vol. 3, n° 1, pp. 131-144. DOI 10.1517/14622416.3.1.131.
206. NOTREDAME, Cédric. Recent evolutions of multiple sequence alignment algorithms. *PLoS computational biology*. août 2007. Vol. 3, n° 8, pp. e123. DOI 10.1371/journal.pcbi.0030123.

207. THOMPSON, J. D., PLEWNIAK, F. et POCH, O. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Research*. 1 juillet 1999. Vol. 27, n° 13, pp. 2682-2690. DOI 10.1093/nar/27.13.2682.
208. WALLACE, Iain M, BLACKSHIELDS, Gordon et HIGGINS, Desmond G. Multiple sequence alignments. *Current Opinion in Structural Biology*. 1 juin 2005. Vol. 15, n° 3, pp. 261-266. DOI 10.1016/j.sbi.2005.04.002.
209. ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. et LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1 septembre 1997. Vol. 25, n° 17, pp. 3389-3402. DOI 10.1093/nar/25.17.3389.
210. PEARSON, W. R. et LIPMAN, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. avril 1988. Vol. 85, n° 8, pp. 2444-2448. DOI 10.1073/pnas.85.8.2444.
211. LIPMAN, D. J. et PEARSON, W. R. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science (New York, N.Y.)*. 22 mars 1985. Vol. 227, n° 4693, pp. 1435-1441. DOI 10.1126/science.2983426.
212. THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. et GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 11 novembre 1994. Vol. 22, n° 22, pp. 4673-4680. DOI 10.1093/nar/22.22.4673.
213. NOTREDAME, Cédric, HIGGINS, Desmond G et HERINGA, Jaap. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment¹¹Edited by J. Thornton. *Journal of Molecular Biology*. 8 septembre 2000. Vol. 302, n° 1, pp. 205-217. DOI 10.1006/jmbi.2000.4042.
214. GREER, J. Comparative modeling methods: application to the family of the mammalian serine proteases. *Proteins*. 1990. Vol. 7, n° 4, pp. 317-334. DOI 10.1002/prot.340070404.
215. LEVITT, Michael. Accurate modeling of protein conformation by automatic segment matching. *Journal of Molecular Biology*. 20 juillet 1992. Vol. 226, n° 2, pp. 507-533. DOI 10.1016/0022-2836(92)90964-L.
216. JONES, Susan et THORNTON, Janet M. Prediction of protein-protein interaction sites using patch analysis¹¹Edited by G. von Heijne. *Journal of Molecular Biology*. 12 septembre 1997. Vol. 272, n° 1, pp. 133-143. DOI 10.1006/jmbi.1997.1233.
217. ŠALI, Andrej et BLUNDELL, Tom L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology*. 5 décembre 1993. Vol. 234, n° 3, pp. 779-815. DOI 10.1006/jmbi.1993.1626.
218. SRINIVASAN, S., MARCH, C. J. et SUDARSANAM, S. An automated method for modeling proteins on known templates using distance geometry. *Protein Science: A*

Publication of the Protein Society. février 1993. Vol. 2, n° 2, pp. 277-289.
DOI 10.1002/pro.5560020216.

219. ASZÓDI, Andrés et TAYLOR, William R. Homology modelling by distance geometry. *Folding and Design*. 1 octobre 1996. Vol. 1, n° 5, pp. 325-334. DOI 10.1016/S1359-0278(96)00048-X.

220. ESWAR, Narayanan, WEBB, Ben, MARTI-RENOM, Marc A., MADHUSUDHAN, M. S., ERAMIAN, David, SHEN, Min-Yi, PIEPER, Ursula et SALI, Andrej. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics*. octobre 2006. Vol. Chapter 5, pp. Unit-5.6. DOI 10.1002/0471250953.bi0506s15.

221. ARNOLD, Konstantin, BORDOLI, Lorenza, KOPP, Jürgen et SCHWEDE, Torsten. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 15 janvier 2006. Vol. 22, n° 2, pp. 195-201. DOI 10.1093/bioinformatics/bti770.

222. KIEFER, Florian, ARNOLD, Konstantin, KÜNZLI, Michael, BORDOLI, Lorenza et SCHWEDE, Torsten. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*. janvier 2009. Vol. 37, n° Database issue, pp. D387-392. DOI 10.1093/nar/gkn750.

223. BIASINI, Marco, BIENERT, Stefan, WATERHOUSE, Andrew, ARNOLD, Konstantin, STUDER, Gabriel, SCHMIDT, Tobias, KIEFER, Florian, CASSARINO, Tiziano Gallo, BERTONI, Martino, BORDOLI, Lorenza et SCHWEDE, Torsten. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*. 1 juillet 2014. Vol. 42, n° Web Server issue, pp. W252-W258. DOI 10.1093/nar/gku340.

224. BAVRO, Vassiliy N., DE ZORZI, Rita, SCHMIDT, Matthias R., MUNIZ, João R. C., ZUBCEVIC, Lejla, SANSOM, Mark S. P., VÉNIEN-BRYAN, Catherine et TUCKER, Stephen J. Structure of a KirBac potassium channel with an open bundle crossing indicates a mechanism of channel gating. *Nature Structural & Molecular Biology*. 8 janvier 2012. Vol. 19, n° 2, pp. 158-163. DOI 10.1038/nsmb.2208.

225. LOMIZE, Mikhail A., POGOZHEVA, Irina D., JOO, Hyeon, MOSBERG, Henry I. et LOMIZE, Andrei L. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*. janvier 2012. Vol. 40, n° D1, pp. D370–D376. DOI 10.1093/nar/gkr703.

226. JO, Sunhwan, KIM, Taehoon, IYER, Vidyashankara G. et IM, Wonpil. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*. 1 août 2008. Vol. 29, n° 11, pp. 1859-1865. DOI 10.1002/jcc.20945.

227. LEVITT, M. et WARSHEL, A. Computer simulation of protein folding. *Nature*. 27 février 1975. Vol. 253, n° 5494, pp. 694-698. DOI 10.1038/253694a0.

228. MARRINK, Siewert J., RISSELADA, H. Jelger, YEFIMOV, Serge, TIELEMAN, D. Peter et DE VRIES, Alex H. The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1 juillet 2007. Vol. 111, n° 27, pp. 7812-7824. DOI 10.1021/jp071097f.

229. SCHLITTER, J., ENGELS, M. et KRÜGER, P. Targeted molecular dynamics: A new approach for searching pathways of conformational transitions. *Journal of Molecular Graphics*. 1 juin 1994. Vol. 12, n° 2, pp. 84-89. DOI 10.1016/0263-7855(94)80072-3.
230. KIRKPATRICK, S., GELATT, C. D. et VECCHI, M. P. Optimization by simulated annealing. *Science (New York, N.Y.)*. 13 mai 1983. Vol. 220, n° 4598, pp. 671-680. DOI 10.1126/science.220.4598.671.
231. LAIO, Alessandro et PARRINELLO, Michele. Escaping free-energy minima. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1 octobre 2002. Vol. 99, n° 20, pp. 12562-12566. DOI 10.1073/pnas.202427399.
232. BARDUCCI, Alessandro, BONOMI, Massimiliano et PARRINELLO, Michele. Metadynamics. *WIREs Computational Molecular Science*. 2011. Vol. 1, n° 5, pp. 826-843. DOI 10.1002/wcms.31.
233. BROOKS, Bernard R., BRUCCOLERI, Robert E., OLAFSON, Barry D., STATES, David J., SWAMINATHAN, S. et KARPLUS, Martin. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*. 1983. Vol. 4, n° 2, pp. 187-217. DOI 10.1002/jcc.540040211.
234. PATEL, Sandeep et BROOKS, Charles L. CHARMM fluctuating charge force field for proteins: I parameterization and application to bulk organic liquid simulations. *Journal of Computational Chemistry*. 15 janvier 2004. Vol. 25, n° 1, pp. 1-15. DOI 10.1002/jcc.10355.
235. PATEL, Sandeep et III, Charles L. Brooks. Fluctuating charge force fields: recent developments and applications from small molecules to macromolecular biological systems. *Molecular Simulation*. 1 mars 2006. Vol. 32, n° 3-4, pp. 231-249. DOI 10.1080/08927020600726708.
236. PATEL, Sandeep, MACKERELL, Alexander D. et BROOKS, Charles L. CHARMM fluctuating charge force field for proteins: II protein/solvent properties from molecular dynamics simulations using a nonadditive electrostatic model. *Journal of Computational Chemistry*. septembre 2004. Vol. 25, n° 12, pp. 1504-1514. DOI 10.1002/jcc.20077.
237. PAULI, W. Über den Zusammenhang des Abschlusses der Elektronengruppen im Atom mit der Komplexstruktur der Spektren. *Zeitschrift für Physik*. 1 février 1925. Vol. 31, pp. 765-783. DOI 10.1007/BF02980631.
238. LONDON, F. Zur Theorie und Systematik der Molekularkräfte. *Zeitschrift für Physik*. 1 mars 1930. Vol. 63, pp. 245-279. DOI 10.1007/BF01421741.
239. VERLET, Loup. Computer « Experiments » on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*. 5 juillet 1967. Vol. 159, n° 1, pp. 98-103. DOI 10.1103/PhysRev.159.98.
240. HOCKNEY, R. W. The Potential Calculation and Some Applications. *Methods Comput. Phys.* 9: 135-211(1970). [en ligne]. 1 janvier 1970. Disponible à l'adresse : <https://www.osti.gov/biblio/4079632-potential-calculation-some-applications>

241. MARTYNA, Glenn J., TOBIAS, Douglas J. et KLEIN, Michael L. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics*. 1 septembre 1994. Vol. 101, n° 5, pp. 4177-4189. DOI 10.1063/1.467468.
242. FELLER, Scott E., ZHANG, Yuhong, PASTOR, Richard W. et BROOKS, Bernard R. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *The Journal of Chemical Physics*. 15 septembre 1995. Vol. 103, n° 11, pp. 4613-4621. DOI 10.1063/1.470648.
243. PHILLIPS, James C., BRAUN, Rosemary, WANG, Wei, GUMBART, James, TAJKHORSHID, Emad, VILLA, Elizabeth, CHIPOT, Christophe, SKEEL, Robert D., KALÉ, Laxmikant et SCHULTEN, Klaus. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*. 2005. Vol. 26, n° 16, pp. 1781-1802. DOI 10.1002/jcc.20289.
244. BROOKS, B. et KARPLUS, M. Harmonic dynamics of proteins: normal modes and fluctuations in bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 novembre 1983. Vol. 80, n° 21, pp. 6571-6575. DOI 10.1073/pnas.80.21.6571.
245. BAHAR, Ivet, LEZON, Timothy R., BAKAN, Ahmet et SHRIVASTAVA, Indira H. Normal mode analysis of biomolecular structures: functional mechanisms of membrane proteins. *Chemical Reviews*. 10 mars 2010. Vol. 110, n° 3, pp. 1463-1497. DOI 10.1021/cr900095e.
246. BAHAR, Ivet, LEZON, Timothy R., YANG, Lee-Wei et EYAL, Eran. Global dynamics of proteins: bridging between structure and function. *Annual Review of Biophysics*. 2010. Vol. 39, pp. 23-42. DOI 10.1146/annurev.biophys.093008.131258.
247. GOLDSTEIN, Herbert. Classical Mechanics. [en ligne]. 1950. Disponible à l'adresse : <https://www.goodreads.com/book/show/10321999-classical-mechanics>
248. WILSON, E. Bright, DECIUS, J. C et CROSS, Paul C. *Molecular vibrations: the theory of infrared and Raman vibrational spectra*. New York : McGraw-Hill, 1955.
249. PERAHIA, D. et MOUAWAD, L. Computation of low-frequency normal modes in macromolecules: improvements to the method of diagonalization in a mixed basis and application to hemoglobin. *Computers & Chemistry*. septembre 1995. Vol. 19, n° 3, pp. 241-246. DOI 10.1016/0097-8485(95)00011-g.
250. MOUAWAD, Liliane et PERAHIA, David. Diagonalization in a mixed basis: A method to compute low-frequency normal modes for large macromolecules. *Biopolymers*. 1993. Vol. 33, n° 4, pp. 599-611. DOI 10.1002/bip.360330409.
251. FLOQUET, Nicolas, MARECHAL, Jean-Didier, BADET-DENISOT, Marie-Ange, ROBERT, Charles H., DAUCHEZ, Manuel et PERAHIA, David. Normal mode analysis as a prerequisite for drug design: application to matrix metalloproteinases inhibitors. *FEBS letters*. 2 octobre 2006. Vol. 580, n° 22, pp. 5130-5136. DOI 10.1016/j.febslet.2006.08.037.
252. COSTA, Mauricio G. S., BATISTA, Paulo R., BISCH, Paulo M. et PERAHIA, David. Exploring Free Energy Landscapes of Large Conformational Changes: Molecular Dynamics

with Excited Normal Modes. [en ligne]. 5 mai 2015. Disponible à l'adresse :
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jctc.5b00003>

253. FLOQUET, Nicolas, COSTA, Mauricio G. S., BATISTA, Paulo R., RENAULT, Pedro, BISCH, Paulo M., RAUSSIN, Florent, MARTINEZ, Jean, MORRIS, May C. et PERAHIA, David. Conformational Equilibrium of CDK/Cyclin Complexes by Molecular Dynamics with Excited Normal Modes. *Biophysical Journal*. 15 septembre 2015. Vol. 109, n° 6, pp. 1179-1189. DOI 10.1016/j.bpj.2015.07.003.

