THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Électrophysiologie et Physiologie

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Laboratoire de Physiologie et Médecine Expérimentale du cœur et des muscles (PhyMedExp)
Unité de recherche INSERM U1046

Activation du canal potassique TREK-1 par les acides gras poly-insaturés

Présentée par Emilie Bechard-Drimaracci
Le 23 Octobre 2023

Sous la direction de la Pr Marie Demion
et du Pr Jean-Yves le Guennec

Devant le jury composé de

Marie DEMION, Professeure, Université de Montpellier	**Directrice de thèse**
Jean-Yves LE GUENNEC, Professeur, Université de Montpellier	**Directeur de thèse**
Bruno ALLARD, Professeur, Université Lyon 1	**Rapporteur**
Sébastien ROGER, Professeur, Université de Tours	**Rapporteur**
Anne-Aliénor VERY, Directrice de recherche, Université de Montpellier	**Examinatrice**
Olga ANDRINI, Maître de conférence, Université Lyon 1	**Examinatrice**

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 7

RÉSUMÉ 15

LISTE DES FIGURES 19

LISTE DES TABLEAUX 22

INTRODUCTION GÉNÉRALE 24

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION SUR LES ACIDES GRAS 27

A. Classification, structure et fonctions des acides gras 27

1. Les acides gras saturés 28
2. Les acides gras insaturés 29
   a. Nomenclatures 29
   b. Les propriétés liées aux acides gras insaturés 30
      b1. Isomérie des acides gras insaturés 30
      b2. Température de fusion et fluidité des acides gras 32
3. Les acides gras dans la composition et la dynamique de la membrane biologique 34
   a. Composition de la membrane plasmique 35
   b. Dynamique au sein de la membrane plasmique 35
4. Les acides gras poly-insaturés dans la régulation des cellules excitables 36
   a. La régulation de l'excitabilité cardiaque 37
   b. Neuroprotection par les acides gras poly-insaturés 40

B. Métabolisme des acides gras poly-insaturés Oméga-3 et Oméga-6 40

5. Métabolisme des acides gras poly-insaturés 41
   a. Voie de synthèse des acides gras poly-insaturés 41
   b. Oxydation des acides gras poly-insaturés 43
      b1. Oxydation enzymatique 44
      b2. Oxydation non enzymatique 44
      b3. Effets physiopathologiques des dérivés oxydés non enzymatiques 47

CHAPITRE 2 : INTRODUCTION SUR LE CANAL TREK-1 48

A. Les 3 grandes familles de canaux potassiques 48

B. Classification et rôles physiologiques des K2P 50

1. La sous-famille TWIK 50
2. La sous-famille TASK 52
3. La sous-famille THIK 52
4. La sous-famille TRESK 53
5. La sous-famille TALK 53
6. La sous-famille TREK 53

C. Les régulations du canal TREK-1 54

1. Un canal de fuite idéal ? 54
2. Régulation pharmacologique 58
   a. Inhibiteurs pharmacologiques de TREK-1 58
   b. Activateurs pharmacologiques de TREK-1 60
3. Régulation par le pH 62
4. Régulation par des voies de signalisatons intracellulaires 63
5. Mécano-sensibilité 65
6. Régulation par les lipides cellulaires 67
   a. Les phospholipides 67
   b. Les acides gras poly-insaturés 69

D. Fonctions physiopathologiques de TREK-1 71

1. Fonctions physiopathologiques de TREK-1 dans le domaine cardiovasculaire 71
   a. TREK-1 dans l'infarctus du myocarde 72
   b. TREK-1 dans la régulation du rythme cardiaque 72
2. Fonctions physiopathologiques de TREK-1 dans le domaine des neurosciences 73
   a. Rôle dans la neuroprotection de l'épilepsie 74
   b. Rôle de TREK-1 dans la physiopathologie de la dépression 74

CHAPITRE 3 : PRINCIPES ET TECHNIQUES D'ELECTROPHYSIOLOGIE 76

A. Petite histoire de l'électrophysiologie 76

1. Une étymologie anecdotique 76
2. 1791 - L'une des premières expériences d'électrophysiologie 77
3. 1840 - Potentiel de repos et potentiel d'action 77
4. 1827 – La loi d'Ohm 78
   a. La loi d'Ohm en physique 78
   b. Modèle électrique des membranes biologiques selon la loi d'Ohm 79

5. 1855 - La loi de diffusion de Fick 81
6. 1889 – L'équation de Nernst : potentiel électrochimique d'un ion 82
a. Origine de la différence de potentiel de part et d'autre d'une membrane 82
b. L'équation de Nernst de but en blanc 83
7. 1902 - Théorie membranaire de Bernstein : sélectivité potassique de la membrane 85
8. 1943 – L'équation de Goldman-Hodgkin-Katz : la théorie des champs constants 87

B. La technique de patch-clamp 88
1. Les configurations de la technique de patch-clamp 88
2. Les conventions de courant et de voltage 92
a. Les conventions de courant 92
a.1 Courants entrant et sortant 92
a.2 Courants positif et négatif 92
b. Les conventions de voltage 92
b1. La « polarité » des cellules 92
b2 La commande de potentiel V_{cmd} et le potentiel de membrane Em 93

CHAPITRE 4 : MATÉRIEL ET MÉTHODES 96

A. Culture cellulaire 96
1. Lignées stables HEK hTREK-1 96
2. Transfections transitoires 96

B. Réactifs et matériels 97

C. Electrophysiologie : Protocoles et réactifs 99
1. Patch-clamp en configuration cellule-entière 99
a. Acquisition des données en configuration cellule-entière 99
b. Analyses des données en configuration cellule-entière 100
c. Caractérisation du système de perfusion en courant-imposé 101
2. Patch-clamp en configuration inside-out 102

D. Etude de la fluidification membranaire par les acides gras poly-insaturés 103

E. Mesure d'affinité protéine-acide gras poly-insaturé 105
1. Purification des microsomes 105
2. Mesure du décalage du spectre de fluorescence 105
a. Acquisition des données de fluorescence 105
b. Analyses des données de fluorescence 106

F. Analyses statistiques 108
1. Distribution des données et normalité 108
2. Tests statistiques de comparaisons de moyennes non paramétriques 111
3. Relations entre deux variables X et Y 112

CHAPITRE 5 : PROBLÉMATIQUES, RÉSULTATS ET DISCUSSION 115

A. Activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés 115
1. Contextualisation : l'origine de lhypothèse de l'activation *via* une voie mécano-sensible 115
2. Activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés *via* un mécanisme direct d'intéraction acide gras-protéine 118
a. L'activation de TREK-1 n'est pas corrélée à la longueur de la chaîne carbonée des acides gras poly-insaturés 119
b. Les acides gras se comportent comme des activateurs directs de TREK-1 123
b1. Cinétique d'activation de TREK-1 et comparaison avec un activateur direct 123
c2. Cinétique de réversibilité immédiate et totale de l'activation de TREK-1 127
c. Étude de la fluidification de la membrane par les acides gras poly-insaturés 129
d. Étude de l'impact de la courbure membranaire sur TREK-1 132
e. Étude de l'affinité d'interaction du complexe TREK-1-acide gras poly-insaturés 136
e1. Mesure d'affinité selon la méthode du déplacement spectrale de fluorescence 136
3. Discussion et Conclusion 137

B. Variabilité de la réponse aux acides gras et mécanisme d'action 142
1. Méthode d'analyse de la variabilité dans un modèle de surexpression stable 142
a. Variabilité du courant initial 143
a1. TREK-1 participe à l'établissement du potentiel de membrane 144
a2. Variabilité du courant initial et expression de TREK-1 148
b. Les acides gras poly-insaturés permettent une activation des canaux TREK-1 « silencieux » en condition initiale 151
b.1 Deux types d'activateurs de TREK-1 151
b.2 Le mode « *leak* » de TREK-1 activé par les acides gras poly-insaturés 159
2. Comparaison des modèles d'expressions stables et d'expression transitoire du canal TREK-1 166
3. La mutation G171D du canal TREK-1 169
a. Mutant G171D du canal TREK-1 169
b. Fraction de canaux TREK-1 « silencieux » : du mode voltage-dépendant au mode « *leak* » 174
4. Discussion et Conclusion 176

C. TREK-1 et les dérivés oxydés des acides gras poly-insaturés 182
1. Contextualisation 182

2. métabolites oxydés de l'acide docosahexaénoïque et de l'acide linoléique sur l'activité du canal TREK-1 183
a. La $4F_{4T}$-NeuroP (dérivés oxydés de l'acide docosahexaénoïque)....183
b. Les oxylipines de l'acide linoléique....185
3. Effets des acides gras en conditions pro- et anti-oxydantes sur le canal TREK-1....187
a. Effet de la Vitamine E sur le canal TREK-1....187
b. Conservation de l'effet activateur des acides gras poly-insaturés en condition antioxydante....189
4. L'acide linoleique deutéré....193
5. Discussion et Conclusion....195

D. Importance de la géométrie des acides gras pour l'activation du canal TREK-1....196
1. L'extrémité carboxyle des acides gras poly-insaturés....196
a. Les acides gras estérifiés....196
2. Les insaturations....198
a. Les acides gras à 18 atomes de carbones qui n'activent pas le canal TREK-1....198
b. La configuration spatiale des acides gras....200
b.1. La position des insaturations....200
b.2. La configuration des insaturations....203
3. Discussion et conclusion partielle....206

E. Conclusion générale et perspectives....212

BIBLIOGRAPHIE....214

ANNEXE....227

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au laboratoire de Physiologie et Médecine expérimentale du cœur et des muscles (PhyMedExp, Montpellier).

Tout d'abord je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, pour avoir accepté d'évaluer mon travail :
Anne-Aliénor Very (Directrice de recherche CNRS) et **Sébastien Roger** (Professeur, Université de Tours) pour ce bel échange au cours de la soutenance.
Bruno Allard (Professeur, Université Lyon 1), qui a été l'un de mes enseignants en électrophysiologie durant mon Master à Lyon, une des raisons pour lesquelles j'ai continué dans cette voie.
Olga Andrini (Maître de conférence, Université Lyon 1), qui a été, il y a quelques années déjà, ma première tutrice de stage. Merci de m'avoir donné un si bel encadrement avec **Thomas**, c'est grâce à vous que j'ai fait mes premiers pas au sein d'un laboratoire et que j'ai adoré !

Je tiens à remercier avec la plus grande sincérité, mes deux directeurs de thèse **Marie** et **Jean-Yves**, qui forment le duo de directeurs de thèse complémentaire, sinon parfait. Vous m'avez offert le meilleur encadrement scientifique qu'on puisse espérer et j'ai conscience de la chance que j'ai eu de faire ma thèse avec vous. Au bout de ces 3 années, votre calvaire touche enfin à sa fin… merci de m'avoir supporté avec mes statistiques et équations en tout genre et mes mille idées à la minute !
Marie, tu m'as appris bien plus que ce que tu ne le crois et tu seras toujours un exemple pour moi (et un bon, parce qu'on en a aussi des mauvais !). Je garderai toujours en tête ton « cahier du recadrement ». Il m'a appris à me concentrer sur une idée et à la terminer avant de passer à la suivante ; chose que j'avais bien besoin d'apprendre en fin de première année ! Alors que nombreux sont ceux qui se contentent de parler de ce qu'ils savent déjà, tu n'as jamais eu honte de poser la question qu'on se posait tous tout bas. En suivant ton exemple, je suis devenue beaucoup moins bête, même si je dois faire répéter 5 fois. Nos visions un peu différentes ont toujours mené à de belles discussions scientifiques, à une nouvelle façon de voir les choses et à aborder une manip sous un angle différent, souvent fructueux. Et enfin, merci de m'avoir amené à San Diego pour la *Biophysic Society* cette année, avec mon poster plus grand que moi

et de ne pas m'avoir laissé prendre un avion toute seule jusque dans le Texas ! J'ai appris beaucoup de choses à tes côtés et je ne t'en remercierai jamais assez.

Jean-Yves, les meilleurs moments du début de ma thèse étaient ceux où tu venais au poste de patch passer 1h ou 2. Ce sont ces moments où j'ai le plus appris, ces moments qui ne devraient pas être une chance quand on est étudiant, mais que j'ai eu la chance d'avoir. Merci de m'avoir transmis l'excitation du patch ; déclencher des potentiels d'action par rupture de choc anodique juste parce qu'on peut le faire et parce que c'est cool ! Merci d'avoir gardé la porte du bureau toujours ouverte pour les fois où j'avais besoin de déverser le contenu, souvent algébrique, de mon cerveau sur quelqu'un avant de tout oublier. Je garde précieusement tous nos tableaux de modélisation et de calcul. J'ai pris des notes et je pense (j'espère) pouvoir m'en sortir toute seule à partir de novembre. En tout cas, j'ai de bonnes blagues à raconter maintenant !

Je pense qu'il me faudrait 300 pages de plus pour vous remercier pour tout ce que vous m'avez appris, mais cette thèse fait déjà 300 pages, alors une dernière fois merci à tous les deux, merci de m'avoir suivie dans mes statistiques farfelues, et merci de m'avoir permis d'apprendre avec vous. Plus que tout merci pour votre disponibilité tous les jours et à toute heure ; merci d'avoir partagé avec moi votre passion pour l'électrophysiologie. Même s'il me reste beaucoup à apprendre, je n'aurai pas pu faire meilleur début qu'avec vous.

Merci pour les illustrations Biorender (Created with BioRender.com).

<u>Aux membres du laboratoire et collaborateurs</u> :

Merci à **Fabien Brette**, un électrophysiologiste de très grande qualité, toujours disponible pour discuter. Merci pour l'aide sur la veille bibliographique, je serai encore en train de chercher certaines références sans ton aide ! Enfin, merci pour la relecture intégrale de ma thèse, les conseils et suggestions et merci d'avoir écouté et nourrie mes réflexions électrophysiologiques jusqu'à la dernière minute de la rédaction.

Merci à l'équipe de chimistes de l'IBMM (Montpellier), **Camille Oger**, **Claire Vigor** et **Jean-Marie Galano** pour nos discussions sur les acides gras lors de nos réunions et vos réponses par mails toujours rapides ! Merci particulièrement à **Thierry Durand**, qui m'a accompagné pendant ces trois années en participant à mon comité de thèse. Merci d'avoir orienté ma réflexion, pour toutes tes réponses à mes questions et surtout pour tes encouragements.

Merci à **Pierre Charnet** et **Fabrice Antigny**, votre aide pendant les comités de thèse m'a été très précieuse. J'attendais toujours avec impatience vos commentaires et vos conseils, je n'ai jamais été déçue !

Merci à **Claudine Menard**, qui dirige l'unité d'enseignement de Biochimie Métabolique de la faculté des sciences. Merci pour ta confiance et ta bienveillance, j'ai appris énormément de choses et je me suis pleinement épanouie durant mes heures d'enseignements. Merci aussi à tous les étudiants de Licence que j'ai eu en TD et en TP, vous m'avez tous appris quelque chose à votre manière, la patience et la reformulation. Vous m'avez aussi beaucoup faite rire, votre bonne humeur et votre participation sont de très bons souvenirs, mais surtout, c'est grâce à vous que m'exprimer devant un public n'est plus du tout stressant !

Merci à **Sylvie**, tu m'as montrée plus d'une fois qu'aucune connaissance ne doit se fonder sur des croyances. Tu m'as appris que l'on peut tout remettre en question, mais avant tout soi-même, si on veut apprendre et s'améliorer. Qu'il faut toujours remonter jusqu'à la source de l'information car ce qu'on tient pour vérité n'est pas toujours justifié. Grâce à toi, je sais quelle chercheuse j'ai envie de devenir (ou ne surtout pas devenir) et je sais que ma soif d'apprendre n'est pas près de s'estomper !

Merci aux membres du pôle gestion, **Fabienne**, **Caroline** et **Frédéric** pour votre aide au cours de ma thèse.
Merci aussi à **Bruno**, **Azzouz** et **Patrice**, pour tout ce que vous faites dans le labo, vous répondez toujours présents quand on a besoin d'aide !

<u>Aux étudiants du laboratoire et amis</u> :

En tout premier, merci à **Xavier**, tu resteras mon « stupide stagiaire » préféré ! Je me rappellerai toujours la décomposition de ta tête quand je t'ai annoncé qu'on allait faire de l'électrophysiologie et des statistiques… et finalement ces 6 mois à travailler avec toi ont été des plus productifs ! On est venu à bout de ces manips d'*inside-out* et c'est en partie grâce à ton calme et ta persévérance. Merci pour ton aide durant ma deuxième année de thèse, et je suis à présent contente de te compter parmi mes amis.

Merci à **Matthias** (deux t), tu es entré un peu par hasard, au détour d'un couloir, dans l'étude de TREK-1 pour ton stage ; ton envie d'apprendre et de comprendre le patch m'a rappelé la mienne 4 ans plus tôt. Ton humour dans la salle d'électrophysiologie nous manque déjà et on ne peut plus manger une quiche sans penser à toi. Bon courage pour le début de ta thèse, tu l'as bien mérité !

Merci à **Vianney**, d'avoir été de bonne compagnie dans la salle d'électrophysiologie pendant 6 mois. Ta persévérance et ta résiliation pendant ton stage étaient admirables.

Merci à la Team de l'animalerie, **Mathias** (un t), **Axel**, **Angel**, **Souhila**, **Elodie D** et **Laurie**, votre bonne humeur est légendaire. Je pense que vous ne saurez jamais qui du tigre ou du gorille gagne dans une arène, ni quelle est la meilleure équipe pour prendre d'assaut le laboratoire, mais c'est déjà bien d'y avoir réfléchis… Merci pour ces fous rires ! Mathias, évite le petit pois-semoule au repas ; Angel et Souhila, achetez-vous un four et un moule à gâteaux bon sang ; Axel, ne change rien, tu es un parfait maître des opérations ; Laurie, ton franc parler n'a pas d'égal, on ne te changerait pour rien au monde ; Elodie, merci pour les discussions de fin de thèse, je te souhaite de finir en beauté et de trouver ta voie, on aura tous fait du mieux qu'on peut et c'est ça le plus important !

Merci à **Tristan**, **Sandro** et **Jamal** pour cette année. Tristan, je t'avais promis de faire mes remerciements en frise chronologique, mais c'était un peu compliqué… On se reverra, mais pas à la patinoire, lever une pinte c'est beaucoup moins risqué ! Sandro et Jamal, merci pour ces fous rires dans la salle d'électrophysiologie et au bar, votre stage nous restera à tous les trois mémorable.

Merci à **Kevin**, chose promise, chose due ! J'avais promis il y a longtemps d'écrire ton slogan « life is a b*tch », parce que c'est on ne peut plus vrai. Après ces trois années, c'est quand même toi qui t'en sors le mieux. Parce qu'on a rarement vu quelqu'un travailler plus que toi, tout ce qui t'arrivera de bien est amplement mérité.

Merci à **Simon**, mon cardiologue préféré, c'est toujours un plaisir de te retrouver en congrès. Ce sera bientôt ton tour de soutenir ta thèse de science !

Merci Xavier Vidal-Gomez pour les illustrations biorender (Created with BioRender.com).

Merci à **Élisa G**, heureusement que notre bureau est le plus grand de PhyMedExp parce qu'on y a mis un sacré bazar ! Ma famille me demande si tu seras encore là à Noël cette année, tu auras toujours une place parmi nous.

Merci à **Jordi**, tu fais partie de mes meilleures rencontres durant ces trois années à PhyMedExp. Toujours ravie de résoudre tes problèmes de statistiques, j'attends que tu finisses ta thèse à Laval (c'est où ça déjà ?) avec impatience, notre labo ne va pas s'ouvrir tout seul ! Merci pour ces folles soirées, le shampoing à l'œuf du nouvel an, la tarte aux pommes et le super fondant au chocolat qui n'a pas fait exception. Merci pour ton amitié et ta bienveillance. Il ne me reste plus qu'à trouver la route de Laval pour venir te voir, prépare toi, j'ai deux trois petits trucs à t'apprendre mon p'tit!

Merci à **Yvonne** et **JB**, vous avez été mes premiers amis dès le début de ma thèse. Yvonne, le meilleur bureau c'était le nôtre, toujours en train de rire, la porte fermée pour que personne ne nous entende ! Merci pour les barbecues du dimanche devant la Formule 1 avec le barbecue électrique de JB qui a fait des étincelles plus d'une fois ! Merci JB d'avoir « réparé » le micromanip plusieurs fois : « mais souffle dessus bon sang ! ».

A ma famille et mes amis :

Merci à **ma maman, Angélina**. J'écris depuis le couloir de l'hôpital, en espérant que quand tu te réveilleras, tout ira bien. Tu es certainement la plus gentille personne de ce monde ; c'est normal, tu portes bien ton prénom. Nous traversons le pire et le meilleur depuis toujours ensemble et tu trouves en permanence la force d'être toujours là pour Paul et moi. Je n'ai pas hérité de ta gentillesse, ça c'est sûr, mais ce n'est peut-être pas plus mal comme ça après tout, il ne peut y avoir qu'une seule personne extraordinaire comme toi. Merci plutôt de m'avoir transmis ton acharnement et ton obstination, dans ce monde où il ne faut jamais baisser les bras. Grâce à toi, je ne m'arrête jamais avant d'avoir réussi. Bon courage dans ton défi de lire ma thèse en totalité et rappel toi que tu es priée de ne pas pleurer pendant ma soutenance, attend au moins la fin. Merci mère.

Merci à **petit mon frère, Paul**. Bien que selon toi, j'ai toujours cherché les problèmes là où il n'y en avait pas et que je passais plus de temps au bar qu'à travailler, je vais finalement être docteur ! C'est vrai, j'ai dû faire de longues études parce que je mettais beaucoup de temps à

comprendre alors que toi tu as tout compris tout de suite ! Depuis tout petit, tu dis que pour être heureux, il faut cultiver son jardin ; parce que c'est le seul livre que tu as lu en fait, mais aussi parce que ça te définit parfaitement. Tu as trouvé ta voie, une vie libre et heureuse sur ton tracteur, c'est bien tout le mal que nous te souhaitons. N'oublie pas que tu devras prendre mes enfants en vacances dans quelques années, pour qu'ils apprennent à cultiver leur jardin ! Merci petit frère, tu resteras toujours mon petit frère, même si tu fais la taille de mon frigo.

Merci à **mon père, Vincent**. J'ai bien fait de ne pas être avocate, les électrophysiologistes sont beaucoup plus drôles ! Ta plus belle qualité, c'est maman, à n'en pas douter. Mais grâce à toi, rien ne peut m'arriver, tu m'as appris à défendre mes idées jusqu'au bout, coute que coute. Tu m'as appris que j'étais autonome et indépendante et que je méritais d'y arriver.

Merci à **ma mamie, Jacqueline**, tu m'as faite réviser tous mes examens, de la Licence au Master, sur la table de la cuisine, et même au bas des pistes de ski devant d'innombrables chocolats chauds avec supplément chantilly ! Je pense que tu es prête à soutenir ta thèse toi aussi avec tout ça, merci ma petite mamie. De tout ce travail accompli, je t'en dois une belle partie.

Merci à **mes grands-parents, Nicole et Michel**, d'avoir gardé Madame Toutou pendant mes études, ça n'a pas été de tout repos pour vous !

Merci à **mes oncles et tantes** qui malgré toutes les épreuves de la vie, forment une famille unie.

Merci à **mes cousins et cousines**, qui répondent toujours présents, même les plus petits.

Merci à **ma cousine Élisa**, au fil des années, tu es devenue la sœur que je n'ai jamais eu.

Merci à **Alex**, tu es la meilleure copine qu'on puisse avoir. Merci pour nos folles aventures passées et à venir à travers tout le pays, en van, en camion et à cheval ! Merci d'avoir déménagé mes cartons de pois chiches à Lyon, Montpellier, Grenoble et on ne sait pas ce que l'avenir nous réserve ; en cas de guerre on ne mourra pas de faim au moins. Merci pour tous ces concours, pour tous ces championnats, nos nuits dans les chalets de Pompadour, dans les tentes ou à la belle étoile. Merci d'être ma meilleure amie depuis toutes ces années, depuis que j'ai vu ta tête sortir d'un trou sur le cross de Cornillon… Tu es celle sur qui je peux toujours compter,

n'importe quand, n'importe où et de préférence si c'est fou, loin et compliqué ! **Tom**, fais attention à elle (je n'ai pas peur pour elle mais pour toi), surtout dans la piscine en présence de frites.

Merci à la **famille Zanello**, Bérengère et Olivier, vous êtes comme ma seconde famille. Vous avez toujours été là pour moi, depuis qu'Alex à sorti sa tête du trou de Cornillon. Toujours partante pour une nouvelle aventure avec vous, dans la joie et la bonne humeur et surtout avec la mousse au chocolat de Bérengère !

Merci à **Roméo**, coach, j'ai vécu mes meilleures années de compétitions avec toi et Ragtime. Mais tu n'as pas seulement été mon coach pendant toutes ces années, c'est avec toi que j'ai grandi. Tu m'as appris à ressentir, répéter, gagner, échouer mais surtout ne jamais craquer, toujours aller en avant, calme et droit. C'est avec toi que j'ai appris que c'est le travail qui paie, répéter ses gammes dans la carrière qu'il pleuve, qu'il vente ou qu'il neige, de jour ou même de nuit. Quand je rentre au centre équestre, je rentre à la maison et c'est grâce à toi et **Sébastien**. Merci à tous les deux de m'avoir permis de grandir avec vous, dans le meilleur des endroits. Merci à toute la **Team Chimères**, **Lola, Loan, Gaby, Marie-Lou, Lou, Jawen, Louise, Jeanne, Laurie**, pour votre amitié. J'ai loupé les championnats de cette année, mais je serai à vos côtés l'année prochaine !

Merci à **Marianne**, ma binôme depuis le début sur les bancs de la fac ! Merci pour ces bons moments en TP de chirurgie, avec ton parkinson précoce et toutes ces heures de révisions intenses à la BU, les camemberts au four le lundi soir et ton amitié depuis tout ce temps.

Merci à **Louis**, de partager ma vie et de ton amour sans condition. La vie n'a jamais été plus belle et plus facile qu'avec toi. Merci de m'avoir soutenue dans la dernière ligne droite de la thèse. Merci pour tous ces jours et toutes ces nuits où tu as veillé à ce que je mange et boive pendant la rédaction. Tu es celui qui retiens mes larmes dans les moments difficiles de la vie et celui qui fait mon bonheur pardessus tout. Merci de préparer mes tartines tous les matins sans exception, et de penser à me fournir un livre par semaine ; il va nous falloir une grande bibliothèque maintenant. Je suis comblée par la vie que nous avons aujourd'hui et tellement heureuse de celle que nous nous apprêtons à construire.

RESUME

Résumé en Français :

Les canaux ioniques sont à l'origine de la genèse et de la transmission des signaux électriques dans les cellules excitables. L'activité de ces protéines est finement régulée et des dysfonctionnements de leur activité sont à l'origine de pathologies. La famille des canaux potassiques est la plus large et diversifiée. On retrouve entre-autre les canaux K_v dépendants du voltage, les canaux Kir à rectification entrante et les canaux K2P à deux domaines pores. L'activité de ces canaux établit le potentiel de membrane des cellules au voisinage du potentiel d'équilibre théorique du potassium (-85 mV) et diminue l'excitabilité cellulaire.

Le canal TREK-1 (*TWIK RElated K^+ channel type 1*) appartient à la famille de canaux potassiques de fond K2P et présente un courant à rectification sortante. Son activité est régulée par divers stimuli physiques ou chimiques comme la pression, le voltage, les modifications du pH, des agents pharmacologiques ou encore les acides gras poly-insaturés (AGPIs). Cette riche modulation par son environnement lui permet de participer à la régulation adaptée de l'excitabilité des cellules en favorisant la repolarisation du potentiel d'action et l'hyperpolarisation du potentiel de repos. Sa poly-modulation fait de TREK-1 une cible pharmacologique de choix dans les pathologies de la dépression, de l'hyperexcitabilité neuronale comme l'épilepsie ou encore des troubles du rythme cardiaque.

Ma thèse s'intéresse à la régulation de l'activité du canal TREK-1 par les acides gras poly-insaturés. Insérés dans les phospholipides, les AGPIs sont des composants de la membrane cellulaire, une bicouche de phospholipides qui sépare le milieu intérieur du milieu extracellulaire. Ils présentent d'autres rôles physiologiques ; l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) sont les précurseurs de molécules impliquées dans les processus inflammatoires par exemple. Les AGPIs de type Oméga-3 présentent des propriétés bénéfiques neuroprotectrices et cardioprotectrices. L'EPA et le DHA (acide docosahexaénoïque), deux Oméga-3, présentent des propriétés antiarythmiques *via* la modulation de l'activité des canaux ioniques sodiques, calciques et potassiques impliqués dans toutes les phases du potentiel d'action, de sa genèse à la repolarisation de la membrane.

L'objectif de ma thèse est d'améliorer notre compréhension du mécanisme d'action des AGPIs dans l'activation de TREK-1. Grâce à la technique de patch-clamp en configurations cellule-

entière et *inside-out*, nous avons étudié dans des modèles de surexpressions stables et transitoires du canal TREK-1 WT et du mutant G171D, l'activation de TREK-1 par des acides gras saturé, monoinsaturé, poly-insaturés et un activateur direct, le ML402.
La réversibilité immédiate et totale de l'effet des AGPIs sur TREK-1 nous a mené à reconsidérer l'hypothèse selon laquelle ils activeraient TREK-1 *via* une voie mécano-sensible, en modifiant les propriétés de la membrane (fluidité et courbure) suite à leur insertion. L'étude des cinétiques des effets des AGPIs et du ML402 montre qu'ils se comportent comme des activateurs directs du canal, suggérant l'existence d'au moins un site d'interaction des AGPIs avec TREK-1. L'accessibilité de ce site par les faces interne et externe, au travers de la membrane est favorisée par les propriétés hydrophobes de la chaîne aliphatique des AGPIs expliquant leur effet en configurations cellule-entière et *inside-out*. L'estérification du domaine carboxylique et la conjugaison des insaturations des AGPIs préviennent leur effet. Ces résultats suggèrent que les AGPIs interagissent avec TREK-1 en formant des liaisons électrostatiques et/ou hydrogènes *via* leur extrémité carboxylique tandis que le volume occupé par la chaîne aliphatique facilite ou non leur accès au site de liaison.
L'étude du courant TREK-1 induit par des *steps* dépolarisants montre que le courant présente une composante instantanée, résultat du changement de gradient-électrochimique, et une composante temps-dépendante, conséquence d'une dépendance au voltage. Au cours de son activation par les AGPIs, la composante temps-dépendante est convertie en composante instantanée et la rectification sortante du courant est perdue. Cette perte de la dépendance au voltage reflète le basculement de TREK-1 d'un mode voltage-dépendant à un mode « *leaky* ».
La mutation gain de fonction G171D abolit la rectification sortante de TREK-1 et prévient l'activation par les AGPIs. Ainsi nous proposons que l'interaction directe des AGPIs avec le canal TREK-1 permet son activation en le rendant indépendant du voltage dans toute la gamme de potentiel, faisant de lui un canal de fuite idéal.

Résumé en anglais :

The genesis and transmission of the electrical signal from excitable cells take their origins in the activity of ionic channels. Their activity is finely regulated and dysfunctions of ionic channels are the cause of various pathologies. The potassium channel family is the largest and the most diversified in the animal kingdom. Among the potassium channels, there is voltage-dependent potassium K_v channels, the inwardly rectifying Kir channels and the background

potassic K2P channels with two pore-domains. Activity of potassium channels sets the membrane potential toward the equilibrium potential of potassium (-85 mV) to reduce cellular excitability.

TREK-1 channel (*TWIK RElated K^+ channel type 1*) belongs to the K2P family of background potassium channels and displays an outwardly rectification. Its activity is poly-modulated by a large range of physical and chemical stimuli such as pressure, voltage, pH modifications, pharmacologic agents and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). This large modulation by its environment enables it to participate in the adapted regulation of the cellular excitability by favorizing the action potential repolarization and the hyperpolarization of the resting membrane potential. Its poly-modulation makes it target of choice for pharmacological molecules in the physiopathology of depression, seizure or cardiac arrythmias.

My thesis focuses on the activation of TREK-1 by PUFAs. Within the phospholipids, PUFAs are membrane components that separate the intra- from the extra-cellular medium. PUFAs have other physiological roles; for instance, arachidonic acid and eicosapentaneoic acid (EPA) are the precursors of inflammatory molecules. Omega-3 PUFAs display beneficial neuro- and cardio-protective properties. The Omega-3 PUFAs, EPA and DHA (docosahexaenoic acid), have antiarrhythmic properties through the modulation of ionic channels activities involved in every phase of the action potential, from the rapid depolarization to the repolarization of the membrane potential.

The aim of my thesis is to improve our understanding of the mechanism of action of PUFAs in the TREK-1 activation. Thanks to the patch-clamp technique in both whole-cell and inside-out configurations, we studied the TREK-1 activation by saturated, monounsaturated, polyunsaturated fatty acids and by a direct activator, ML402. We worked in cellular models of HEK that stably overexpressed TREK-1 or in a model of HEK cells transiently transfected with WT TREK-1 or with the G171D mutant of TREK-1 channel.