254. ZHANG, Z. et SMITH, D. L. Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. avril 1993. Vol. 2, n° 4, pp. 522-531.

255. WALES, Thomas E. et ENGEN, John R. Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrometry Reviews*. février 2006. Vol. 25, n° 1, pp. 158-170. DOI 10.1002/mas.20064.

256. KONERMANN, Lars, PAN, Jingxi et LIU, Yu-Hong. Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics. *Chemical Society Reviews*. 22 février 2011. Vol. 40, n° 3, pp. 1224-1234. DOI 10.1039/C0CS00113A.

257. MORGAN, Christopher R., HEBLING, Christine M., RAND, Kasper D., STAFFORD, Darrel W., JORGENSON, James W. et ENGEN, John R. Conformational transitions in the membrane scaffold protein of phospholipid bilayer nanodiscs. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. septembre 2011. Vol. 10, n° 9, pp. M111.010876. DOI 10.1074/mcp.M111.010876.

258. REY, Martial, MAN, Petr, CLÉMENÇON, Benjamin, TRÉZÉGUET, Véronique, BRANDOLIN, Gérard, FOREST, Eric et PELOSI, Ludovic. Conformational dynamics of the bovine mitochondrial ADP/ATP carrier isoform 1 revealed by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry. *The Journal of Biological Chemistry*. 5 novembre 2010. Vol. 285, n° 45, pp. 34981-34990. DOI 10.1074/jbc.M110.146209.

259. MEHMOOD, Shahid, DOMENE, Carmen, FOREST, Eric et JAULT, Jean-Michel. Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward- and outward-facing conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 3 juillet 2012. Vol. 109, n° 27, pp. 10832-10836. DOI 10.1073/pnas.1204067109.

260. WEST, Graham M., CHIEN, Ellen Y. T., KATRITCH, Vsevolod, GATCHALIAN, Jovylyn, CHALMERS, Michael J., STEVENS, Raymond C. et GRIFFIN, Patrick R. Ligand-dependent perturbation of the conformational ensemble for the GPCR β 2 adrenergic receptor revealed by HDX. *Structure (London, England: 1993)*. 12 octobre 2011. Vol. 19, n° 10, pp. 1424-1432. DOI 10.1016/j.str.2011.08.001.

261. BURKE, John E., VADAS, Oscar, BERNDT, Alex, FINEGAN, Tara, PERISIC, Olga et WILLIAMS, Roger L. Dynamics of the phosphoinositide 3-kinase p110 δ interaction with p85 α and membranes reveals aspects of regulation distinct from p110 α . *Structure (London, England: 1993)*. 10 août 2011. Vol. 19, n° 8, pp. 1127-1137. DOI 10.1016/j.str.2011.06.003.

262. SKINNER, John J., LIM, Woon K., BÉDARD, Sabrina, BLACK, Ben E. et ENGLANDER, S. Walter. Protein dynamics viewed by hydrogen exchange. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. juillet 2012. Vol. 21, n° 7, pp. 996-1005. DOI 10.1002/pro.2081.
263. CAO, Jian, BURKE, John E. et DENNIS, Edward A. Using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry to define the specific interactions of the phospholipase A2 superfamily with lipid substrates, inhibitors, and membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 18 janvier 2013. Vol. 288, n° 3, pp. 1806-1813. DOI 10.1074/jbc.R112.421909.
264. HIBINO, Hiroshi, INANOBE, Atsushi, FURUTANI, Kazuharu, MURAKAMI, Shingo, FINDLAY, Ian et KURACHI, Yoshihisa. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiological Reviews*. janvier 2010. Vol. 90, n° 1, pp. 291-366. DOI 10.1152/physrev.00021.2009.
265. BICHET, D., HAASS, F. A. et JAN, L. Y. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003. Vol. 4, n° 12, pp. 957-967. ISI:000186790700015
266. SWARTZ, K. J. Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat Rev Neurosci*. 2004. Vol. 5, n° 12, pp. 905-16. DOI 10.1038/nrn1559. 15550946
267. HANSEN, S. B., TAO, X. et MACKINNON, R. Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature*. 2011. Vol. 477, n° 7365, pp. 495-U152. DOI 10.1038/nature10370. WOS:000295080500047
268. KUO, A. L., GULBIS, J. M., ANTCLIFF, J. F., RAHMAN, T., LOWE, E. D., ZIMMER, J., CUTHBERTSON, J., ASHCROFT, F. M., EZAKI, T. et DOYLE, D. A. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science*. 2003. Vol. 300, n° 5627, pp. 1922-1926. ISI:000183619400039
269. DE ZORZI, Rita, NICHOLSON, William V., GUIGNER, Jean-Michel, ERNE-BRAND, Françoise et VÉNIEN-BRYAN, Catherine. Growth of large and highly ordered 2D crystals of a K⁺ channel, structural role of lipidic environment. *Biophysical Journal*. 16 juillet 2013. Vol. 105, n° 2, pp. 398-408. DOI 10.1016/j.bpj.2013.05.054.
270. KUO, A. L., DOMENE, C., JOHNSON, L. N., DOYLE, D. A. et VENIEN-BRYAN, C. Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography. *Structure*. octobre 2005. Vol. 13, n° 10, pp. 1463-1472. DOI 10.1016/j.str.2005.07.011.
271. ENKVETCHAKUL, Decha, JELIAZKOVA, Iana, BHATTACHARYYA, Jaya et NICHOLS, Colin G. Control of inward rectifier K channel activity by lipid tethering of cytoplasmic domains. *JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY*. septembre 2007. Vol. 130, n° 3, pp. 329-334. DOI 10.1085/jgp.200709764.
272. BAVRO, Vassiliy N., DE ZORZI, Rita, SCHMIDT, Matthias R., MUNIZ, João R. C., ZUBCEVIC, Lejla, SANSOM, Mark S. P., VÉNIEN-BRYAN, Catherine et TUCKER, Stephen J. Structure of a KirBac potassium channel with an open bundle crossing indicates a

mechanism of channel gating. *Nature Structural & Molecular Biology*. février 2012. Vol. 19, n° 2, pp. 158-163. DOI 10.1038/nsmb.2208.

273. CLARKE, O.B., CAPUTO, A, HILLS, A.P., VANDENBERG, J.I., SMITH, B.J. et GULBIS, J.M. Domain reorientation and rotation of an intracellular assembly regulate conduction in Kir Potassium Channels. *Cell*. 2010. Vol. 141, pp. 1018-1029.

274. WHORTON, M. R. et MACKINNON, R. Crystal Structure of the Mammalian GIRK2 K(+) Channel and Gating Regulation by G Proteins, PIP(2), and Sodium. *Cell*. 2011. Vol. 147, n° 1, pp. 199-208. DOI 10.1016/j.cell.2011.07.046. WOS:000295396700026

275. BERNECHE, S et ROUX, B. Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *NATURE*. 1 novembre 2001. Vol. 414, n° 6859, pp. 73-77. DOI 10.1038/35102067.

276. ZHOU, M, MORAI-CABRAL, JH, MANN, S et MACKINNON, R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *NATURE*. juin 2001. Vol. 411, n° 6838, pp. 657-661. DOI 10.1038/35079500.

277. WANG, Shizhen, LEE, Sun-Joo, HEYMAN, Sarah, ENKVETCHAKUL, Decha et NICHOLS, Colin G. Structural rearrangements underlying ligand-gating in Kir channels. *NATURE COMMUNICATIONS*. janvier 2012. Vol. 3. DOI 10.1038/ncomms1625.

278. WANG, Shizhen, VAFABAKHSH, Reza, BORSHELL, William F., HA, Taekjip et NICHOLS, Colin G. Structural dynamics of potassium-channel gating revealed by single-molecule FRET. *NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY*. janvier 2016. Vol. 23, n° 1, pp. 31-36. DOI 10.1038/nsmb.3138.

279. GUPTA, Sayan, BAVRO, Vassiliy N., D'MELLO, Rhijuta, TUCKER, Stephen J., VÉNIEN-BRYAN, Catherine et CHANCE, Mark R. Conformational changes during the gating of a potassium channel revealed by structural mass spectrometry. *Structure (London, England: 1993)*. 14 juillet 2010. Vol. 18, n° 7, pp. 839-846. DOI 10.1016/j.str.2010.04.012.

280. CUELLO, L. G., JOGINI, V., CORTES, D. M. et PEROZO, E. Structural mechanism of C-type inactivation in K⁺ channels. *Nature*. 2010. Vol. 466, n° 7303, pp. 203-U73. DOI 10.1038/nature09153. WOS:000279580800029

281. GROTTESI, A, DOMENE, C, HALL, B et SANSOM, MSP. Conformational dynamics of M2 helices in KirBac channels: Helix flexibility in relation to gating via molecular dynamics simulations. *BIOCHEMISTRY*. 8 novembre 2005. Vol. 44, n° 44, pp. 14586-14594. DOI 10.1021/bi0510429.

282. MENG, Xuan-Yu, LIU, Shengtang, CUI, Meng, ZHOU, Ruhong et LOGOTHETIS, Diomedes E. The Molecular Mechanism of Opening the Helix Bundle Crossing (HBC) Gate of a Kir Channel. *SCIENTIFIC REPORTS*. 21 juillet 2016. Vol. 6. DOI 10.1038/srep29399.

283. COSTA, Mauricio G. S., BATISTA, Paulo R., BISCH, Paulo M. et PERAHIA, David. Exploring Free Energy Landscapes of Large Conformational Changes: Molecular Dynamics with Excited Normal Modes. *JOURNAL OF CHEMICAL THEORY AND COMPUTATION*. juin 2015. Vol. 11, n° 6, pp. 2755-2767. DOI 10.1021/acs.jctc.5b00003.

284. HUANG, Jing et MACKERELL, Alexander D., Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY*. 30 septembre 2013. Vol. 34, n° 25, pp. 2135-2145. DOI 10.1002/jcc.23354.
285. MEHMOOD, Shahid, DOMENE, Carmen, FOREST, Eric et JAULT, Jean-Michel. Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward- and outward-facing conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 3 juillet 2012. Vol. 109, n° 27, pp. 10832-10836. DOI 10.1073/pnas.1204067109.
286. GILADI, Moshe, ALMAGOR, Lior, VAN DIJK, Liat, HILLER, Reuben, MAN, Petr, FOREST, Eric et KHANANSHVILI, Daniel. Asymmetric Preorganization of Inverted Pair Residues in the Sodium-Calcium Exchanger. *SCIENTIFIC REPORTS*. 15 février 2016. Vol. 6. DOI 10.1038/srep20753.
287. CHENG, W., W.,L., ENKVETCHAKUL, D. et NICHOLS, C.G. KirBac1.1: It's an Inward Rectifying Potassium Channel. *J. Gen. Physiol.* 2009. Vol. 133, n° 3, pp. 295-305.
288. BERNSTEINER, Harald, ZANGERL-PLESSL, Eva-Maria, CHEN, Xingyu et STARY-WEINZINGER, Anna. Conduction through a narrow inward-rectifier K⁺ channel pore. *The Journal of General Physiology*. 7 octobre 2019. Vol. 151, n° 10, pp. 1231-1246. DOI 10.1085/jgp.201912359.
289. LI, Dailin, JIN, Taihao, GAZGALIS, Dimitris, CUI, Meng et LOGOTHETIS, Diomedes E. On the mechanism of GIRK2 channel gating by phosphatidylinositol bisphosphate, sodium, and the G $\beta\gamma$ dimer. *The Journal of Biological Chemistry*. 6 décembre 2019. Vol. 294, n° 49, pp. 18934-18948. DOI 10.1074/jbc.RA119.010047.
290. LONG, SB, CAMPBELL, EB et MACKINNON, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *SCIENCE*. 5 août 2005. Vol. 309, n° 5736, pp. 897-903. DOI 10.1126/science.1116269.
291. PAYANDEH, Jian, SCHEUER, Todd, ZHENG, Ning et CATTERALL, William A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *NATURE*. 21 juillet 2011. Vol. 475, n° 7356, pp. 353-U104. DOI 10.1038/nature10238.
292. WHORTON, M. R. et MACKINNON, R. X-ray structure of the mammalian GIRK2-beta gamma G-protein complex. *Nature*. 2013. Vol. 498, n° 7453, pp. 190- +. DOI 10.1038/nature12241. WOS:000320283400039
293. JAROSLAWSKI, Szymon, ZADEK, Brittany, ASHCROFT, Frances, VENIEN-BRYAN, Catherine et SCHEURING, Simon. Direct visualization of KirBac3.1 potassium channel gating by atomic force microscopy. *Journal of Molecular Biology*. 23 novembre 2007. Vol. 374, n° 2, pp. 500-505. DOI 10.1016/j.jmb.2007.09.043.
294. PEGAN, S, ARRABIT, C, ZHOU, W, KWIATKOWSKI, W, COLLINS, A, SLESINGER, PA et CHOE, S. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *NATURE NEUROSCIENCE*. mars 2005. Vol. 8, n° 3, pp. 279-287. DOI 10.1038/nn1411.

295. MENG, Xuan-Yu, ZHANG, Hong-Xing, LOGOTHETIS, Diomedes E. et CUI, Meng. The Molecular Mechanism by which PIP2 Opens the Intracellular G-Loop Gate of a Kir3.1 Channel. *BIOPHYSICAL JOURNAL*. 2 mai 2012. Vol. 102, n° 9, pp. 2049-2059. DOI 10.1016/j.bpj.2012.03.050.
296. D'AVANZO, Nazzareno, CHENG, Wayland W. L., WANG, Shizhen, ENKVETCHAKUL, Decha et NICHOLS, Colin G. Lipids driving protein structure? Evolutionary adaptations in Kir channels. *Channels (Austin, Tex.)*. juin 2010. Vol. 4, n° 3, pp. 139-141.
297. SOOM, M., SCHÖNHERR, R., KUBO, Y., KIRSCH, C., KLINGER, R. et HEINEMANN, S. H. Multiple PIP2 binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS letters*. 9 février 2001. Vol. 490, n° 1-2, pp. 49-53.
298. KRISSINEL, Evgeny et HENRICK, Kim. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *Journal of Molecular Biology*. 21 septembre 2007. Vol. 372, n° 3, pp. 774-797. DOI 10.1016/j.jmb.2007.05.022.
299. OLSSON, Mats H. M., SONDERGAARD, Chresten R., ROSTKOWSKI, Michal et JENSEN, Jan H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pK(a) Predictions. *JOURNAL OF CHEMICAL THEORY AND COMPUTATION*. février 2011. Vol. 7, n° 2, pp. 525-537. DOI 10.1021/ct100578z.
300. SONDERGAARD, Chresten R., OLSSON, Mats H. M., ROSTKOWSKI, Michal et JENSEN, Jan H. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pK(a) Values. *JOURNAL OF CHEMICAL THEORY AND COMPUTATION*. juillet 2011. Vol. 7, n° 7, pp. 2284-2295. DOI 10.1021/ct200133y.
301. LOMIZE, Mikhail A., POGOZHEVA, Irina D., JOO, Hyeon, MOSBERG, Henry I. et LOMIZE, Andrei L. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Research*. 1 janvier 2012. Vol. 40, n° D1, pp. D370-D376. DOI 10.1093/nar/gkr703.
302. LOMIZE, Mikhail A., POGOZHEVA, Irina D., JOO, Hyeon, MOSBERG, Henry I. et LOMIZE, Andrei L. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*. janvier 2012. Vol. 40, n° D1, pp. D370-D376. DOI 10.1093/nar/gkr703.
303. LEE, Jumin, CHENG, Xi, SWAILS, Jason M., YEOM, Min Sun, EASTMAN, Peter K., LEMKUL, Justin A., WEI, Shuai, BUCKNER, Joshua, JEONG, Jong Cheol, QI, Yifei, JO, Sunhwan, PANDE, Vijay S., CASE, David A., CHARLES L. BROOKS, I. I. I., ALEXANDER D. MACKERELL, Jr, KLAUDA, Jeffery B. et IM, Wonpil. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. [en ligne]. 3 décembre 2015. [Consulté le 24 septembre 2018]. Disponible à l'adresse : <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jctc.5b00935>
304. JORGENSEN, William L., CHANDRASEKHAR, Jayaraman, MADURA, Jeffrey D., IMPEY, Roger W. et KLEIN, Michael L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*. 15 juillet 1983. Vol. 79, n° 2, pp. 926-935. DOI 10.1063/1.445869.

305. PHILLIPS, JC, BRAUN, R, WANG, W, GUMBART, J, TAJKHORSHID, E, VILLA, E, CHIPOT, C, SKEEL, RD, KALE, L et SCHULTEN, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY*. décembre 2005. Vol. 26, n° 16, pp. 1781-1802. DOI 10.1002/jcc.20289.
306. MOUAWAD, L et PERAHIA, D. Diagonalization in a mixed basis: A method to compute low-frequency normal modes for large macromolecules. *Biopolymers*. avril 1993. Vol. 33, n° 4, pp. 599-611. DOI 10.1002/bip.360330409.
307. PERAHIA, D et MOUHAWAD, L. Computation of low-frequency normal-modes in macromolecules- improvements to the method of diagonalization in a mixed basis and application to hemoglobin. *COMPUTERS & CHEMISTRY*. septembre 1995. Vol. 19, n° 3, pp. 241-246. DOI 10.1016/0097-8485(95)00011-G.
308. HUMPHREY, William, DALKE, Andrew et SCHULTEN, Klaus. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1 février 1996. Vol. 14, n° 1, pp. 33-38. DOI 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
309. ZHANG, ZQ et MARSHALL, AG. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY*. mars 1998. Vol. 9, n° 3, pp. 225-233. DOI 10.1016/S1044-0305(97)00284-5.
310. ASHCROFT, Frances M. ATP-sensitive K⁺ channels and disease: from molecule to malady. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM*. octobre 2007. Vol. 293, n° 4, pp. E880-E889. DOI 10.1152/ajpendo.00348.2007.
311. BABENKO, Andrey P., POLAK, Michel, CAVE, Helene, BUSIAH, Kanetee, CZERNICHOW, Paul, SCHARFMANN, Raphael, BRYAN, Joseph, AGUILAR-BRYAN, Lydia, VAXILLAIRE, Martine et FROGUEL, Philippe. Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*. 3 août 2006. Vol. 355, n° 5, pp. 456-466. DOI 10.1056/NEJMoa055068.
312. GLOYN, AL, PEARSON, ER, ANTCLIFF, JF, PROKS, P, BRUINING, GJ, SLINGERLAND, AS, HOWARD, N, SRINIVASAN, S, SILVA, JMCL, MOLNES, J, EDGHILL, EL, FRAYLING, TM, TEMPLE, IK, MACKAY, D, SHIELD, JPH, SUMNIK, Z, VAN RHIJN, A, WALES, JKH, CLARK, P, GORMAN, S, AISENBERG, J, ELLARD, S, NJOLSTAD, PR, ASHCROFT, FM et HATTERSLEY, AT. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*. 29 avril 2004. Vol. 350, n° 18, pp. 1838-1849. DOI 10.1056/NEJMoa032922.
313. HATTERSLEY, AT et ASHCROFT, FM. Activating mutations in Kir6.2 and neonatal diabetes - New clinical syndromes, new scientific insights, and new therapy. *DIABETES*. septembre 2005. Vol. 54, n° 9, pp. 2503-2513. DOI 10.2337/diabetes.54.9.2503.
314. PROKS, P, ANTCLIFF, JF, GLOYN, AL, HATTERSLEY, AT et ASHCROFT, FM. Molecular basis of Kir6.2 mutations causing neonatal diabetes and neonatal diabetes with neurological features. *BIOPHYSICAL JOURNAL*. janvier 2005. Vol. 88, n° 1, 2, S, pp. 181A.

315. AGUILAR-BRYAN, L et BRYAN, J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *ENDOCRINE REVIEWS*. avril 1999. Vol. 20, n° 2, pp. 101-135. DOI 10.1210/er.20.2.101.
316. ANTCLIFF, JF, HAIDER, S, PROKS, P, SANSOM, MSP et ASHCROFT, FM. Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the K-ATP channel Kir6.2 subunit. *EMBO JOURNAL*. 26 janvier 2005. Vol. 24, n° 2, pp. 229-239. DOI 10.1038/sj.emboj.7600487.
317. NICHOLS, CG. K-ATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *NATURE*. 23 mars 2006. Vol. 440, n° 7083, pp. 470-476. DOI 10.1038/nature04711.
318. VEDOVATO, Natascia, ASHCROFT, Frances M. et PULJUNG, Michael C. The Nucleotide-Binding Sites of SUR1: A Mechanistic Model. *BIOPHYSICAL JOURNAL*. 15 décembre 2015. Vol. 109, n° 12, pp. 2452-2460. DOI 10.1016/j.bpj.2015.10.026.
319. ASHCROFT, F. M., ASHCROFT, S. J. et HARRISON, D. E. Properties of single potassium channels modulated by glucose in rat pancreatic beta-cells. *The Journal of Physiology*. juin 1988. Vol. 400, pp. 501-527. DOI 10.1113/jphysiol.1988.sp017134.
320. ASHCROFT, FM. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annual Review of Neuroscience*. 1988. Vol. 11, pp. 97-118. DOI 10.1146/annurev.ne.11.030188.000525.
321. MAENNIKKOE, Roope, STANSFELD, Phillip J., ASHCROFT, Alexandra S., HATTERSLEY, Andrew T., SANSOM, Mark S. P., ELLARD, Sian et ASHCROFT, Frances M. A conserved tryptophan at the membrane-water interface acts as a gatekeeper for Kir6.2/SUR1 channels and causes neonatal diabetes when mutated. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON*. 1 juillet 2011. Vol. 589, n° 13, pp. 3071-3083. DOI 10.1113/jphysiol.2011.209700.
322. FOREST, Eric et MAN, Petr. Conformational Dynamics and Interactions of Membrane Proteins by Hydrogen/Deuterium Mass Spectrometry. In : MUSVETEAU, I (éd.), *HETEROLOGOUS EXPRESSION OF MEMBRANE PROTEINS: METHODS AND PROTOCOLS, 2ND EDITION*. 2016. pp. 269-279. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-3637-3.
323. OGANESYAN, Irina, LENTO, Cristina et WILSON, Derek J. Contemporary hydrogen deuterium exchange mass spectrometry. *METHODS*. 15 juillet 2018. Vol. 144, pp. 27-42. DOI 10.1016/j.ymeth.2018.04.023.
324. VADAS, O., JENKINS, M. L., DORNAN, G. L. et BURKE, J. E. Using Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry to Examine Protein-Membrane Interactions. In : GELB, MH (éd.), *ENZYMOLGY AT THE MEMBRANE INTERFACE: INTERFACIAL ENZYMOLOGY AND PROTEIN-MEMBRANE BINDING*. 2017. pp. 143-172. Methods in Enzymology. ISBN 978-0-12-809695-6.
325. FAGNEN, charline, BANNWARTH, Ludovic, OUBELLA, Iman, FOREST, Eric, DE ZORZI, Rita, DE ARAUJO, Aline, MHOUMADI, Yasmina, BENDAHHOU, Saïd, PERAHIA, David et VÉNIEN-BRYAN, Catherine. New Structural and functional insights into Kir channel gating from molecular simulations, HDX-MS and functional studies. *submitted*. 2020.

326. ASHCROFT, F. M. *Ion channels and diseases*. New-York : Academic press, 2000.
327. DING, Dian, WANG, Mengmeng, WU, Jing-Xiang, KANG, Yunlu et CHEN, Lei. The Structural Basis for the Binding of Repaglinide to the Pancreatic K-ATP Channel. *CELL REPORTS*. 7 mai 2019. Vol. 27, n° 6, pp. 1848+. DOI 10.1016/j.celrep.2019.04.050.
328. SHIMOMURA, K., HOERSTER, F., DE WET, H., FLANAGAN, S. E., ELLARD, S., HATTERSLEY, A. T., WOLF, N. I., ASHCROFT, F. et EBINGER, F. A novel mutation causing DEND syndrome - A treatable channelopathy of pancreas and brain. *NEUROLOGY*. 25 septembre 2007. Vol. 69, n° 13, pp. 1342-1349. DOI 10.1212/01.wnl.0000268488.51776.53.
329. TARASOV, A. I., GIRARD, C. A., LARKIN, B., TAMMARO, P., FLANAGAN, S. E., ELLARD, S. et ASHCROFT, F. M. Functional analysis of two Kir6.2 (KCNJ11) mutations, K170T and E322K, causing neonatal diabetes. *DIABETES OBESITY & METABOLISM*. novembre 2007. Vol. 9, n° 2, pp. 46-55. DOI 10.1111/j.1463-1326.2007.00777.x.
330. DRAIN, P, GENG, XH et LI, LH. Concerted gating mechanism underlying K-ATP channel inhibition by ATP. *BIOPHYSICAL JOURNAL*. avril 2004. Vol. 86, n° 4, pp. 2101-2112. DOI 10.1016/S0006-3495(04)74269-1.
331. MCCOY, Airlie J., GROSSE-KUNSTLEVE, Ralf W., ADAMS, Paul D., WINN, Martyn D., STORONI, Laurent C. et READ, Randy J. Phaser crystallographic software. *JOURNAL OF APPLIED CRYSTALLOGRAPHY*. août 2007. Vol. 40, n° 4, pp. 658-674. DOI 10.1107/S0021889807021206.
332. EMSLEY, P. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*. 2004. Vol. 60, pp. 2126-2132. DOI 10.1107/s0907444904019158|issn. WOS:000225360500002
333. BLANC, E, ROVERSI, P, VONRHEIN, C, FLENSBURG, C, LEA, SM et BRICOGNE, G. Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION D-STRUCTURAL BIOLOGY*. décembre 2004. Vol. 60, n° 12, 1, pp. 2210-2221. DOI 10.1107/S0907444904016427.
334. CHEN, Vincent B., ARENDALL, W. Bryan, III, HEADD, Jeffrey J., KEEDY, Daniel A., IMMORMINO, Robert M., KAPRAL, Gary J., MURRAY, Laura W., RICHARDSON, Jane S. et RICHARDSON, David C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION D-STRUCTURAL BIOLOGY*. janvier 2010. Vol. 66, n° 1, pp. 12-21. DOI 10.1107/S0907444909042073.
335. BROOKS, BR, BRUCCOLERI, RE, OLAFSON, BD, STATES, DJ, SWAMINATHAN, S et KARPLUS, M. CHARM - A PROGRAM FOR MACROMOLECULAR ENERGY, MINIMIZATION, AND DYNAMICS CALCULATIONS. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY*. 1983. Vol. 4, n° 2, pp. 187-217. DOI 10.1002/jcc.540040211.
336. KRISSINEL, Evgeny et HENRICK, Kim. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*. 21 septembre 2007. Vol. 372, n° 3, pp. 774-797. DOI 10.1016/j.jmb.2007.05.022.