The immediate and total reversibility of the PUFAs effects on TREK-1 led us to rethink the assumption that PUFAs activation of TREK-1 involved a mechanosensitive pathway in which PUFAs insert into the membrane modifying its biophysical properties (fluidity or curvature). The study of the kinetics PUFAs and ML402 effects show that PUFAs behave like direct activators of TREK-1. This observation suggests that there is at least one binding site for PUFAs on TREK-1 channel. The activation of TREK-1 in both whole-cell and inside-out configuration suggests that the binding site is accessible from the inner and outer leaflet of the membrane. This double accessibility through the membrane would be allowed by the hydrophobic

properties of the aliphatic chain of PUFAs. The esterification of the carboxyl extremity and the conjugation of PUFAs (configuration Cis to Trans) prevent TREK-1 activation. These results suggest that PUFAs bind to TREK-1 with their carboxyl extremity, by forming electrostatic and/or hydrogen interactions and that the volume occupied by the aliphatic chain facilitates, or not, their accessibility to the binding site.

The study of the TREK-1 current elicited by depolarizing steps shows that TREK-1 current displays two components: an instantaneous component resulting from the alteration of the driving-force and a second time-dependent component characteristic of a voltage-dependence of the channel. The activation of TREK-1 channel by PUFAs shifts the time-dependent component into an instantaneous component and the outwardly rectification of the current-voltage relation is lost. This loss of voltage-dependent feature reflects the shift from a voltage-dependent mode to a leak mode. The G171D gain-of-function mutation of TREK-1 abolished the outwardly rectification of TREK-1 current and prevents TREK-1 activation by PUFAs. Hence, we suggest that PUFAs binding on TREK-1 allows the TREK-1 activation through a switch from the voltage-dependent mode to the leak mode where TREK-1 is fully opened for all voltages. Thus, TREK-1 channel is converted into a perfect leak channel by PUFAs.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation générale des acides gras

Figure 2 : Illustrations des nomenclatures systématique et physiologique des acides gras insaturés

Figure 3 : Illustration de la géométrie des isomères Cis et Trans de l'acide oléique

Figure 4 : Évolution de la géométrie des acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés à 18 atomes de carbones

Figure 5 : Évolution du point de fusion des acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés

Figure 6 : Travaux d'Alexander Leaf sur la régulation de l'excitabilité des cardiomyocytes par les acides gras poly-insaturés

Figure 7 : Canaux ioniques impliqués dans les effets antiarythmiques des acides gras poly-insaturés

Figure 8 : Voie métabolique des acides gras poly-insaturés Oméga-3 et Oméga-6

Figure 9 : Voie des eicosanoïdes

Figure 10 : Voie de péroxydation radicalaire et dérivés oxydés des acides gras poly-insaturés

Figure 11 : Structure des canaux potassiques

Figure 12 : Dendrogramme de la famille de canaux K2P chez l'Homme

Figure 13 : Structure-fonction des canaux K2P

Figure 14 : Voltage- et temps-dépendance du canal TREK-1

Figure 15 : Illustration des différents états « *up* » et « *down* » des canaux TREK

Figure 16 : Activation du canal TREK-1 par le ML402

Figure 17 : Sensibilité de TREK-1 aux modifications de pH

Figure 18 : Régulation de TREK-1 par les récepteurs couplés aux protéines G

Figure 19 : Mécano-sensibilité du canal TREK-1

Figure 20 : Régulation du canal TREK-1 par les phospholipides

Figure 21 : Modèle de régulation de l'ouverture du canal TREK-1 par les phospholipides de la membrane

Figure 22 : Activation des canaux TRAAK et TREK-1 par les acides gras poly-insaturés

Figure 23 : Analogie entre le circuit RC et la membrane biologique

Figure 24 : Diffusion de la matière et potentiel électrochimique d'un ion

Figure 25 : Asymétrie de la distribution des ions à l'origine de la différence de potentiel transmembranaire (Em)

Figure 26 : L'approche de Neher et Sakmann en 1976

Figure 27 : Les différentes configurations de la technique de patch-clamp

Figure 28 : Les conventions de courant et de voltage des configurations de la technique de patch-clamp

Figure 29 : Caractérisation et optimisation du système de perfusion

Figure 30 : Acide pyrènedécanoïque pour l'évaluation de la fluidification membranaire

Figure 31 : Principe de la mesure du décalage du spectre de fluorescence

Figure 32 : Représentation de la distribution des données d'un échantillon

Figure 33 : Tests non paramétriques utilisés pour la comparaison des données et l'analyse de la relation entre deux variables X et Y

Figure 34 : Principe d'organisation en rangs pour la comparaison de jeux de données par des tests non paramétriques

Figure 35 : Régression linaire simple et droite des moindres carrés

Figure 36 : Origine de l'hypothèse de l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés *via* une voie mécano-sensible

Figure 37 : Formules chimiques linéaires des acides gras testés sur le canal TREK-1

Figure 38 : Illustration du protocole de dépolarisation et des paramètres électrophysiologiques étudiés

Figure 39 : Augmentation du courant TREK-1 en réponse aux acides gras

Figure 40 : L'activation de TREK-1 ets indépendante de la longueur des acides gras insaturés

Figure 41 : Comparaison des cinétiques d'activation de TREK-1 par un activateur direct (ML402) et les acides gras poly-insaturés

Figure 42 : Demi-activation de TREK-1 activé par les acides gras poly-insaturés

Figure 43 : Cinétique de réversibilité des effets des acides gras poly-insaturés et du ML402

Figure 44 : Évaluation de la fluidité de la membrane en réponse aux acides gras poly-insaturés

Figure 45 : Effet dose-réponse des acides gras poly-insaturés sur le canal TREK-1

Figure 46 : Activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés en configuration *inside-out*

Figure 47 : Activation de TREK-1 par le ML402 en configuration *inside-out*

Figure 48 : Mesure d'affinité par décalage du spectre de fluorescence du complexe TREK-1-C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$

Figure 49 : Variabilité du degré d'activation du canal TREK-1 par les acides gras

Figure 50 : Variabilité initiale associée à la lignée stable de cellules HEK surexprimant TREK-1

Figure 51 : Inhibition du courant TREK-1 par la Norfluoxétine

Figure 52 : Hyperpolarisation du potentiel de membrane des cellules HEK hTREK-1 par le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$

Figure 53 : Hétérogénéité du courant initial et du courant maximal activé par les acides gras poly-insaturés

Figure 54 : Mode d'action du ML402

Figure 55 : Illustration des hypothèses de travail

Figure 56 : relation entre l'activité initiale de TREK-1 et la réponse aux acides gras poly-insaturés

Figure 57 : Relation linéaire négative entre l'activité initial de TREK-1 et al réponse aux acides gras poly-insaturés

Figure 58 : Illustration de la perte de rectification sortante du courant macroscopique TREK-1

Figure 59 : Perte de la rectification sortante du courant macroscopique tREK-1 et coefficient de linéarité

Figure 60 : Perte progressive de la rectification sortante avec l'augmentation du courant TREK-1

Figure 61 : Illustration des composantes instantanée et temps-dépendante du courant TREK-1

Figure 62 : Dispersion de l'activité initiale du canal TREK-1 dans des modèles de surexpression stables ou transitoire

Figure 63 : relation linéaire négative entre l'activité initiale de TREK-1 et la réponse aux acides gras poly-insaturés dans différents modèles de surexpression de TREK-1

Figure 64 : Maintien du potentiel de membrane par TREK-1 WT et G171D

Figure 65 : Activation du mutant TREK-1 G171D par le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$

Figure 66 : Perte de la rectification sortante du mutant G171D du canal TREK-1

Figure 67 : Modèle de Hodgkin et Huxley pour l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés

Figure 68 : TREK-1 n'est pas activé par la 4F$_{4t}$-NeuroProstane

Figure 69 : TREK-1 n'est pas activé par les oxylipines de l'acide linoléique

Figure 70 : La Vitamine E ne modifie pas l'activité du canal TREK-1

Figure 71 : Effet de l'acide linoléique en condition antioxydante

Figure 72 : Effet de l'acide docosahexaénoïque en condition antioxydante

Figure 73 : Effet de l'acide linoléique deutéré

Figure 74 : Effet des acides gras estérifiés sur le canal TREK-1

Figure 75 : Diagramme de prédominance acide-base des acides gras

Figure 76 : Hypothèse d'interaction de l'extrémité carboxyle des acides gras avec le canal TREK-1

Figure 77 : Comparaison des effets des acides gras à 18 atomes de carbones su rel canal TREK-1

Figure 78 : Le rôle de la position des insaturations dans l'effet des acides gras poly-insaturés sur l'activation du canal TREK-1

Figure 79 : Structures chimiques linéaires des acides gras conjugués de l'acide linoléique C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$

Figure 80 : Différences géométrique et spatiale des acides gras conjugués de l'acide linoléique

Figure 81 : Effets des acides gras conjugués de l'acide linoléique sur le canal TREK-1

Figure 82 : Différence du volume occupé par les chaînes aliphatiques poly-insaturés et saturés

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Réactifs et matériels utilisés pour la culture cellulaire

Tableau 2 : Réactifs utilisés pour les expérimentations

Tableau 3 : Statistiques descriptives de l'activation du canal TREK-1 par les acides gras

Tableau 4 : Statistiques descriptives des cinétiques d'activation de TREK-1

Tableau 5 : Statistiques descriptives des cinétiques d'activation et de réversibilité du canal TREK-1 en configuration *inside-out*

Tableau 6 : Statistiques descriptives des paramètres électrophysiologiques initiaux

Tableau 7 : paramètres de la droite de régression : $Log10(I_{max}/I_0) = f(Log10(I_0)$

Tableau 8 : Coefficient de linéarité du courant macroscopique TREK-1

INTRODUCTION GENERALE

Cette thèse s'intéresse à l'activation du canal potassique TREK-1 par les acides gras poly-insaturés.

Les acides gras poly-insaturés sont des modulateurs de l'activité de nombreuses protéines, comme les canaux ioniques. En régulant l'activité des canaux ioniques présents dans les cellules excitables, comme les neurones ou les cardiomyocytes, les acides gras poly-insaturés sont des modulateurs importants de grandes fonctions physiologiques. Dans le domaine cardiovasculaire, l'association américaine pour le cœur recommande en prévention secondaire de l'infarctus, la consommation d'au moins 1 g/jour d'acide eicosapentaénoïque (EPA) et d'acide docosahexaénoïque (DHA). Ces deux acides gras poly-insaturés de la famille des Oméga-3 que l'on retrouve dans les poissons gras, présentent des propriétés cardioprotectrices antiarythmiques. Leurs propriétés antiarythmiques passent par la modulation de l'activité des canaux ioniques impliqués dans les différentes phases du potentiel d'action, de la genèse à la repolarisation : canal sodique cardiaque (Kang et al., 1995), canal calcique de type L (Xiao et al., 1995), canal responsable du courant I_{to} (Li et al., 2011) et canal potassique responsable du courant I_{KS} (Larsson et al., 2018 ; Liin et al., 2016 ; Liin et al., 2015).

Dans la grande famille des canaux potassiques, TREK-1 (*TWIK-RElated K^+ channel type 1*) appartient à la famille de canaux K2P à deux domaines pores. Les K2P sont des canaux potassiques de fond (*background channels*) puisqu'ils sont ouverts dans toute la gamme de potentiels physiologiques. Ces canaux sont exprimés et adressés dans de nombreux tissus excitables ou non. Dans les cellules non excitables, ils participent à la régulation du volume cellulaire. Exprimé dans les cellules excitables, comme les neurones ou les cardiomyocytes, TREK-1 participe à la régulation de l'excitabilité cellulaire en favorisant l'hyperpolarisation du potentiel de membrane des cellules au voisinage du potentiel d'équilibre théorique du potassium ($\sim$ -85 mV). TREK-1 est un canal polymodulé par divers stimuli physiques et chimiques comme la pression, les modifications de pH intra- et extracellulaire, des agents pharmacologiques ou encore les acides gras poly-insaturés. Cette large possibilité de modulation fait de lui une cible intéressante dans la prise en charge pharmacologique de nombreuses pathologies impliquant les cellules excitables comme l'épilepsie, la douleur, la dépression ou encore les arythmies cardiaques. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées

au rôle de TREK-1 dans ces processus physiopathologiques et au potentiel thérapeutique de son activation par des agents pharmacologiques synthétiques ou par les acides gras poly-insaturés.

A ce jour, le mécanisme d'action des acides gras poly-insaturés leur permettant d'activer le canal TREK-1 n'a toujours pas été établi. Depuis sa découverte en 1996 (Fink et al., 1996), quelques hypothèses sur ce mécanisme d'action ont été émises dans la littérature. Parmi les hypothèses, on retrouve l'hypothèse d'une activation par les acides gras poly-insaturés impliquant une voie mécano-sensible, mais la possibilité d'une interaction directe des acides gras avec le canal n'a jamais été écartée.

La famille des canaux K2P regroupe 15 membres et est divisée en 6 sous-familles fonctionnelles. Avec le canal TREK-2 et le canal TRAAK, TREK-1 appartient à la sous-famille TREK des canaux mécano-sensibles. Si aucune étude comparative de l'effet de plusieurs acides gras (de saturés à poly-insaturés) n'a été faite sur le canal TREK-1, cette étude a été réalisée pour le canal TRAAK (Fink et al., 1998). Les travaux sur TRAAK ont montré une potentielle corrélation entre la longueur des acides gras poly-insaturés et l'amplitude d'activation de TRAAK (Fink et al., 1998). Cette corrélation entre la longueur des acides gras et l'amplitude d'activation de TRAAK pourrait supporter l'hypothèse d'une activation mécano-sensible du canal, consécutive de l'insertion des acides gras dans la membrane qui modifierait ses propriétés biophysiques de fluidité et/ou de courbure (revue de Patel et al., 2001). Cependant, l'activation des canaux TREK (TREK-1, TREK-2 et TRAAK) par les acides gras poly-insaturés en configuration de patch-excisé indique que l'activation de ces canaux peut aussi bien résulter d'une interaction directe indépendamment de la courbure induite de la membrane.

Par ailleurs, des expériences menées au sein du laboratoire ont montré qu'au moins un dérivé oxydé du DHA, la $4F_{4T}$-neuroprostane, présentait des propriétés antiarythmiques *in vivo* et *in cellulo* (Roy et al., 2015 ; Roy et al., 2017). Une partie des effets antiarythmiques de ce dérivé oxydé a été attribué à une amélioration de l'homéostasie calcique post-infarctus *via* des régulations post-traductionnelles du récepteur à la ryanodine RYR_2. Cependant, l'origine de l'hyperpolarisation du potentiel de repos des cardiomyocytes induite par la $4F_{4T}$-neuroprostane n'a pas pu être expliquée. En raison de l'expression et de l'adressage de TREK-1 à la membrane des cardiomyocytes et de sa régulation par les acides gras poly-insaturés, nous avons fait l'hypothèse que la $4F_{4T}$-neuroprostane, dérivé oxydé du DHA, pouvait exercer son effet hyperpolarisant en activant le canal TREK-1.

Au regard du manque observé dans la littérature sur le mécanisme d'action des acides gras poly-insaturés dans l'activation du canal TREK-1, nous proposons une étude approfondie de leur mécanisme d'action. Nous avons réalisé une étude comparative de l'effet de plusieurs acides gras (de saturé à poly-insaturé) sur l'activité du canal TREK-1 dans un modèle de cellule HEK. Afin de confronter les hypothèses qui opposent une activation mécano-sensible à une activation *via* une interaction directe, nous avons travaillé en configuration cellule-entière et *inside-out* et comparé les effets des acides gras à ceux d'un activateur direct de TREK-1, le ML402 (Lolicato et al., 2017). Nous avons également étudié les propriétés biophysiques de la membrane en évaluant la fluidification induite par les acides gras poly-insaturés dans ce modèle cellulaire. Par la suite, nous avons observé que l'intégrité de la tête carboxylique des acides gras poly-insaturés était indispensable à l'activation de TREK-1 et que la configuration Trans des insaturations prévenait l'activation de TREK-1. Au travers de ces études électrophysiologiques de TREK-1 et biophysiques de la membrane, nous proposons finalement que l'activation de TREK-1 résulte d'une interaction directe avec les acides gras poly-insaturés.

L'étude électrophysiologique de l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés a révélé une large variabilité de leurs effets et soulevé de nombreuses questions sur les conséquences physiopathologiques de l'activation du canal TREK-1. Aussi, TREK-1 ne répond pas à tous les critères d'un canal de fuite idéal et présente une composante de courant voltage-dépendante dans les conditions initiales de notre modèle. Nous avons observé qu'au cours de son activation par les acides gras poly-insaturés, la composante voltage-dépendante était perdue tout comme la rectification sortante du courant. Ainsi, nous proposons également une étude approfondie des modifications des paramètres biophysiques du canal TREK-1 consécutives de son activation par les acides gras poly-insaturés.

Le mécanisme d'action des acides gras poly-insaturés dans l'activation du canal TREK-1 et les conséquences biophysiques de son activation mérites à être investigués afin de mieux appréhender l'impact physiopathologique de son activation dans les cellules excitables tels que les neurones et les cardiomyocytes.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION SUR LES ACIDES GRAS

Les acides gras sont des lipides simples puisque que leur composition élémentaire contient uniquement du carbone (C), de l'hydrogène (H) et de l'oxygène (O). On les différencie des lipides complexes, les glycérophospholipides et les sphingolipides, qui contiennent en plus un azote (N), du phosphore (P), du soufre (S) ou des oses. Ils sont peu abondants sous forme libre.

A. CLASSIFICATION, STRUCTURE ET FONCTIONS DES ACIDES GRAS

Les acides gras sont des monoacides aliphatiques (hydrocarbures à chaîne ouverte) ; on les appelle également des acides carboxyliques : R-COOH. Leur chaîne carbonée est linéaire et peut être saturée ou insaturée (présence de doubles liaisons). Le nombre de carbones qui constituent la chaîne carbonée est généralement paire, comprise entre 4 carbones (acide butyrique) et 32 carbones. Il existe également des acides gras à nombre impair de carbones mais nous ne verrons pas plus de détails les concernant.

Les acides gras sont composés d'une tête polaire (-COOH) et d'une chaîne apolaire (chaîne d'hydrocarbures) (**Figure 1**).

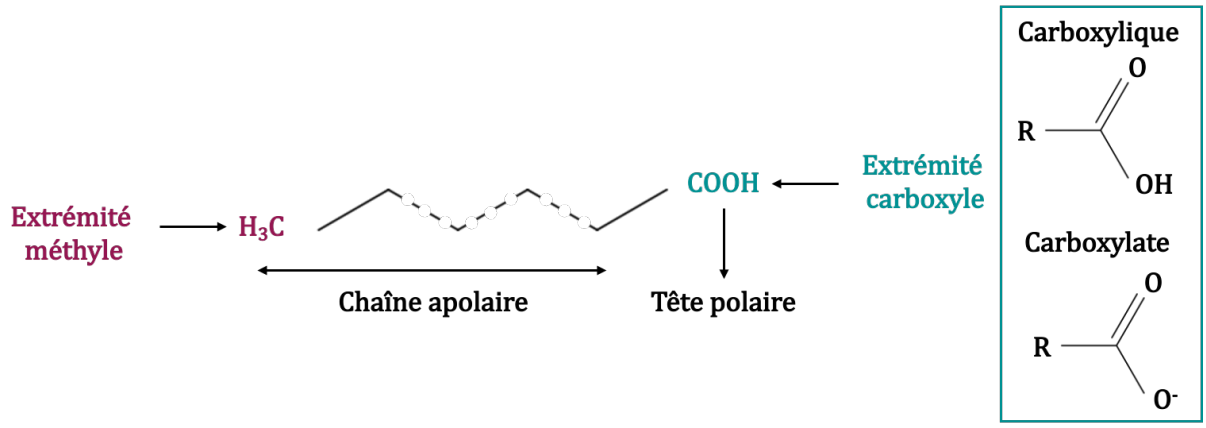

Figure 1

Représentation générale des acides gras

Les acides gras sont des chaînes d'hydrocarbures, aliphatiques, plus ou moins longues qui possèdent une extrémité méthyle et une extrémité carboxyle. La chaîne d'hydrocarbures est apolaire (non chargée), donc lipophile (ou hydrophobe) ; elle peut être saturée ou insaturée et

la tête carboxyle est polaire (à la fois donneur et accepteur de liaison hydrogène). Lorsque la tête polaire est chargée négativement, (COO^-) c'est un groupement carboxylate, très polaire et donc hydrophile.

1. LES ACIDES GRAS SATURES

La chaîne carbonée des acides gras saturés ne contient pas d'insaturation (C = C), ils sont donc saturés en hydrogènes. La formule générale brute des acides gras saturé est :

(1) $C_nH_{2n}O_2$

Avec n le nombre de chaque atome.
Par exemple, la formule brute de l'acide stéarique est : $C_{18}H_{36}O_2$.

Bien que beaucoup d'acides gras aient un nom usuel, le plus souvent indiquant son origine (*e.g.* acide palmitique que l'on trouve dans l'huile de palme), il existe une nomenclature systématique qui permet d'identifier les acides gras saturés tel que :

(2) Cn:x

Avec n le nombre d'atomes de carbones et x le nombre d'insaturations.
Par exemple, la nomenclature systématique de l'acide stéarique est C18:0, puisqu'il possède 18 atomes de carbones et qu'il est saturé. On parle d'acide stéarique si l'extrémité -COOH est protonée et de stéarate si l'extrémité $-COO^-$ est déprotonée.

Le nom systématique (ou nom IUPAC : *International Union of Pure and Applied Chemistry*) des acides gras saturés est :

(3) nC-an-oïque

Avec nC pour le nombre de carbone, « an » pour indiquer que la chaîne est saturée et « oïque » indique qu'il s'agit d'un acide carboxylique.
Par exemple, pour l'acide stéarique, on parle d'acide octadécanoïque.

2. LES ACIDES GRAS INSATURES

La chaîne carbonée des acides gras insaturés contient une ou plusieurs insaturations. On parle alors d'acides gras mono-insaturés, comme l'acide oléique, ou poly-insaturés, comme l'acide linoléique.

a. Nomenclatures

La formule générale brute des acides gras insaturés est :

(4) $C_nH_{2n-2x}O_2$

Avec n le nombre de chaque atome et n-2x pour chaque insaturation, x représentant le nombre d'insaturations.
Par exemple, la formule brute de l'acide oléique est $C_{18}H_{34}O_2$, avec deux hydrogènes en moins que l'acide stéarique du fait de son insaturation ; et la formule brute de l'acide linoléique est $C_{18}H_{32}O_2$, du fait de ses 2 insaturations.

La nomenclature systématique permet d'identifier les acides gras insaturés et la position de leur(s) doubles(s) liaison(s) en partant de l'extrémité carboxyle (-COOH), tel que :

(5) $Cn{:}x\ ^{\Delta\ p,p'\ldots}$

Avec n le nombre d'atomes de carbones, x le nombre d'insaturations et **Δ** p,p' la position des insaturations.
Par exemple, la nomenclature systématique des acides oléique et linoléique sont : $C18{:}1^{\Delta 9}$ et $C18{:}2^{\Delta 9,12}$, respectivement
Le nom systématique (ou nom IUPAC) des acides gras insaturés est :

(6) nC-m-én-oïque

Avec nC pour le nombre de carbones, m pour le nombre d'insaturations, « én » pour indiquer que la chaîne est insaturée et « oïque » indique qu'il s'agit d'un acide carboxylique.

Par exemple, pour l'acide oléique on parle d'acide octadécénoïque et pour l'acide linoléique on parle d'acide octadécadiénoïque.

Pour les acides gras insaturés, il existe une nomenclature physiologique supplémentaire permettant l'identification de la série à laquelle appartient l'acide gras : Oméga-3, Oméga-6 ou Oméga-9. Cette nomenclature débute à l'extrémité méthyle (-CH_3) et le carbone qui porte la première insaturation donne la famille Oméga (ω) de l'acide gras. Cette nomenclature se note :

(7) Cn:x ω_i

Avec n le nombre d'atomes de carbones, x le nombre d'insaturations et ω_i la série à laquelle appartient l'acide gras insaturé en fonction de la position de la première insaturation (**Figure 2**).

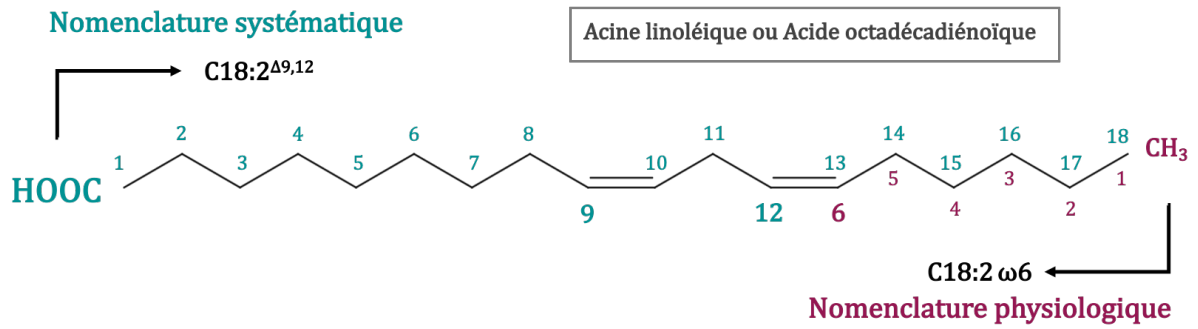

Figure 2

Illustration des nomenclatures systématique et physiologique des acides gras insaturés

Exemple de l'acide linoléique (nom usuel). Son nom systématique, sa nomenclature systématique et sa nomenclature physiologique sont indiquées.

b. Les propriétés liées aux acides gras insaturés

b1. Isomérie des acides gras insaturés

La présence de doubles liaisons va rendre possible des processus d'isoméries, c'est-à-dire que certaines doubles liaisons pourront être en en position Cis ou Trans. Les préfixes Cis et Trans renseignent sur la géométrique de l'acide gras insaturé au niveau d'une double liaison (**Figure**

3). La configuration géométrique Cis d'un acide gras insaturé signifie que les carbones (groupes prioritaires) en aval et en amont de la double liaison se trouvent du même côté du plan formé par la double liaison ; en latin, le mot « cis » signifie « du même côté ». La configuration géométrique Trans signifie que les carbones en aval et en amont de la double liaison se trouvent de part et d'autre du plan de la double liaison ; en latin, le mot « trans » signifie « au-delà » ou « au-travers ».

En chimie organique, la nomenclature cis/trans se différencie de la nomenclature Cahn-Ingold-Prelog puisqu'elle se fonde sur l'encombrement stérique des groupes prioritaires. La convention de Cahn-Ingold-Prelog quant-à-elle se fonde sur l'ordre des priorités du numéro atomique, où l'atome de numéro atomique supérieur est prioritaire (C > H : 6 > 1). Malgré tout, en considérant le cas des acides gras insaturés, les insaturations Cis seront toujours Z et les Trans seront E. En allemand, Z pour « *Zusammen* » qui signifie « ensemble » et E pour « *Entgegen* » qui signifie « contrairement à ».

La forme naturelle des acides gras insaturés est la forme Cis, tandis que la forme Trans est plutôt rare et généralement associée à des effets néfastes, responsables d'une augmentation du LDL cholestérol et d'une diminution du HDL cholestérol, augmentant ainsi le risque cardiovasculaire.

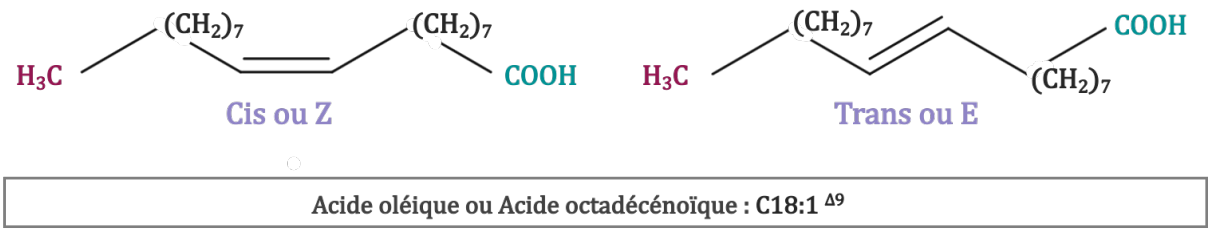

Figure 3

Illustration de la géométrie des isomères Cis et Trans de l'acide oléique

Pour les acides gras insaturés, la nomenclature Cis/Trans, correspond à la nomenclature Z/E.

b2. Température de fusion et fluidité des acides gras

Les acides gras insaturés Cis et Trans ont une géométrie différente dans l'espace. Les acides gras insaturés Cis vont être courbés, autant de fois qu'il y a d'insaturations, tandis que les acides gras Trans vont se comporter comme les acides gras saturés en étant plutôt linéaires (**Figure 4**). La configuration spatiale des acides gras est associée à des propriétés de rigidité/fluidité telles que les acides gras insaturés Cis sont plus fluides que les acides gras Trans et les acides gras saturés. Ainsi, les acides gras Trans et saturés auront tendance à rigidifier les membranes biologiques en s'insérant dans le feuillet de phospholipides tandis que les acides gras insaturés en configuration Cis fluidifient la membrane.

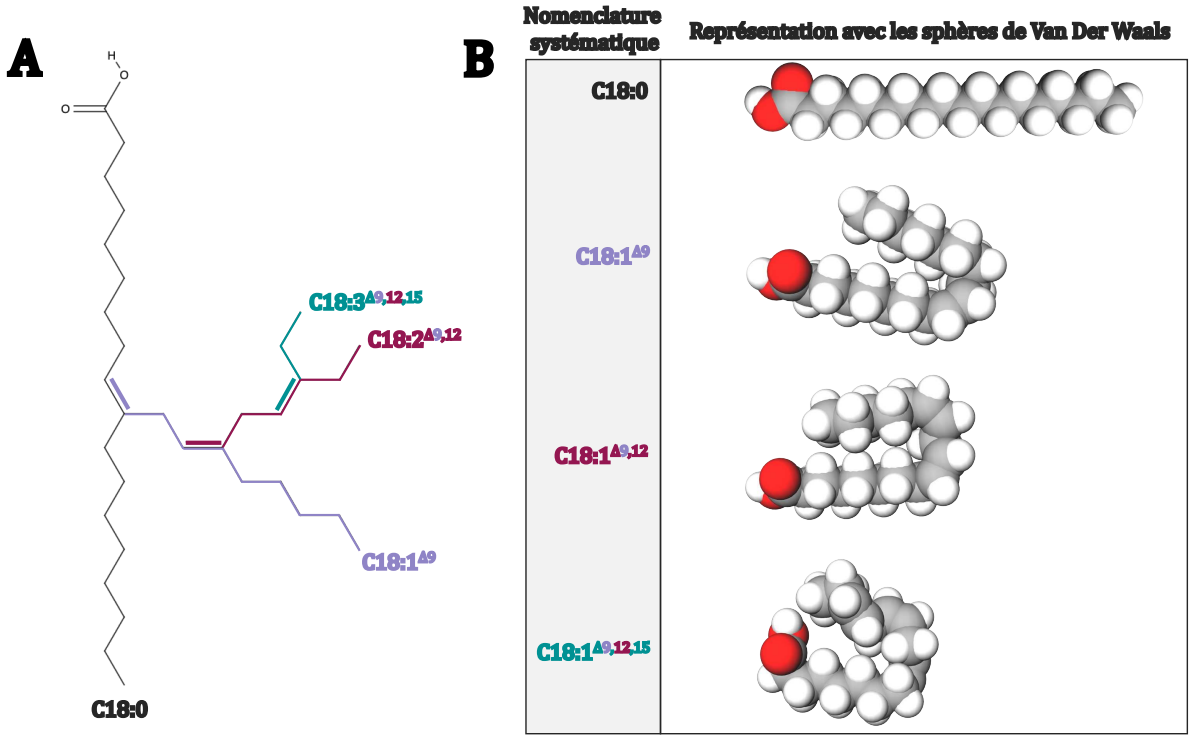

Figure 4

Évolution de la géométrie des acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés à 18 atomes de carbones

A. *Comparaison 2D des acides gras à 18 atomes de carbones selon le degré d'insaturation. La nomenclature systématique des acides gras est indiquée sur la figure. Toutes les insaturations sont en configuration Cis.* ***B.*** *Représentation en sphères de Van der Waals des acides gras, illustrant l'évolution de la configuration spatiale en fonction du degré d'insaturation (logiciel MolView).*

Ces notions de fluidité ou de rigidité s'expliquent par le point de fusion des acides gras. Le point de fusion d'un corps, ou température de fusion, correspond à la température pour laquelle un corps passe d'un état solide à un état liquide. Autrement dit, au-dessus du point de fusion (en °C), les acides gras sont sous forme liquide (fluide) et en-dessous de ce point de fusion ils sont sous forme solide (rigide). Le point de fusion dépend alors de la structure de l'acide gras et de sa configuration spatiale : il augmente avec la masse moléculaire, soit le nombre de carbones, et diminue avec le nombre d'insaturations (Knothe and Dunn., 2009). Ainsi, le point de fusion des acides gras insaturés est plus faible que celui des acides gras saturés, c'est-à-dire que pour une même longueur de chaîne carbonée, l'acide gras insaturé sera liquide pour une température plus basse que l'acide gras saturé (**Figure 5**). A température ambiante, on retrouve donc majoritairement les acides gras saturés dans un état solide alors que les acides gras poly-insaturés sont dans un état liquide.