337. PETERSEN, EF, GODDARD, TD, HUANG, CC, COUCH, GS, GREENBLATT, DM, MENG, EC et FERRIN, TE. UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY*. octobre 2004. Vol. 25, n° 13, pp. 1605-1612. DOI 10.1002/jcc.20084.
338. JORGENSEN, WL, CHANDRASEKHAR, J, MADURA, JD, IMPEY, RW et KLEIN, ML. COMPARISON OF SIMPLE POTENTIAL FUNCTIONS FOR SIMULATING LIQUID WATER. *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*. 1983. Vol. 79, n° 2, pp. 926-935. DOI 10.1063/1.445869.
339. JO, Sunhwan, KIM, Taehoon, IYER, Vidyashankara G. et IM, Wonpil. Software news and updates - CHARNIM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY*. août 2008. Vol. 29, n° 11, pp. 1859-1865. DOI 10.1002/jcc.20945.
340. LEE, Jumin, CHENG, Xi, SWAILS, Jason M., YEOM, Min Sun, EASTMAN, Peter K., LEMKUL, Justin A., WEI, Shuai, BUCKNER, Joshua, JEONG, Jong Cheol, QI, Yifei, JO, Sunhwan, PANDE, Vijay S., CASE, David A., BROOKS, Charles L., III, MACKERELL, Alexander D., Jr., KLAUDA, Jeffery B. et IM, Wonpil. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *JOURNAL OF CHEMICAL THEORY AND COMPUTATION*. janvier 2016. Vol. 12, n° 1, pp. 405-413. DOI 10.1021/acs.jctc.5b00935.
341. PIOVESAN, Damiano, MINERVINI, Giovanni et TOSATTO, Silvio C. E. The RING 2.0 web server for high quality residue interaction networks. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*. 8 juillet 2016. Vol. 44, n° W1, pp. W367-W374. DOI 10.1093/nar/gkw315.
342. SHANNON, P, MARKIEL, A, OZIER, O, BALIGA, NS, WANG, JT, RAMAGE, D, AMIN, N, SCHWIKOWSKI, B et IDEKER, T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *GENOME RESEARCH*. novembre 2003. Vol. 13, n° 11, pp. 2498-2504. DOI 10.1101/gr.1239303.
343. HUMPHREY, W, DALKE, A et SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. *JOURNAL OF MOLECULAR GRAPHICS & MODELLING*. février 1996. Vol. 14, n° 1, pp. 33-38. DOI 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
344. PAYNTER, Jennifer J., ANDRES-ENGUIG, Isabelle, FOWLER, Philip W., TOTTEY, Stephen, CHENG, Wayland, ENKVETCHAKUL, Decha, BAVRO, Vassiliy N., KUSAKABE, Yoshio, SANSOM, Mark S. P., ROBINSON, Nigel J., NICHOLS, Colin G. et TUCKER, Stephen J. Functional Complementation and Genetic Deletion Studies of KirBac Channels ACTIVATORY MUTATIONS HIGHLIGHT GATING-SENSITIVE DOMAINS. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 24 décembre 2010. Vol. 285, n° 52, pp. 40754-40761. DOI 10.1074/jbc.M110.175687.
345. NISHIDA, M., CADENE, M., CHAIT, BT et MACKINNON, R. Crystals structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *Embo Journal*. 2007. Vol. 26, n° 17, pp. 4005-4015.
346. CLARKE, Oliver B., CAPUTO, Alessandro T., HILL, Adam P., VANDENBERG, Jamie I., SMITH, Brian J. et GULBIS, Jacqueline M. Domain Reorientation and Rotation of an

Intracellular Assembly Regulate Conduction in Kir Potassium Channels. *Cell*. 11 juin 2010. Vol. 141, n° 6, pp. 1018-1029. DOI 10.1016/j.cell.2010.05.003.

347. MOUAWAD, Liliane et PERAHIA, David. Diagonalization in a mixed basis: A method to compute low-frequency normal modes for large macromolecules. *Biopolymers*. 1 avril 1993. Vol. 33, n° 4, pp. 599-611. DOI 10.1002/bip.360330409.

348. TAYLOR, K. A. et GLAESER, R. M. Electron microscopy of frozen hydrated biological specimens. *Journal of Ultrastructure Research*. juin 1976. Vol. 55, n° 3, pp. 448-456. DOI 10.1016/s0022-5320(76)80099-8.

349. DUBOCHET, J., LEPAULT, J., FREEMAN, R., BERRIMAN, J. A. et HOMO, J.-C. Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions. *Journal of Microscopy*. décembre 1982. Vol. 128, n° 3, pp. 219-237. DOI 10.1111/j.1365-2818.1982.tb04625.x.

350. LEPAULT, J., BOOY, F. P. et DUBOCHET, J. Electron microscopy of frozen biological suspensions. *Journal of Microscopy*. janvier 1983. Vol. 129, n° Pt 1, pp. 89-102. DOI 10.1111/j.1365-2818.1983.tb04163.x.

351. ADRIAN, M., DUBOCHET, J., LEPAULT, J. et MCDOWALL, A. W. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature*. 1 mars 1984. Vol. 308, n° 5954, pp. 32-36. DOI 10.1038/308032a0.

352. DUBOCHET, J. et MCDOWALL, A. W. Vitrification of Pure Water for Electron Microscopy. *Journal of Microscopy*. 1981. Vol. 124, n° 3, pp. 3-4. DOI 10.1111/j.1365-2818.1981.tb02483.x.

353. DUBOCHET, J., ADRIAN, M., CHANG, J. J., HOMO, J. C., LEPAULT, J., MCDOWALL, A. W. et SCHULTZ, P. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Reviews of Biophysics*. mai 1988. Vol. 21, n° 2, pp. 129-228. DOI 10.1017/s0033583500004297.

354. HENDERSON, R. The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Quarterly Reviews of Biophysics*. mai 1995. Vol. 28, n° 2, pp. 171-193. DOI 10.1017/s003358350000305x.

355. FRANK, Joachim. *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State* [en ligne]. Oxford University Press, 2006. ISBN 978-0-19-989341-6. Disponible à l'adresse : <https://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780195182187.001.0001/acprof-9780195182187>

356. ERICKSON, H. P. et KLUG, A. Measurement and Compensation of Defocusing and Aberrations by Fourier Processing of Electron Micrographs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1971. Vol. 261, n° 837, pp. 105-118. JSTOR

357. WADE, R. H. A brief look at imaging and contrast transfer. *Ultramicroscopy*. 1 octobre 1992. Vol. 46, n° 1, pp. 145-156. DOI 10.1016/0304-3991(92)90011-8.

358. HANSZEN, Karl-Joseph. The Optical Transfer Theory of the Electron Microscope: Fundamental Principles and Applications. In : HAWKES, Peter W. (éd.), *Advances in Imaging and Electron Physics* [en ligne]. Elsevier, 1971. pp. 1-84. *Advances in Imaging and Electron Physics*. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1076567018300144>
359. SPENCE, John C. H. *High-Resolution Electron Microscopy*. Fourth Edition. Oxford, New York : Oxford University Press, 2017. ISBN 978-0-19-879583-4.
360. HAWKES, Peter W. The Electron Microscope as a Structure Projector. In : FRANK, Joachim (éd.), *Electron Tomography: Methods for Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell* [en ligne]. New York, NY : Springer, 2006. pp. 83-111. ISBN 978-0-387-69008-7. Disponible à l'adresse : https://doi.org/10.1007/978-0-387-69008-7_4
361. ZHU, J., PENCZEK, P. A., SCHRÖDER, R. et FRANK, J. Three-dimensional reconstruction with contrast transfer function correction from energy-filtered cryoelectron micrographs: procedure and application to the 70S Escherichia coli ribosome. *Journal of Structural Biology*. avril 1997. Vol. 118, n° 3, pp. 197-219. DOI 10.1006/jsbi.1997.3845.
362. TOYOSHIMA, Chikashi et UNWIN, Nigel. Contrast transfer for frozen-hydrated specimens: Determination from pairs of defocused images. *Ultramicroscopy*. 1 janvier 1988. Vol. 25, n° 4, pp. 279-291. DOI 10.1016/0304-3991(88)90003-4.
363. SMITH, M. F. et LANGMORE, J. P. Quantitation of molecular densities by cryo-electron microscopy. Determination of the radial density distribution of tobacco mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*. 5 août 1992. Vol. 226, n° 3, pp. 763-774. DOI 10.1016/0022-2836(92)90631-s.
364. TANI, Kazutoshi, SASABE, Hiroyuki et TOYOSHIMA, Chikashi. A set of computer programs for determining defocus and astigmatism in electron images. *Ultramicroscopy*. 1 septembre 1996. Vol. 65, n° 1, pp. 31-44. DOI 10.1016/S0304-3991(96)00052-6.
365. PENCZEK, P.A., ZHU, J., SCHRÖDER, R. et FRANK, J. THREE DIMENSIONAL RECONSTRUCTION WITH CONTRAST TRANSFER COMPENSATION FROM DEFOCUS SERIES. In : FRANK, Joachim, *Series in Structural Biology* [en ligne]. World Scientific, 2018. pp. 232-239. ISBN 978-981-323-485-7. Disponible à l'adresse : https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9789813234864_0021
366. GRIGORIEFF, N. Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *Journal of Molecular Biology*. 17 avril 1998. Vol. 277, n° 5, pp. 1033-1046. DOI 10.1006/jmbi.1998.1668.
367. CONWAY, J. F. et STEVEN, A. C. Methods for reconstructing density maps of « single » particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution. *Journal of Structural Biology*. 1 décembre 1999. Vol. 128, n° 1, pp. 106-118. DOI 10.1006/jsbi.1999.4168.
368. LUDTKE, S. J., BALDWIN, P. R. et CHIU, W. EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *Journal of Structural Biology*. 1 décembre 1999. Vol. 128, n° 1, pp. 82-97. DOI 10.1006/jsbi.1999.4174.

369. RADERMACHER, M., RUIZ, T., WIECZOREK, H. et GRÜBER, G. The structure of the V(1)-ATPase determined by three-dimensional electron microscopy of single particles. *Journal of Structural Biology*. juillet 2001. Vol. 135, n° 1, pp. 26-37. DOI 10.1006/jsbi.2001.4395.
370. HUANG, Zhong, BALDWIN, Philip R, MULLAPUDI, Srinivas et PENCZEK, Pawel A. Automated determination of parameters describing power spectra of micrograph images in electron microscopy. *Journal of Structural Biology*. 1 octobre 2003. Vol. 144, n° 1, pp. 79-94. DOI 10.1016/j.jsb.2003.10.011.
371. MINDELL, Joseph A. et GRIGORIEFF, Nikolaus. Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *Journal of Structural Biology*. juin 2003. Vol. 142, n° 3, pp. 334-347. DOI 10.1016/S1047-8477(03)00069-8.
372. SANDER, B., GOLAS, M. M. et STARK, H. Automatic CTF correction for single particles based upon multivariate statistical analysis of individual power spectra. *Journal of Structural Biology*. 1 juin 2003. Vol. 142, n° 3, pp. 392-401. DOI 10.1016/S1047-8477(03)00072-8.
373. VELÁZQUEZ-MURIEL, J. A., SORZANO, C. O. S., FERNÁNDEZ, J. J. et CARAZO, J. M. A method for estimating the CTF in electron microscopy based on ARMA models and parameter adjustment. *Ultramicroscopy*. 1 juillet 2003. Vol. 96, n° 1, pp. 17-35. DOI 10.1016/S0304-3991(02)00377-7.
374. SORZANO, C. O. S., MARABINI, R., VELÁZQUEZ-MURIEL, J., BILBAO-CASTRO, J. R., SCHERES, S. H. W., CARAZO, J. M. et PASCUAL-MONTANO, A. XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *Journal of Structural Biology*. novembre 2004. Vol. 148, n° 2, pp. 194-204. DOI 10.1016/j.jsb.2004.06.006.
375. MALLICK, Satya P., CARRAGHER, Bridget, POTTER, Clinton S. et KRIEGMAN, David J. ACE: Automated CTF Estimation. *Ultramicroscopy*. 1 août 2005. Vol. 104, n° 1, pp. 8-29. DOI 10.1016/j.ultramic.2005.02.004.
376. ROHOU, Alexis et GRIGORIEFF, Nikolaus. CTFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *Journal of Structural Biology*. novembre 2015. Vol. 192, n° 2, pp. 216-221. DOI 10.1016/j.jsb.2015.08.008.
377. ZHANG, Kai. Gctf: Real-time CTF determination and correction. *Journal of Structural Biology*. janvier 2016. Vol. 193, n° 1, pp. 1-12. DOI 10.1016/j.jsb.2015.11.003.
378. WIENER, Norbert. Extrapolation, Interpolation, and Smoothing of Stationary Time Series. *The MIT Press*. 1964. pp. 163.
379. AVILA-SAKAR, A. J., GUAN, T. L., ARAD, T., SCHMID, M. F., LOKE, T. W., YONATH, A., PIEFKE, J., FRANCESCHI, F. et CHIU, W. Electron cryomicroscopy of *Bacillus stearothermophilus* 50 S ribosomal subunits crystallized on phospholipid monolayers. *Journal of Molecular Biology*. 24 juin 1994. Vol. 239, n° 5, pp. 689-697. DOI 10.1006/jmbi.1994.1406.
380. FERNÁNDEZ, José-Jesús, SANJURJO, JoséR. et CARAZO, José-María. A spectral estimation approach to contrast transfer function detection in electron microscopy.

Ultramicroscopy. 1 août 1997. Vol. 68, n° 4, pp. 267-295. DOI 10.1016/S0304-3991(97)00032-6.

381. VELÁZQUEZ-MURIEL, J. A., SORZANO, C. O. S., FERNÁNDEZ, J. J. et CARAZO, J. M. A method for estimating the CTF in electron microscopy based on ARMA models and parameter adjustment. *Ultramicroscopy*. juillet 2003. Vol. 96, n° 1, pp. 17-35. DOI 10.1016/S0304-3991(02)00377-7.

382. BROERSEN, P.M.T. Facts and fiction in spectral analysis. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*. août 2000. Vol. 49, n° 4, pp. 766-772. DOI 10.1109/19.863921.

383. ZHOU, Z. H., HARDT, S., WANG, B., SHERMAN, M. B., JAKANA, J. et CHIU, W. CTF determination of images of ice-embedded single particles using a graphics interface. *Journal of Structural Biology*. février 1996. Vol. 116, n° 1, pp. 216-222. DOI 10.1006/jsbi.1996.0033.

384. SAAD, Ali, LUDTKE, Steven J., JAKANA, Joanita, RIXON, Frazer J., TSURUTA, Hiro et CHIU, Wah. Fourier Amplitude Decay of Electron Cryomicroscopic Images of Single Particles and Effects on Structure Determination. *Journal of Structural Biology*. 1 janvier 2001. Vol. 133, n° 1, pp. 32-42. DOI 10.1006/jsbi.2001.4330.

385. SORZANO, C. O. S., JONIC, S., NÚÑEZ-RAMÍREZ, R., BOISSET, N. et CARAZO, J. M. Fast, robust, and accurate determination of transmission electron microscopy contrast transfer function. *Journal of Structural Biology*. 1 novembre 2007. Vol. 160, n° 2, pp. 249-262. DOI 10.1016/j.jsb.2007.08.013.

386. BOYLE, W. S. et SMITH, G. E. Charge Coupled Semiconductor Devices. *Bell System Technical Journal*. 1970. Vol. 49, n° 4, pp. 587-593. DOI 10.1002/j.1538-7305.1970.tb01790.x.

387. BAI, Xiao-chen, MCMULLAN, Greg et SCHERES, Sjors H. W. How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends in Biochemical Sciences*. janvier 2015. Vol. 40, n° 1, pp. 49-57. DOI 10.1016/j.tibs.2014.10.005.

388. MCMULLAN, G., CHEN, S., HENDERSON, R. et FARUQI, A. R. Detective quantum efficiency of electron area detectors in electron microscopy. *Ultramicroscopy*. août 2009. Vol. 109, n° 9, pp. 1126-1143. DOI 10.1016/j.ultramic.2009.04.002.

389. BAMMES, Benjamin E., ROCHAT, Ryan H., JAKANA, Joanita, CHEN, Dong-Hua et CHIU, Wah. Direct electron detection yields cryo-EM reconstructions at resolutions beyond 3/4 Nyquist frequency. *Journal of Structural Biology*. mars 2012. Vol. 177, n° 3, pp. 589-601. DOI 10.1016/j.jsb.2012.01.008.

390. CAMPBELL, Melody G., CHENG, Anchi, BRILOT, Axel F., MOELLER, Arne, LYUMKIS, Dmitry, VEESLER, David, PAN, Junhua, HARRISON, Stephen C., POTTER, Clinton S., CARRAGHER, Bridget et GRIGORIEFF, Nikolaus. Movies of ice-embedded particles enhance resolution in electron cryo-microscopy. *Structure (London, England: 1993)*. 7 novembre 2012. Vol. 20, n° 11, pp. 1823-1828. DOI 10.1016/j.str.2012.08.026.

391. LI, Xueming, MOONEY, Paul, ZHENG, Shawn, BOOTH, Christopher R., BRAUNFELD, Michael B., GUBBENS, Sander, AGARD, David A. et CHENG, Yifan. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nature Methods*. juin 2013. Vol. 10, n° 6, pp. 584-590. DOI 10.1038/nmeth.2472.
392. ABRISHAMI, Vahid, VARGAS, Javier, LI, Xueming, CHENG, Yifan, MARABINI, Roberto, SORZANO, Carlos Óscar Sánchez et CARAZO, José María. Alignment of direct detection device micrographs using a robust Optical Flow approach. *Journal of Structural Biology*. mars 2015. Vol. 189, n° 3, pp. 163-176. DOI 10.1016/j.jsb.2015.02.001.
393. AFANASYEV, Pavel, RAVELLI, Raimond B. G., MATADEEN, Rishi, DE CARLO, Sacha, VAN DUINEN, Gijs, ALEWIJNSE, Bart, PETERS, Peter J., ABRAHAMS, Jan-Pieter, PORTUGAL, Rodrigo V., SCHATZ, Michael et VAN HEEL, Marin. A posteriori correction of camera characteristics from large image data sets. *Scientific Reports*. 11 juin 2015. Vol. 5, pp. 10317. DOI 10.1038/srep10317.
394. SCHERES, Sjors H. W. Semi-automated selection of cryo-EM particles in RELION-1.3. *Journal of Structural Biology*. février 2015. Vol. 189, n° 2, pp. 114-122. DOI 10.1016/j.jsb.2014.11.010.
395. WAGNER, Thorsten, MERINO, Felipe, STABRIN, Markus, MORIYA, Toshio, ANTONI, Claudia, APELBAUM, Amir, HAGEL, Philine, SITSEL, Oleg, RAISCH, Tobias, PRUMBAUM, Daniel, QUENTIN, Dennis, RODERER, Daniel, TACKE, Sebastian, SIEBOLDS, Birte, SCHUBERT, Evelyn, SHAIKH, Tanvir R., LILL, Pascal, GATSOGIANNIS, Christos et RAUNSER, Stefan. SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM. *Communications Biology*. 2019. Vol. 2, pp. 218. DOI 10.1038/s42003-019-0437-z.
396. SCHERES, Sjors H. W. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *Journal of Structural Biology*. décembre 2012. Vol. 180, n° 3, pp. 519-530. DOI 10.1016/j.jsb.2012.09.006.
397. PUNJANI, Ali, RUBINSTEIN, John L., FLEET, David J. et BRUBAKER, Marcus A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nature Methods*. 2017. Vol. 14, n° 3, pp. 290-296. DOI 10.1038/nmeth.4169.
398. BOTTOU, Léon. Large-Scale Machine Learning with Stochastic Gradient Descent. In : LECHEVALLIER, Yves et SAPORTA, Gilbert (éd.), *Proceedings of COMPSTAT'2010*. Heidelberg : Physica-Verlag HD, 2010. pp. 177-186. ISBN 978-3-7908-2604-3.
399. GRIGORIEFF, Nikolaus. FREALIGN: high-resolution refinement of single particle structures. *Journal of Structural Biology*. janvier 2007. Vol. 157, n° 1, pp. 117-125. DOI 10.1016/j.jsb.2006.05.004.
400. TANG, Guang, PENG, Liwei, BALDWIN, Philip R., MANN, Deepinder S., JIANG, Wen, REES, Ian et LUDTKE, Steven J. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *Journal of Structural Biology*. janvier 2007. Vol. 157, n° 1, pp. 38-46. DOI 10.1016/j.jsb.2006.05.009.

401. FRANK, J., RADERMACHER, M., PENCZEK, P., ZHU, J., LI, Y., LADJADJ, M. et LEITH, A. SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *Journal of Structural Biology*. février 1996. Vol. 116, n° 1, pp. 190-199. DOI 10.1006/jsbi.1996.0030.
402. VAN HEEL, Marin, PORTUGAL, Rodrigo et SCHATZ, Michael. Multivariate Statistical Analysis in Single Particle (Cryo) Electron Microscopy. . pp. 47.
403. MACQUEEN, J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In : *In 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*. 1967. pp. 281–297.
404. HARAUZ, George et HEEL, Marin G. van. Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction. *Optik*. 1986. Vol. 73, pp. 146–156.
405. ORLOV, S. S. Theory of three dimensional reconstruction—conditions of a complete set of projections. *Sov Phys Crystallogr*. 1976. Vol. 20, pp. 312-314.
406. PENCZEK, P. A. Single particle reconstruction. *International tables for crystallography*. 2008.
407. VAN HEEL, Marin et SCHATZ, Michael. Fourier shell correlation threshold criteria. *Journal of Structural Biology*. septembre 2005. Vol. 151, n° 3, pp. 250-262. DOI 10.1016/j.jsb.2005.05.009.
408. ROSENTHAL, Peter B. et HENDERSON, Richard. Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *Journal of Molecular Biology*. 31 octobre 2003. Vol. 333, n° 4, pp. 721-745. DOI 10.1016/j.jmb.2003.07.013.
409. COSTA, Mauricio G. S., FAGNEN, Charline, VÉNIEN-BRYAN, Catherine et PERAHIA, David. A New Strategy for Atomic Flexible Fitting in Cryo-EM Maps by Molecular Dynamics with Excited Normal Modes (MDeNM-EMfit). *Journal of Chemical Information and Modeling*. 28 janvier 2020. DOI 10.1021/acs.jcim.9b01148.
410. PEGAN, Scott, ARRABIT, Christine, ZHOU, Wei, KWIATKOWSKI, Witek, COLLINS, Anthony, SLESINGER, Paul A. et CHOE, Senyon. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nature Neuroscience*. mars 2005. Vol. 8, n° 3, pp. 279-287. DOI 10.1038/nn1411.
411. DU, Xiaona, ZHANG, Hailin, LOPES, Coeli, MIRSHAHI, Tooraj, ROHACS, Tibor et LOGOTHETIS, Diomedes E. Characteristic interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determine regulation of kir channels by diverse modulators. *The Journal of Biological Chemistry*. 3 septembre 2004. Vol. 279, n° 36, pp. 37271-37281. DOI 10.1074/jbc.M403413200.
412. HIBINO, Hiroshi, INANOBE, Atsushi, FURUTANI, Kazuharu, MURAKAMI, Shingo, FINDLAY, Ian et KURACHI, Yoshihisa. Inwardly rectifying potassium channels: their structure,

function, and physiological roles. *Physiological Reviews*. janvier 2010. Vol. 90, n° 1, pp. 291-366. DOI 10.1152/physrev.00021.2009.

6 Annexes

6.1 Etude de la structure du complexe Cyclodextrine-ADN par cryo-microscopie.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai été amenée sur des projets annexes. Je décris ici les résultats de la collaboration avec l'équipe du Pr. Sollogoub à l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire.

Le projet porte sur un complexe composé de l'ADN et de polymères de cyclodextrine.

6.1.1 Contexte et Objectif

Les siARN sont des ARN double brin très courts avec la capacité d'inhiber spécifiquement l'expression d'un gène. Les thérapies à base de siARN sont très prometteuses mais rencontrent quelques difficultés d'application. Un défi majeur pour leur développement est la conception de méthodes de livraison sophistiquées, sûres et efficaces. L'un des principaux obstacles est relatif à leur utilisation comme médicaments, ils ont besoin d'un vecteur efficace et non toxique pour laisser l'ARNsi atteindre sa cible et jouer son rôle. Le travail de l'équipe du Pr. Sollogoub est axé sur la conception de vecteurs potentiels, pour cela ils se sont inspirés des virus. En effet, les virus sont parmi les systèmes biologiques les plus simples créés par la nature et sont des véhicules très efficaces pour la livraison de matériel génétique dans les cellules. Cependant, le développement de tels vecteurs à l'échelle industrielle reste compliqué. Ainsi, l'imitation de leur structure auto-assemblée hautement coopérative avec des systèmes artificiels est un véritable défi. Ils se sont inspirés de l'assemblage du virus de la mosaïque du tabac dont la protéine d'enveloppe s'auto-assemble dans de petits disques à moins que l'ARN soit présent et induit un co-assemblage hiérarchique coopératif avec la protéine d'enveloppe. Il existe plusieurs exemples de virus artificiels décrits, mais leur taille est limitée par celle de l'acide nucléique correspondant. L'objectif global de ce projet est de trouver le vecteur parfait pour introduire le siARN dans les cellules ciblées.