L'explication de cette évolution du point de fusion est très simple et se rapporte à la géométrie des molécules (et quelques notions de thermodynamique). La géométrie linéaire des acides gras saturés leur permet de « s'imbriquer » les uns dans les autres, en favorisant les interactions intermoléculaires (liaisons de Van Der Waals). Alors, il faudra plus d'énergie pour défaire ses interactions, d'où un point de fusion élevée.

(8) $\Delta S = \frac{\Delta H}{T}$

Avec ΔS la variation d'entropie de changement d'état (J/K) qui traduit le désordre, soit le passage d'un état solide organisé à un état liquide désorganisé, ΔH la variation d'enthalpie de changement d'état (J), c'est-à-dire l'énergie échangée et T la température de fusion absolue (K).

Du côté des acides gras insaturés Cis, la configuration spatiale imposée par les coudes des insaturations Cis diminue la possibilité d'interactions intermoléculaires (liaisons de Van Der Waals), expliquant la diminution de l'énergie nécessaire pour passer de l'état solide à l'état liquide. Aussi, pour une même longueur de chaine carbonée, le point de fusion diminue avec le nombre d'insaturations (**Figure 5**).

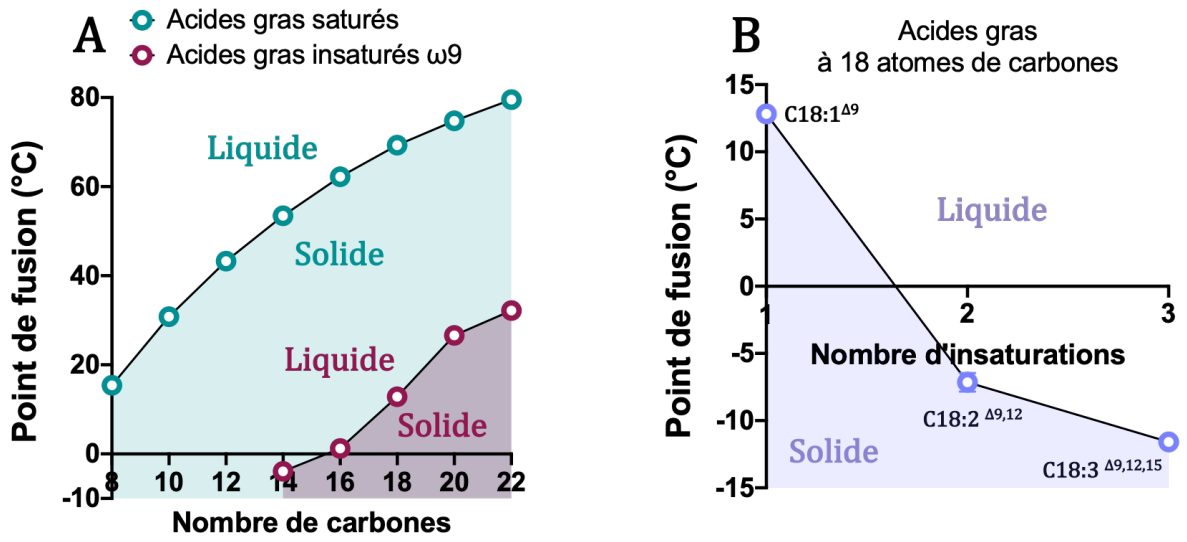

Figure 5

Évolution du point de fusion des acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés

A. *Les acides gras saturés sont compris entre 8 et 22 atomes de carbones et les acides gras mono-insaturés de la série Oméga-9 sont : cis-14:* $^{\Delta 9}$*, cis-16:1* $^{\Delta 9}$*, cis-18:1*$^{\Delta 9}$*, cis-20:1*$^{\Delta 5}$*, cis-22:1*$^{\Delta 13}$*.* ***B.*** *Les 3 acides gras ont 18 atomes de carbones et sont mono- et poly-insaturés. Leur nomenclature systématique est indiquée sur la figure.* La figure a été faite à partir des données issues de Knhote et Dunn., 2009.

3. LES ACIDES GRAS DANS LA COMPOSITION ET LA DYNAMIQUE DE LA MEMBRANE BIOLOGIQUE

Le terme grec « *cytologie* » constitué de *cyto-* (cellule) et *-logie* (étude) correspond à l'étude de la cellule. Aujourd'hui, on entend le terme d'« examen cytologique » pour la détection des cancers du col de l'utérus par exemple, où la morphologie des cellules épithéliales de l'utérus est modifiée, permettant alors le diagnostic. Mais le terme *cytologie* est cependant bien souvent remplacé par « biologie cellulaire » dans les universités. Ainsi, une partie de la biologie cellulaire ou cytologie s'intéresse au fonctionnement de la cellule ainsi qu'à sa morphologie. Et si l'on peut parler de morphologie cellulaire, c'est parce que la cellule est délimitée par une

membrane plasmique, dont la composition biochimique est très importante pour garantir son intégrité morphologique et fonctionnelle.

a. Composition de la membrane plasmique

La membrane plasmique sépare l'intérieur de la cellule de l'environnement extracellulaire mais ne l'isole pas ! Elle établit une barrière avec une perméabilité sélective et sert de matrice pour des protéines transmembranaires. La membrane plasmique est donc définie comme une mosaïque fluide non homogène, constituée de macromolécules lipidiques, protéiques et glycoprotéiques. Ainsi, deux feuillets de glycérophospholipides forment la structure bidimensionnelle principale de la membrane (Gorter and Grandel., 1925) dans laquelle sont insérées des protéines (Singer and Nicolson., 1972), comme les canaux ioniques.

Bien qu'elle soit encombrée par de nombreuses protéines, la composition biochimique de la membrane est principalement d'origine lipidique avec plusieurs types de lipides qui se distinguent par leur polarité, leur longueur et leur degré d'insaturation. Il est vrai que cette composition biochimique varie d'un type cellulaire à l'autre mais de manière générale, les glycérophospholipides représentent entre 50 % et 60 % des lipides de la membrane, le cholestérol représente environ 25 % (absent dans les cellules végétales et bactéries), les glycolipides 18 % et on retrouve seulement 2 % d'acides gras libre (Goñi., 2014 ; Spector an Yorek., 1985 ; Bretscher., 1972). Les phospholipides qui composent la membrane sont répartis de manière asymétrique entre les feuillets externe et interne : les phosphatidylcholine et sphingomyéline majoritairement sur le feuillet externe et les phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine majoritairement sur le feuillet interne. La phosphatidylsérine située uniquement sur le feuillet interne de la membrane, possède une charge négative et concourt à la différence de potentiel membranaire (Bevers et Williamson., 2010).

b. Dynamique au sein de la membrane plasmique

La membrane est un matériel fluide dans lequel des protéines et des lipides se déplacent. La fluidité de la membrane est probablement l'une de ses caractéristiques la plus importante. Les cellules sont capables de moduler le degré de saturation des lipides de la membrane pour

s'adapter à leur environnement. La fluidité de la membrane dépend de plusieurs facteurs dont la température, la composition du milieu aqueux, la quantité de cholestérol et le degré d'insaturation des phospholipides. Si la fluidité augmente avec le degré d'insaturation des phospholipides et la température, elle diminue avec les acides gras saturés et la quantité de cholestérol qui s'insère entre les chaînes carbonées des phospholipides et les immobilise.

La notion de fluidité membranaire est associée à la capacité des phospholipides à se déplacer latéralement au sein de la membrane. Les phospholipides de la membrane sont mobiles et peuvent passer d'un feuillet à l'autre, via un mécanisme de « flip-flop » plutôt rare et coûteux en énergie (Van Meer et al., 2008). Ils peuvent effectuer une rotation sur eux-mêmes (Heyn., 1979) ou alors se déplacer selon une diffusion latérale dans le feuillet auquel ils appartiennent ; ils changent ainsi de position dans un ordre de grandeur de 10^7 fois par seconde à une vitesse de 2 µm/s (Lipowsky and Sackmann., 1995).

4. LES ACIDES GRAS POLY-INSATURES DANS LA REGULATION DES CELLULES EXCITABLES

Quand on pense aux acides gras, on pense à l'énergie qu'ils nous fournissent, et quand on pense plus précisément aux acides gras poly-insaturés à longues chaînes, on pense à eux dans la composition de nos membranes cellulaires une fois insérés dans les phospholipides. Après le tissu adipeux blanc, le cerveau est l'organe qui concentre le plus de lipides en contenant environ 50% à 60% de son poids sec en lipides ; et les organes qui concentrent le plus de DHA (acide docosahexaénoïque, Oméga-3) sont le cerveau, la rétine et les testicules (Lauritzen et al., 2001). Le DHA et l'acide arachidonique sont les acides gras poly-insaturés à longues chaînes les plus importants dans le développement cérébral. L'apport de DHA est un facteur critique durant le développement embryonnaire et une carence en DHA pendant cette période est associée avec de nombreuses pathologies (Lauritzen et al., 2001).

Nous pouvons citer de nombreux autres effets des acides gras poly-insaturés : les oméga-3 (DHA et EPA) sont antiathérogènes, ils réduisent la quantité de triglycérides dans le sang et favorise la lipoprotéine HDL (*High Density Lipoprotein*) (Calder et al., 2018). Dans le cancer, enrichir les membranes en EPA et DHA est un mécanisme anti-cancéreux puisque le DHA a des propriétés pro-apoptotique, anti-inflammatoire et antiprolifération (Merendino et al., 2013).

Bien que les effets bénéfiques des acides gras poly-insaturés soient pléiotropes, nous allons nous concentrer sur leurs effets dans la régulation des cellules excitables comme les cardiomyocytes.

a. La régulation de l'excitabilité cardiaque

De nombreuses études épidémiologiques et fondamentales apportent l'évidence d'une association bénéfique entre la consommation d'acide gras Oméga-3 et une réduction de la mortalité cardiovasculaire (pour revue, Clifton et al., 2017). L'association Américaine pour le cœur recommande la consommation de 1000 mg/jour de DHA+EPA en prévention secondaire des accidents coronariens. En 2020, l'étude contrôlée randomisée REDUCE-IT montre une réduction de la mortalité cardiovasculaire chez les patients avec des taux élevés de triglycérides avec un apport sous forme de complément 4 g d'EPA en plus des statines (Bhatt et al., 2020).
Si certains effets bénéfiques de ces Oméga-3 doivent être imputés à leurs effets sur le métabolisme lipidique (triglycérides, lipoprotéines), les Oméga-3 présentent aussi des propriétés antiarythmiques. En modulant l'activité de canaux ioniques cardiaques, les Oméga-3 préviennent les arythmies consécutives de l'infarctus et protègent de la mort subite cardiaque (Roy et al., 2015 ; Billman et al., 1994 ; McLennan et al., 1993 ; McLennan et al., 1988).
Les travaux majeurs dans la démonstration de ces propriétés antiarythmique sont les travaux d'Alexander Leaf entre 1994 et 1998. L'EPA et le DHA (5 µM) réduisent la fréquence de contraction des cardiomyocytes de 50% en 2 min de perfusion (Kang et Leaf., 1994). Cette réduction de la fréquence de contraction des cardiomyocytes s'explique par la stabilisation de l'excitabilité des cardiomyocytes *via* une augmentation du seuil de déclenchement du potentiel d'action et une hyperpolarisation du potentiel de repos (Kang et al., 1995) (**Figure 6**). L'EPA inhibe le canal sodique cardiaque voltage-dépendant qui porte le courant I_{Na} avec une IC_{50} de 4,8 µM (Kang et al., 1995). Ce canal est impliqué dans la phase de dépolarisation rapide du potentiel d'action et son inhibition par l'EPA explique l'augmentation du seuil de déclenchement du potentiel d'action (Xiao et al., 1998 ; Kang et al., 1995) (**Figure 6**). Les antiarythmiques de classe I comme la flécaïnide inhibent le courant sodique I_{Na} et sont utilisés dans le traitement des troubles du rythme ventriculaire et la fibrillation atriale. L'EPA exerce aussi un effet inhibiteur sur le canal calcique voltage-dépendant qui porte le courant I_{CaL} avec une IC_{50} de 0,8 µM (Kang et Leaf., 1997) (**Figure 6**).

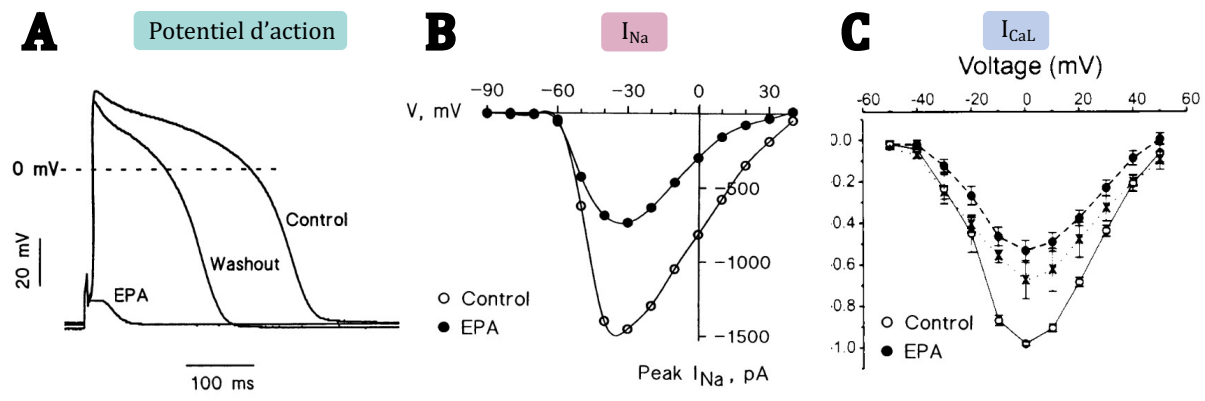

Figure 6

Travaux d'Alexander Leaf sur la régulation de l'excitabilité des cardiomyocytes par les acides gras poly-insaturés

A. *L'injection d'un courant dépolarisant (30 pA/15 ms à 0,05 Hz) ne permet pas d'initier un potentiel d'action en présence de 10 µM d'EPA.* ***B.*** *Relations courant-voltage du canal sodique cardiaque (courant I_{Na}) en condition contrôle et en présence de 5 µM d'EPA.* ***C.*** *Relation courant-voltage du canal calcique cardiaque (courant I_{CaL}) en condition contrôle et en présence de 1,5 µM d'EPA*. Figure adaptée de : (A) Kang et al., 1995, (B) Kang et al., 1995 et (C) Xiao et al., 1997.

Ainsi, les acides gras poly-insaturés à longue chaîne comme l'EPA et le DHA exercent leurs propriétés antiarythmiques en modulant l'activité des canaux ioniques impliqués dans la genèse et dans le plateau du potentiel d'action (**Figure 7**). D'autres canaux ioniques sont modulés par l'EPA et le DHA : en présence de ces deux acides gras poly-insaturés, la durée du potentiel d'action augmente et le courant I_{to} est diminué (Li et al., 2011). Le canal sodique voltage-dépendant $K_v7.1$ qui porte le courant I_{KS} impliqué dans la repolarisation du potentiel d'action est également activé par les acides gras poly-insaturés (Larsson et al., 2018 ; Liin et al., 2016 ; Liin et al., 2015) (**Figure 7**). Le canal $K_v7.1$ (KCNQ1) est aussi nommé KVLQT1 en raison de son association avec le syndrome du QT long (LQT1). Les mutations de ce canal associées à une réduction du courant I_{KS} sont responsables d'anomalies de la repolarisation (Kekenes-Huskey et al., 2022). Les molécules permettant d'activer le canal $K_v7.1$, comme les acides gras poly-insaturés pourraient être utilisées dans le traitement du syndrome du QT long.

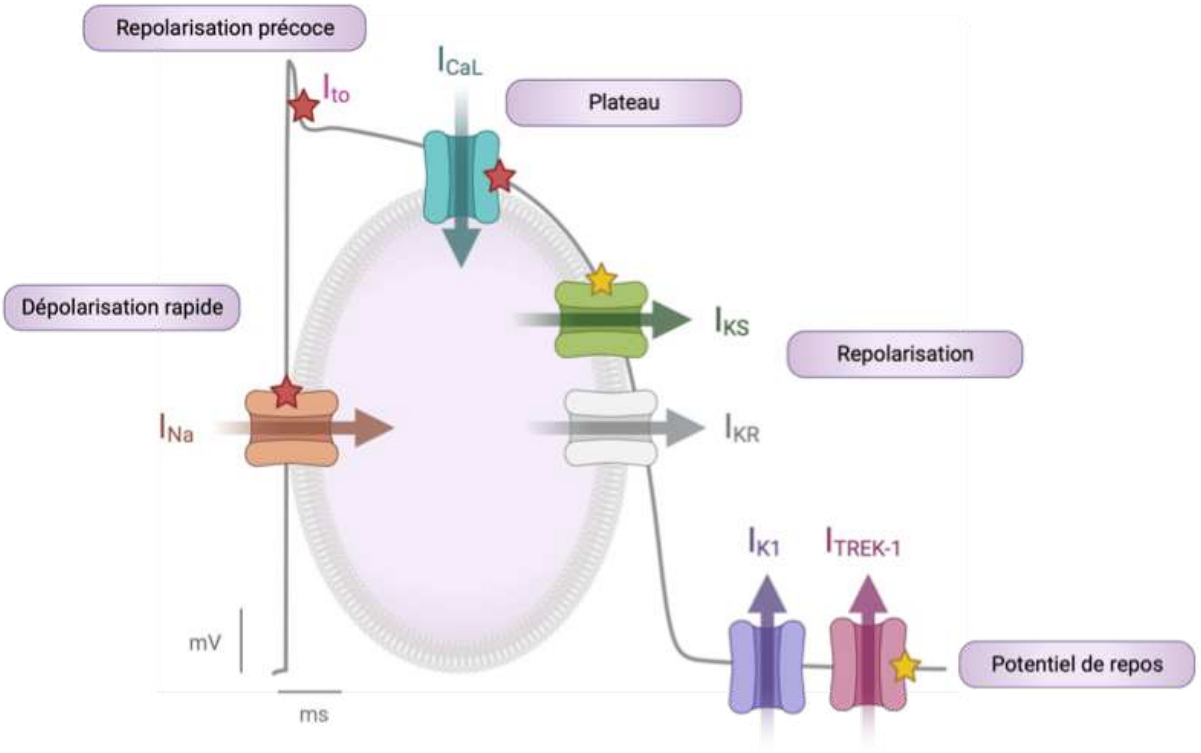

Figure 7

Canaux ioniques impliqués dans les effets antiarythmiques des acides gras poly-insaturés

Potentiel d'action ventriculaire illustrant les canaux ioniques impliqués dans les différentes phases du potentiel d'action (dépolarisation rapide, repolarisation précoce, repolarisation du potentiel d'action) et dans le potentiel de repos des cellules. Les canaux ioniques identifiés avec une étoile rouge sont les canaux dont l'activité est inhibée par les acides gras poly-insaturés (DHA et EPA) et les canaux identifiés avec une étoile jaune sont les canaux dont l'activité est augmentée par les acides gras poly-insaturés.

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la régulation du canal potassique TREK-1 par les acides gras poly-insaturés. Ce canal est exprimé à la surface des cardiomyocytes et des neurones. TREK-1 est décrit comme un canal potassique de fond puisqu'il est ouvert dans toute la gamme de potentiel et participe à l'établissement du potentiel de repos des cellules vers le potentiel d'équilibre du potassium (≈-85 mV) (**Figure 7**).

b. Neuroprotection par les acides gras poly-insaturés

Les acides gras poly-insaturés modulent l'activité des canaux ioniques du tissu cardiaque. De nombreux canaux ioniques cardiaques ont leurs homologues cérébraux, suggérant que ces canaux peuvent également être modulés par les acides gras poly-insaturés. Effectivement, les courants calcique et sodique voltage-dépendants des neurones hippocampique CA1 sont modulés par le DHA et l'EPA avec un décalage de la voltage-dépendance vers les potentiels dépolarisés et une inhibition du courant (Vreugdenhil et al., 1996). De tels effets suggèrent un potentiel anticonvulsivant de ces acides gras poly-insaturés (Leaf et al., 1999 ; Voskuyl et al., 1998). L'acide α -linolénique (ALA) et l'acide arachidonique (AA) ont des effets neuroprotecteurs dans des modèles *in vivo* d'épilepsie et d'ischémie cérébrale (Lauritzen et al., 2000).

Le canal potassique TREK-1 est également exprimé dans les neurones et plusieurs études lui prêtent des effets de neuroprotection (Heurteaux et al., 2004). L'activation de ce canal potassique par les acides gras poly-insaturés fait de lui un bon candidat pour expliquer la jugulation de l'hyperexcitabilité neuronale par les acides gras. Nous verrons dans la partie dédiée aux « **Fonctions physiopathologiques de TREK-1** » son implication dans les physiopathologies de l'épilepsie et de la dépression.

B. METABOLISME DES ACIDES GRAS POLY-INSATURES OMEGA-3 ET OMEGA-6

Dans cette partie nous allons nous intéresser aux acides gras poly-insaturés de type Oméga-3 et Oméga-6, de leur voie de synthèse à leurs rôles physiologiques chez l'Homme. Nous nous intéresserons aussi aux dérivés oxydés non enzymatique de ces acides gras et à leurs rôles physiopathologiques. Au cours de ma thèse sur l'« Activation du canal potassique TREK-1 par les acides gras poly-insaturés », nous partions des hypothèses que la caractérisation de l'activation de TREK-1 était déjà bien établie et que au moins un des dérivés oxydés du DHA était un activateur de TREK-1.

5. METABOLISME DES ACIDES GRAS POLY-INSATURES

Nous avons déjà vu plus haut que les acides gras poly-insaturés étaient divisés en deux grandes familles physiologiques : les Oméga-3 et les Oméga-6, dictées par la position de la première insaturation en partant de l'extrémité méthyle.

a. Voie de synthèse des acides gras poly-insaturés

Contrairement aux acides gras saturés et mono-insaturés, les acides gras poly-insaturés Oméga-3 et Oméga-6 ne sont pas synthétisés *de novo* par notre organisme. S'il y a bien une synthèse *de novo* d'acide gras saturés et mono-insaturés dans l'organisme, où l'acide gras est synthétisé de l'extrémité méthyle vers l'extrémité carboxylique (élongation de la chaîne carbonée), notre organisme ne possède pas les enzymes nécessaires pour désaturer les acides gras au-delà du 9ème carbone. Il est donc essentiel d'apporter les acides gras Oméga-3 et Oméga-6 par l'alimentation.

Où trouve-t-on les acides gras Oméga-3 et Oméga-6 ? Les graines et céréales (lin, tournesol, colza, maïs, palme…), les fruits oléagineux (noix, noisettes, amandes…) sont riches en Oméga-6, comme l'acide linoléique (LA, C18:2$^{\Delta 9,12}$) ou l'acide arachidonique (C20:4$^{\Delta 5,8,11,14}$). Les algues, les végétaux et les herbes fourragères sont riches en acide α-linolénique (ALA, C18:3$^{\Delta 9,12,15}$), le précurseur des autres Oméga-3. La viande de poisson ou la viande bovine par exemple, sont également des sources d'acide gras poly-insaturés. Les acides docosahexaénoïque (DHA) et eicosapentaénoïque (EPA), des Oméga-3, sont communément appelés « *fish oils* » puisqu'on les retrouve abondamment dans les chairs des poissons gras (saumon, thon, sardine, maquereau). En fait, en consommant les acides gras poly-insaturés présents dans les végétaux (algues et herbes) ou les céréales, les tissus des poissons ou des bovins s'enrichissent en acides gras Oméga-3 et Oméga-6 (Ponnampalam et al., 2018) ; ensuite nous consommons ces viandes animales, c'est pourquoi il est important de connaître les conditions d'élevage et d'alimentation des animaux que nous consommons.

L'acide linoléique (LA) et l'acide α-linolénique (ALA) sont des acides gras poly-insaturés à 18 atomes de carbones (C18:2$^{\Delta 9,12}$ et C18:3$^{\Delta 9,12,15}$) ; ils sont les précurseurs respectifs des Oméga-6 et Oméga-3 à longues chaînes (**Figure 8**). Si seuls les végétaux possèdent les enzymes nécessaires à la synthèse *de novo* des acides gras poly-insaturés à longues chaînes, notre

organisme est capable d'interconvertir ces acides gras à partir de leurs précurseurs issus de l'alimentation (LA et ALA). La première enzyme impliquée dans le processus de conversion des Oméga-3 et des Oméga-6 est la Δ6-désaturase (Sprecher et al., 2000 ; Liou et al., 2007) (**Figure 8**). La conversion de l'ALA en EPA et DHA reste toutefois faible : 8 % et 0,1 % respectivement (Plourde et Cunnane., 2007 ; Burdge et al., 2006 ; Burdge et al., 2003). La conversion de l'acide stéaridonique (C18:$4^{\Delta 6,9,12,15}$) en EPA est plus élevée, entre 17% et 30%, en court-circuitant la réaction limitante catalysée par la Δ6-désaturase (Whelan et al., 2009 ; James et al., 2003). Les revues de Palmquist., 2009 et Vrinten et al., 2007 donnent davantage de détails sur le métabolisme des acides gras poly-insaturés.

Les Oméga-3 et Oméga-6 forment deux familles distinctes d'acides gras poly-insaturés, avec des rôles physiologiques bien distincts, mais leurs voies de conversions sont étroitement imbriquées dû à l'utilisation d'enzymes communes pour la conversion des acides gras poly-insaturés à longues chaînes (**Figure 8**). Ainsi, le ratio Oméga-6:Oméga-3 est très important en physiopathologie ; une présence excessive de LA, au-delà des besoins physiologiques, est un facteur limitant de la conversion des Oméga-3 et donc de la conversion en EPA et DHA. Un ratio de 10:1 est observé dans les pays industrialisés alors qu'un ratio optimal serait de 4:1 ou moins (Simopoulos., 2001). Nous avons vue dans la partie « **Les acides gras poly-insaturés dans la régulation des cellules excitables** », les rôles physiopathologiques de ces acides gras poly-insaturés et la conséquence de la dérégulation de leur métabolisme.

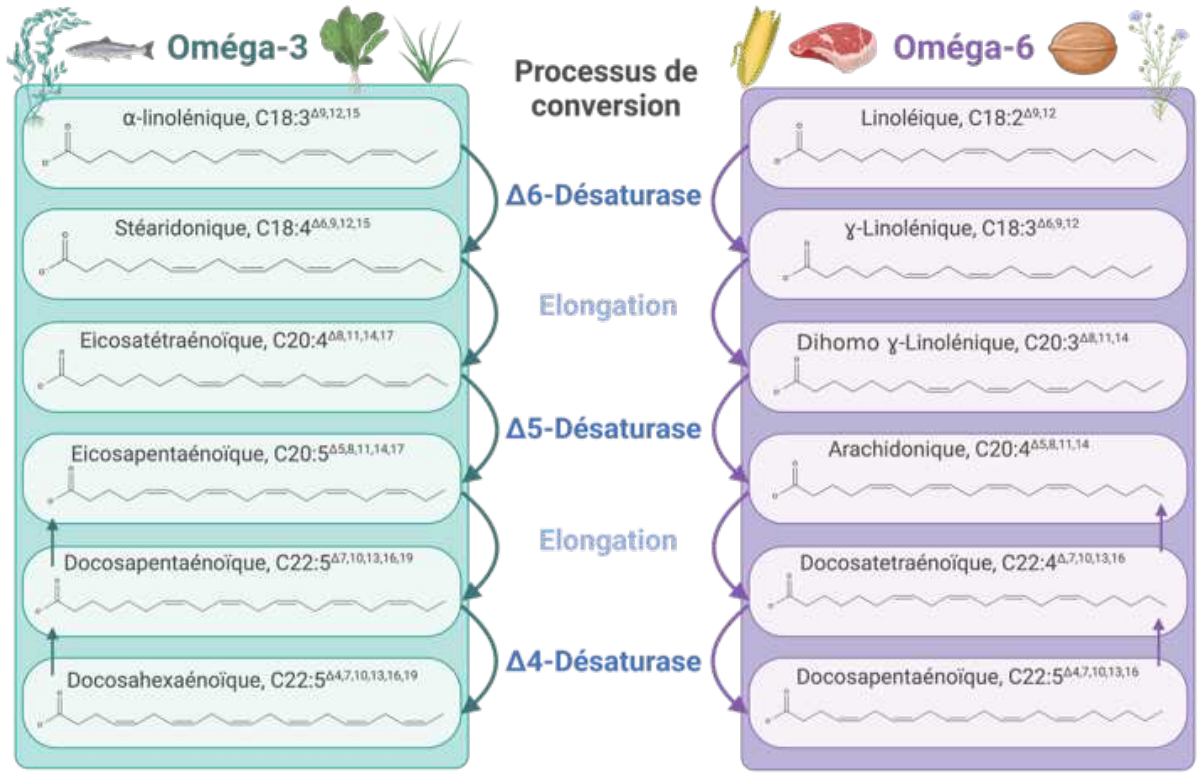

Figure 8

Voie métabolique des acides gras poly-insaturés Oméga-3 et Oméga-6

Les acides gras Oméga-3 et Oméga-6 sont convertis en acides gras poly-insaturés à partir de leurs précurseurs : l'acide α-linolénique pour les Oméga-3 et l'acide linoléique pour les Oméga-6. Cette voie métabolique de conversion des acides gras poly-insaturés met en jeu des enzymes comme les Δ-désaturases et des processus d'élongation. La réaction catalysée par la Δ6-désaturase est la réaction limitante de ce processus de conversion. L'acide α-linolénique et l'acide linoléique entre en compétition et une dérégulation de la balance Oméga-6:Oméga-3, souvent au bénéfice des Oméga-6, altère l'équilibre de la voie de conversion. Cette illustration est simplifiée et non exhaustive ; voir les revues Ponnampalam et at., 2018 et Palmquist., 2009 pour plus de détails.

b. Oxydation des acides gras poly-insaturés

Nous avons tous en tête que nous avons besoin de consommer ces acides gras puisqu'ils sont les constituants de nos membranes ou qu'ils participent à la couverture énergétique de notre organisme *via* la β-oxydation (voie catabolique des acides gras). Cependant, ils présentent

d'autres qualités et il existe d'autres voies d'oxydation des acides gras poly-insaturés qui n'aboutissent pas sur une production d'énergie, mais plutôt sur une production de multiples métaboliques oxydés ayant des effets biologiques, régulateurs des fonctions de notre organisme. Ainsi, il existe une voie d'oxydation enzymatique produisant un panel bien défini de métabolites oxydés spécifiques et une voie d'oxydation non enzymatique en réponse à des modifications de la balance oxydative. Cette oxydation non enzymatique produit un très large panel de métabolites oxydés dont le profil dépend des conditions oxydantes cellulaires.

b1. Oxydation enzymatique

Les eicosanoïdes sont les dérivés enzymatiques des acides gras, bien connus pour leurs rôles dans la régulation de la réponse inflammatoire. Ils sont synthétisés à partir de précurseurs poly-insaturés à 20 atomes de carbones : l'acide dihomo-γ-linolénique (ω-6), l'acide arachidonique (ω-6), et l'acide eicosapentaénoïque (ω-3) (**Figure 8**). La **Figure 9** illustre les voies d'oxydations enzymatiques et les molécules alors synthétisées à partir de l'acide arachidonique. Ces molécules sont impliquées dans la mise en place des processus inflammatoires, dans la régulation de la vasomotricité pendant l'inflammation ou encore dans les réactions allergiques. Le acides gras Oméga-3 comme le DHA et l'EPA peuvent également donner des résolvines D et résolvines E, respectivement, des protectines et des marésines. Ces molécules sont plutôt impliquées dans la jugulation des processus inflammatoires.

b2. Oxydation non enzymatique

Une péroxydation des acides gras poly-insaturés libres peut être initiée par des radicaux libres comme l'anion superoxyde (O_2) ou des espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce processus radicalaire non enzymatique aboutie à la formation de dérivés oxydés appelés Phytoprostanes pour l'ALA, Isoprostanes (IsoPs) pour l'AA et l'EPA et Neuropsrostane (NeuroPs) pour le DHA (Roberts et al., 1998 ; Durand et al., 2009 ; Durand et al., 2011) (**Figure 10**). La **Figure 10** illustre le processus d'oxydation non enzymatique du DHA et la production de neuroprostanes de la famille F de manière simplifiée. Il existe d'autres familles de neuroprostanes (A, D, E et J) en fonction des radicaux initiateurs et de la structure

du cyclopentane (**Figure 10**). Le processus de péroxydation détaillé est donné dans la revue Durand et al., 2009. Pour le DHA, il existe 128 isomères de neuroprostanes regroupés en 8 séries : 4F, 7F, 10F, 11F, 13F, 14F, 17F et 20F. La nomenclature permet de désigner ces molécules oxydées selon la structure de l'anneau cyclopentane et les différentes séries sont identifiées par le numéro de carbone portant l'hydroxyle (OH) de la chaîne latérale, en partant de l'extrémité carboxylique (Taber et al., 1997) (**Figure 10**).