Le dsADN étant plus stable que le siARN, le complexe cyclodextrine/dsADN (CD-dsADN) a été réalisé sous forme de fibres. Notre objectif est de comprendre le mécanisme d'assemblage entre la cyclodextrine et le dsADN, pour cela une étude en microscopie électronique a été menée sur ce complexe pour résoudre cette structure à haute résolution.

6.1.2 Résultats

Les complexes ont été préparés par Leonid Lavnevich à l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire. Un premier jeu de données en cryo-microscopie a été pris sur un Glacios 200kV sur une caméra à détection directe d'électrons à Madrid dans le cadre du réseau INSTRUMENT. Pour déterminer la structure à haute résolution du complexe, nous avons réalisé un picking manuel sur Relion donnant 93 729 particules à partir de 292 images. Suite à ce picking une classification 2D (Figure 66) a été réalisée et 62 972 particules ont été conservées.

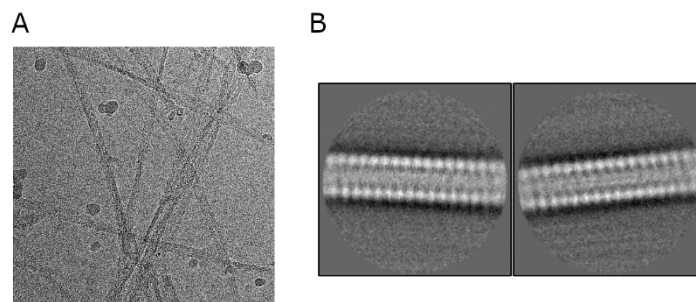


Figure 66 - A) Visualisation d'un micrographe avec les fibres du complexe sdADN présentes. B) Classification 2D de référence pour le picking des particules.

Cette classification 2D (Figure 67) a été utilisée comme modèle pour réaliser un picking automatique par le programme de picking automatique de Relion qui a trouvé 1 135 135 particules. Un cycle de classifications 2D a été lancé afin de sélectionner les classes des particules d'intérêt, ce procédé a abouti à la sélection de 379 672 particules.

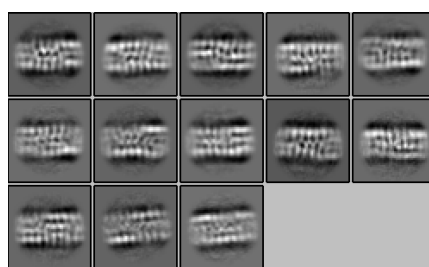


Figure 67 - Classification 2D des particules retenues pour la reconstruction 3D.

En appliquant une symétrie $C7$, nous avons procédé à la reconstruction 3D du complexe par Relion (Figure 68). Le résultat final de cette analyse est une structure 3D du complexe à 2.06Å de résolution.

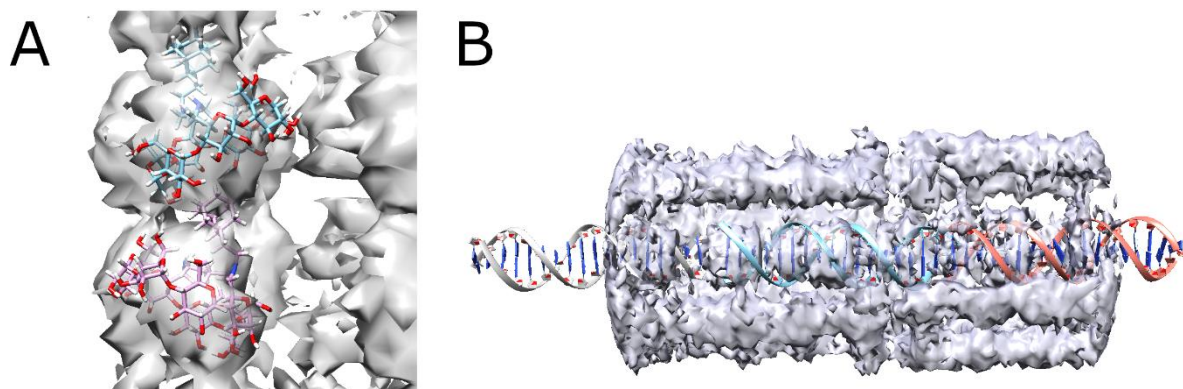


Figure 68 - Complexe CD-dsADN. A) Fitting de deux cyclodextrines dans le complexe. B) Position de l'ADN au sein du complexe. L'ADN blanc commence dans l'unité précédente N-1, l'ADN bleu dans l'unité N se termine dans l'unité suivante N+1, où un début d'ADN (relatif à l'ADN orange) débute.

6.1.3 Conclusions

La densité électronique du complexe est obtenue à une résolution de 2,06Å par cryo-EM. Cette résolution de structure donne quelques indices à la compréhension de: l'organisation des cyclodextrines et leur interaction avec le dsADN. La première information donnée par cette structure est la symétrie du complexe. Plusieurs symétries ont été appliquées pour construire un modèle initial à partir des particules détectées sur les micrographies. La symétrie C7 est la seule symétrie qui décrivait (avec un bruit mineur) la forme fibreuse du polymère. La deuxième observation a montré la division des fibres en unités. La longueur d'une unité est très comparable à celle du dsADN. Ainsi, la longueur du dsADN (autour de 7nm ici) pourrait déterminer la longueur de l'unité composée de plusieurs cyclodextrines. Troisièmement, nous avons étudié l'interface entre deux unités et nos résultats préliminaires montrent une continuité du dsADN dans l'espace entre deux unités. Cette observation pourrait expliquer que: i) la plupart des fibres vues sur les micrographies ne sont pas droites; ii) la longueur des fibres.

6.1.4 Méthodes

6.1.4.1 Préparation

The DNA-CD complex was prepared extemporaneously for observation with the MET. In an Eppendorf tube containing 15 μ L of 1x TBE buffer (pH=8.3) , 2.4 μ L of 50 μ M DNA

solution in water and 2.6 μL solution of 5.5 mM of $\beta\text{-CD}$ in 1x TBE buffer were added. The mixture was mixed.

6.1.4.2 Microscopie

Les images du complexe ont été réalisées dans le centre de microscopie à l'IP2C à Madrid. Les paramètres du microscope Glacios utilisés lors de l'analyse d'images sont les suivants : l'aberration sphérique (2.7mm), le voltage : 200 kV, l'amplitude du contraste : 0.1, la taille du pixel 0.85Å/pix. Les images ont été prises sur une caméra à détection directe d'électrons. Les résultats montrés ici représentent l'analyse de 292 micrographies sélectionnés parmi les 586 fournis par l'IP2C. L'analyse d'images a été réalisée avec le logiciel Relion.

7 Table des illustrations

Figure 1 - Les canaux activés par le calcium. A) Représentation schématique d'une unité de canal. B-C) Modèle atomique d'un canal activé par le calcium : PDB 3U6N. B) Vue du dessus du canal. C) Vue latérale du canal.....	13
Figure 2 - Canaux à deux pores(K2P). A) Représentation schématique d'une unité du canal à deux pores.B) Représentation structurale du canal.....	14
Figure 3 - Canaux dépendants du potassium (Kv). A) Représentation schématique d'une unité de canal dépendant du potassium. B) Représentation structurale d'un canal Kv.....	15
Figure 4 - A) Représentation schématique d'une unité de canal Kir. B-C) Représentation atomique provenant de PDB 2WLJ. B) Vue latérale du canal.	17
Figure 5 - Arbre phylogénétique des canaux Kir. (Adaptée d'Hibino(51)).....	18
Figure 6 - Alignement des différents membres des sous-familles des canaux Kir humains et bactériens. Les recouvrements identiques sont représentés en rouge, les recouvrements similaires en bleu.....	21
Figure 7 - Potentiel de repos.....	22
Figure 8 - Potentiel d'action.....	23
Figure 9 - Présentation des différents éléments composant le KirBac3.1. En rouge sont présentés les deux points de constriction du canal : Leu124 et Tyr 132.....	26
Figure 10 - Alignement des canaux humains Kir sur KirBac3.1. A) Alignement du canal KirBac3.1 (rouge) sur le canal humain Kir2.1 (violet). B) Alignement du canal KirBac3.1 (rouge) sur le canal humain Kir6.2 (bleu).	28
Figure 11 - Description du mécanisme twist-to-open, figure issue de Bavro(107).	30
Figure 12 - Localisation des mutations causant le syndrome d'Andersen sur le canal Kir2.1 humain.....	32
Figure 13 - Localisation des mutations responsables de l'hyperinsulinisme sur le canal Kir6.2 humain.....	33
Figure 14 - Nombre de repliements connus cumulés depuis 1972.....	37
Figure 15 - Description des interactions liées. A) Liaisons. B) Angles. C) Angles dièdres. ..	51
Figure 16 - Interactions non liées. A) Interactions électrostatiques. B) Interactions de Van der Waals.....	51
Figure 17 - Principe de la MDeNM (adapté de Costa et al.(252))	58
Figure 18 - Principe de l'échange hydrogène deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS), cette figure est adaptée de Cao et al(263).	62
Figure 19 - Structure, Normal Mode and constriction points of KirBac3.1. (a) Overview of the KirBac3.1 structure (from PDB 2WLJ). NewCartoon representation of two opposite monomers (chain A in blue, chain C in pink) for clarity, the other two subunits (chains B and D) are represented in Newribbon gray. Leu124 and Tyr132 at the constriction points are respectively in green and purple. The membrane is in dotted gray. The purple circle represents the Helix Bundle Crossing (HBC) gate. (b) Direction of motion of mode 123 involved in the opening/closing of the KirBac3.1 channel. Gly120 is in red in Van der Waals representation, arrows show the direction followed by the C α atoms. (c) Minimal atomic distances on the plane parallel to the membrane between opposite residues of chains A and C (in red) and between chains B and D (in orange) versus residue numberings. The position of the constriction regions located at Leu124 and Tyr132 are highlighted in green and purple circles, respectively. (d) Crystallographic structure of the KirBac3.1 channel. Stretch of residues from Met121 to Ala 133 is in blue. The constriction residues Leu124 (green) and Tyr132 (purple) are highlighted.	68

Figure 20 - Gating at the two constriction points Leu124 and Tyr132. (a) Scatter plots of the minimal distances between the chains B and D and between A and C. Red and blue points correspond to the residues Leu124 and Tyr132, respectively. The gray area delimits the region where the channel is closed. (b) Scatter plots of distances between C α atoms of the residues 124 (in red) and 132 (in blue) for chains AC and BD. (c-d) Scatter plots of C α -C α distances on X-Y plane between chains A and C (abscissa) and between chains B and D (ordinate) at the residue Leu124 (c), and at the residue Tyr132 (d). Each point is colored in function of its state: red for closed, blue for open, green for only open for the Leu124, purple for only open for Tyr132. Along each axis, the population density curve of the points is given for each state of the channel; (e-f) Scatter plots of χ_1 and χ_2 angles for all the chains for Leu124 (e) and Tyr132 (f); (g) Superposition of the most open structure (in blue) with the most closed structure (in red) for residue Leu124; (h) same as in (g) but for residue Tyr132. 75

Figure 21 - Description of the structural determinants. (a) Kink angle of the inner helix (*kix*) defined by the two axes: Ala109 to Gly120 (in orange) and Gly120 to Phe135 (in yellow). Kink angle of the outer helices (*kox*) defined by the two axes: Cys71 to Leu56 (in blue) and Leu56 to Trp46 (in purple) (b) Swivel angle of the slide-helices (*swix*) in purple, the twist angle (*tx*) in blue and the swing angle *sx* in green of the cytoplasmic domain. (c) Uprising angle of the slide-helices (*upx*). *x* character in the naming of structure determinant stands for the chains A, B, C and D. (see supplementary data for the definition of the angles). 77

Figure 22 - Graphs of normalized correlations between the structural determinants within the ensemble of MDeNM relaxed structures. *g124ac*, and *g124bd* are the minimal distances at the residue Leu124 between the opposite chains A and C and between the chains B and D, respectively; *g132ac* and *g132bd* are those relative to the constriction point at residue Tyr132. The area of the circle is proportional to the correlation strength between two parameters, the blue color indicates a positive correlation, and the red one a negative one (inverse correlation). The correlation value is given by the color scale bar at the right of the figure. (a) Correlations between minimal distances between the chains at the constriction points and the kink angles of TM helices. *kia*, *kib*, *kic*, *kid* represent the kink of the inner helices of the chains A,B,C and D, respectively ; *koa*, *kob*, *koc*, *kod* represent the kink of the outer helices of the chains A,B,C and D, respectively (b) Correlations between minimal distances between chains at constriction points, the swivel (*swia*, *swib*, *swic*, *swid*) and uprising angles (*upa*, *upb*, *upc*, *upd*) of the slide-helices; (c) Correlation between minimal distances between chains, the twist and swing angles of the cytoplasmic domain. *ta*, *tb*, *tc*, *td* represent the twist angles of the cytoplasmic domain of the chains A, B, C and D respectively. *sa*, *sb*, *sc*, *sd* represent the swing angles of the cytoplasmic domain of the chains A, B, C and D respectively. 80

Figure 23 - HDX rates of peptides reported on the KirBac3.1 model (2WLJ) and functional studies on the channel. (a-b) Identified peptides are drawn with blue to red color according to their percentage of deuterium exchange after 1,200 s (scale of exchange shown between panel a and panel b). Gray color is used in regions where no data are available. (c) Single channel recordings from wild-type KirBac3.1 channels; example of traces for 6-min consecutive recordings at -80 mV holding potential. Closed level is labeled C, and O for open. 82

Figure 24 - Alignment of the sequences of the KirBac3.1, KirBac1.1, human Kir1, human Kir2.1 and chicken Kir2.2. In red are represented the identical residues between the sequences and in blue the residues of similar types between the sequences. α -helix and β -strand are represented with red squares and green arrows, respectively. G-loop, CD-loop and G-gasket are noticed with a blue square. 98

Figure 25 - Directions of motions of the 11 selected modes involved in the opening/closing of the KirBac3.1 channel, arrows show the direction followed by the C α atoms. 100

Figure 26 - Representation of the opening of the channel at four different states. From left to right are represented the most closed structure, the most open of the closed structures, the most

closed of the open structures and the most open structure. The channel is computed with the Hole software v2.2.005. Areas in red indicate where one water molecule cannot go through, green the areas where only one water molecule can go through and blue where more than one water molecule can go through. To select the represented structures among the closed states, we calculated the average of the distances between the chains A and C, and between B and D at the level of Leu124 and Tyr132. From left to right: the minimal value obtained corresponds to the most closed structure (1st structure: radius at the level of Leu124: 1.04Å, radius at the level of Tyr132: 1.26Å), the maximal value represents the most open of the closed structures (2nd structure: radius at the level of Leu124: 1.53Å, radius at the level of Tyr132: 1.56Å). To select the open structures, we select the structures showing the lowest (3rd structure) and the highest values (4th structure) for each constriction points between all opposite chains. Radii of the third structure from Hole are 1.79Å at the level of Leu124 and 1.77Å at the level of Tyr132. Radii of the fourth structure from Hole are 2.39Å at the level of Leu124 and 2.15Å at the level of Tyr132. Considering the K⁺ radius is 1.76Å, the open states show radii greater than the radius of the K⁺ ion and closed states show lower radii. 100

Figure 27 – A) Docking of the spermine molecule in one of our open structures of KirBac3.1 WT with the Autodock Vina software. B) Enlarged structure. The spermine is well docked inside the channel and its location is similar to the one seen in the X-Ray structure of KirBac3.1 complexed with spermine, PDB 1XL6. 101

Figure 28 - Peptide mapping of KirBac3.1 using pepsin in solution (A), pepsin in column (B), and nepenthesin (C). The signal intensity of the peptides is shown in green (strong) and yellow (medium), see also Table. S1. We used nepenthesin because the coverage is larger. 102

Figure 29 - Heat Map of the KirBac3.1. Deuteration maps of KirBac3.1 peptides at different times up to 20 minutes deuteration. The color key indicates the HDX level..... 103

Figure 30 - Percentage of deuteration versus time (15s, 120s and 1200s) for regions 95-112, 113-118, 119-124, 123-130, 131-143 and 135-143. The stretch from 113-130 is not covered. 103

Figure 31 - Purified KirBac 3.1 channels are functionally active channels in planar lipid bilayers (a). Representative all point histograms of KirBac 3.1 WT from 6 minutes of continuous recording. Fits of Gaussian distributions of multiple histograms led to a single channel current level of 3.75 ± 0.027 pA at -80 mV (membrane bilayer contains two channels); (b) KirBac 3.1 channels has multiple subconductance states. Dwell time of the whole 6-min recording at -80 mV revealed channel subconductance levels. Fits of Gaussian distributions of multiple histograms showed current amplitudes (levels 1 to 8) at -1.02, -2.03, -3.6, -4.9, -6, -7.06, -8.1, and -9.5 pA..... 104

Figure 32 - Minimum distances of opposing G-loops. Scatter plot of the minimal distances between the chains B and D and between the chains A and C at the level of the residues of the G-loop (residues Glu248 to Ala251). 105

Figure 33 - Minimal distances at the level of opposite selective filter. Scatter plot of the minimal distances between the C α atoms of the chains B and D and between A and C at the level of the residues of the selective filter (residues Ile97 to Lys101). 105

Figure 34 - Crystallographic structure of KirBac3.1 W46R. A) Structure of KirBac3.1 W46R showing the location of the mutant R46 in cyan at the bottom of TM1. Grey area represents the membrane, the various domains are indicated on the figure. B) Top: Zoom on the area around the mutation R46 at the bottom of TM1 from chain B (R46-B) interacting with Y38-A on the slide helix of the n-1 chain (chain A) Bottom: Same area as above with KirBac3.1 WT (PDB 2WL). W46-B (chainB) in the “flipped in” conformation packed against the C-terminal end of TM2 (chain A). Yellow dots show the polar contacts for Arg46 and Trp46. C) Alignment for Kir channels the tryptophan at the position corresponding to W68 in Kir 6.2, at the bottom of

TM2 is absolutely conserved (pink). The aspartate at the position corresponding to Asp58 in Kir6.2, on the slide helix is also highly conserved (cyan). 116

Figure 35 - HDX-MS rates. HDX-MS rates of peptides reported on the KirBac3.1 WT (from Fagnen et al. 2020) (A) and the mutant W46R (B). C) Rate difference between the mutant W46R and KirBac3.1 WT. Scale of exchange is shown at the bottom of the figures (Blue being low exchange and high rigidity, red being high exchange and high flexibility). 119

Figure 36 - Overview of the network of interactions around Trp46 (KirBac3.1 WT) and Arg46 (KirBac3.1 W46R). A) KirBac3.1 WT: representation of the Trp46 flipped-in (in red) and the flipped-out (in purple) B) Superimposition of the residue Trp46 (flipped in) in red and the mutation Arg46 in blue. C) Network of interaction around Arg46. The chains A and D are colored in blue and magenta respectively, and the residue Trp46 (flipped in) is superimposed in red. D, E, F and G) KirBac3.1 WT: Comparison of the interaction network of residue Trp46 in flipped in and flipped out conformation for the chains A (panel D), B (panel E), C (panel F), D (panel G). The green lines indicate the interactions present in the flipped-in configuration but absent in the flipped-out one and red lines those present in the flipped-out configuration but absent in flipped-in one. Black lines are common between the two conformers H, I, J and K) Comparison of the interaction network of residue Trp46 flipped in (KirBac3.1 WT) and of residue Arg46 (KirBac3.1 W46R) for the chains A (panel H), B (panel I), C (panel J), D (panel K). The green lines indicate the interactions present in KirBac3.1 WT but absent in W46R mutant, and the red lines the interactions present in the W46R mutant but absent in KirBac3.1 WT. The symbols along the edges indicate the interaction type: H for hydrogen bond, W for Van der Waals interaction, π for π - π interaction, and πc for π -cation interaction. The flipped-in configuration considered is from the X-ray structure, and the flipped-out one corresponds to a representative structure issued from MDeNM simulations. 121

Figure 37 - Interactions of Trp/Arg46 in MDeNM study. A) Histogram of Accessible Surface Area (ASA) values of residue Trp46 in KirBac3.1 WT (in red) and Arg46 in KirBac3.1 W46R (in blue) obtained on the set of relaxed MDeNM structures. B) Boxplot of ASA values of Arg134 in KirBac3.1 WT (in red) and in KirBac3.1 W46R (in blue) over the same set of structures. C) Boxplot of ASA values of Phe135 in KirBac3.1 WT (in red) and in KirBac3.1 W46R (in blue) over the same set of structures. 123

Figure 38 - Hydrophobic interaction. Histogram of the minimal distances between residue 46 and I131 in KirBac3.1 WT (in red) and KirBac3.1 W46R (in blue). 124

Figure 39 - Correlation between the interactions of the slide-helix and the uprising of the slide-helices in KirBac3.1 W46R and WT. A) Correlations in the case of the mutation W46R. The uprising of the slide-helix for the chains A, B, C and D are denoted by the uprising of the slide-helix up_x where x is the letter of the chain. $d_{46n36n-1}$ corresponds to the minimal distance between the residue Arg46 of the chain n and the residue Asp36 of the chain $n-1$, and $d_{35n167n+1}$ to that between the residue Asp35 of the chain n and the residue Arg167 of the chain $n+1$. Blue circles correspond to positive correlations, while red ones to negative correlations. The diameter and the color intensity of a circle are proportional to the strength of the correlation. B) Representation of the measures taken into account to realize the correlations. C) Correlations in the case of the WT. 126

Figure 40 - Correlation between the gating and the uprising of the slide-helices and transmembrane helices inclinations in KirBac3.1 W46R. A) Correlations in the case of the mutation W46R. The minimal distance between the residues LEU124 belonging to the chains A and C defining the gating at this level is denoted g_{124ac} , and similarly, for TYR132, it is designated g_{132ac} . The uprising of the slide-helices of the chains A, B, C and D are denoted upa , upb , upc , upd , respectively. The tilt angle of the axes of the inner and outer helices from the perpendicular line to the membrane plane are denoted $tiltin$ and $tilton$, respectively, where n is the name of the chain. Blue and red circles correspond to positive and negative correlations,

respectively. The diameter and the color intensity of a circle are proportional to the strength of the correlation. B) Definition of the inner and outer tilts The uprising of the slide-helices is defined as in Figure 23B. C) Correlations in the case of the WT. 129

Figure 41 – Gating motions and statistics. A-B) Scatter plots of distances between C α atoms of the residues 124 (in red) and 132 (in blue) for chains AC and BD for KirBac3.1 WT (a) and KirBac3.1 W46R (b) . C) Statistics on the opening state of the channel realized on the relaxed MDeNM structures..... 130

Figure 42- Root Mean Square Fluctuation by residue computed on all relaxed structures from MDeNM in blue, red, green and magenta for the chain A, B, C and D , respectively. 131

Figure 43 - Heat Map of the KirBac3.1 W46R mutant. Deuteration maps of KirBac3.1 peptides at different times up to 20 minutes deuteration. The color key indicates the HDX level. 144

Figure 44 - Overview of the effect of the mutation on the channel gating. 144

Figure 45 - Comparison of cristallographic structures between closed (2WLJ) and open (3ZRS) states (Figures from Bavro et al(2)). A) Pore-radius profile of the closed (2WLJ) and open (3ZRS) states. B) Location of the constriction points Leu124 and Tyr132 (in yellow). C) Top view of the closed (left) and open (right) states describing the Tyr132 conformation. D) Top view of the closed (left) and open (right) states describing the Leu124 conformation. E) Comparison of the bending (left) and the rotation (right) of the inner helices for closed (blue) and open (red) states. F) Observation of the rotation of the cytoplasmic domain between the closed (blue -non-twisted) and the open (red - twisted) states 149

Figure 46 – Gating at the mutation S129R and at the constriction point Tyr132. A) Scatter plots of the minimal distances between the chains B and D and between A and C at the level of the residue 129. B) Scatter plots of the minimal distances between the chains B and D and between A and C at the level of the residue Tyr132. A-B) Red and blue points correspond to the KirBac3.1 WT and KirBac3.1 S129R, respectively. The gray area delimits the region where the channel is closed. C-E: representation of the equilibrated structures C) Locations of the residues Tyr132 (red) and Ser129 (orange) in KirBac3.1 WT. D) Locations of the residues Tyr132 (dark blue) and Arg129 (cyan) in KirBac3.1 S129R. E) Zoom on the π -interaction between Tyr132 and Arg129 in KirBac3.1 S129R. F) Locations of the residues Tyr132 (dark blue) and Arg129 (cyan) in KirBac3.1 S129R when the Arg129 is oriented toward the center of the channel. 151

Figure 47 - Kink of the outer helices. Histograms of the values of the kink of the external helices during the relaxed simulations of molecular dynamics after MDeNM. The structures populations of KirBac3.1 WT are represented in red and the structures of KirBac3.1 S129R in blue. A) Kink of the outer helix of the chain A. B) Kink of the outer helix of the chain B. C) Kink of the outer helix of the chain C. D) Kink of the outer helix of the chain D. E) Representation of the outer kink angle (ke). 152

Figure 48 - Rotation of the cytoplasmic domain. A) Representation of the cytoplasmic domain rotation. B) Boxplots of the values of rotation of the cytoplasmic domain for each chain, in red for KirBac3.1 WT and in blue for KirBac3.1 S129R..... 153