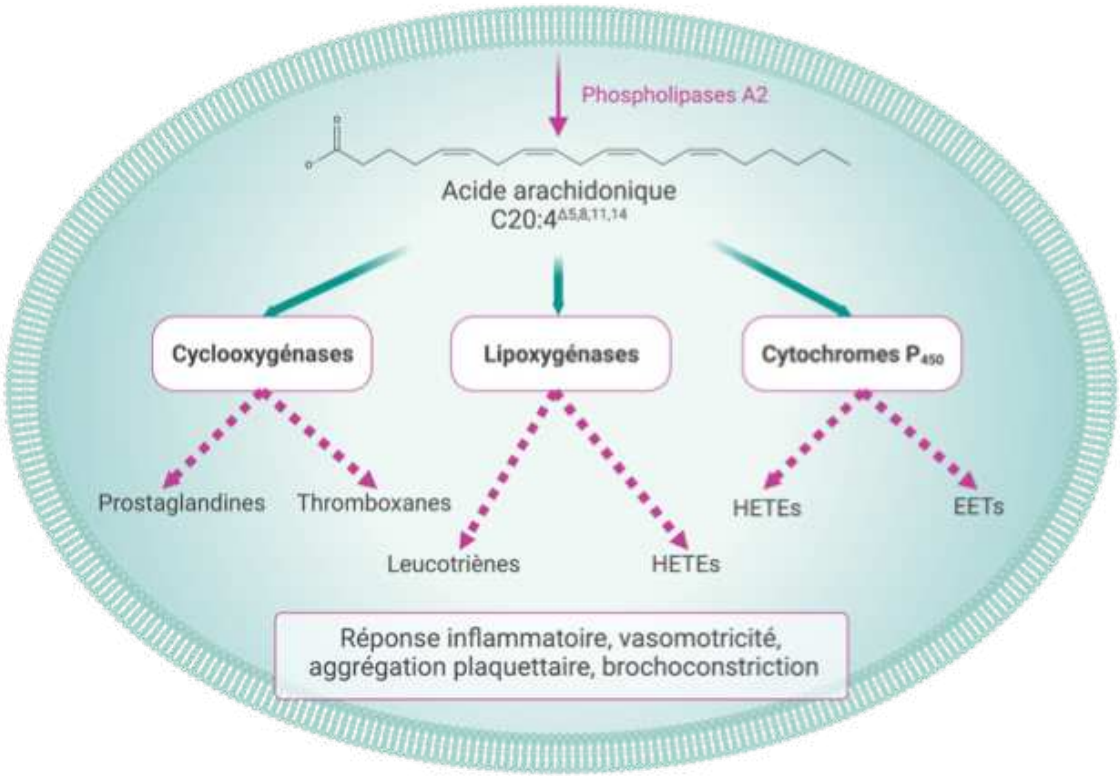

Figure 9

Voie des eicosanoïdes

L'acide arachidonique est libéré des phospholipides de la membrane par les phospholipases A2. Une fois libre, il peut être impliqué dans trois voies d'oxydation enzymatique : la voie des cyclooxygénases, la voie des lipoxygénases et la voie des cytochromes P_{450}. HETEs : hydroxyeicosatetrénoïques. EETs : epoxyeicosatriénoïques.

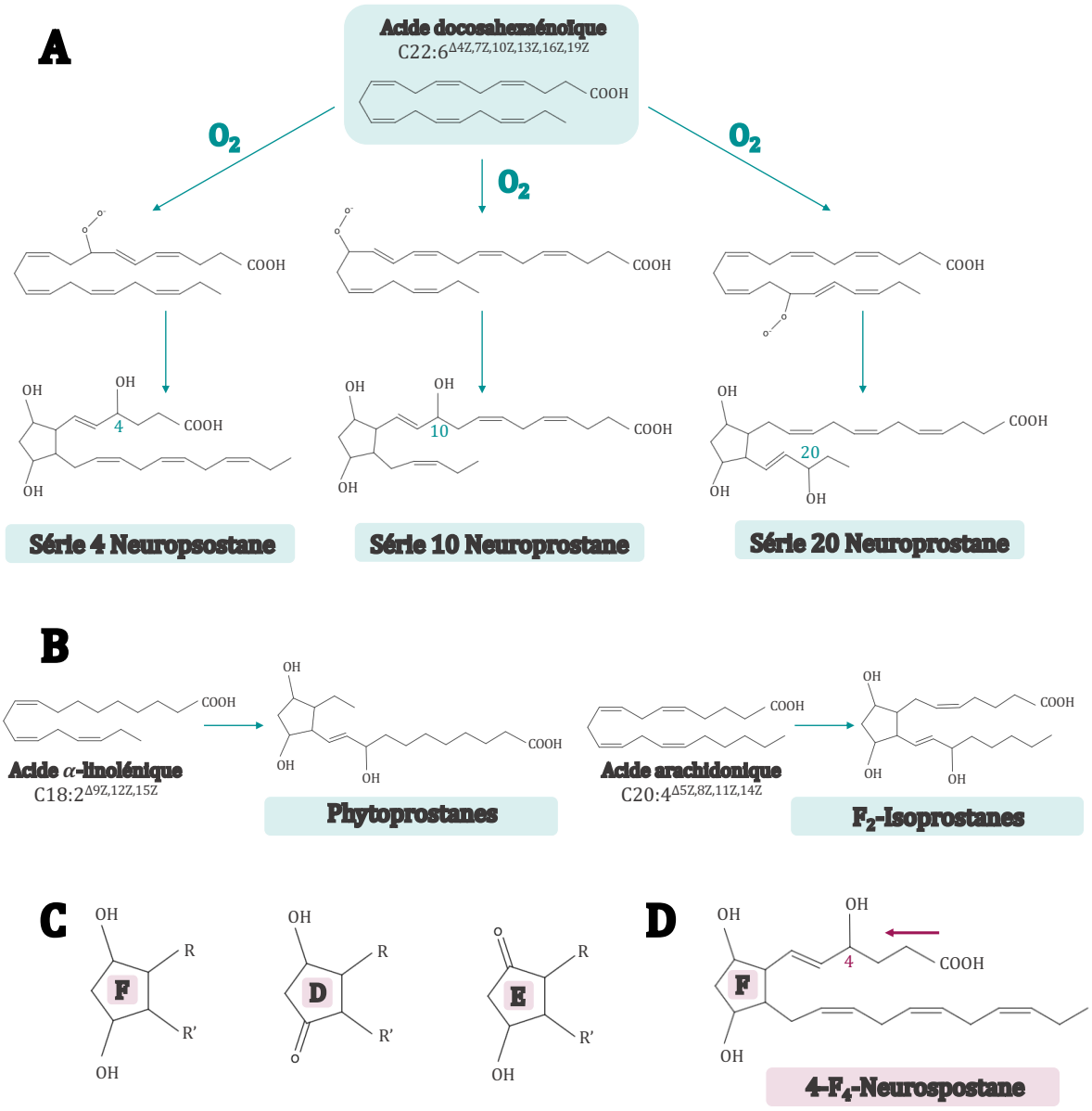

Figure 10

Voie de peroxydation radicalaire et dérivés oxydés des acides gras poly-insaturés

A. *Formation de neuroprostanes des séries 4F, 10F et 20F à partir de l'acide docosahexaénoïque (DHA).* ***B.*** *Des phytoprostanes sont produites à partir de l'acide α-linolénique et des isoprostanes sont produites à partir de l'acide arachidonique.* ***C.*** *Nomenclature de l'anneau cyclopentane avec R correspondant à la chaîne latérale α comportant l'extrémité carboxylique et R' la chaîne latérale ω comportant l'extrémité méthyle.* ***D.*** *Nomenclature des neuroprostanes et isoprostanes. Exemple de la 4-F_{4t}-neuroprostane : avec 4- correspondant à la série, soit l'hydroxyle de la chaîne latérale α est porté par le carbone 4 en partant du COOH, F correspondant à la structure du cyclopentane et le 4 en indice correspondant au nombre d'insaturations.*

b3. Effets physiopathologiques des dérivés oxydés non enzymatiques

La péroxydation des lipides, médiée par les radicaux libres de l'oxygène est spontanée *in vivo*. Cette péroxydation a lieu même en conditions physiologiques ce qui permet de définir une fourchette de concentrations physiologiques dans les fluides et les tissus. Les dérivés oxydés non enzymatiques sont ainsi considérés comme de bons biomarqueurs de stress oxydant et de la péroxydation lipidique *in vivo* (Roberts et Milne., 2009 ; Roberts et Morrow., 2000 ; Berdeaux et al., 2005). Au-delà de leur aspect pratique dans l'évaluation des dérégulations de la balance oxydative, les dérivés oxydés non enzymatiques des acides gras ont des propriétés biologiques bénéfiques qui leurs sont propres.

Par exemple, les travaux de Sethi (Sethi et al., 1996 ; Sethi et al., 2002) ont démontré que les dérivés non enzymatiques du DHA et de l'EPA ont des propriétés anti-inflammatoires et que l'oxydation de ces deux acides gras est nécessaire pour exercer leurs effets.

Des études *in vivo* et *in vitro* menées au laboratoire ont montrées que des dérivés oxydés non enzymatique du DHA ont des propriétés bénéfiques sur la fonction cardiaque (Roy et al., 2015 ; Roy et al., 2017). Plus particulièrement, le laboratoire a focalisé ses recherches sur les propriétés cardioprotectrices de la 4(RS)-4-F_{4t}-neuroprostane (4-F_{4t}-NeuroP). Cette molécule dérivée de l'oxydation radicalaire du DHA (**Figure 10**) présente des propriétés antiarythmiques *via* la prévention des extrasystoles ventriculaire post-infarctus dans un modèle de souris (Roy et al., 2015). Ces effets antiarythmiques ont été attribués à des modifications post-traductionnelles du récepteur de la ryanodine (RyR2) induite par la 4-F_{4t}-NeuroP (Roy et al., 2017). Cependant, l'hyperpolarisation des cardiomyocytes ventriculaire induite par cette molécule n'a toujours pas été expliquée. Ainsi, au cours de ma thèse, nous nous sommes demandé si cette hyperpolarisation induite par la 4-F_{4t}-NeuroP pouvait être médiée par l'activation du canal potassique TREK-1 sensible aux acides gras poly-insaturés, exprimé à la surface des cardiomyocytes (Kelly et al., 2006 ; Tan et al., 2004) et impliqué dans la régulation de la fonction cardiaque (Bechard et al., 2022 ; Wiedman et al., 2021).

CHAPITRE 2 : INTRODUCTION SUR LE CANAL TREK-1

A. LES 3 GRANDES FAMILLES DE CANAUX POTASSIQUES

Les canaux potassiques sont des protéines membranaires ubiquitaires qui représentent la famille de canaux la plus large et diversifiée des canaux ioniques. Chez les mammifères, une multitude de canaux potassiques ont été clonés depuis la découverte du canal potassique « *Shaker* » chez la drosophile (Papazian et al., 1987). En 1998 le premier canal potassique, KcsA provenant de la bactérie *Streptomyces lividans*, a été cristallisé (Doyle et al., 1998). Aujourd'hui, on n'en dénombre pas moins de 80, uniquement chez le mammifère. Cette grande diversité de canaux potassiques provient non seulement d'un grand nombre de gènes codants, mais résulte également des processus d'épissages alternatifs, d'assemblages hétérodimériques des sous-unités principales ou encore de nombreuses modifications post-traductionnelles (Coetzee et al., 1999).

Pour mieux s'y retrouver, les canaux potassiques sont divisés en trois grandes familles. La première famille correspond aux canaux potassiques voltage-dépendants (Kv) et calcium-dépendants (K_{CA}) où chaque sous-unité α est formée de 6 segments transmembranaires et d'un unique domaine pore. La deuxième famille correspond aux canaux à rectification entrante (Kir pour « *inward rectifier* K^+ *channel* ») où une sous-unité est formée de 2 segments transmembranaires et d'un unique domaine pore. Enfin, la troisième famille correspond aux canaux à deux domaines pores (K2P), des canaux de fond où chaque sous-unité est formée de 4 segments transmembranaires et de 2 domaines pores (**Figure 11**).

Pour qu'un canal soit fonctionnel, le port doit être formé par 4 domaines pores. Ainsi, les canaux des deux premières familles (K_v/K_{Ca} et Kir) sont fonctionnels une fois tétramérisés tandis que ceux de la famille des K2P sont fonctionnels une fois dimérisés. La sélectivité du pore au potassium résulte d'une séquence d'acide aminés consensus, signature : TxGYG ou TxGFG (T : Thréonine, G : glycine, Y : Tyrosine, F : phenylalanine) (Shealy et al., 2003 ; Heginbotham et al., 1994) (**Figure 11**).

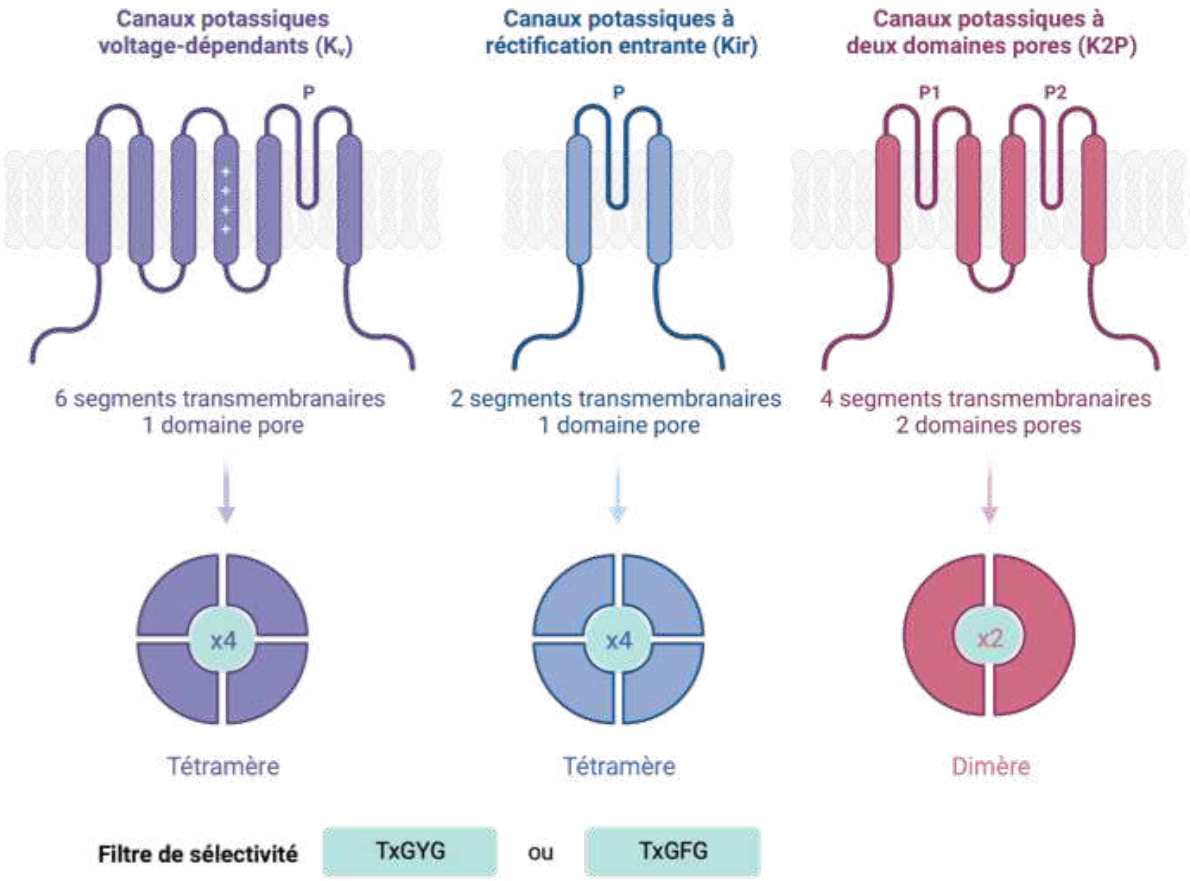

Figure 11

Structure des canaux potassiques

Chaque sous-unité α des canaux K_v possède 6 segments transmembranaires, un domaine pore et un segment senseur de voltage illustré par les symboles « + ». Pour les canaux Kir, chaque sous-unité α possède 2 segments transmembranaires et un domaine pore. Chaque sous-unité des canaux K2P possède 4 segments transmembranaires et 2 domaines pores. Les domaine N-term et C-term sont intracellulaires. Pour qu'un canal potassique soit fonctionnel, il doit être constitué de 4 domaines pores (P) formant le pore sélectif au potassium avec une séquence consensus pour former le filtre de sélectivité : TxG[Y/F]G. Les canaux K_v et Kir fonctionnels sont donc des tétramères et les canaux K2P des dimères.

Les canaux potassiques sont impliqués dans un grand nombre, sinon toutes les fonctions physiologiques et leurs dysfonctionnements génétique, iatrogène ou acquis sont à l'origine de nombreuses pathologies. Ma thèse s'intéresse à la régulation du canal TREK-1, un canal

membre de la famille des canaux K2P. Ainsi, je vais détailler cette famille de canaux potassiques en mettant l'accent sur le canal TREK-1.

B. CLASSIFICATION ET ROLES PHYSIOLOGIQUES DES K2P

Les canaux de la famille K2P sont des canaux potassiques, membranaires et ubiquitaires, exprimés tant au niveau central que périphérique. Si on les retrouve dans le règne animal, on retrouve aussi des K2P chez les plantes (Rengunta et al., 2015 ; González et al., 2014). Le premier membre cloné de la famille K2P, chez l'Homme, est le canal TWIK (« *Tandem of P domains in a Weak Inwardly-rectifying* K^+ *channel* ») (Lesage et al., 1996), qui donnera le début du nom de tous les autres K2P (« *TWIK-related …* K^+ *channel* »). Après ce premier clone, 14 autres membres ont été clonés entre 1996 et 2003. Ainsi, à ce jour et chez l'Homme il a été rapporté 15 gènes *KCNKx* codants pour les canaux K2P (**Figure 12**). S'ils partagent tous une structure commune (**Figure 11**), cette famille de 15 membres est divisée en 6 sous-familles fonctionnelles et d'homologie de séquence (**Figure 12**) (Enyedi et Czirjak., 2010 ; Honoré., 2007).

1. LA SOUS-FAMILLE TWIK

La sous-famille TWIK (*Tandem of P domains in a Weak Inwardly-rectifying* K^+ *channel*) regroupe TWIK-1 (*KCNK1*), TWIK-2 (*KCNK6*) et *KCNK7*. Ils partagent tous les trois une homologie de séquence et TWIK-1 et TWIK-2 portent un courant potassique à rectification entrante. Tout comme les canaux Kir (Yang et al., 1995), cette rectification entrante caractéristique des canaux TWIK résulte d'un bouchon interne, voltage-dépendant, par le Mg^{2+} (Lesage et al., 1996). Dans les modèles d'expression hétérologue, TWIK-1 produit peu de courant du fait d'une rapide endocytose et de son recyclage dans l'endosome (Feliciangeli et al., 2010). Presque de la même manière, l'expression fonctionnelle de chacun des variants d'épissage de *KCNK7* (*KCNK7-A, KCNK7-B* et *KCNK7-C*) n'a pas encore été décrite et l'enregistrement de son courant dans des systèmes d'expression hétérologues est largement entravé par sa rétention intracellulaire (Salinas et al., 1999).

Les canaux TWIK sont retrouvés dans les tissus comme les reins, les poumons, le système vasculaire et les cellules immunitaires comme les macrophages (TWIK-2 ; Salinas et al., 1999 ;

Bryan et al., 2006 ; Di et al., 2018) ou encore le cœur et le cerveau (TWIK-1 ; Lesage et al., 1996).

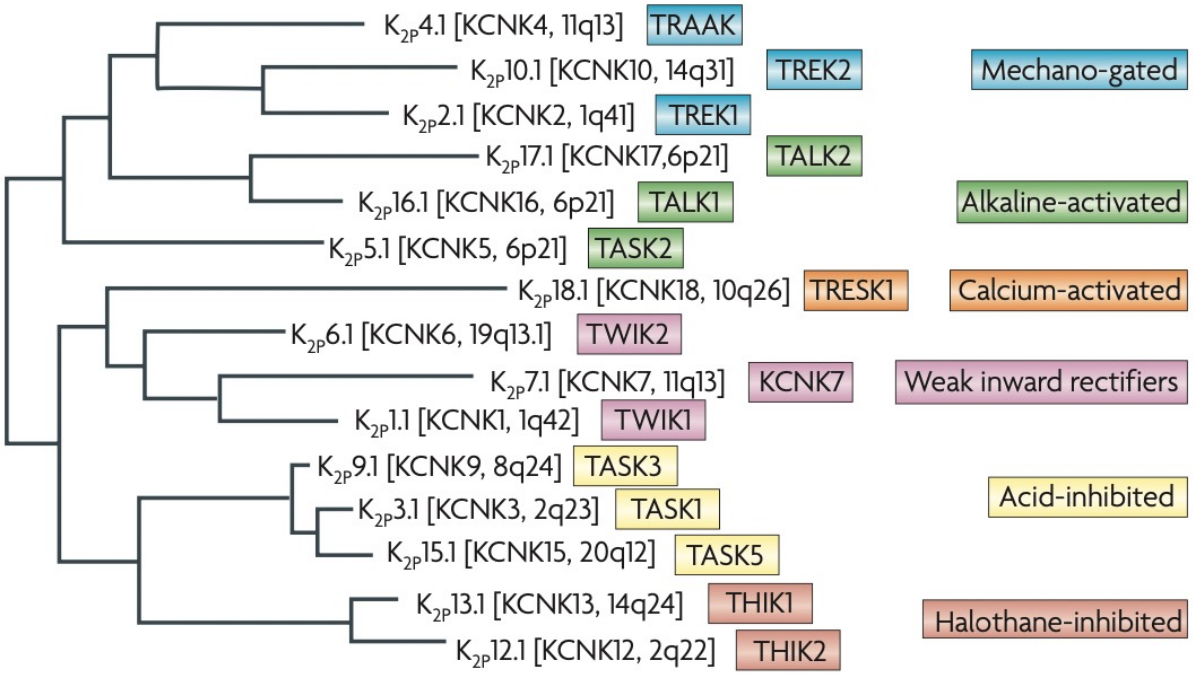

Figure *12*

Dendrogramme de la famille de canaux K2P chez l'Homme.

Un dendrogramme ou arbre phylogénétique illustre une classification descendante hiérarchique permettant de regrouper progressivement les membres d'une famille par similarités ou homologie de séquence d'acides aminés. On peut imaginer un axe X indiquant le % de similarité et débutant à 0 %. Plus on se décale vers la droite sur l'axe X, plus le % de similarité diminue. Ainsi, 6 sous-familles de canaux K2P sont identifiées et leurs identités fonctionnelles sont indiquées à droite. Pour chaque membre on peut voir, de gauche à droite, la nomenclature associée au canal, le nom du gène selon la nomenclature HUGO (HUman Genome Oganization) et sa localisation chromosomiale. Figure adaptée de Honoré., 2007.

2. LA SOUS-FAMILLE TASK

La sous-famille TASK (*TWIK-related Acid-Sensitive K^+ channel*) regroupe TASK-1 (*KCNK3*), TASK-3 (*KCNK9*) et TASK-5 (*KCNK15*). Ils partagent tous les trois une homologie de séquence et leur activité est modifiée par les variations physiologiques de pH extracellulaire mais pas par les variations de pH intracellulaire (Duprat et al., 1997 ; Lesage and Barhanin., 2011 Review). L'acidification extracellulaire à pH 6.4 inhibe l'activité de TASK tandis que l'alcalinisation extracellulaire à pH 8.4 l'active (Ovocyte de Xénope et cellules COS). Comme d'autres canaux K2P, TASK-1 et TASK-3 sont aussi régulés et plus précisément inhibés par les acides gras insaturés. Comme *KCNK7* de la sous-famille TWIK, l'expression fonctionnelle de TASK-5 dans des systèmes d'expression hétérologues n'a pas pu être décrite. Bien qu'il partage plus de 50 % d'homologie avec TASK-1 et TASK-3, il ne produit pas de courant fonctionnel à la membrane plasmique (Kim and Gnatenco., 2001).

Les canaux TASK sont plus particulièrement exprimés dans le pancréas et le placenta et on les retrouve aussi avec un plus faible niveau d'expression dans des tissus comme le système nerveux central, les poumons, la prostate, le cœur (TASK-1 et TASK-5) et les glandes surrénales (TASK-1 et TASK-3) (Duprat et al., 1997 ; pour revue Lesage and Barhanin., 2011)

3. LA SOUS-FAMILLE THIK

La sous-famille THIK (*TWIK-related Halothane Inhibited K^+ channel*) regroupe THIK-1 (*KCNK13*) et THIK-2 (*KCNK12*). Ils partagent 60 % d'homologie de séquence et leur activité est inhibée par l'halothane et plus généralement par les anesthésiques volatiles, contrairement aux autres K2P qui sont sensibles et activés par les anesthésiques volatiles (TREK-1, TREK-2, TASK-1, TASK-3, TRESK). Comme *KCNK7* et TASK-5, l'étude fonctionnelle de THIK-2 a longtemps été entravée par sa rétention intracellulaire, dans le réticulum endoplasmique (Rajan et al., 2001 ; Chatelain et al., 2013).

Les canaux THIK sont largement exprimés dans le système nerveux central comme dans le cortex, l'hippocampe et les bulbes olfactifs mais également au niveau périphérique, dans les cellules épithéliales comme celles présentes dans les poumons, les reins ou encore l'estomac. L'expression de THIK-1 est également retrouvée dans les muscles squelettiques, le cœur et les testicules (Rajan et al., 2001).

4. LA SOUS-FAMILLE TRESK

TRESK (*TWIK-related spinal cord K^+ channel*) est le seul et unique membre de sa propre sous-famille. Il se rapproche le plus de TREK-2 avec seulement 19 % d'homologie de séquence (Sano et al., 2003). Son activité augmente avec l'augmentation du calcium intracellulaire, grâce à sa régulation par la protéine phosphatase calmoduline-calcium dépendante, calcineurine (Czirjak et al., 2004). TRESK est également inhibé par les acides gras insaturés comme le DHA, LA et l'oléate mais pas par les acides gras saturés comme le stéarate et le palmitate (Sano et al., 2003).

Comme son nom l'indique, l'expression de TRESK est retrouvée au niveau central, dans la moelle épinière, le cervelet mais aussi au niveau périphérique comme dans les testicules.

5. LA SOUS-FAMILLE TALK

La sous-famille TALK (*TWIK-related ALkalin pH activated K^+ channel*) regroupe TALK-1 (*KCNK16*), TALK-2 (*KCNK17*) et TASK-2 (*KCNK5*). Au-delà de leurs homologies de séquences, ils sont tous les trois activés par l'alcalinisation extracellulaire (Girard et al., 2001). Bien que le canal TALK-1 est exprimé à la membrane plasmique, il présente aussi une rétention fonctionnelle dans le réticulum endoplasmique en continuité de la membrane nucléaire, qui lui permettrait de moduler l'homéostasie calcique intracellulaire des cellules pancréatiques (Vierra et al., 2017).

Les canaux TALK sont exprimés majoritairement dans les cellules endocrines du pancréas mais on retrouve également leur expression dans les reins, le foie (TASK-2) ainsi que le cœur et le cerveau (TALK-2) (Girard et al., 2001 ; Decher 2001 ; Vierra et al., 2017).

6. LA SOUS-FAMILLE TREK

La sous-famille TREK (*TWIK RElated K^+ channel*) regroupe TREK-1 (*KCNK2*), TREK-2 (*KCNK10*) et TRAAK (*KCNK4*). Les canaux de cette sous-famille sont mécano-sensibles. Ces canaux ont la particularité d'être poly-modulés ; ils sont sensibles aux modifications de pH intra- et extracellulaire, modulés par les anesthésiques volatiles, par des voies de signalisation

intracellulaires, par la pression et activés par les acides gras insaturés. Les régulations du canal TREK-1 sont détaillées dans la partie suivante : « **Les régulations du canal TREK-1** ».
L'expression des canaux TREK est retrouvée au niveau central (TREK-1 : Fink et al., 1996 ; TRAAK : Lesage et al., 2000), mais aussi en périphérie dans le tissu cardiaque (Tan et al., 2004 ; Kelly et al., 2006 ; Wiedmann et al., 2021), le placenta (Lesage et al., 2000a), le pancréas et les reins (TREK-2 : Lesage et al., 2000b).

C. LES REGULATIONS DU CANAL TREK-1

1. UN CANAL DE FUITE IDEAL ?

Les canaux K2P sont aussi appelés canaux de fuite (*leak channels*) ou encore canaux de fond (*background channels*). Attention, il ne faut pas confondre « canaux de fuite » avec la fuite ou l'artefact que l'on peut observer en patch-clamp (configuration cellule-entière) avec une courbe courant-voltage linéaire et un potentiel d'inversion proche de 0 mV qui résulte d'un « *seal* » insuffisant entre la pipette et la membrane. Cet artefact n'a pas de sélectivité ionique (d'où le décalage du potentiel d'inversion) tandis que les K2P sont sélectifs au potassium.
En fait, on parle de canaux de fuite puisqu'ils sont pour la grande majorité constitutivement ouverts dans toute la gamme de potentiels, même au potentiel de repos et qu'ils participent à l'établissement du potentiel de membrane, proche du potentiel d'équilibre du potassium autour de -85 mV. Aussi, leur structure composée de 4 segments transmembranaires (M1-M4), deux domaines pores (P1-P2) et deux hélices extracellulaire (C1-C2) formant un domaine cap est dépourvue de la structure canonique senseur de voltage des canaux voltage-dépendant (**Figure 13**). Les K2P seraient alors des canaux de fuite sélectif au potassium, mais ne faudrait-il pas nuancer cette appellation ?

Tout d'abord, qu'est-ce qu'un canal de fuite idéal ?

Les canaux de fuite sont des canaux dont les courbes courant-voltages avec différentes concentrations de potassium extracellulaire peuvent être décrites par l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) (Hill., 2001). Cette équation se fonde sur la théorie des champs constants.

La membrane est considérée comme un matériel homogène dans lequel les particules perméantes se répartissent instantanément de part et d'autre. Comme nous parlons d'ions K^+, des particules chargées, leur flux au travers de la membrane est déterminé par un gradient de concentration et le champ électrique. Aussi, les ions sont supposés traverser la membrane de manière indépendante, sans interagir les uns avec les autres, et le champ électrique est supposé constant, diminuant linéairement au travers de la membrane. Ainsi, l'équation de GHK prédit que le courant dépend des concentrations intra- et extra-cellulaires et que le courant est plus important quand les ions vont du compartiment le plus concentré vers le moins concentré (Hill., 2001). Simplement dit, la relation courant-voltage d'un canal de fuite doit être rectifiante dans le sens sortant en conditions physiologique (asymétrie des concentrations qui influence le courant) et linéaire en condition iso-potassique (absence d'influence du gradient de concentration) (**Figure 13**).

Un canal de fuite idéal n'est donc pas voltage-dépendant et concentration-dépendant, c'est-à dire que sa probabilité d'ouverture (Po) ne varie ni avec le voltage, ni avec les concentrations intra- et extra-cellulaires. Par exemple, la Po des canaux voltage-dépendants varie en fonction du voltage.

Une autre caractéristique importante des canaux de fuite est qu'ils sont temps-indépendants. Autrement dit, l'amplitude du courant suit instantanément le changement de potentiel de membrane (illustration dans la revue Enyedi et Czirjak., 2010) ; il n'y a pas de cinétique d'activation, de désactivation (courant de queue) ou d'inactivation.

TREK-1 est-il donc un canal de fuite idéal ?

TREK-1 est un K2P qui présente bien une rectification sortante en conditions physiologiques comme prédit par l'équation de GHK (Honoré., 2007) ($[K^+]_{int}$ = 150 mM > $[K^+]_{ext}$ = 5 mM, **Figure 13**). Cependant, TREK-1 présente une composante temps-dépendante. Lors d'une dépolarisation en *step*, on observe deux composantes de courant : (1) une composante instantanée qui reflète l'altération du gradient électrochimique, (2) suivie d'une composante temps-dépendante (τ = 4-6 ms) qui représente la voltage-dépendance de TREK-1 (Maingret et al., 2002 ; Bockenhauer et al., 2001) (**Figure 14.A et B**). TREK-1 n'est toutefois pas un canal voltage-dépendant classique, puisqu'il lui manque la structure canonique senseur de voltage et puisqu'il ne présente pas d'inactivation. Cependant, à la repolarisation, il présente un courant de queue et une cinétique de désactivation (τ = 5-8 ms) (Maingret et al., 2002) (**Figure 14.C**).