Figure 49 - Interaction between the cytoplasmic and the membrane interface. Pink points are for KirBac3.1 WT, blue points for the S129R mutant. A) Minimal distance between the slide-helix (residue Asp35 Chain B) and the CD-loop (residue Arg167 Chain C) versus the minimal distance between the linker (residue Pro138 Chain B) and the G-Loop (residue Phe250 Chain B). B) Minimal distance between the slide-helix (residue Asp35 Chain C) and the CD-loop (residue Arg167 Chain D) versus the distances between the linker (residue Pro138 Chain C) and the G-Loop (residue Phe250 Chain C). C) Location of the interactions. 154

Figure 50 – HDX-MS. A-B) The gradient of color from blue to red corresponds to regions from rigid to flexible, respectively. Grey area represent areas without data. A) Projection of the HDX-MS results of KirBac3.1 WT. B) Projection of the HDX-MS results for the mutant S129R. C) Nomenclature. D) RMSD of KirBac3.1 WT (red) and KirBac3.1 S129R (blue) 155

Figure 51 – Statistiques sur le développement et l’amélioration de la cryo-microscopie. Les données sont issues de la base de données EMDB. En bleu est représenté le nombre de densités électroniques renseignées par année. En orange est indiquée la meilleure résolution atteinte par année.....	165
Figure 52 - Grilles. A) Support de grilles, image issue du site emresolutions.com. B) Grille industrielle. C) Grille réalisée en laboratoire.	166
Figure 53 - Microscope. A) Schéma représentant l'organisation d'un microscope à transmission électronique. B) Microscope Krios Titan, image issue de forschungsinfrastruktur.bmbwf.gv.at.	167
Figure 54 - Représentation de la CTF et de son enveloppe. Données réalisées par Nicolas Boisset. A) Représentation de la CTF sans son enveloppe. B) Représentation de la fonction d'enveloppe. C) Représentation du produit de la CTF et de la fonction d'enveloppe. D) Représentation du produit de la CTF et de la fonction d'enveloppe au carré.....	170
Figure 55 - Effet de la CTF sur la résolution et le contraste des images. Ici, pour observer l'effet de la CTF sur l'image, la transformée de Fourier a été multipliée par une CTF modélisée à deux valeurs de défocalisation différentes. Haut: défocalisation proche du point focal Bas: défocalisation plus loin du point focal.	171
Figure 56 - Correction de la CTF par le filtre de Wiener. A) Représentation de la CTF à une valeur de défocalisation aux alentours de 1000 nm. B) Filtre de Wiener. C) Correction de la CTF par le filtre de Wiener. Lorsque CTF=0, aucune correction n'est réalisée.....	172
Figure 57 - Filtre de Wiener appliqué sur deux images dont les valeurs de défocalisation sont différentes. La CTF s’annule à 11Å, il s’agit de la limite de résolution, c’est le cas pour les deux images. Lorsque les images sont considérées individuellement, la CTF s’annule pour les valeurs de 16 et 9Å, les filtres utilisent alors la figure 2 pour récupérer les données de fréquences.	173
Figure 58 - Spectre de puissance. A) Spectre de puissance pour un ensemble de micrographes montrant des valeurs de défocalisation entre -1.2 et -3.9 µm, adapté de Frank(355) (2006). B) Comparaison des spectres de puissance modélisés (hémisphère gauche) et expérimental (hémisphère droit).	175
Figure 59 – Reconstruction 3D dans l’espace réel. A la surface de la sphère d'Euler, sont représentées les différentes classes moyennes d’un objet étudié. Chacune est rétro-projetée selon son angle d'Euler dans l'espace réel. Les densités de chaque moyenne des classes 2D sont étirées sous forme de rayons à travers l'espace 3D et les points où se rencontrent les rayons seront sommés pour définir la densité électronique 3D de l'objet dans sa globalité.....	181
Figure 60 - Reconstruction 3D dans l'espace de Fourier. A) Différentes vues de l’objet étudié partageant au moins une ligne commune. B) Projections équivalentes à la vue proposée en A. C) Transformée de Fourier des projections B. D) Représentation de deux transformées de Fourier partageant au moins une ligne commune dans l’espace réciproque. En vert sont indiquées les lignes communes à la vue latérale (s) et la vue du haut (e). En violet est indiquée la ligne commune entre les vues de côté s1 et s7. L’angle entre deux lignes communes détermine l’angle d’orientation d’Euler relatif. E) La transformée de Fourier inverse des transformées 2D combinées forme une structure améliorée de l’espace réel vue comme une densité électronique.	182
Figure 61 - A) Denaturing gels 12% of Kir2.1 WT. Visible red band on the left corresponding to the monomer of Kir2.1 after purification. B) Profile of the size exclusion chromatography of Kir2.1 WT, the tetramer is eluded at 11 mL.	198
Figure 62 - Picking and 2D classification. A) Example of micrographs of cryo-EM to pick. In red, four examples of particles detected. B) 2D classification of the particles.	199
Figure 63 - Refinement 3D of human Kir2.1. A) Initial modelled structure of Kir2.1 used for the refinement (i-Tasser). The structure is low-passed to 40Å to be used as model. B and E)	

Final result with the application of a tight mask: 13.4Å. C and E) Final result with the application of a conservative masked: 7.7Å. D and E) Final result without mask: 6.2Å.	200
Figure 64 - Distribution of orientations of the final structure composing particles. A) Graphical representation of particles orientations as they are distributed on the structure. Every peak on the Euler sphere surface represents an orientation of particles generated during the final 3D refinement. More the peak is high and green, more the orientation is populated. Around the Euler sphere, projection of the final structure corresponding to the orientation of the classes are shown.	201
Figure 65 - Functional reconstitution of the purified Kir2.1 protein in black lipid membranes. Recording of reconstituted Kir2.1 in lipid bilayers in presence of 1% PIP, at -100 mV. A cluster of 3 channels is gating between open (O) and closed states. Channel activity was completely silenced by application of 100 μ M BaCl ₂	201
Figure 66 - A) Visualisation d'un micrographe avec les fibres du complexe sdADN présentes. B) Classification 2D de référence pour le picking des particules.	249
Figure 67 - Classification 2D des particules retenues pour la reconstruction 3D.	249
Figure 68 - Complexe CD-dsADN. A) Fitting de deux cyclodextrines dans le complexe. B) Position de l'ADN au sein du complexe. L'ADN blanc commence dans l'unité précédente N-1, l'ADN bleu dans l'unité N se termine dans l'unité suivante N+1, où un début d'ADN (relatif à l'ADN orange) débute.	250

8 Table des Tableaux

Tableau 1 - Récapitulatif des concentrations intracellulaires et extracellulaires des différents ions.	22
Tableau 2 - Récapitulatif des différentes structures résolues de KirBac3.1 répertoriées dans la base de données des PDB.	29
Tableau 3 - Populations (in percentage) of different opening states in the relaxed structures of KirBac3.1 WT obtained through MDeNM simulations.	72
Tableau 4 - Sequence coverage for KirBac3.1 obtained in different digestion conditions and after deuteration.	108
Tableau 5 - C α -C α distance variations (in Å) between opposite chains at the levels of the residues Leu124 and Tyr132 when displacing the energy minimized structure by 2 Å of rmsd along each of the 11 selected modes of WT.	108
Tableau 6 - Parameters used in the MDeNM.	109
Tableau 7 - Data collection and structure refinement statistics for KiBac3.1 W46R.	138
Tableau 8 - States of the channels of KirBac3.1 and KirBac3.1 S129R.	152

Résumé :

Les canaux potassiques (Kir) à rectification entrante sont des protéines transmembranaires impliquées dans des processus physiologiques fondamentaux tels que la régulation du volume cellulaire, la contraction musculaire ou encore le pouls. Des pathologies existantes sont directement liées à des mutations sur des protéines appartenant à de cette famille de canaux. Par exemple, certaines mutations au niveau de Kir2.1 provoquent le syndrome d'Andersen ou l'hyperinsulinisme dans le cas de mutation sur Kir6.2. Cette étude a quatre objectifs: i) comprendre le mécanisme moléculaire d'ouverture et de fermeture de KirBac3.1, ii) comprendre l'impact de la mutation W46R sur le canal, iii) comprendre l'impact de la mutation S129R, une mutation conçue pour stabiliser l'état ouvert du canal, iv) résoudre la structure de Kir2.1 humain par cryo-microscopie.

Pour étudier le comportement de ce système, la dynamique moléculaire utilisant la méthode des modes normaux excités (MDeNM) a été employée. La dynamique moléculaire (MD) nous permet d'observer des mouvements particulièrement rapides et de faible amplitude tels que des mouvements de chaînes latérales ou de boucles, alors que que les modes normaux décrivent des mouvements lents et collectifs de grande amplitude. Cette approche hybride donne accès à une exploration plus large de l'espace conformationnel que la MD seule, et permet en outre de déterminer les populations conformationnelles des différents états (ouverts et fermés). Pour déterminer la structure de Kir2.1 WT, nous avons utilisé la cryo-microscopie électronique combinée à l'analyse d'images, la structure 3D est actuellement en cours de détermination.

Les simulations réalisées avec MDeNM ont produit des structures intermédiaires entre les états fermés et ouverts. Ils ont permis de déterminer les mouvements clés du mécanisme d'ouverture/fermeture du canal comme l'implication du domaine cytoplasmique, de l'hélice de glissement ainsi que des hélices transmembranaires dans l'ouverture du canal. Ces observations ont été confrontées à la méthode de spectrométrie de masse HDX-MS et à des expériences d'électrophysiologie pour validation. Notre étude se poursuit avec des mutants ciblés de KirBac3.1: KirBac3.1 W46R causant un gain de fonction et une pathologie liée à l'hyperinsulinisme, et KirBac3.1 S129R conçu pour obtenir la forme ouverte stable du canal. La détermination de la structure cristallographique de KirBac3.1 W46R et nos études de modélisation ont montré que, l'interaction du W46 avec l'hélice interne du canal (qui existe chez le sauvage) est perdue dans le KirBac3.1 W46R mutant et est remplacée par une interaction de Arg46 mutée avec l'hélice de glissement voisine. Cette modification des interactions entraîne la rupture des interactions entre le bas des deux hélices transmembranaires provoquant le soulèvement de l'hélice de glissement ce qui facilite l'ouverture du canal. L'étude du mutant KirBac3.1 S129R à l'état ouvert explique comment la mutation repousse les points de constriction et maintient le canal ouvert avec un rôle surprenant de la mutation Arg129. Nous avons étudié la structure de Kir2.1 par cryo-microscopie et obtenu une densité électronique à une résolution de 7 Å.

Ces investigations permettent une meilleure compréhension moléculaire du mécanisme d'ouverture du canal sauvage et une explication moléculaire du dysfonctionnement dans les canaux Kir mutés.

Mots clés : canaux Kir, gating, MDeNM, cryo-EM, HDX-MS

Structural, functional and conformational dynamics studies of a Kir channel : towards the gating molecular mechanism of this channel.

Abstract:

Inwardly-rectifying potassium (Kir) channels are transmembrane proteins involved in fundamental physiological processes like the regulation of the cellular volume, the muscular contraction and the heart pulse. Pathologies are directly linked to a mutation of this family of channels. For example, some mutations in Kir2.1 cause the Andersen's syndrome or hyperinsulinism in Kir6.2 channels. This study has four objectives: i) to understand the gating mechanism of the KirBac3.1, ii) to understand the impact

of the mutation W46R on the channel, iii) to understand the impact of the mutation S129R on the channel, iv) to resolve the structure of Kir2.1 at an atomic level.

To study the dynamical characteristics of this system, Molecular Dynamics using excited Normal Modes (MDeNM) method was used. The Molecular Dynamics (MD) allows us to observe particularly fast and small amplitude movements such as side-chain movements or loops, while the normal modes describes slow and collective movements of large amplitude. This mixed approach gives access to a wider exploration of the conformational space than MD alone, besides, it allows to determine the conformational populations of the different states (open and closed). To determine the structure of the human Kir2.1 WT, we are using cryo-electron microscopy combined with image analysis from which the determination of its 3D structure is presently being improved.

The simulations carried out with MDeNM provided us with the intermediate structures between the closed and open ones. They allowed us to determine the key motions in the gating mechanism like the involvement of the cytoplasmic domain, the slide-helix and the transmembrane helices during the opening of the channel. These observations were confronted to HDX-MS Spectrometry and electrophysiological experiments for validation. Our study extended to two KirBac3.1 mutant channels: W46R (equivalent to the human Kir2.1 W68R, causing hyperinsulinism) and S129R (an engineered open state mutant). The crystallographic data of W46R mutant and the comparison between the interaction networks of KirBac3.1 WT and KirBac3.1 W46R revealed that the interactions of the W46 with the inner helix of the channel is disrupted and replaced by interaction with the neighbouring slide-helix when the residue is mutated in R46. This modification in the interactions causes the loss of interactions between the bottoms of the two transmembrane helices that triggers the uprising of the slide-helix which opens the channel. The study of KirBac3.1 S129R mutant in the open state explains how the mutation pushes away the point of constriction and keeps the channel open with a surprising role of the mutation Arg129. We investigated the structure of Kir2.1 by cryo-EM and obtained a electronic density at 7 Å resolution.

These investigations provide a greater understanding of the mechanism of gating function and dysfunction in Kir channels.

Keywords: Kir channels, gating, MDeNM, cryo-EM, HDX-MS