Ainsi, la composante instantanée du courant vient du fait que les canaux ont une probabilité d'ouverture, non nulle, y compris dans les potentiels négatifs. La Po est toutefois faible, souvent inférieure à 0,1. D'autre part, la temps-dépendance vient de la dépendance de la Po au voltage (Li et al., 2006) (**Figure 14.D**) comme c'est le cas pour de nombreux K2P (pour revue Reningunta et al., 2015 ; Schewe et al., 2016 ; Ashmole et al., 2009 ; Kim et al., 2001 ; Rajan et al., 2000). Au niveau unitaire, l'ouverture de TREK-1 se fait sous forme de « *burst* » correspondant à des ouvertures du canal interrompues par la fermeture du canal et s'ouvre également en « *flickering* » (Li et al., 2006). L'augmentation de la Po avec le voltage est due à une réduction du temps séparant les « *burst* » d'ouvertures (**Figure 14.D**).

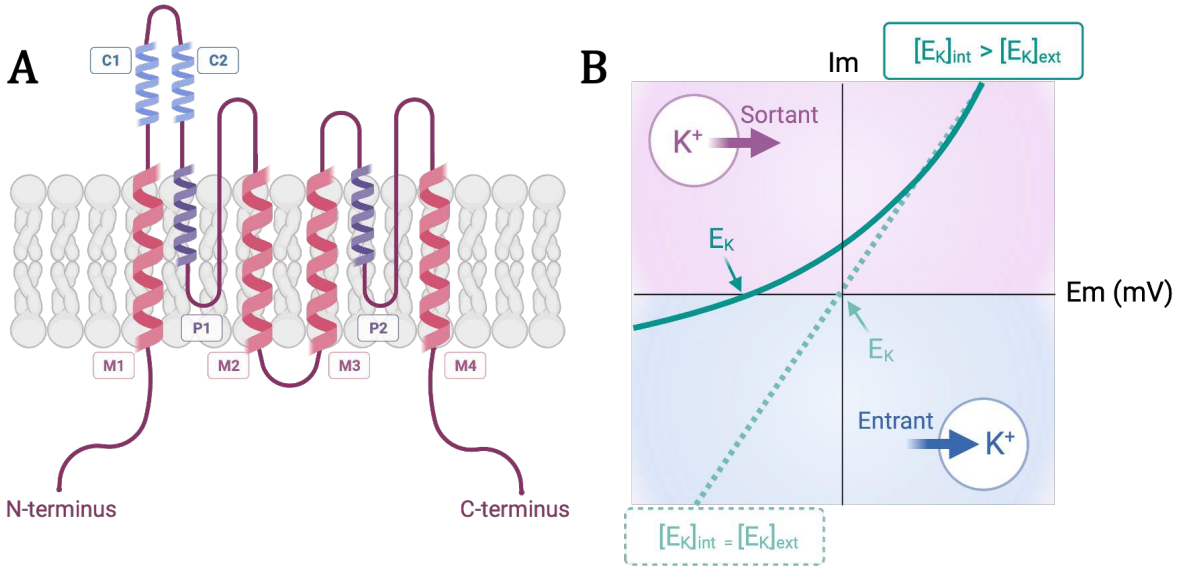

Figure 13

Structure-fonction des canaux K2P

A. *Structure générale des canaux K2P : 4 domaines transmembranaires (M1-M4), deux domaines pores (P1-P2) et deux hélices extracellulaires (C1-C2) formant un domaine cap. Le C-terminus et le N-terminus sont intracellulaires.* ***B.*** *La majorité des canaux K2P présentent une rectification sortante dans des conditions physiologiques ($[K^+]_{int} > [K^+]_{ext}$) et une courbe courant-voltage linéaire en conditions iso-potassique ($[K^+]_{int} = [K^+]_{ext}$).*

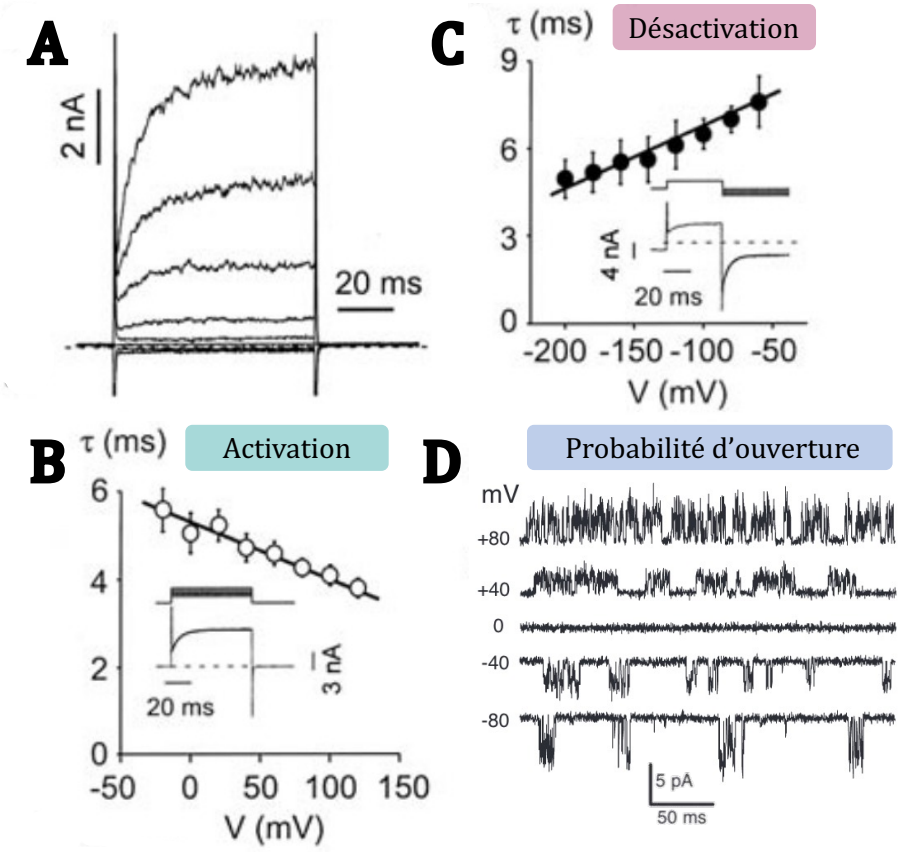

Figure 14

Voltage- et temps-dépendance du canal TREK-1

A. *Courant TREK-1 en réponse à un protocole de dépolarisation en step de -160 mV à +120 mV avec un incrément de 40 mV à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV.* ***B.*** *Cinétique d'activation lissée avec une équation exponentielle et constante de temps d'activation en fonction du potentiel.* ***C.*** *Courant de queue lissée avec une équation exponentielle et constante de temps de désactivation en fonction du potentiel.* ***D.*** *Enregistrement du canal TREK-1 en configuration inside-out sur des cardiomyocytes de rat en condition iso-potassique.* Les figures sont adaptées de Maingret et al., 2002 (A-C) et Li et al., 2006 (D).

Dès lors, le terme de « canal de fuite » pourrait conduire à une mésinterprétation du fonctionnement de ces canaux. Certains auteurs proposent d'appeler les K2P non plus des « canaux de fuite », mais plutôt des « canaux potassiques régulateurs » (Reningunta et al.,

2015). En effet, les canaux K2P en général sont des canaux poly-modulés par de nombreux stimuli physiques ou chimiques. TREK-1 est donc régulé par une grande diversité de signaux comme des agents pharmacologiques, les modifications de pH, des voies intracellulaires, la pression et les déformations de la membrane et encore les acides gras, insaturés que nous allons détailler dans cette partie.

2. REGULATION PHARMACOLOGIQUE

a. Inhibiteurs pharmacologiques de TREK-1

L'absence d'inhibiteur spécifique de TREK-1 complique beaucoup l'étude de son rôle physiologique dans les tissus. TREK-1 est résistant aux inhibiteurs classiques des canaux potassiques comme le tétraéthylammonium (TEA) et la 4-amidopyridine (4-AP) (Patel et al., 1998 ; Fink et al., 1996).

Il existe cependant des inhibiteurs de TREK-1 mais non spécifiques parmi lesquels nous pouvons citer les agents antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, la fluoxétine (prozac®) (IC_{50} = 9 µM) et son métabolite actif la norfluoxétine (Kennard et al., 2005). Au cours de ma thèse, nous avons utilisé la norfluoxétine pour inhiber le canal TREK-1 (10 µM).

La structure cristallographique de TREK-1 (Lolicato et al., 2017), révèle deux conformations du canal « *up* » et « *down* ». L'état « up », est un état conductif, activé par différents stimuli comme l'acide arachidonique ou l'étirement de la membrane (Lolicato et al., 2017 ; Dong et al., 2015). L'état « *down* » quant à lui, est très peu conductif ; c'est cet état qui est stabilisé par la fluoxétine et la norfluoxétine via une interaction directe dans le site de fenestration du canal (Lolicato et al., 2017 ; Dong et al., 2015). Des études sur le canal TREK-2 ont montré qu'une mutation (Y315A) faisant basculer le canal vers l'état « *up* » prévient l'effet inhibiteur de la norfluoxétine (Mcclenaghan et al., 2016). Si ces inhibiteurs non spécifiques ne permettent pas réellement l'étude du rôle physiologique de TREK-1 dans les tissus, ils ont permis de mettre en lumière différentes configurations du canal. Ainsi, il est proposé que les canaux TREK (TREK-1, TREK-2 et TRAAK) n'existeraient pas dans un simple système binaire comprenant un état conductif et un état fermé. Mcclenaghan et al., proposent plutôt que l'activation du canal

pourrait survenir indépendamment dans les deux conformations et que différents stimuli influencent la probabilité d'ouverture via des mécanismes structurels distincts (Mcclenaghan et al., 2016 ; Lolicato et al., 2017).

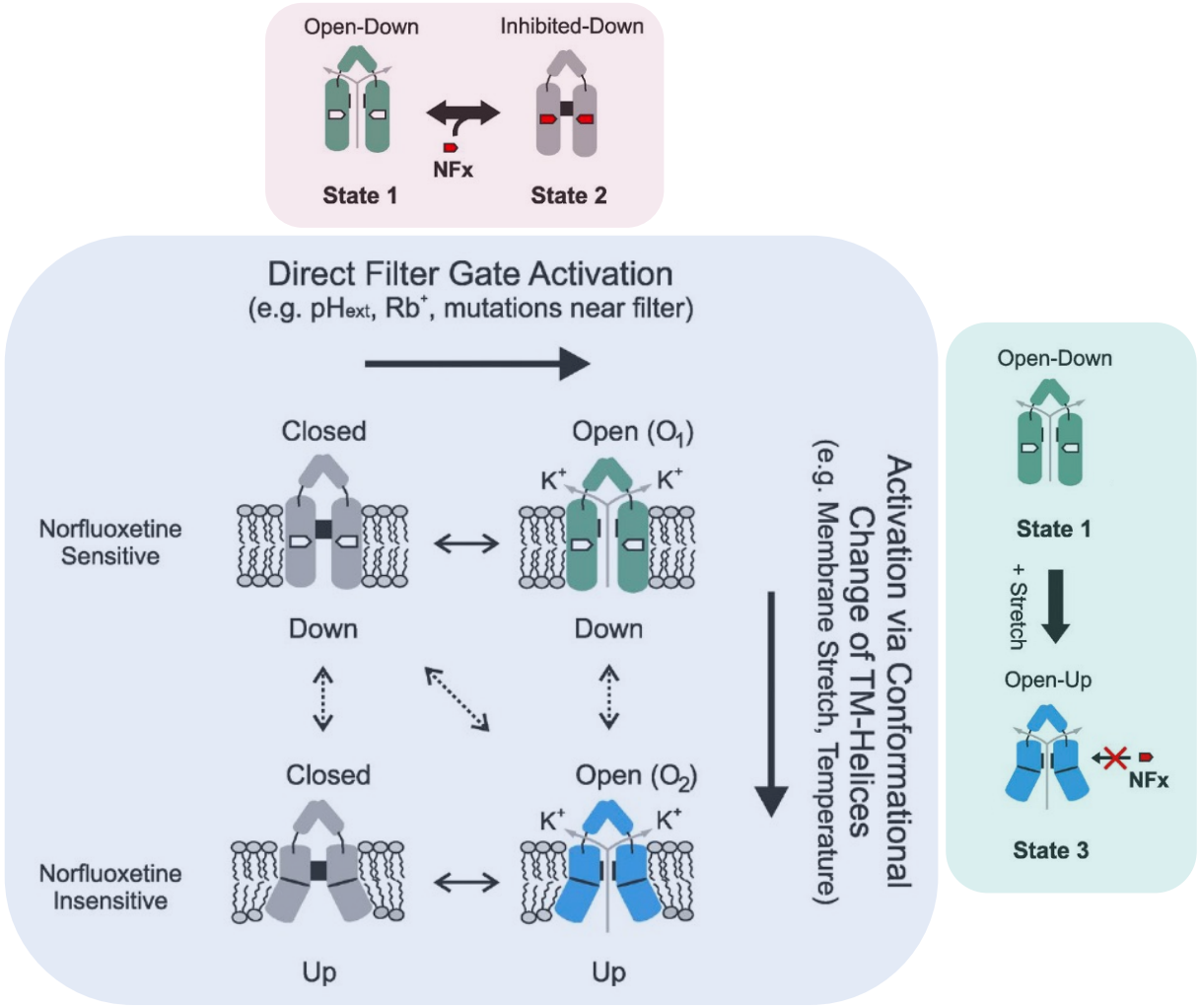

Figure 15

Illustration des différents états « up » et « down » des canaux TREK

Ce modèle montre comment le canal peut être converti entre les différents états sous l'influence de plusieurs stimuli. Il existe au moins deux états ouverts (O1 et O2) dépendants des changements de conformations des hélices transmembranaires du canal. (NFx : norfluoxétine). Figure adaptée de Mcclenaghan et al., 2016.

La spadine (peptide de 17 acides aminés) est un agent antidépresseur résultant de la maturation d'une autre protéine, la sortiline (Mazella et al., 2010). Après une pré-activation avec de l'acide

arachidonique (10 µM), la spadine se révèle être un inhibiteur de TREK-1 (Mazella et al., 2010 ; Hivelin et al., 2016 ; Djilani et al., 2017). Ainsi, la spadine n'est pas un inhibiteur direct du canal TREK-1 mais plutôt un antagoniste de l'acide arachidonique dépourvu d'activité intrinsèque agissant *via* un mécanisme allostérique (Ma et Lewis., 2020).

b. Activateurs pharmacologiques de TREK-1

D'autres agents pharmacologiques sont des activateurs de TREK-1 comme les anesthésiques volatiles à doses cliniques : chloroforme, isoflurane, halothane, diethylester (Patel et al., 1999). Ainsi, l'ouverture de ce canal potassique participe aux effets de ces anesthésiques en diminuant l'excitabilité neuronale (Patel et al., 1999 ; Winegar et al., 1996). Comme TREK-1 est activé par les anesthésiques volatiles en configurations cellule-entière et patch-excisé de la technique de patch-clamp, les auteurs proposent un mécanisme d'interaction direct avec le canal, comme pour la fluoxétine (Lolicato et al., 2017 ; Mcclenaghan et al., 2016 Kennard et al., 2005 ; Kennard et al., 2005 ;) et impliquant le domaine C-terminal (Patel et al., 1999).
Les anesthésiques gazeux tels que le xénon, l'oxyde nitrique et le cyclopropane sont aussi des activateurs de TREK-1 à doses cliniques (Gruss et al., 2004).

Le ML402 (N-[2-(4chloro-2-methylphenoxy)ethyl]thiophene-2-carboxamide) et le ML335 (N-[(2,4-dichlorophenyl) methyl]-4-(methanesulfonamido) benzamide) sont des activateurs de TREK-1 et TREK-2 (Lolicato et al., 2017) (**Figure 16.A**). Au cours de ma thèse, nous avons utilisé le ML402 pour comparer son mécanisme d'action sur le canal TREK-1 à celui des acides gras poly-insaturés. Le ML402 a une EC_{50} de 13,7 ± 7,0 µM pour le canal TREK-1 mais ne se révèle pas être un activateur efficace du canal TRAAK (Lolicato et al., 2017) (**Figure 16.B**). ML402 et ML335 partagent un même site d'interaction nommé « *L-shaped pocket* » situé à l'arrière du filtre de sélectivité, à l'interface de l'hélice du pore P1 et de l'hélice du segment transmembranaire M4 (interface P1-M4). Ce site d'interaction est différent de celui occupé par la norfluoxétine et requiert une densité de deux activateurs par canal (**Figure 16.C**). Le site d'interaction est également différent du site d'interaction des acides gras poly-insaturés avec le canal puisque l'effet de l'acide arachidonique n'est pas altéré par la mutation K271Q, tandis que le mutant TREK-1_{K271Q} est insensible au ML402/ML335 (**Figure 16.B**).En effet, 3 résidus sont impliqués dans l'interaction du ML402/ML335 avec TREK-1: Lys271, Trp275 et Ala259

avec lesquels ils forment des pont hydrogènes et des interactions électrostatiques permettant de stabiliser l'interface P1-M4 (Lolicato et al., 2017). La mutation $TRAAK_{Q258K}$ le rend sensible au ML402 avec une EC_{50} comparable à celle du canal TREK-1 ($TREK\text{-}1_{WT}$: EC_{50} = 13,7 ±7,0 µM, $TRAAK_{Q258K}$: EC_{50} = 13,6 ± 1,5 µM) (Lolicato et al., 2017) (**Figure 16.B**).

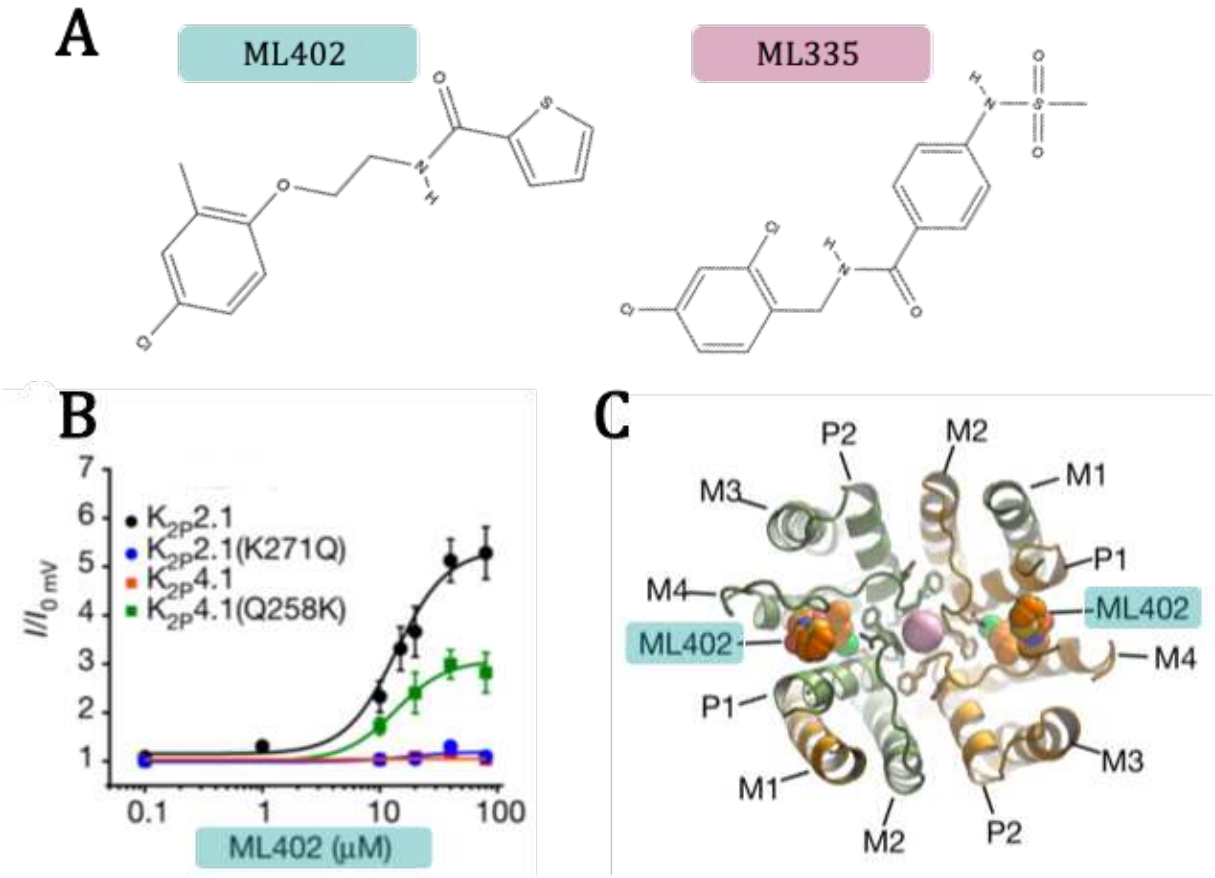

Figure 16

Activation du canal TREK-1 par le ML402

A. Structure chimique du ML402 et du ML335, deux activateurs directs du canal TREK-1. B. Courbes pharmacologiques de l'activation de TREK-1 (K2P2.1, noir) et de TRAAK (K2P4.1, rouge) par le ML402. C. Vue extracellulaire excluant le domaines CAP de TREK-, montrant le site de liaison du ML402 avec le canal à l'interface M4-P1. Figure (B-C) adaptée de Lolicato et al., 2017.

3. REGULATION PAR LE PH

La sensibilité de TREK-1 aux modifications de pH intra- et extra-cellulaires ferait de lui un bon senseur de pH au niveau central. En effet, l'acidification du milieu intracellulaire active TREK-1 (Maingret et al., 1999, Honoré et al., 2002) tandis que l'acidification du milieu extracellulaire l'inhibe (Cohen et al., 2008). TREK-1 est un canal mécano-sensible et la protonation du domaine C-terminal modifie ses propriétés mécano-sensibles. L'acidose intracellulaire décale la relation pression-effet de TREK-1 vers les pressions positives (Maingret et al., 1999, Honoré et al., 2002).

D'autre part, l'alcalinisation du milieu extracellulaire active TREK-1 en augmentant sa probabilité d'ouverture (Cohen et al., 2008). La protonation de deux histidines extracellulaires (His97 et His141) situées entre le segment transmembranaire M1 et l'hélice du pore P1 est responsable de la réponse de TREK-1 aux modifications de pH extracellulaires (**Figure 17**). Une autre étude identifie l'histidine en position 126 comme senseur de protons (Sandoz et al., 2009).

Le résidu intracellulaire Glu306 chargé négativement et situé dans le domaine C-terminal de TREK-1 agit comme un senseur de protons (**Figure 17**). La protonation de ce résidu lors de l'acidose intracellulaire induit une augmentation de l'activité du canal TREK-1 (Maingret et al., 1999, Honoré et al., 2002).

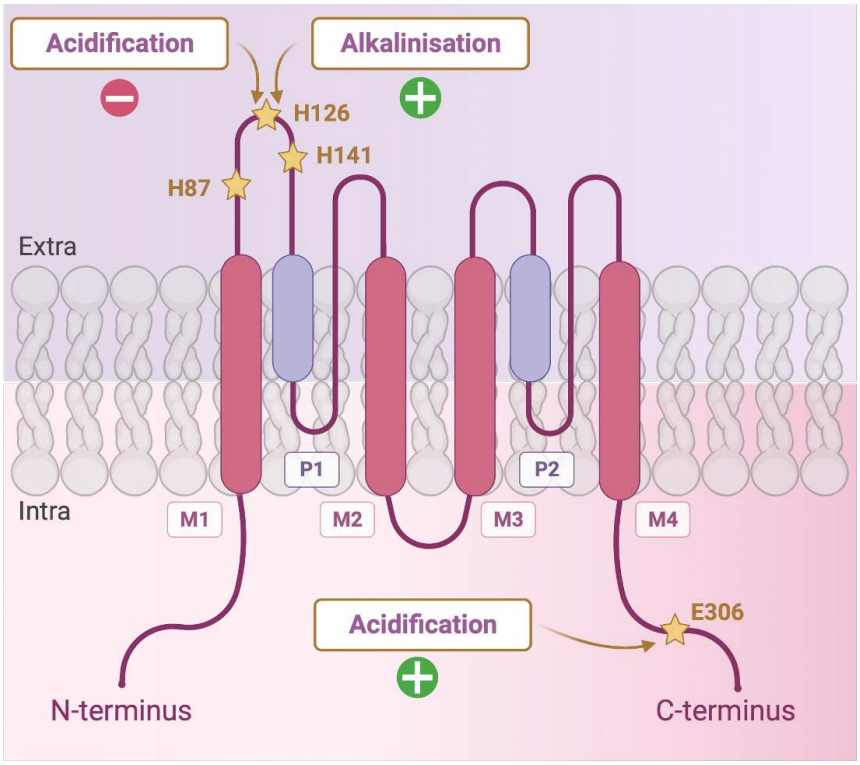

Figure 17

Sensibilité de TREK-1 aux modifications de pH

Les résidus impliqués dans la sensibilité de TREK-1 aux modifications de pH sont indiqués par des étoiles. La sensibilité au pH extracellulaire est gouvernée par les histidines extracellulaires en position 87 (His87) et 141 (His141). La sensibilité au pH intracellulaire est gouvernée par le glutamate en position 306 (E306). L'acidification intracellulaire et l'alcalinisation extracellulaire active le canal TREK-1 tandis que l'acidification extracellulaire inhibe l'activité de TREK-1.

4. REGULATION PAR DES VOIES DE SIGNALISATONS INTRACELLULAIRES

Certains neurotransmetteurs, dont les récepteurs sont couplés aux protéines G, sont capables de réguler l'excitabilité neuronale en modulant l'activité du canal TREK-1. Les protéines $G\alpha_s$ et $G\alpha_q$ sont associées à une inhibition du canal TREK-1 *via* l'activation respective des PKA et

PKC (Murbatián et al., 2005 ; Chemin et al., 2003 ; Lesage et al., 2000 ; Patel et al., 1998 ; Fink et al., 1996) (**Figure 18**). Les phosphorylations des résidus sérines S300 et S333 localisés dans le domaine C-terminal de TREK-1 sont responsables de cette inhibition. Ainsi, les deux neurotransmetteurs, sérotonine (5HT) et glutamate sont des inhibiteurs du canal TREK1 puisque leurs récepteurs métabotropiques $5HT_4R$, mGluR1 et mGluR5, sont couplés aux protéines $G\alpha_s$ et $G\alpha_q$ (Murbatián et al., 2005 ; Chemin et al., 2003). TREK-1 est aussi directement inhibé par le diacylglycérol (DAG) résultant du clivage du PIP2 (phosphatidylinositol 4,5 biphosphate) après l'activation de la PLC (phospholipase C) par la protéine $G\alpha_q$ activée (Chemin et al., 2003).

En revanche, les récepteurs associés avec une diminution de l'activité de la PKA permettent l'activation du canal TREK-1, comme les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR2 et mGluR4 couplés à une protéine $G\alpha_i$ (Cain et al., 2008) (**Figure 18**).

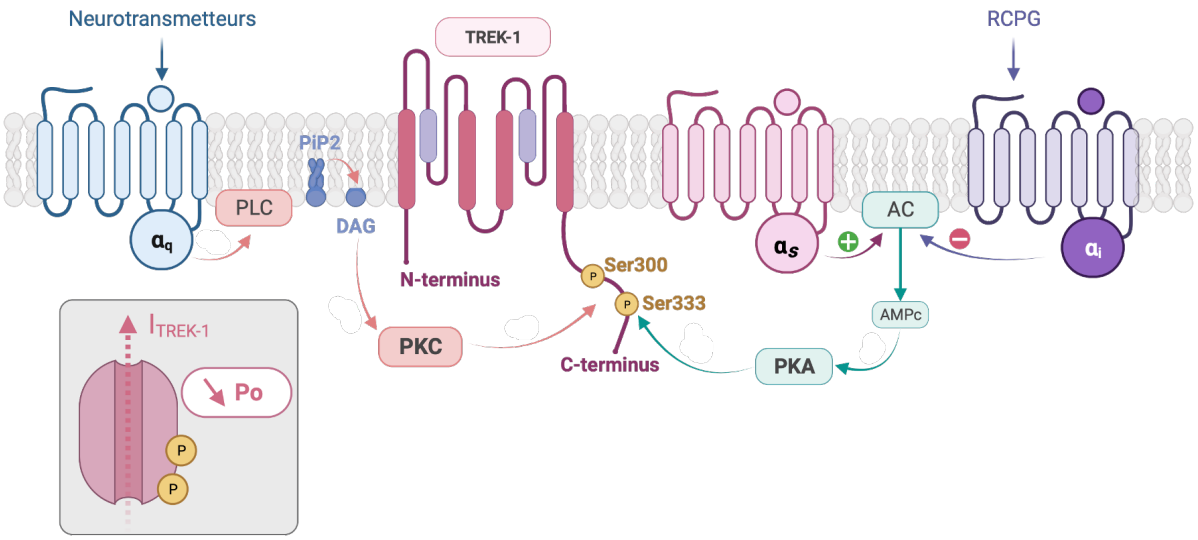

Figure 18

Régulation de TREK-1 par les récepteurs couplés aux protéines G

La phosphorylation des résidus sérines S300 et S333 du domaine C-terminal de TREK-1 par les PKA (voie de la protéine $G\alpha_s$) et PKC (voie de la protéine $G\alpha_q$) est associée à une inhibition du canal. L'activation du récepteur couplé à la protéine $G\alpha_i$ permet de diminuer l'activité de la PKA et est donc associée avec une activation du canal TREK-1. Récepteur couplé à une protéine G (RCPG), phospholipase C (PLC), phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2), diacylglycérol (DAG), protéine kinase C (PKC), adénylate cyclase (AC), adénosine monophosphate cyclique (AMPc), protéine kinase A (PKA).

5. MECANO-SENSIBILITE

TREK-1 est un canal mécano-sensible directement modulé par l'étirement de la membrane. Il est activé par la déformation convexe (pression négative, succion) (Honoré et al., 2006 ; Maingret et al., 1999 ; Patel et al., 1998) et inhibé par la déformation concave (pression positive) (Berrier et al., 2013) (**Figure 19**). L'application d'une pression négative sur la membrane, en configurations cellule-attachée et *inside-out* de la technique de patch-clamp, active le canal TREK-1 de manière réversible, avec une demie-activation atteinte pour -50 mmHg (Honoré et al., 2006) (**Figure 19**).

Le volume cellulaire influence également l'activité du canal TREK-1, *via* des modifications de tension membranaire. La diminution de l'osmolarité extracellulaire augmente l'activité du canal TREK-1 tandis que l'augmentation de l'osmolarité extracellulaire diminue son activité (Patel et al., 1998). Ainsi, en cas de gonflement cellulaire, l'activité du canal TREK-1 est augmentée, suggérant un rôle de ce canal dans la régulation ou l'adaptation des cellules à des modifications du volume cellulaire.

Au niveau de la cellule entière, certaines molécules modifiant la courbure de la membrane en s'insérant préférentiellement dans le feuillet externe ou interne modulent l'activité du canal TREK-1. Les molécules cationiques s'insèrent préférentiellement dans le feuillet interne tandis que des molécules anioniques ou neutres vont s'insérer dans le feuillet externe en raison de l'asymétrie des charges. Les molécules induisant une déformation concave de la membrane sont appelées des « *cup-former* », ce sont les molécules qui s'insèrent dans le feuillet interne. Les molécules associées à une déformation convexe de la membrane sont des « *crenators* » et s'insèrent dans le feuillet externe de la membrane (**Figure 19**). La chlorpromazine est une molécule qui s'insère préférentiellement dans le feuillet interne de la membrane provoquant une courbure concave (Sheetz et Singer., 1974). En configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp, la chlorpromazine inhibe le canal TREK-1 (Patel et al., 1998). D'un autre côté, le trinitrophénol s'insère dans le feuillet externe, causant une déformation convexe de la membrane et active le canal TREK-1 (Patel et al., 1998) (**Figure 19**).

La mécano-sensibilité du canal TREK-1 implique le domaine C-terminal puisque sa délétion rend le canal résistant à l'étirement de la membrane (Honoré et al., 2006 ; Maingret et al., 1999 ; Patel et al., 1998)

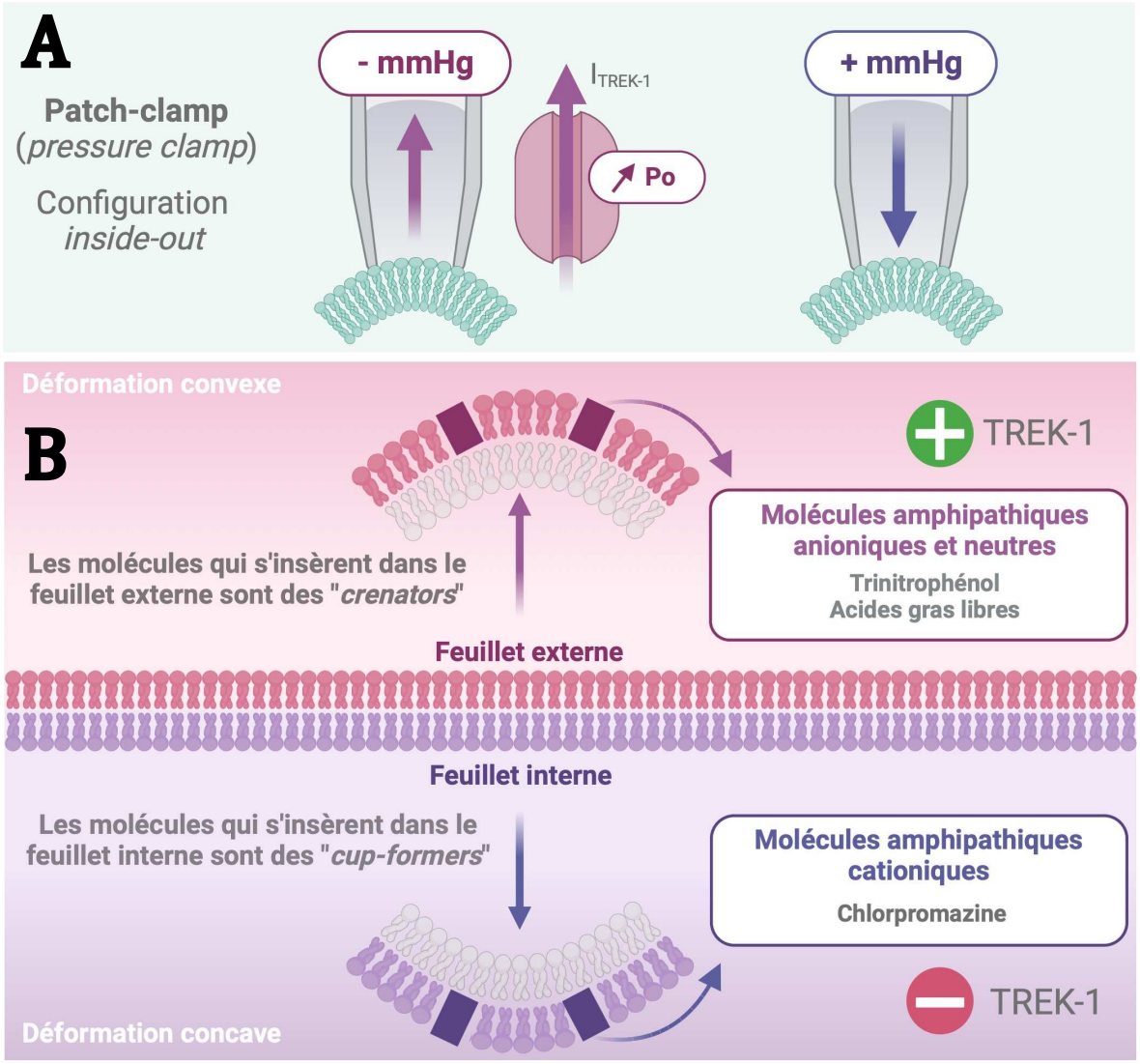

Figure 19

Mécano-sensibilité du canal TREK-1

A. *TREK-1 est activé par les pression négative en configuration cellule-attachée et « inside-out » de la technique de patch-clamp.* ***B.*** *TREK-1 est activé par les déformation convexe et inhibé par les déformations concave de la membrane. Les molécules amphipatiques anioniques et neutres s'insèrent préférentiellement dans le feuillet externe et courbe la membrane de manière convexe, ce qui active le canal TREK-1. Les molécules amphipatiques cationiques s'insèrent préférentiellement dans le feuillet interne et courbe la membrane de manière concave, ce qui inhibe le canal TREK-1.*

6. REGULATION PAR LES LIPIDES CELLULAIRES

a. Les phospholipides

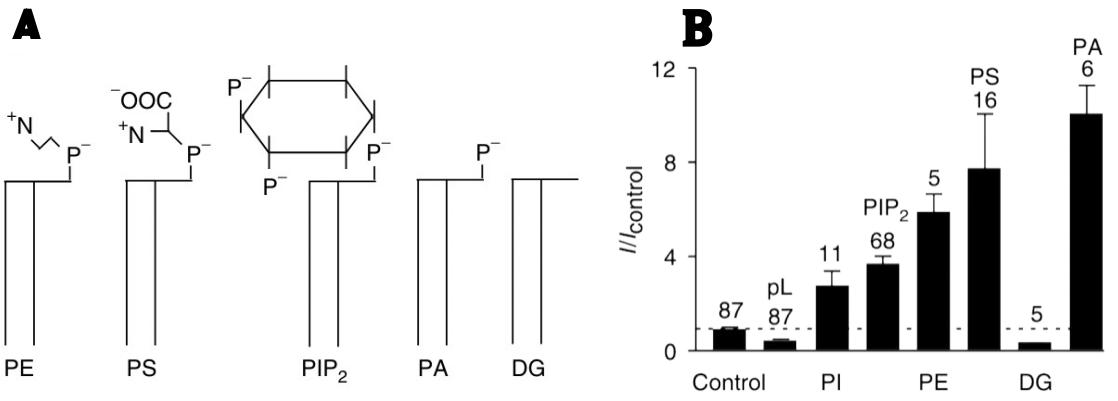

Figure 20

Régulation du canal TREK-1 par les phospholipides

A. *Diagramme des différents phospholipides.* ***B.*** *Effets des différents phospholipides (5 µM) sur l'activité du canal TREK-1, en configuration inside-out. Phosphatidyléthanolamine (PE), Phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2), phosphatidylinositol (PI), acide phosphatidique (PA), diacylglycérol (DG).* Figure adaptée de Chemin et al., 2005.

Comme les canaux Kir, l'activité du canal TREK-1 dépend de l'intégrité de ses interactions avec les phospholipides de la membrane (Chemin et al., 2005 ; Lopes et al., 2002 ; Huang et al., 1998). Le phosphatidylinositol (PIP2) et la phosphatidylsérine sont des phospholipides de la membrane. Leur application en configuration *inside-out* de la technique de patch-clamp augmente l'activité du canal TREK-1 (Chemin et al., 2005). La présence d'une tête polaire, chargée négativement, semble être indispensable aux phospholipides pour activer le canal TREK-1 puisque le diacylglycérol (apolaire) n'active pas le canal TREK-1(Chemin et al., 2005) (**Figure 20**).

La polylysine est une molécule cationique connue pour masquer les charges négatives des phospholipides de la membrane. Lorsqu'elle est appliquée sur la face interne de la cellule, en

configuration *inside-out* de la technique de patch-clamp, l'activité du canal TREK-1 est inhibée. Après un traitement à la polylysine, l'application de PIP2 intracellulaire, les pressions négatives et même l'acidification intracellulaire ne peuvent plus activer le canal TREK-1 (Chemin et al., 2005) (**Figure 21**).

Ainsi, les charges négatives des phospholipides à pH physiologique leur sont indispensables pour interagir avec le canal TREK-1. Les phospholipides se lient à TREK-1 sur une région du domaine C-terminal contenant une série de 5 résidus chargés positivement : R297, K301, K302, K304, R311. La délétion de ces résidus rend le canal TREK-1 résistant au PIP2 (Chemin et al., 2005). La sensibilité au pH et aux pressions négatives de TREK-1 dépendent de l'intégrité des interactions de TREK-1 avec les phospholipides de la membrane. Le canal TREK-1 peut basculer d'un mode voltage-dépendant à un mode de fuite (« *leak* ») lorsqu'il est modulé par les phospholipides comme le PIP2 et l'acidification du pH intracellulaire (**Figure 21**).

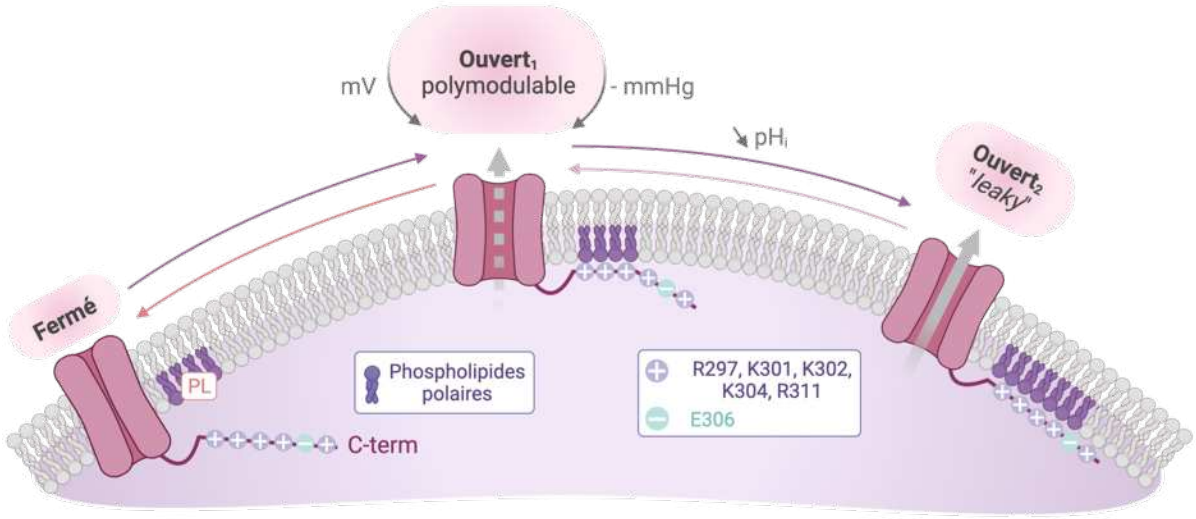

Figure 21

Modèle de régulation de l'ouverture du canal TREK-1 par les phospholipides de la membrane

La capacité de TREK-1 à être poly-modulé dépend de l'intégrité des interactions électrostatiques entre les résidus polaires (+) de son domaine C-terminal et les phospholipides de la membrane (Ouvert$_1$). Une altération de ces interactions par la polylysine (PL) inhibe le canal (fermé). Dans cet état fermé, le PIP2 et l'acidification du pH$_i$ n'activent pas le canal. L'acidification du pH$_i$ fait basculer le canal d'un mode voltage-dépendant et poly-modulable,

à un mode de fuite (« leaky »). Le résidu E306 chargé négativement à pH physiologique est le senseur de pH intracellulaire.

b. Les acides gras poly-insaturés

Comme TRAAK et TREK-2, TREK-1 est réversiblement activé par l'acide arachidonique (AA) (Patel et al., 1998) et de nombreux autres acides gras poly-insaturés libres. L'effet activateur de l'AA sur TREK-1 est observé en configuration cellule-entière et en patch excisé. L'activation de TRAAK par l'AA est indépendante de son métabolisme puisque son effet n'est pas prévenu par la présence d'inhibiteurs des enzymes lipoxygénases (nordihydroguaiaretique et acide eicosatetraynoïque), cyclooxygénases (indomethacine), époxygénase (clotrimazole) (Fink et al., 1998). L'ensemble du **CHAPITRE 5** fait l'état de l'art et discute de nouveaux résultats sur la régulation du canal TREK-1 par les acides gras poly-insaturés. A ce jour dans la littérature, il existe au moins deux hypothèses sur le mécanisme d'action permettant aux acides gras d'activer le canal TREK-1 :

(1) les acides gras sont des molécules amphipatiques anioniques qui activent TREK-1 *via* une voie mécano-sensible en s'insérant dans le feuillet externe de la membrane et en modifiant les tensions membranaires (**Figure 19**).

(2) Les acides gras interagissent directement avec le canal TREK-1 en formant des liaisons hydrogènes et/ou électrostatiques *via* leur extrémité polaire, comme les phospholipides (**Figure 21**).

Bien que TREK-1 soit activé par les acides gras poly-insaturés, aucune étude comparative de l'effet de plusieurs acides gras n'a été faite. Une telle étude comparative a été réalisée pour le canal TRAAK (Fink et al., 1998) et le canal TREK-2 (Lesage et al., 2000 et Bang et al., 2000) (**Figure 22**). Au cours de ma thèse, nous avons réalisé une étude comparative des effets de plusieurs acides gras de 0 à 6 insaturations qui nous en apprend davantage sur le mécanisme

d'action des acides gras dans l'activation du canal TREK-1 (voir partie « **Activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés** »).

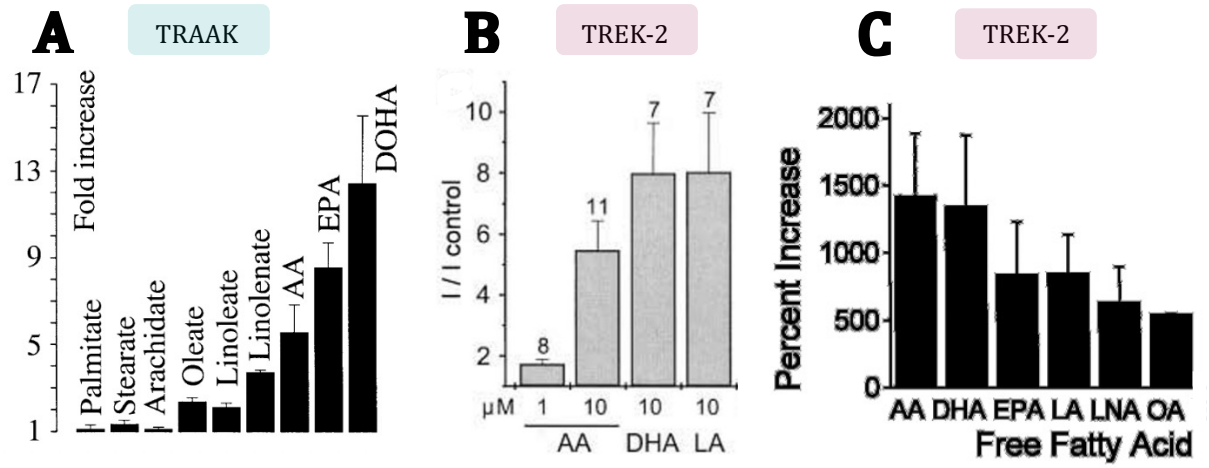

Figure 22

Activation des canaux TRAAK et TREK-2 par les acides gras poly-insaturés

A. *Activation de TRAAK à +50 mV dans des cellules COS transfectées transitoirement (1 µg pIREScd8-TRAAK) par différents acides gras saturés, monoinsaturés et poly-insaturés à 10 µM en configuration cellule-entière. Le « fold increase » correspond au* I_{max}/I_0. *AA pour acide arachidonique, EPA pour acide eicosapentaénoïque et DHA pour acide docosahexaénoïque.* ***B.*** *Activation de TREK-2 à 0 mV dans des cellules COS transfectées transitoirement (0,2 µg pIRES-CD8 TREK-2) par l'AA, le DHA et l'acide linoléique (LA) aux concentrations indiquées, en configuration cellule-entière.* ***C.*** *Activation de TREK-2 dans des cellules COS transfectées transitoirement (pcDNA3.1/TREK-2) par 20 µM d'AA, de DHA, d'EPA, de LA, d'acide linolénique (LNA) ou d'acide oléique en configuration inside-out. Les données sont exprimées en pourcentage d'augmentation par rapport au* I_0. Figure adaptée de : A. Fink et al., 1998 ; B. Lesage et al., 2000 ; C.Bang et al., 2000.

D. FONCTIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE TREK-1

La constante modulation de TREK-1 par son environnement suggère que la fraction de canaux TREK-1 actifs varie en permanence et donc l'excitabilité des cellules (cardiomyocytes et neurones) dans lesquels il est exprimé varie également.

1. FONCTIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE TREK-1 DANS LE DOMAINE CARDIOVASCULAIRE

Voir Annexe : revue publiée en 2022

Bechard E, Bride J, Le Guennec J-Y, Brette F & Demion M (2022) TREK-1 in the heart: Potential physiological and pathophysiological roles. Front Physiol 13: 1095102

Le canal TREK-1 est exprimé dans les cellules cardiaques atriales et ventriculaires. Son expression est hétérogène : 17 fois plus élevée (ARNm) dans le tissu endocardique que dans le tissu épicardique (Tan et al., 2004 ; Kelly et al., 2006 ; Wiedmann et al., 2021). Bien que des changements dans l'expression ou dans la fonction de TREK-1 sont impliqués dans des processus physiopathologiques, aucun rôle physiologique ne lui a encore été attribué au niveau cardiaque. TREK-1 est un canal ouvert dans toute la gamme de potentiels physiologiques, même au potentiel de repos, produisant un courant rectifiant dans le sens sortant. Au regard de ses propriétés électrophysiologiques, ce canal exprimé dans les cardiomyocytes, contribue à l'hyperpolarisation du potentiel de membrane au repos et participe aussi à la régulation de la durée du potentiel d'action (APD) (Kamathan et al., 2019 ; Benoist et al., 2014 ; Kelly et al., 2006). La difficulté dans l'étude du rôle physiologique de TREK-1 est qu'il n'existe à ce jour aucun inhibiteur spécifique de ce canal.

Si le rôle physiologique de TREK-1 n'est pas complètement élucidé, son association avec des pathologies cardiaques nous permet de faire certaines inférences.

a. TREK-1 dans l'infarctus du myocarde

Après un infarctus du myocarde, il y a une augmentation de l'instabilité électrique du tissu cardiaque, consécutive d'un remodelage électrique. Ce remodelage électrique est en partie associé à une diminution régionale de l'expression de canaux potassiques voltage-dépendants et de la conductance potassique (Huang et al., 2001). Les arythmies post-infarctus, consécutives de ce remodelage électrique de la membrane, représentent un risque majeur dans la survenue de la mort subite cardiaque.

Après l'infarctus, on retrouve un remodelage de l'expression du canal TREK-1. Son expression diminue dans la zone infarcie mais augmente dans la zone qui borde la zone infarcie (Zhao et al., 2011). L'asymétrie de la conductance potassique entre ces deux régions peut être responsable d'une hétérogénéité de la repolarisation et donc être arythmogène. D'autre part, l'étude de Kamathan et al., en 2019 montre que l'expression de TREK-1 est cardioprotectrice. Dans un modèle murin d'invalidation de TREK-1 (souris TREK-1 KO), la taille de l'infarctus et la dysfonction systolique augmente après la ligature définitive de l'artère coronaire gauche antérieure descendante. Ainsi, cette étude montre que cette délétion de TREK-1 accélère le remodelage ventriculaire post-infarctus.
Pendant l'infarctus, l'acidification intracellulaire et la libération de l'acide arachidonique par les phospholipases peuvent être responsables d'une activation du canal TREK-1. Ainsi, son activation faciliterait la repolarisation, en raccourcissant l'APD. En réduisant l'APD, TREK-1 permet de protéger les cardiomyocytes de la mort cellulaire et limite les dommages tissulaires, *via* une régulation de l'homéostasie calcique (Kamathan et al., 2019).

b. TREK-1 dans la régulation du rythme cardiaque

TREK-1 participe à la régulation du signal électrique cardiaque en régulant la repolarisation du potentiel d'action et l'homéostasie calcique intracellulaire. Les cardiomyocytes issus du modèle murin de délétion de TREK-1 présente un transitoire calcique plus long, avec un temps de recapture allongé et une augmentation de l'APD (Kamathan et al., 2019). Ces résultats suggèrent un rôle de TREK-1 dans la régulation du rythme cardiaque en physiologie et pathologie.

La fibrillation atriale, qui est l'une des arythmies les plus commune, est en partie associée avec un remodelage électrique responsable de l'altération de la repolarisation et de la conduction (Schmidt et al., 2011 ; Wakili et al., 2011 ; Dobrev et al., 2012). On observe chez les patients présentant une fibrillation atriale compliquée par une insuffisance cardiaque, une diminution de l'expression de TREK-1 (ARNm) dans les cellules atriales (-82%) (Schmidt et al., 2013 ; Schmidt et al., 2017 ; Lugenbiel et al., 2017). Cette diminution de l'expression de TREK-1 est reproduite dans un modèle cochon de fibrillation atrial avec une réduction de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (Lugenbiel et al., 2017). La diminution de l'expression de TREK-1 dans ce modèle est également associée à une augmentation de l'APD et de la période réfractaire ainsi qu'à une augmentation de la susceptibilité aux extrasystoles. Cette étude qui propose une thérapie génique pour restaurer le niveau d'expression de TREK-1, montre que la thérapie permet d'augmenter le courant TREK-1, réduire l'APD et retrouver un rythme sinusal. Ainsi, le développement de la fibrillation trial est associé avec une altération de l'expression de TREK-1 et de son courant.

TREK-1 est donc une bonne cible thérapeutique dans la prise en charge de la fibrillation atriale. Il est également une cible intéressante dans les thérapies antiarythmiques puisque la modulation de son activité permet de moduler la forme du potentiel d'action au travers de la durée du potentiel d'action et de diminuer l'excitabilité cellulaire.

2. FONCTIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE TREK-1 DANS LE DOMAINE DES NEUROSCIENCES

TREK-1 est exprimé dans le système nerveux central avec une forte expression dans le thalamus, l'hippocampe et le cervelet (Talley et al., 2001 ; Hervieu et al., 2001 ; Lauritzen et al., 2000 ; Fink et al., 1996). Il est exprimé au niveau des éléments pré- et post-synaptiques et participe donc à la régulation de l'exocytose des neurotransmetteurs et à la transmission de l'information (Lauritzen et al., 2000).

a. Rôle dans la neuroprotection de l'épilepsie

TREK-1 est activé par les acides gras poly-insaturés comme l'acide arachidonique, l'EPA et le DHA. Les acides gras poly-insaturés présentent des effets neuroprotecteurs en diminuant l'hyperexcitabilité neuronale et donc la susceptibilité à l'épilepsie (Lauritzen et al., 2000) (voire partie « **Neuroprotection par les acides gras poly-insaturés** »). Au moins une partie des effets protecteurs des acides gras poly-insaturés est attribuée à l'activation du canal TREK-1.

Une forte neuroprotection lors d'une épilepsie déclenchée par l'acide kaïnique (agoniste des récepteurs aux glutamates) est observée par l'injection intraveineuse d'acide α-linolénique, de DHA et d'AA (Blondeau et al., 2002 ; Lauritzen et al., 2000). L'invalidation du gène *KCNK2* codant pour TREK-1 (*Trek-1*$^{-/-}$) chez les souris les rend plus vulnérables aux épilepsies déclenchées par l'acide kaïnique et le PTZ (pentylènetétrazole, inhibiteur des récepteurs au GABA) (Heurteaux et al., 2004). La protection apportée par l'injection d'acide gras poly-insaturés est perdue chez les animaux *Trek-1*$^{-/-}$ montrant que l'effet neuroprotecteur passe pas l'activation de ce canal (Franks et Honoré., 2004 ; Heurteaux et al., 2004). Les souris Traak$^{-/-}$ ne présentent pas la même susceptibilité aux épilepsies que les souris Trek-1$^{-/-}$ suggérant un rôle neuroprotecteur spécifique du canal TREK-1 (Heurteaux et al., 2004).

L'activation de TREK-1 permet d'hyperpolariser les régions pré- et post-synaptiques. L'hyperpolarisation pré-synaptique ayant pour conséquence la diminution de l'excitotoxicité du glutamate tandis que l'hyperpolarisation post-synaptique permet de maintenir le blocage des récepteurs NMDA au glutamate par le Mg^{2+} (Lauritzen et al., 2000). De plus, TREK-1 est transitoirement activé par des molécules neuroprotectrices et anti-convulsivantes comme le Riluzole, utilisé dans le traitement de la sclérose latérale amyotrophique (dégénérescence des motoneurones) (Duprat et al., 2000).

b. Rôle de TREK-1 dans la physiopathologie de la dépression

La dépression est un trouble de l'humeur qui résulte en partie d'une altération de la neurotransmission sérotoninergique ; cette neurotransmission est insuffisante. Les traitements communs proposés pour les troubles dépressifs sont les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (IRS) parmi lesquels on retrouve la molécule active du Prozac®, la fluoxétine, la paroxétine et l'amitriptyline. TREK-1 est exprimé dans les neurones au niveau des éléments

pré- et post-synaptiques (Lauritzen et al., 2000) et impliqué dans la régulation de l'humeur. Son rôle dans la régulation de l'humeur a pu être mis en évidence grâce au modèle murin d'invalidation du canal Trek-1$^{-/-}$. Dans ce modèle, l'évaluation de l'état dépressif est permise par les tests comportementaux comme le test de natation forcée (ou le test du désespoir). La fluoxétine, la paroxétine et l'amitriptyline améliore l'état dépressif chez les rongeurs Trek-1$^{+/+}$ mais n'affecte pas les rongeurs Trek-1$^{-/-}$ qui présentent déjà un une résistance à la dépression (Heurteaux et al., 2006). De plus, les neurones sérotoninergiques possèdent des autorécepteurs qui permettent un *feedback* négatif de la neurotransmission sérotoninergique. Les autorécepteurs 5HT-$_{1A}$ sont des récepteurs couplés à la protéine Gα_i qui est associée à une déphosphorylation de TREK-1 et à son activation (**Figure 18**) (Cain et al., 2008). L'invalidation Trek-1$^{-/-}$ préviendrait l'hyperpolarisation pré-synaptique induite par l'activation de TREK-1 par levée de sa phosphorylation et contribuerait à l'augmentation de la transmission de la sérotonine (Honoré et al., 2007 ; Gordon et al., 2006).

Ainsi, dans le traitement de la dépression, c'est un inhibiteur sélectif du canal TREK-1 qui est cette fois recherché, afin d'augmenter l'excitabilité de l'élément pré-synaptique. L'augmentation de l'exocytose de la sérotonine induite par cette hyperexcitabilité, associée aux inhibiteurs de la recapture de la sérotonine contribuerait à l'augmentation de la neurotransmission sérotoninergique et donc au rétablissement de l'humeur (Heurteaux et al., 2006 ; Kennard et al., 2005).

CHAPITRE 3 : PRINCIPES ET TECHNIQUES D'ELECTROPHYSIOLOGIE

A. PETITE HISTOIRE DE L'ELECTROPHYSIOLOGIE

1. UNE ETYMOLOGIE ANECDOTIQUE

Le mot « électrophysiologie » vient du grec : ἤλεκτρον (*elektron* qui veut dire « ambre », φύσις (*physis* qui veut dire « nature ») et -λογία, (*-logia* qui veut dire « étude »).

Mais quelle est l'histoire de l'« ambre » dans l'électrophysiologie ? C'est peut-être dans cette partie que vous apprendrez la chose la plus intéressante de cette thèse. J'ai un moment cherché le rapport entre l'ambre et l'électricité et je pense l'avoir trouvé. Le mot « ambre » fait référence à la chute de Phaéton, qui dans la mythologie grecque était considéré comme le fils du dieu soleil Helios et de Clymène. Phaéton fût foudroyé par le dieu du tonnerre Zeus à la suite d'une petite incartade dans le ciel qui embrasa la terre. Toujours pas de rapport avec l'« ambre » ? Phaéton foudroyé, ses sœurs pleurèrent tant qu'elles furent changées en peupliers. Ainsi, leurs larmes produisirent l'*électrum*, ou l'ambre, une résine fossilisée, sécrétée par certains arbres comme les peupliers (Pline, Naturalis Historia, XXXVII).
L'électrophysiologie étudie alors les phénomènes électriques qui se produisent dans la nature, dans les cellules comme les neurones ou les cellules musculaires, mais aussi dans les plantes.

Alors que l'ambre jaune s'appelait déjà « *êlektron* » 600 avant J.C, c'est le mathématicien et philosophe grec Thalès de Millet qui fit le premier rapport de l'électricité statique produite par l'ambre. Bien-sûr il ne l'appela pas électricité statique, mais il se rendit compte qu'en polissant un ambre avec une peau de chat, la résine fossile devenait capable d'attirer à elle des corps légers : « L'ambre et l'aimant, doués d'une âme, attirent les corps légers comme par un souffle ». C'est William Gilbert (1544-1603) au début du XVIIème siècle qui parla le premier d'électricité en forgeant l'adjectif « électrique » pour comparer les matériaux qui comme l'ambre (« *êlktron* »), une fois frottés, attiraient des corps légers.

2. 1791 - L'UNE DES PREMIERES EXPERIENCES D'ELECTROPHYSIOLOGIE

Honte à moi si je me trompe, mais il me semble que les premières expériences d'électrophysiologie commencent avec Luigi Galvani (1737-1798), un physicien et médecin du XVIIIème siècle et sa théorie sur l'électricité animale (1791). Il fût le premier à s'interroger sur la nature électrique de la conduction nerveuse et le mécanisme de la contraction musculaire. Ainsi, dans ses premières expériences en 1780, Galvani compara les effets de la contraction du quadriceps suite au stimulus électrique du nerf crural de grenouille, ligaturé ou non, à l'aide d'un « arc métallique ». Le but était de tester la conduction du signal électrique le long du nerf. Le résultat de ces expériences confirma sa théorie « neuroélectrique » selon laquelle un signal électrique peut courir le long d'un tissu nerveux et que la contraction du muscle peut être évoqué même par un très faible stimulus électrique tel que celui provenant d'une bouteille de Leyden (ancêtre du condensateur), quasiment déchargée (Piccolino 2006). Ainsi Galvani est l'un des fondateurs de l'électrophysiologie.

3. 1840 - POTENTIEL DE REPOS ET POTENTIEL D'ACTION

Dans la tradition de Galvani et sa théorie de l'électricité animale, Carlo Matteucci (1811-1868) réussi à enregistrer le courant électrique dans un muscle au repos, grâce à un galvanomètre. Autrement dit, Matteucci fut le premier à enregistrer le courant de repos, qu'il appela « courant de blessure », qui existe entre un muscle et sa surface. Il observa que ce courant électrique est modifié durant la contraction du muscle. Ce courant électrique correspond aujourd'hui à ce que l'on appelle le potentiel de repos.

C'est Matteucci qui influença les travaux d'Émil Du Bois-Reymond (1818-1896) dans lesquels ce dernier observa une « fluctuation négative », générant un courant d'action et permettant la contraction des muscles. Ce n'est qu'après 1926 que cette « fluctuation négative » sera appelée potentiel d'action.

4. 1827 – LA LOI D'OHM

a. La loi d'Ohm en physique

Galvani introduisit l'électricité dans la physiologie animale quelques années avant que Georg Simon Ohm (1789-1854) ne publie la loi d'Ohm, liant l'intensité d'un courant électrique et la tension aux bornes d'un dipôle électrique, ou conducteur :

(1) U = R . I (la loi qui est sensée vous sauver la vie devant un post de patch qui ne marche pas).

Avec U la tension (Volts, V) aux bornes de la résistance du dipôle électrique, R la valeur de la résistance (Ohms, Ω) et I l'intensité du courant électrique (Ampères, A) traversant la résistance. Ainsi, lorsque l'on soumet un objet à une tension U, ou différence de potentiel, on déclenche la circulation de charges électriques quantifiée par I, l'intensité du courant et la résistance R s'exprime :

(2) $R = \frac{U}{I}$

La résistance est liée à la résistivité, c'est-à-dire à la capacité d'un matériau, ou d'un canal ionique, à s'opposer à la circulation du courant électrique (les ions en physiologie). Cette résistance est l'inverse de la conductivité (G, S/m), c'est-à-dire la capacité d'un matériau, ou d'un canal ionique, à laisser passer les charges électriques (le courant, les ions) :

(3) $R = \frac{1}{G}$

La loi d'Ohm signe le début de l'analyse des circuits électriques, y compris les circuit R-C (résistance-condensateur), auxquels s'apparenteront plus tard les membranes biologiques qui contiennent des canaux ioniques.

b. Modèle électrique des membranes biologiques selon la loi d'Ohm

La membrane d'une cellule s'apparente donc à un circuit RC, c'est-à-dire un circuit électrique composé d'une résistance (Rm, la résistance membranaire) et d'un condensateur (les phospholipides de la membrane) montés en parallèle (**Figure 23**).

.

La membrane :

La membrane se comporte comme un condensateur, c'est-à-dire comme un dipôle électrique capable d'accumuler des charges électriques, de part et d'autre d'un isolant (les phospholipides de la membrane), lorsqu'elle est mise sous tension (charge) et de les restituer (décharge) (**Figure 23.A**).

(4) $Q = C.U$

Avec Q la quantité de charge électrique accumulée sur chaque borne du condensateur (exprimée en Coulombs), C la capacité (en Faradays) et U la tension entre les bornes du dipôle électrique (en Volts).

Il est alors possible de déterminer la capacité d'une membrane, correspondant à sa capacité à accumuler les charges de part et d'autre des phospholipides :

(5) $C = \frac{Q}{U}$

Il existe alors une relation positive entre la taille de la membrane et sa capacité à accumuler des charges, nous permettant d'évaluer la taille d'une cellule (**Figure 23.A**). Pour une membrane biologique, la capacité moyenne est de 1 $\mu F/cm^2$ ou 0,01 $pF/\mu m^2$.

Les canaux ioniques :

La résistance membranaire (Rm), exprimée en Ohm, s'oppose au passage des électrons. Elle s'exprime en MΩ ou GΩ. Les canaux ioniques correspondent aux conductances de ce circuit

RC, c'est-à-dire qu'ils vont permettre le passage des électrons (les charges portées par les ions) au travers de la résistance de la membrane (**Figure 23.B**). Pour parler des canaux ioniques en électrophysiologie, on choisit d'exprimer la conductance ionique telle que :

(6) $\mathbf{G = \sum G_i = \sum \frac{1}{R_i}}$

Avec G la conductance (Siemens) et R la résistance (Ohm).

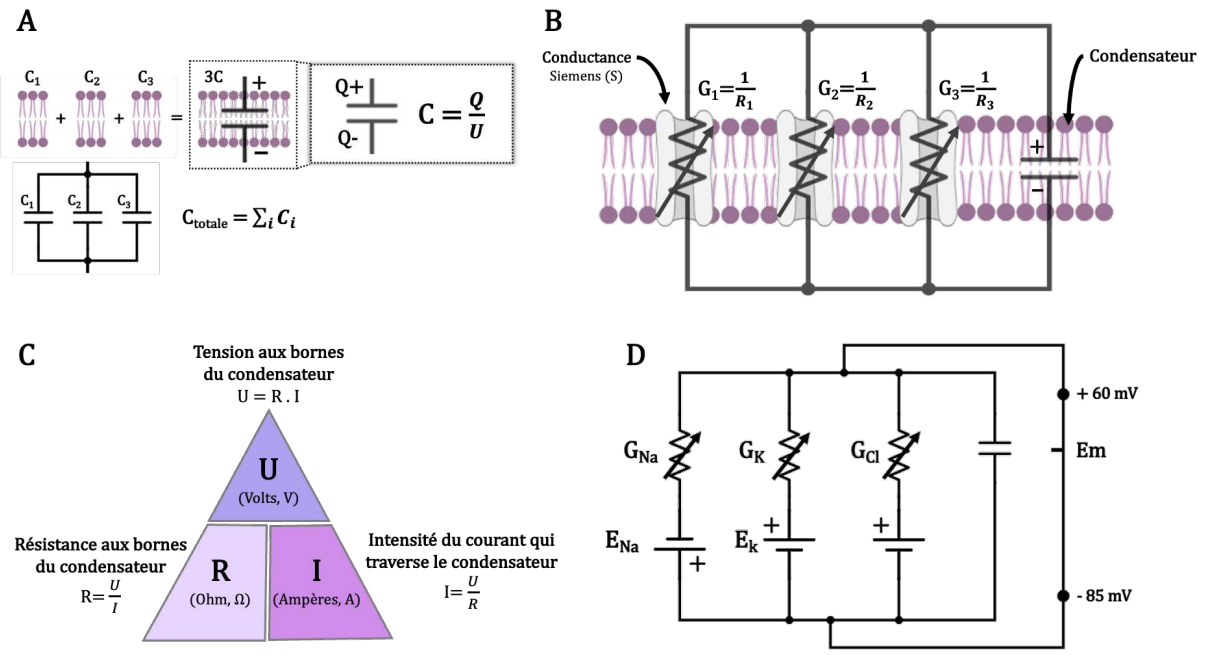

Figure 23

Analogie entre le circuit RC et la membrane biologique

(A) *Les phospholipides de la membrane forment un excellent isolant permettant à la membrane biologique de se comporter comme un condensateur électrique. La membrane possède une capacité (C en Farads) correspondant à l'accumulation de charges électriques (Q en Coulombs) sur les conducteurs de part et d'autre de l'isolant quand elle est soumise à une tension (U en Volts). Chaque portion de phospholipides de la membrane correspond à une capacité (C_i) et la somme des capacités traduit la capacité totale de la membrane. Plus la membrane est grande, plus la capacité sera élevée.* ***(B)*** *La membrane se comporte comme un circuit RC (Résistance-Condensateur) où les canaux ioniques représentent les conductances du circuit, l'inverse de la résistance. La résistance s'oppose à la circulation du courant. En*

*électrophysiologie, on parle de conductances ioniques (K^+, Na^+, Cl^-). **(C)** C'est la loi d'Ohm qui relie l'intensité d'un courant électrique au travers d'un condensateur avec la tension aux bornes de ce condensateur. **(D)** Circuit RC de la membrane comprenant les conductances majoritaires dans l'établissement du potentiel de membrane Em (mV). Le gradient de concentration est assimilé à une pile de force électromotrice égale au potentiel d'équilibre de l'ion considéré. Pour le K^+, la borne négative de la pile est dirigée vers le milieux intracellulaire puisque E_K est de signe négatif. La pile est en série avec la conductance G_K. Le potentiel de membrane s'établit entre le potentiel d'équilibre du sodium (E_{Na} = +60 mV) et le potentiel d'équilibre du potassium (E_K = -85 mV) en fonction de leurs conductances respectives. Au repos, la conductance majoritaire est la conductance potassique G_K, la membrane se comporte donc comme une pile au potassium et Em est tiré vers E_K.*

5. 1855 - LA LOI DE DIFFUSION DE FICK

En 1855, Adolf Eugene Fick (1829-1901) établi la loi de la diffusion de la matière par analogie avec l'équation de la chaleur (Joseph Fourrier, 1822). Cette loi de diffusion traduit la relation linéaire existante entre le flux de diffusion de la matière et son gradient de concentration ; un phénomène spontané, inévitable et irréversible qui mène à un état d'homogénéité ou d'équilibre des concentrations d'un soluté qui compose un milieu. De manière simplifiée, la diffusion d'un ion K^+ par exemple, se fait du compartiment le plus concentré vers le moins concentré si ces deux compartiments sont séparés par une membrane hémiperméable (ce qui est le cas des membranes biologiques, grâce aux canaux de fonds potassiques) (**Figure 24.A**). Ainsi la loi de Fick donne accès au flux de diffusion ou le flux massique d'un soluté :

(7) $$\frac{\Delta n}{\Delta t} = -D_i \cdot \frac{\Delta C}{\Delta x} \cdot S$$

Avec Δn la quantité de mole qui va passer d'un compartiment à l'autre dans un temps Δt, d'où $\frac{\Delta n}{\Delta t}$ le flux de diffusion (mol.cm^{-2}.s^{-1}), D_i le coefficient de diffusion d'un ion (cm^2.s^{-1}), le signe négatif indique que la diffusion se fait dans le sens des concentrations décroissantes (Robinson

and Stokes., 1965 ; Hille., 2001), $\frac{\Delta C}{\Delta x}$ le gradient de concentration ou fraction massique et S la surface qui sépare les deux compartiments (cm^{-2}).

6. 1889 – L'EQUATION DE NERNST : POTENTIEL ELECTROCHIMIQUE D'UN ION

a. Origine de la différence de potentiel de part et d'autre d'une membrane

En accord avec la théorie de la dissociation de Svante August Arrhénius (1859-1927), lorsque du KCl est mis en solution, il se produit une réaction de dissociation telle que :

(8) $KCl_{(s)} \rightarrow K^+_{(aq)} + Cl^-_{(aq)}$

A la lumière de la loi de Fick décrite précédemment, un flux de K^+ et de Cl^- va se produire pour atteindre l'équilibre de leurs concentrations de part et d'autre de la membrane hémiperméable. Si la membrane hémiperméable n'est perméable qu'au K^+, alors les ions K^+ vont diffuser vers l'autre compartiment selon le gradient de concentration. Le compartiment initial accumule les charges négatives du Cl^- qui ne diffuse pas, tandis que le second compartiment accumule les charges positives du K^+ qui lui est perméant. En plaçant une électrode dans chaque compartiment, on constate qu'il existe donc une différence de potentiel entre les deux compartiments (**Figure 24.B**).

b. L'équation de Nernst de but en blanc

Dans l'exemple précédent, nous avons considéré la diffusion du K^+ uniquement selon son gradient de concentration. Or, les ions sont chargés, positivement ou négativement selon la nature de l'ion, et leur diffusion doit prendre en compte non seulement le gradient de concentration, mais aussi le gradient électrique :

(9) $I_{K^+} = I_{diff} + I_{cond}$

Le courant potassique I_K correspond à la somme du courant de diffusion I_{diff} selon le gradient de concentration et du courant de conduction I_{cond} selon le gradient électrique en sens inverse, dû à l'accumulation de charges de chaque côté de la membrane.

On parle alors de potentiel électrochimique de l'ion. Ce potentiel électrochimique, appelé potentiel d'équilibre de l'ion, est atteint lorsque le gradient de concentration est de même valeur absolue que le gradient électrique, mais de signe opposé (**Figure 24.B**).

Entre 1888 et 1889, Walther Nernst (1864-1941) posa la base de l'électrochimie avec l'équation qui porte son nom, permettant de calculer le potentiel électrochimique des ions, comme la somme du gradient de concentration et du gradient électrique :

(10) $\tilde{\mu} = R.T.Ln([ion]) + z.F.E$

Avec $\tilde{\mu}$ le potentiel électrochimique de l'ion (V), R la constante des gaz parfaits (8,31 $J.mol^{-1}.K^{-1}$), T la température absolue (K), Ln([ion]) le logarithme népérien de la concentration de l'ion considéré, z la valence de l'ion, F la constante de Faraday (96485 $C.mol^{-1}$) et E la valeur locale de potentiel électrique (V).
Considérant une cellule, nous avons à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule :

(11) $\tilde{\mu}_{extra} = R.T.Ln([ion]_{extra}) + z.F.E_{extra}$ et $\tilde{\mu}_{intra} = R.T.Ln([ion]_{intra}) + z.F.E_{intra}$

La différence de potentiel électrochimique de l'ion, c'est-à-dire l'énergie nécessaire au transport de l'ion d'un compartiment à un autre, devient donc :

(12) $\Delta\tilde{\mu} = \tilde{\mu}_{intra} - \tilde{\mu}_{extra} = R.T.Ln\left(\frac{[Ion]_{intra}}{[Ion]_{extra}}\right) + Z.F.Em$

Finalement, l'équation de Nernst nous permet de calculer la valeur de potentiel de membrane pour laquelle le flux net de l'ion perméant est à l'équilibre (E_{ion}), c'est-à-dire nulle ; $\Delta\mu = 0$:

(13) $\Delta\tilde{\mu} = 0 = R.T.Ln\left(\frac{[Ion]_{intra}}{[Ion]_{extra}}\right) + Z.F.Em$

(14) $E_{ion} = \frac{R.T}{Z.F} . Ln \frac{[Ion]_{extra}}{[Ion]_{intra}}$

Avec E_{ion} la valeur de potentiel de membrane pour laquelle l'équilibre est atteint (V), R la constante des gaz parfaits (8,31 $J.mol^{-1}.K^{-1}$), T la température absolue (Kelvin, K), Z la valence de l'ion perméant, F la constante de Faraday (96485 $C.mol^{-1}$), $[Ion]_{extra}$ et $[Ion]_{intra}$ les concentrations de l'ion dans les compartiments extracellulaire et intracellulaire (molaires, M).

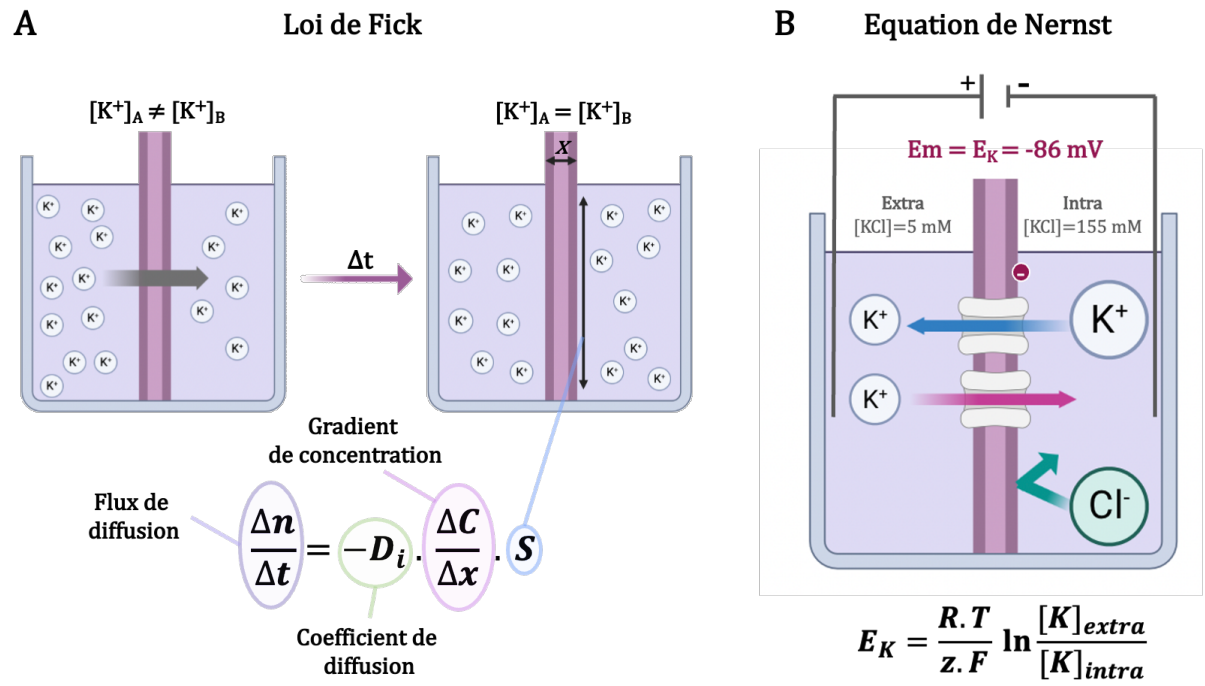

Figure 24

Diffusion de la matière et potentiel électrochimique d'un ion

(A) Illustration de la diffusion de la matière, décrite par la loi de Fick. Une molécule diffuse (exemple du K^+), au travers d'une membrane hémiperméable, selon son gradient de concentration, jusqu'à atteindre un état d'équilibre. (B) Illustration de l'équation de Nernst. Le potentiel électrochimique de l'ion (E_{ion}) est atteint lorsque le gradient électrique s'oppose totalement au gradient de concentration. Ce potentiel est alors appelé « potentiel d'équilibre » de l'ion considéré.

7. 1902 - THEORIE MEMBRANAIRE DE BERNSTEIN : SELECTIVITE POTASSIQUE DE LA MEMBRANE

Les membranes biologiques sont relativement imperméables aux ions ; leur passage passif est uniquement permis par l'ouverture transitoire de canaux ioniques. Ce fut Julius Berstein (1839-1917) qui avança le premier l'idée selon laquelle la membrane d'une cellule sépare les milieux intra- et un milieu extra-cellulaire de compositions ioniques différentes. Il fit également l'hypothèse que la membrane possède une sélectivité au potassium et que cette sélectivité était à l'origine de l'établissement du potentiel de repos. En reprenant l'équation de Nernst décrite précédemment, il confirma que le potentiel de repos s'établit au voisinage du potentiel d'équilibre du K^+ grâce à la sélectivité au potassium et que lors du potentiel d'action, décrit par Galvani puis Du Bois-Reymond, il y avait une perte transitoire de cette sélectivité au potassium (Seyfarth., 2006). Aujourd'hui, sa théorie membranaire est un concept fondamental qui demeure toujours valide.

Les membranes biologiques séparent de ce fait deux compartiments intra- et extra-cellulaires, aux compositions ioniques différentes (**Figure 25**). Cette asymétrie ionique est due à l'activités de canaux ioniques et autres transporteurs ioniques (pompe Na^+/K^+ ATP_{ase}, échangeurs Na^+/Ca^{2+} et Na^+/H^+). Ainsi, comme la composition des milieux intra- et extra-cellulaires, les charges accumulées de part et d'autre de la membrane sont asymétriques (**Figure 25**).

Alors, les membranes biologiques qui possèdent une grande résistance électrique et se comportent comme un condensateur, vont accumuler les charges électriques et du fait de l'asymétrie ionique, donnent naissance à une différence de potentiel transmembranaire Em :

(15) $Em = V_{Int} - V_{Ext}$

Avec Em le potentiel transmembranaire (V), V_{Int} le potentiel du milieu intracellulaire (V) et V_{Ext} le potentiel du milieu extracellulaire (V).

Comme l'a décrit il y a plusieurs années Bernstein, la conductance majoritaire des membranes biologiques au repos est la conductance potassique, nettement supérieure aux conductances calcique, sodique ou chlorure. Cette conductance potassique au repos est permise par la présence de canaux potassiques de fonds (Kir et K2P), ouverts dans toute la gamme de potentiels physiologiques et tirant ainsi le potentiel de repos vers le potentiel d'équilibre du K^+ (-85 mV). On dit alors que les membranes au repos se comportent comme des piles au potassium. Ainsi, l'équation de Nernst nous permet de calculer le potentiel de membrane (Em) au repos tel que :

(16) $$E_m \sim E_{K+} = \frac{R.T}{Z.F} . Ln \frac{[K]_{extra}}{[K]_{intra}}$$

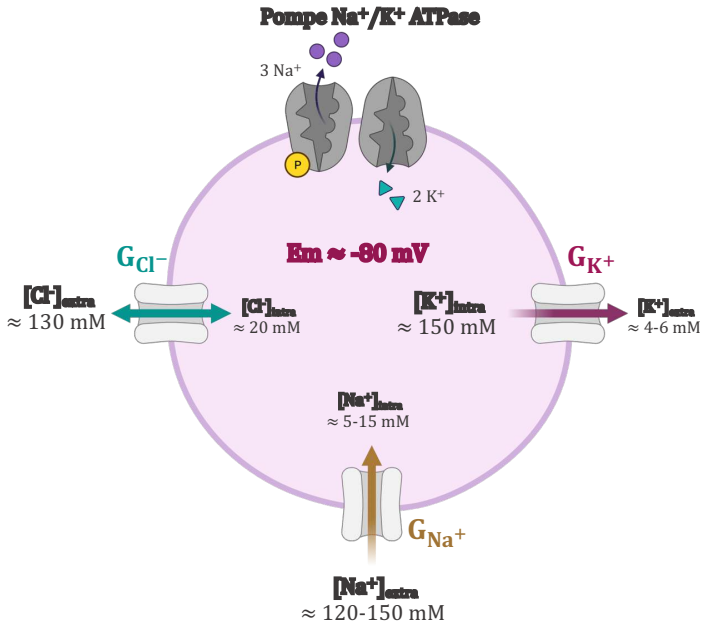

Figure 25

Asymétrie de la distribution des ions à l'origine de la différence de potentiel transmembranaire (Em)

La membrane des cellules contient trois types de canaux ioniques à l'origine du potentiel de membrane, permettant un transport passif des ions K^+, Na^+ et Cl^-. La pompe Na^+/K^+ ATPase extrude 3 Na^+ contre 2 K^+ importés contre leurs gradients de concentrations (transport actif). Le potentiel de membrane au repos est maintenu autour de -80 mV.

8. 1943 – L'EQUATION DE GOLDMAN-HODGKIN-KATZ : LA THEORIE DES CHAMPS CONSTANTS

Si nous prenons en compte que la membrane n'est pas uniquement perméable au K^+, l'équation de Goldman-Hodgkin et Katz (GHK) nous permet de calculer le potentiel de membrane Em en prenant en compte toutes les perméabilités ou conductances ioniques (Alvarez et Latorre., 2017). Cette équation s'établit selon deux principes qui bornent ses limites : (1) la membrane est constituée d'un matériel homogène donc le champ électrique est constant au travers de la membrane ; (2) les ions se déplacent indépendamment les uns des autres dans une direction *x*. Elle prend en compte la perméabilité ionique :

(17) $$P_i = \frac{D_i}{L}$$

Avec P_i la perméabilité pour un ion considéré dépendant de D_i le coefficient de diffusion de l'ion et de L l'épaisseur de la membrane.
Et l'équation se calcule telle que :

(18) $$Em = \frac{R.T}{F} . Ln \left(\frac{\sum_{cations} P_i .[C]_{extra} + \sum_{anions} P_i . [A]_{intra}}{\sum_{cations} P_i .[C]_{intra} + \sum_{anions} P_i . [A]_{extra}}\right)$$

Avec Em le potentiel de membrane, R la constante des gaz parfait, T la température absolue, F la constante de Faraday, P_i la perméabilité pour un ion considéré et [x] les concentrations intra- et extracellulaire des cations C et anions A.

Le potentiel de membrane s'établit majoritairement selon les conductances K^+ (z = +1), Na^+ (z = +1) et Cl^- (z = -1). Dans le calcul de l'équation de GHK, seuls les ions de valence +1 ou -1 sont considérés. On obtient donc :

(19) $$\mathrm{Em} = \frac{R.T}{F} . Ln \left(\frac{P_K .[K]_{extra} + P_{Na} .[Na]_{extra} + P_{Cl} .[Cl]_{intra}}{P_K .[K]_{intra} + P_{Na} .[Na]_{intra} + P_{Cl} .[Cl]_{extra}}\right)$$

Il est alors facile de concevoir qu'au repos, sachant que la seule conductance non nulle est la conductance potassique, le potentiel de membrane s'établit au potentiel d'équilibre du K^+:

(20) $$\mathrm{Em} = E_{K+} = \frac{R.T}{F} . Ln \left(\frac{\cancel{P_K} .[K]_{extra} + 0.\cancel{[Na]_{extra}} + 0.\cancel{[Cl]_{intra}}}{\cancel{P_K} .[K]_{intra} + \cancel{0.[Na]_{intra}} + \cancel{0.[Cl]_{extra}}}\right)$$

B. LA TECHNIQUE DE PATCH-CLAMP

1. LES CONFIGURATIONS DE LA TECHNIQUE DE PATCH-CLAMP

La technique de patch-clamp, introduite par Erwin Neher et Bert Sakmann en 1976 a permis de faire passer l'existence des canaux ioniques de la théorie à la réalité (Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1991). Grâce à cette technique, ils ont été les premiers à enregistrer l'activité unitaire du récepteur ionotrope de l'acétylcholine sur des fibres musculaires (Neher et al., 1978 ; Neher et Sakmann., 1976). Le premier montage utilisé à l'époque diffère de celui utilisé actuellement, mais le principe reste toujours la même (**Figure 26.A**). Dans leur première approche, il s'agissait d'isoler électriquement une portion de membrane d'une fibre musculaire grâce à une pipette de verre très fine (diamètre de 1 à 3 µm) en collant le plus possible la membrane à la pipette grâce au crochet (Neher et Sakmann., 1976).
Cependant, pour bien isoler électriquement la portion pipette-membrane il faut établir un contact très résistant, au-delà du GigaOhm (GΩ, unité de la résistance), en appliquant une dépression à l'intérieur de la pipette de verre jusqu'à la formation d'un oméga de membrane (forme de l'Ω) (Hamill et al., 1981, **Figure 26.B**). Ce contact étroit et résistant entre la pipette et la portion de membrane est appelé le « *seal* », qui se traduit par « sceau » ou « scellement » en français.

A partir de cet état de « *seal* », il existe plusieurs configurations de la technique de patch-clamp qui permettent d'enregistrer les courant ioniques qui transitent au travers des canaux ioniques

de la membrane sélectifs ou non d'un ion. Certaines configurations permettent d'enregistrer un courant unitaire, c'est-à-dire qui passe au travers d'un seul canal ouvert : on parle de la configuration cellule-attachée qui se fait sur une cellule entière ou des configurations *inside-out* et *outisde-out*, des configurations de patch-excisé (**Figure 27**). Pour ces 3 configurations, le diamètre de la pointe de la pipette doit être assez petit pour parvenir à isoler un seul canal et la résistance de la pipette (Rp) est généralement comprise entre 6 MΩ et 10 MΩ. Dans ces configurations, en voltage-imposé, on peut observer des créneaux de courant correspondant aux ouvertures et aux fermetures d'un canal (**Figure 27**). Ainsi, on peut étudier plusieurs paramètres de l'activité dynamique du canal : l'amplitude du courant unitaire (i en pA) qui donnera accès à la conductance (γ en pS) du canal et sa probabilité d'ouverture (Po). Grâce à ces paramètres on peut caractériser l'activité d'un canal dans des conditions basales et voir l'effet d'agents pharmacologiques par exemple. Un agent pharmacologique activateur du canal pourra être mis en évidence si la Po et/ou γ du canal augmentent et inversement pour un agent inhibiteur.

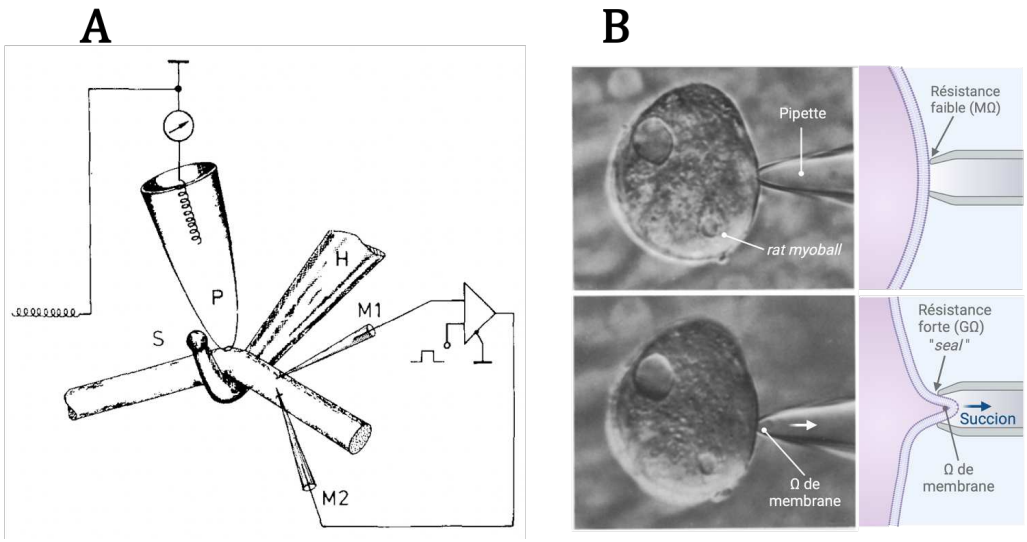

Figure 26

De l'approche de Neher et Sakmann en 1976 à la formation de l'Ω de membrane

(A) *Une portion de la membrane de la fibre musculaire est isolée par une fine pipette de verre (P) contenant une solution de Ringer et l'intérieur de la pipette est connecté électriquement grâce à une électrode Ag/AgCl. Dans ce montage, la force du seal ou résistance, est très faible et n'atteint pas le GigaOhm.* ***(B)*** *Illustration de la formation de l'Ω de membrane à partir d'un myoballe de rat à gauche et schématisation à droite. En haut, la pipette est posée au contact de la membrane, produisant un contact peu résistant. En bas, une succion permet la formation*

d'une vésicule dans la pointe de la pipette de la forme d'un Ω, d'où l'appellation d' Ω de membrane. Ce contact est alors hautement résistant et dépasse le GigaOhm. Figure adaptée de **(A)** Neher et Sakmann., 1976 et **(B)** de Hamill et al., 1981.

Une dernière configuration, cellule-entière, permet l'enregistrement de courants macroscopiques en accédant au milieu intracellulaire *via* la rupture de la portion de membrane isolée par le « *seal* » (Sigworth et al., 1986). Le courant macroscopique (I) correspond au courant traversant l'ensemble des canaux de la membrane :

(21) $I = N \times Po \times i$

Avec I le courant macroscopique (pA), N le nombre de canaux disponibles, Po la probabilité qu'un canal soit ouvert et i le courant unitaire.

Pour cette configuration, le diamètre de la pointe de la pipette est plus large, avec une résistance comprise entre 2 MΩ et 4 MΩ. Si la Rp est trop élevée, la résistance en série (Rs), correspondant à la somme de toutes les résistances du système, devient trop élevée et engendre des erreurs sur l'évaluation du voltage (erreur = Rs x Im). Ainsi, pour des courant de 1 nA et une résistance de 3 MΩ l'erreur d'évaluation du potentiel de membrane peut atteindre 3 mV ($10^6 \times 3.10^{-9}$), ce qui n'est pas négligeable.

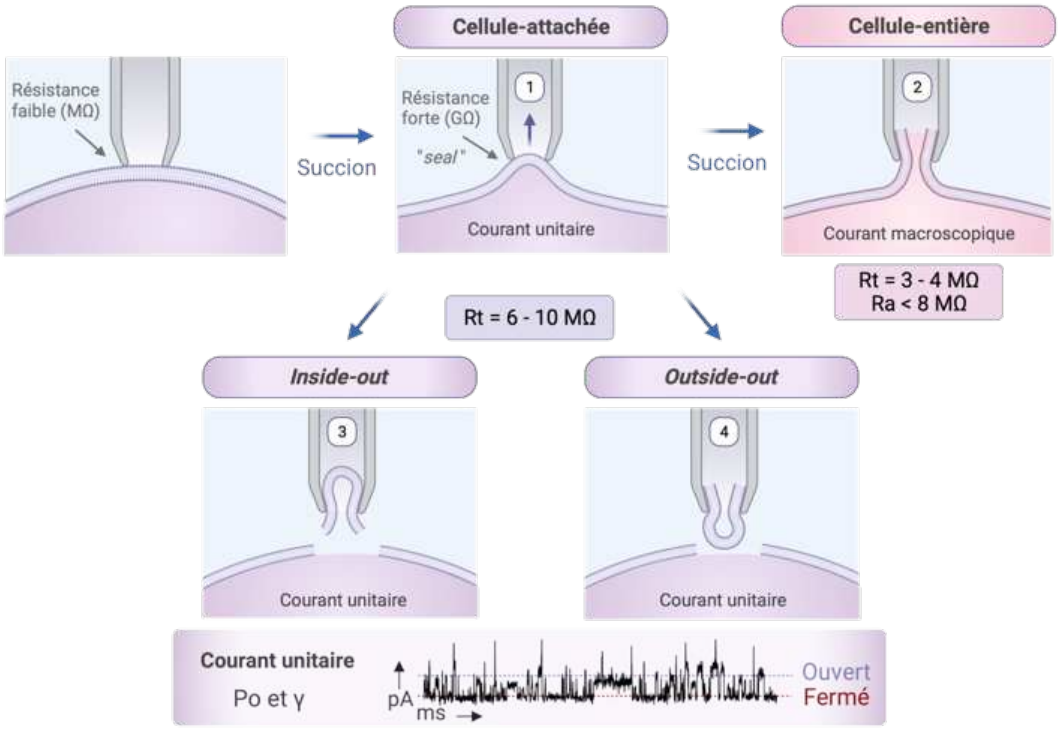

Figure 27

Les différentes configurations de la technique de patch-clamp

Les différentes configurations de la technique de patch-clamp s'acquièrent à partir de la configuration cellule-attachée. Cette configuration (1) est obtenue après une première succion exercée dans la pipette permettant de créer un contact étroit et hautement résistant ($\geq G\Omega$) entre la pipette de verre et la membrane de la cellule. La portion de la membrane sous la pipette est alors isolée du reste de la membrane permettant d'enregistrer le courant du seul (ou des quelques canaux) compris dans cette portion membranaire. Dans cette configuration, le milieu intracellulaire n'est pas contrôlé et le milieu contenu dans la pipette est de même composition que le milieu extracellulaire. La configuration cellule-entière (2) est obtenue après une deuxième succion exercée dans la pipette permettant la rupture de la portion de membrane isolée par la pipette en configuration (1). Une fois rompue, le milieu contenu dans la pipette dialyse le milieu intracellulaire, c'est pourquoi ils sont généralement équivalents. Dans cette configuration, les milieux intracellulaire et extracellulaire peuvent donc être contrôlés. La configuration cellule-entière est la seule configuration de patch permettant d'enregistrer un courant macroscopique. Les configuration (3) inside-out et (4) outside-out sont obtenues après avoir arraché la membrane à partir de la configuration (1). En configuration inside-out (3), le côté intracellulaire est exposé au milieu du bain et le côté extracellulaire est exposé au milieu contenu dans la pipette.

2. LES CONVENTIONS DE COURANT ET DE VOLTAGE

Pour l'acquisition et l'analyse des courants, il existe des conventions de courant et de voltage.

a. Les conventions de courant

a.1 Courants entrant et sortant

Pour les cations comme le potassium (K^+), un courant sortant correspond à un flux de cations, de la surface interne vers la surface externe de la membrane tandis qu'un courant entrant correspond à un flux de cations de la surface externe vers la surface interne de la membrane (**Figure 28**).

a.2 Courants positif et négatif

Un courant positif est un courant qui passe de la tête d'ampli à l'électrode et de l'électrode à la solution au travers de la membrane. Alors, selon la configuration de patch considérée un courant positif peut être entrant ou sortant (**Figure 28**).

Configuration cellule-entière : un courant positif est un courant sortant
Configuration cellule-attachée : un courant positif est un courant entrant
Configuration *inside-out* : un courant positif est un courant entrant
Configuration *outside-out* : un courant positif est un courant sortant

b. Les conventions de voltage

b1. La « polarité » des cellules

Nous avons vu précédemment qu'il existe un potentiel transmembranaire des cellules Em et que Em correspond à la valeur potentiel à la surface interne de la membrane moins le potentiel

à la surface externe de la membrane. Le potentiel Em des cellules est le plus généralement négatif, soit les cellules sont « polarisées » négativement.
Au niveau de la cellule intègre, un courant entrant de cations va conduire à une dépolarisation d'Em, c'est-à-dire qu'Em devient moins négatif, c'est un décalage positif d'Em. Un courant sortant de cations va conduire à une hyperpolarisation d'Em, c'est-à-dire qu'Em devient encore plus négatif, c'est un décalage négatif d'Em.

b2 La commande de potentiel V_{cmd} et le potentiel de membrane Em

Lorsque que l'on travaille en voltage-imposé, le potentiel imposé V_{cmd} commande le voltage à l'extrémité de l'électrode. V_{cmd} est toujours positif lorsqu'il augmente la valeur de potentiel dans la pipette. Ainsi, le décalage positif (dépolarisation) ou négatif (hyperpolarisation) d'Em dépend du signe de V_{cmd} et diffère selon la configuration de patch considérée (**Figure 28**).

Configuration cellule-entière : $Em = V_{cmd}$
Un décalage positif de V_{cmd} induit une dépolarisation d'Em et un décalage négatif de V_{cmd} induit une hyperpolarisation d'Em. Dans cette configuration c'est la valeur de potentiel de la surface interne (V_{int}) qui est commandée et la valeur de potentiel de la surface externe (V_{ext}) est égale à 0 mV (potentiel du bain). Ainsi, si $V_{cmd} = +30$ mV alors $Em = +30$ mV car $Em = V_{int} - V_{ext}$ avec $V_{ext} = 0$ mV et $V_{int} = V_{cmd}$.

Configuration cellule-attachée : $Em = - V_{cmd} + RMP$ (RMP = *resting membrane potential*)
Un décalage positif de V_{cmd} induit une hyperpolarisation d'Em et un décalage négatif de V_{cmd} induit une dépolarisation d'Em à partir de la valeur de RMP. Dans cette configuration, si RMP = -60 mV, $V_{cmd} = +30$ mV alors Em = -30 - 60 = -90 mV.

Configuration *inside-out* : $Em = - V_{cmd}$
Un décalage positif de V_{cmd} induit une hyperpolarisation d'Em et un décalage négatif de V_{cmd} induit une dépolarisation d'Em. Dans cette configuration c'est la valeur de potentiel de la surface externe (V_{ext}) qui est commandée et la valeur de potentiel de la surface interne (V_{int}) est égale à 0 mV (potentiel du bain). Ainsi, si $V_{cmd} = +30$ mV alors $Em = -30$ mV car $Em = V_{int} - V_{ext}$ avec $V_{int} = 0$ mV et $V_{ext} = V_{cmd}$.

Configuration *oustide-out* : $Em = V_{cmd}$

Un décalage positif de V_{cmd} induit une dépolarisation d'Em et un décalage négatif de V_{cmd} induit une hyperpolarisation d'Em. Dans cette configuration c'est la valeur de potentiel de la surface interne (V_{int}) qui est commandée et la valeur de potentiel de la surface externe (V_{ext}) est égale à 0 mV (potentiel du bain). Ainsi, si V_{cmd} = +30 mV alors Em = +30 mV car Em = V_{int} – V_{ext} avec V_{ext} = 0 mV et V_{int} = V_{cmd}.

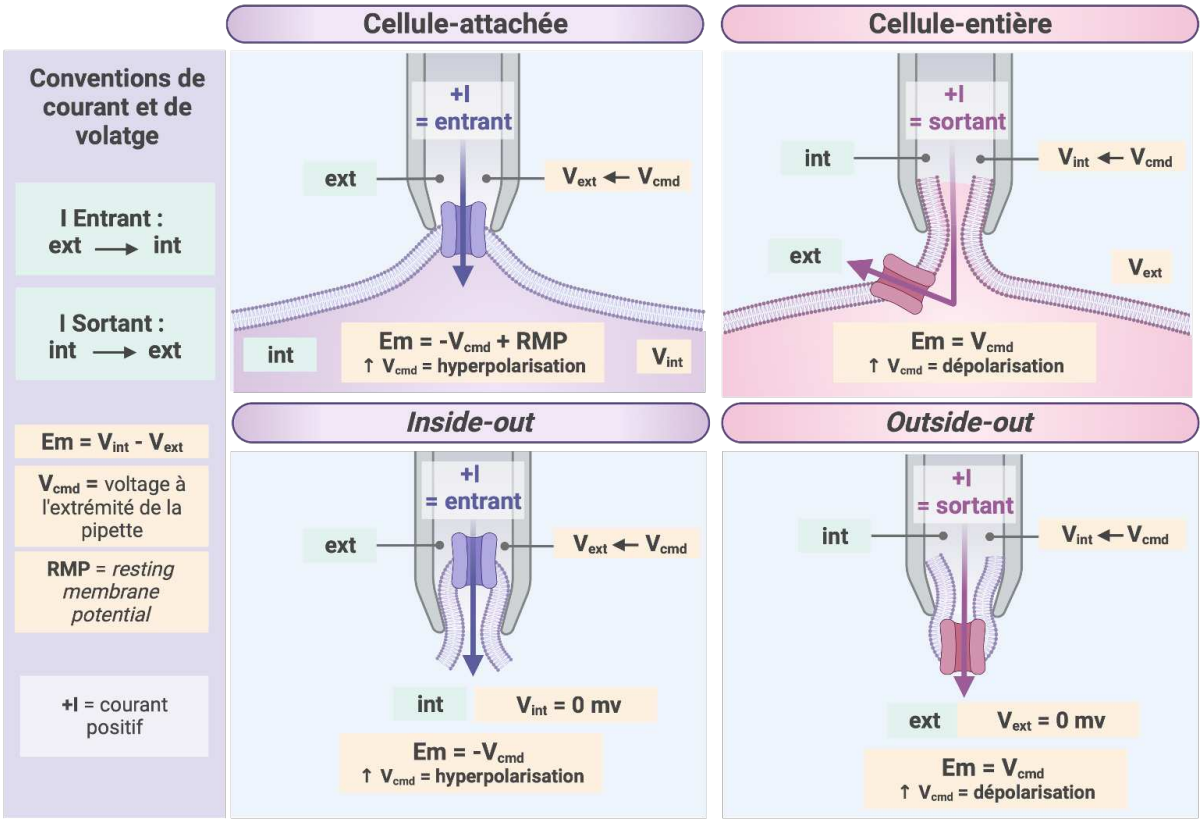

Figure 28

Les conventions de courant et de voltage des configurations de la technique de patch-clamp

Les conventions de courant et de voltage sont rappelées à gauche. Un courant entrant (I Entrant) est un courant dont le flux est dirigé de la face externe (ext) vers la face interne (int) de la membrane. A l'inverse, un courant sortant (I Sortant) est un courant dont le flux est dirigé de la face interne (int) vers la face externe (ext) de la membrane. Un courant positif (+I) est un courant dont le flux est dirigé de la pipette vers la solution. En configurations cellule-attachée et inside-out, un courant positif (+I) est un courant entrant. En configurations cellule-entière et outside-out, un courant positif (+I) est un courant sortant. Le potentiel de commande (Vcmd) correspond à la valeur de potentiel imposé à l'extrémité de la pipette. En configuration cellule-attachée une augmentation de V_{cmd} provoque une hyperpolarisation du potentiel de membrane

(Em) à partir de la valeur de RMP (resting membrane potential). En configuration inside-out, une augmentation de V_{cmd} provoque une hyperpolarisation d'Em telle que : si V_{cmd} = +30 mV alors Em = -30 mV = -V_{cmd}. En configurations cellule-entière et outside-out, une augmentation de V_{cmd} provoque une dépolarisation d'Em telle que : Em = V_{cmd}.

CHAPITRE 4 : MATERIEL ET METHODES

A. CULTURE CELLULAIRE

1. LIGNEES STABLES HEK HTREK-1

La lignée de cellules HEK hTREK-1 #1 surexprime de manière stable la sous-unité du canal TREK-1 (Moha ou Maati et al., 2011). Le plasmide pIRES2-eGFP (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) utilisé pour réaliser le clone stable contient la séquence codante du canal TREK-1 (gène *KCNK2*), une séquence GFP et une séquence de résistance à la généticine (ou G418). Cette lignée a été cultivée dans un milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium and Glutamax, Invitrogen, Cergy- Pontoise, France) supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal et dans une atmosphère composée de 5 % de CO_2 et de 95 % d'air. La pression de sélection est maintenue avec 0,5 mg/mL de G418.

La lignée de cellules HEK hTREK-1 #2 surexprime de manière stable la sous-unité du canal TREK-1 (Andharai et al., 2017). Un vecteur viral contenant une séquence GFP et une séquence codante de TREK-1 a été utilisée pour établir cette seconde lignée. Les cellules ont été cultivées dans les mêmes conditions que les cellules HEK hTREK-1 #1, à l'exception de l'antibiotique de pression de sélection G418.

2. TRANSFECTIONS TRANSITOIRES

La lignée de cellules HEK 293 T (mêmes conditions de culture) a été utilisée pour réaliser les transfections transitoires à partir du plasmide pIRES2 contenant la séquence codante du gène *KCNK2* WT qui code pour la sous-unité du canal TREK-1. Les transfections transitoires sont réalisées à l'aide du kit JetPEI® (Ozyme) pour la transfection de plasmides. La polyethylenimine (PEI) est un polymère cationique qui se lie à l'ADN. Le complexe PEI/ADN est endocyté et l'ADN est relargué dans le cytoplasme avant de pénétrer dans le noyau pour être transcrit.

Pour que le complexe PEI/ADN se forme, 10 µL de PEI du kit et 3 µg d'ADN sont mélangés dans 500 µL de NaCl stérile (6 ng/µL) et incubés 30 minutes à température ambiante. Les

cellules HEK 293 T sont ensemencées dans des boîtes en plastiques 35x10 mm (Falcon), avec 90 µL du complexe PEI/ADN et 0,5 mg/ml de G418 pendant 48h avant les expériences de patch-clamp.

B. REACTIFS ET MATERIELS

Les **Tableau 1** et **Tableau 2** répertorient l'ensemble des molécules, solvants, réactifs et matériels utilisés.

Réactif/Matériel	Fournisseur	Référence
Culture cellulaire		
Lignée cellulaire HEK hTREK-1 #1	Moha ou Maati et al., 2011	
Lignée cellulaire HEK hTREK-1 #2	Andharia et al., 2017	MTA: LS275819
Lignée cellulaire HEK 293 T		
Milieu de culture DMEM + Glutamax	ThermoFisher	31966-021
Sérum de veau fœtal	Sigma-Aldrich	F7524
G418 (généticine)	Sigma-Aldrich	4727878001
jetPEI®	Ozyme	POL101000053
Trypsine-EDTA	ThermoFisher	25300-054

Tableau 1

Réactifs et matériels utilisés pour la culture cellulaire

Réactif/Matériel	Fournisseur	Référence	Solvant
Molécules et solvants			
Acide gras C18:0	Sigma-Aldrich	S4751-1G	Éthanol
Acide gras C18:1$^{\Delta 9Z}$	Sigma-Aldrich	O1008	Éthanol
Acide gras C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$	Sigma-Aldrich	L1376	Éthanol
Acide gras conjugué C18:2$^{\Delta 9Z,11E}$	Sigma-Aldrich	16413	Éthanol
Acide gras conjugué C18:2$^{\Delta 9E,11E}$	Sigma-Aldrich	90983	Éthanol
Acide gras conjugué C18:2$^{\Delta 10E,12Z}$	Sigma-Aldrich	04397	Éthanol
Acide gras C18:3$^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$	Sigma-Aldrich	L-039	Éthanol
Acide gras C20:2$^{\Delta 11Z,14Z}$	Sigma-Aldrich	E3127	Éthanol
Acide gras C20:4$^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z}$	Sigma-Aldrich	A3611	Éthanol
Acide gras C20:4$^{\Delta 8Z,11Z,14Z,17Z}$	Santa Cruz	sc229695	Éthanol
Acide gras C20:5$^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z}$	Sigma-Aldrich	E2011	Éthanol
Acide gras C22:5$^{\Delta 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z}$	Sigma-Aldrich	18566	Éthanol
Acide gras C22:5$^{\Delta 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z}$	Sigma-Aldrich	D-120	Éthanol
Acide gras C22:6$^{\Delta 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z}$	Sigma-Aldrich	D2534	Éthanol
ML402	MedChemexpress	HY-104027	DMSO
Ester méthylique du LA	Santa Cruz	Sc215355	Éthanol
Ester éthylique du DHA	Fournit par l'IBMM (Montpellier)		Éthanol
4-F4t-Neuroprostane	Synthétisée à l'IBMM (Montpellier)		Éthanol
LA deutéré	Synthétisé à l'IBMM (Montpellier)		Éthanol
Oxylipines du LA	Cayman	20794	Éthanol
Vitamine E (α-tocophérol)	Sigma-Aldrich	V-010	Éthanol

Tableau 2

Réactifs utilisés pour les expérimentations

Les réactifs sont indiqués avec la référence du fournisseur et leur solvant respectif. Ils ont été utilisés pour l'ensemble des expériences : patch-clamp en configurations cellule-entière, inside-out, évaluation de la fluidité de la membrane et expérience d'interaction protéine-lipide.

C. ELECTROPHYSIOLOGIE : PROTOCOLES ET REACTIFS

1. PATCH-CLAMP EN CONFIGURATION CELLULE-ENTIERE

a. Acquisition des données en configuration cellule-entière

Les expériences de patch-clamp ont été réalisées sur des cellules HEK 293T et HEK hTREK-1 #1 et #2 adhérentes et non confluentes, dans des boîtes en plastiques 35 x 10 mm (Falcon). Les cellules sont ensemencées entre 2 et 4 jours avant l'expérimentation. Les cellules HEK 293 T sont transfectées et ensemencées 2 jours avant l'expérimentation.
Les expériences sont réalisées à température ambiante autour de 22 °C. Le milieu de culture est retiré juste avant l'expérimentation et remplacé par le milieu extracellulaire de composition suivante (en mM) : 150 NaCl, 5 KCl, 3 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$ et 10 HEPES, avec un pH de 7,4 ajusté avec du NaOH. Le milieu intrapipette contient (en mM) : 155 KCl, 3 $MgCl_2$, 5 EGTA et 10 HEPES, avec un pH ajusté à 7,2 avec du KOH. Les pipettes de verre sont obtenues à partir de capillaires de soda lime (Vitrex Medical), étirés à l'aide d'une étireuse verticale (PC- 10, Narishige, London, UK) jusqu'à une résistance de pipette (Rp) comprise entre 2 MΩ et 4 MΩ, une fois remplie avec le milieu intrapipette.

Les acquisitions de courant sont permises par un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instrument, Sunnyvale, CA, USA), filtrées avec un passe-bas de 5 kHz. Les données sont numérisées avec la digidata 1550B (Axon Instrument, Sunnyvale, CA, USA) avec une fréquence d'échantillonnage de 10 kHz. Les protocoles d'électrophysiologie sont appliqués à l'aide du logiciel pClamp10.7 (Axon Instrument).

Les critères d'inclusions des cellules sont déterminés en amont tels que : la Rs doit être comprise entre la Rp et 8 MΩ et maintenue constante sur toute la durée du protocole ; la capacitance des cellules est comprise entre 20 pF et 35 pF ; le potentiel de membrane ne doit pas être plus dépolarisé que -53 mV ; le courant initial (I_0) doit présenter la rectification sortante

caractéristique du courant TREK-1 et il ne peut pas y avoir de compensation électronique de fuite.

Une fois en configuration cellule-entière, les cellules sont continuellement perfusées avec du milieu extracellulaire ou avec du milieu extracellulaire contenant une molécule dont nous testons l'effet sur l'activité de TREK-1. Le débit de la perfusion est de 1 mL/min permettant un changement total du milieu autour de la cellule en moins de 10 secondes (**Figure 28**) et le volume est maintenu constant autour de 2,5 mL grâce à une pompe péristaltique (ISMATEC).

Les cellules sont clampées à un potentiel de maintien de -80 mV et perfusées pendant 2 minutes avant d'enregistrer le courant initial (I_0). Les cellules sont maintenues à -80 mV pendant 10 s, hyperpolarisées de – 80 mV à -100 mV pendant 50 ms puis dépolarisées en rampe de -100 mV à +30 mV en 800 ms avant de revenir au potentiel de maintien. Le protocole se répète toutes les 10 s. Ainsi, nous pouvons enregistrer I_0, la cinétique d'activation ou d'inhibition, le courant activé ou inhibé à l'état stable et la cinétique de réversibilité lors du rinçage du composé avec du milieu extracellulaire.

Pour valider qu'un composé n'a pas d'effet sur le canal TREK-1, une perfusion du composé d'au-moins 3 minutes est respectée, même sans effet et un contrôle positif est réalisé juste après avec un activateur connu, l'acide docosahexaénoïque (DHA) à 10 µM.

b. Analyses des données en configuration cellule-entière

Une fois que l'état stable de l'activation ou de l'inhibition par un composé est atteint, le courant à 0 mV est mesuré comme la moyenne des trois dernières traces stables, sur un delta de 1 mV, entre -0,5 mV et +0,5 mV pour sortir du bruit. Le courant est normalisé par la capacité membranaire (pF) et exprimé en densité de courant (pA/pF).

Les cinétiques d'activation ou d'inhibition et de réversibilité sont tracées pour chacune des cellules, à 0 mV et normalisées telles que :

(22) $$I_t = \frac{(I_t - I_0)}{(I_{max} - I_0)}$$

Avec I_t le courant au temps t, I_0 le courant initial avant activation ou inhibition et I_{max} le courant activé ou inhibé par le composé à l'état stable.

Chacune de ces cinétiques est lissée avec une équation sigmoïdale qui dérive de l'équation de Boltzmann :

(23) $$I_t = I_0 + \frac{(I_{max} - I_0)}{1 + e^{\frac{t_{50} - t}{pente}}}$$

Avec I_t le courant au temps t, I_0 le courant initial avant activation ou inhibition et I_{max} le courant activé ou inhibé par le composé à l'état stable.

Initialement, l'équation sigmoïdale de Boltzmann est utilisée pour décrire la voltage-dépendance de l'activation des canaux ioniques en traçant la conductance (en ordonnée) vis-à-vis du voltage (en abscisse). Ainsi on obtient la valeur de voltage en mV (V_{50}) pour laquelle on à 50 % de l'activation (correspondant dans notre cas au t_{50}, c'est-à-dire le temps nécessaire en minute pour arriver à 50 % de l'activation).

c. Caractérisation du système de perfusion en courant-imposé

Afin de travailler sur les cinétiques d'activation et de réversibilité de TREK-1 par les acides gras et autres composés, il était nécessaire d'optimiser et de caractériser notre système de perfusion pour que celui-ci soit en mesure de changer le plus rapidement possible le milieu environnant la cellule sous le patch.

En utilisant des solutions extracellulaires de concentrations potassiques différentes (5 mM KCL ou 15 mM KCL), le temps nécessaire pour accomplir le changement de potentiel de membrane ($5_e/155_i$ mM KCl = -86,50 mV et $15_e/155_i$ mM KCl = -58,82 mV) nous permet de déterminer le temps nécessaire pour changer en totalité le milieu environnant la cellule sous le patch (Le Guennec et Noble., 1994). Ainsi, nous pouvons observer un changement du milieu survenant en moins de 10 secondes (**Figure 29**) avec un débit de 1 mL/min et une tête de perfusion positionnée selon un angle aigu par rapport au fond de la boite.

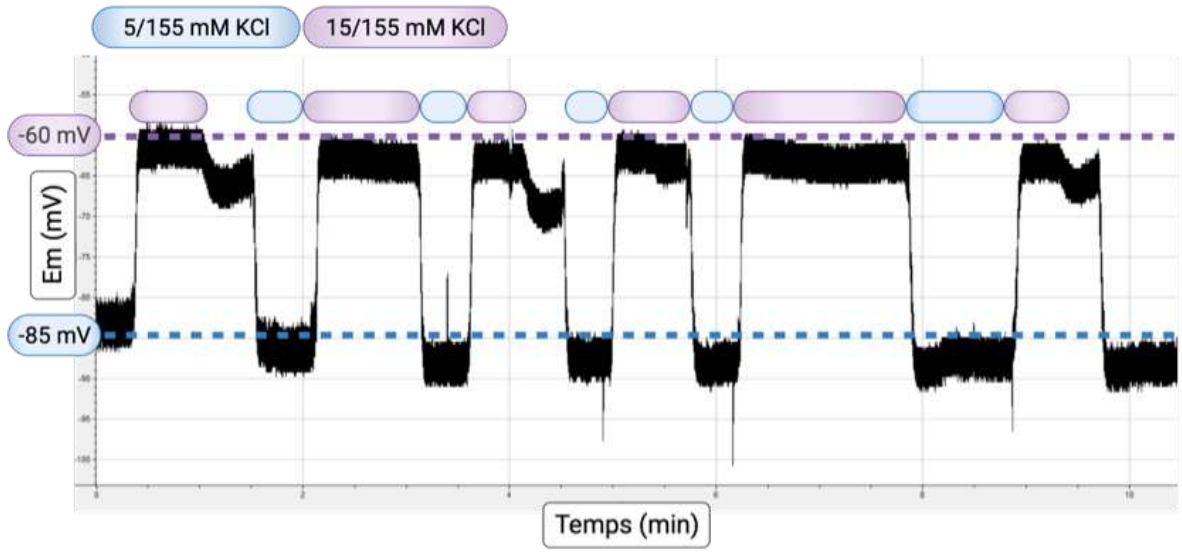

Figure 29

Caractérisation et optimisation du système de perfusion

La perfusion d'une solution extracellulaire avec 15 mM de KCl permet la dépolarisation du potentiel de membrane vers le potentiel théorique du K^+ de -58,82 mV. La dépolarisation complète traduit le changement de milieu autour de la cellule. Ce changement de milieu complet s'effectue en moins de 10 secondes. La réversibilité de la dépolarisation par la perfusion d'une solution extracellulaire physiologique ($5_e/155_i$ mM KCl) survient en moins de 10 secondes également. Lorsque le flux de perfusion est maintenu, il n'y a pas de mélange des solutions, se traduisant par un potentiel de membrane intermédiaire.

2. PATCH-CLAMP EN CONFIGURATION INSIDE-OUT

Les expériences de patch-clamp ont été réalisées sur les cellules HEK hTREK-1#1 adhérentes et non confluentes, dans des boîtes en plastiques 35 x 10 mm (Falcon). Les cellules sont ensemencées entre 2 et 4 jours avant l'expérimentation.

Le milieu de culture est retiré juste avant l'expérimentation et remplacé par le milieu extracellulaire de composition suivante (en mM) : 140 NaCl, 4,8 KCl, 1,2 $MgCl_2$, 10 glucose et 10 HEPES, avec un pH de 7,4 ajusté avec du NaOH. Le milieu intrapipette contient (en mM) : 145 KCl, 1,2 $MgCl_2$, 10 glucose et 10 HEPES, avec un pH ajusté à 7,2 avec du KOH. Après être passé en patch-excisé, le milieu extracellulaire (bain) est remplacé par le même milieu que

le milieu intrapipette. Les enregistrements d'*inside-out* sont réalisés en conditions iso-potassique. Les pipettes de verre sont étirées jusqu'à une résistance de pipette comprise entre 6 MΩ et 8 MΩ, une fois remplie avec le milieu intrapipette. Les cellules sont perfusées en continue par le milieu intrapipette et maintenues à 0 mV, le potentiel théorique d'équilibre du potassium en condition iso-potassique. Les cinétiques d'activation et de réversibilité du courant sont ensuite suivies à un potentiel imposé de +30 mV durant la perfusion du composé et son rinçage.
Les acquisitions de courant sont permises par un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instrument, Sunnyvale, CA, USA) et filtré avec un passe-bas de 2 kHz.

D. ETUDE DE LA FLUIDIFICATION MEMBRANAIRE PAR LES ACIDES GRAS POLY-INSATURES

L'étude de la fluidification de la membrane par les acides gras a été réalisée sur les cellules de la lignée HEK hTREK-1 #1 à l'aide d'une sonde analogue aux lipides, l'acide pyrènedécanoïque (PDA). Les longueurs d'ondes d'émission de la PDA sont : 405 nm pour un monomère et 470 nm pour un excimère (**Figure 30**).

Une fois insérée dans la membrane, lorsque celle-ci est fluidifiée c'est-à-dire que la mobilité latérale au sein de la membrane s'accroît, la probabilité de dimérisation de la sonde augmente et son spectre d'émission se déplace de 405 nm à 470 nm. Ainsi, l'analyse du ratio d'émission 405/470 nm nous renseigne sur la fluidification relative de la membrane. Si le ratio 405/470 (monomère/excimère) diminue dans le temps, alors la membrane est fluidifiée au temps T_i.
Les cellules sont ensemencées entre 3 et 5 jours avant l'expérimentation dans des boîtes de culture cellulaire de 35 mm de diamètre avec fond en verre (MatTek, Ashland, U.S.A) et cultivée jusqu'à confluence. Avant l'expérimentation, les cellules sont incubées 1h, dans l'obscurité et à température ambiante avec 5 µM de PDA et 0,08 % d'acide pluronique (pluronic F127) dans une solution tampon. Les trois réactifs proviennent du kit vendu par Abcam (*membrane fluidity kit*, Abcam). Après incubation, la solution contenant la PDA et l'acide pluronique est retirée et les cellules adhérentes sont rincées deux fois avec le même milieu extracellulaire qu'utilisé pour les expériences de patch-clamp.

Les expériences de fluorescences ont été réalisées au microscope à épifluorescence (Zeiss), grossissement x40. La lumière d'excitation est filtrée avec un filtre dichroïque de 370 mm et les lumières d'émissions sont recueillis à 405 nm et 470 nm. Le ratio est calculé à différents temps T_i en minute, sur une moyenne de 5 s : T_0 avant l'application de l'acide gras à 10 µM ou 100 µM, T_2 (2 min), T_4, T_6, T_8, T_{10}, T_{20}, T_{30}, T_{40}, T_{50} and T_{60}. Le ratio est ensuite normalisé tel que :

(24) Ratio normalisé = $\left(\frac{F}{F_0}\right)$-1

Avec F_0 le ratio de fluorescence initial au temps T_0 et F le ratio de fluorescence au temps T_i.

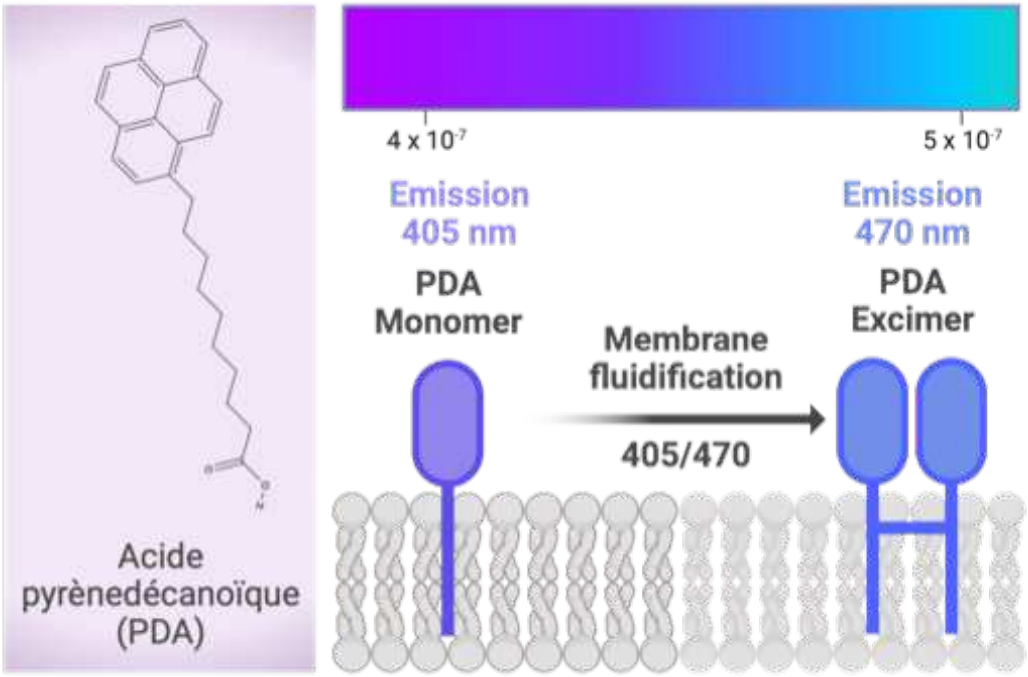

Figure 30

Acide pyrènedécanoïque pour l'évaluation de la fluidification membranaire

L'acide pyrènedécanoïque monomérique est une sonde fluorescente analogue aux lipides qui émet à 405 nm. Lorsque la membrane est fluidifiée, la sonde fluorescente se retrouve à l'état d'excimère et sa longueur d'émission se décale vers 470 nm.

E. MESURE D'AFFINITE PROTEINE-ACIDE GRAS POLY-INSATURE

La mesure d'affinité entre TREK-1 inséré dans des microsomes et l'acide docosahexaénoïque (DHA) a été réalisée par la technique de mesure du décalage de spectre. Simplement, l'affinité entre deux partenaires est mesurée par le décalage du spectre de fluorescence d'une molécule marquée, vers le bleu (vers 650 nm) ou vers la rouge (vers 670 nm), lorsqu'elle se lie avec son ligand (**Figure 31**).

1. PURIFICATION DES MICROSOMES

Des microsomes issus de la membrane plasmique ont été obtenus par des cycles de centrifugations à partir des lignées cellulaires HEK hTREK-1 #1 et HEK 293T. Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluences (≈ 40 millions) dans des flasques T75 puis lavées 2 fois avec du PBS et centrifugées 5 min à 15000 RPM. Les culots cellulaires ont été lysés à l'aide d'une seringue à insuline dans une première solution tampon composée de 300 mM de sucrose et 20 mM de PIPES ajustée à pH 7 avec du NaOH. Les membranes lysées ont été centrifugées 20 min à 10000 g à 4°C. Une fois les culots écartés, les surnageants contenant les membranes plasmiques ont été centrifugés 1 h à 32000 RPM à 4°C (OptimaTML-90K Ultracentrifuge, Beckamn Coulter, Rotor SW60Ti). Les culots de l'ultracentrifugation contenant les microsomes ont été re-suspendus dans une seconde solution tampon composée de 300 mM de sucrose et 5 mM de PIPES ajusté à pH 7,4 avec du NaOH. La concentration en protéine total des échantillons de microsomes a été ajustée à 25 mg/mL et conservé à -20°C deux jours avant le protocole de mesure d'affinité.

2. MESURE DU DECALAGE DU SPECTRE DE FLUORESCENCE

a. Acquisition des données de fluorescence

Les protéines des microsomes issues des lignées HEK hTREK-1 #1 et HEK 293T ont été marquées avec un fluorophore se fixant sur les lysines (MO_L011 RED-NHS 2nd generation, NanoTemper Tehnologies GmbH). Un volume de 200 µL de microsomes contenant 25 mg/mL

de protéine a été incubé 20 min à l'obscurité avec 20 µL du fluorophore à 600 µM. Les microsomes marqués ont ensuite été passés sur une colonne d'exclusion fournit dans le kit : élution dans la colonne en 5 étapes de 200 µL de tampon contenant 300 mM de sucrose et 5 mM de PIPES ajustée à pH 7,4. Les 5 fractions d'élutions de 200 µL sont séparées dans 5 Eppendorfs distincts ; les dernières fractions d'élution contenant davantage de fluorophore libre.

L'intensité de l'émission de fluorescence des premières fractions d'élutions (1,2 et 3) ont été vérifiées à une puissance d'excitation de 100% et conservées si l'intensité de fluorescence étaient comprise entre 400 et 2000 (unité arbitraire). Une dilution a été nécessaire pour les fractions ayant une intensité d'émission de fluorescence supérieure à 2000. Pour éviter les agrégats de membrane et les problèmes d'homogénéité, les échantillons ont été centrifugés 10 min à 16000g, comme recommandé par le fournisseur.

Une dilution en série de l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6$^{\Delta 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z}$) a été réalisée (de 1 mM à 30,5 nM). Chaque point de dilution (10 µL) a été mélangé avec 10 µL de microsomes marqués (10 µL) et chargé dans des capillaires (NanoTemper Technologies GmbH) par capillarités. Finalement, la concentration en protéine des microsomes est d'environ 2,5 µg/m.

b. Analyses des données de fluorescence

La mesure du décalage du spectre de fluorescence a été réalisé avec le Monolith X provenant de chez NanoTemper Technologies GmbH pour chacun des échantillons de la gamme DHA + microsomes. La courbe d'affinité avec le DHA a été tracée en reportant les changements de longueur d'onde d'émission après une mesure ratiométrique du complexe protéine-DHA en fonction de la concentration de DHA (Langer et al., 2022). L'analyse des intensités de fluorescence a été réalisée avec le logiciel MO.Control 3 provenant de chez NanoTemper Technologies.

Pour déterminer la part de décalage du spectre induite par la formation spécifique du complexe TREK-1-DHA dans les microsomes enrichis en TREK-1, nous avons utilisé l'équation suivante :

(25) $I_{\lambda}(\text{TREK1, HEK}) = I_{\lambda}(\text{TREK1}) + I_{\lambda}(\text{HEK})$

Avec $I_{\lambda}(\text{TREK1, HEK})$ les fluorescences à λ 670 nm et λ 650 nm correspondantes aux microsomes issus des cellules HEK hTREK-1 #1, $I_{\lambda}(\text{HEK})$ les fluorescences correspondantes aux microsomes issus des cellules HEK 293T et $I_{\lambda}(\text{TREK1})$ les fluorescences spécifiques induites par la formation spécifique des complexes TREK-1-DHA.

Après avoir isolé les fluorescences spécifiques associées à la formation des complexes TREK-1-DHA, nous avons normalisé le signal pour tracer la relation d'affinité de TREK-1 avec le DHA :

(26) $$R_{\frac{670}{650}}(\text{TREK1}) = \frac{I_{670}(TREK1,HEK) - I_{670}(HEK)}{I_{650}(TREK1,HEK) - I_{650}(HEK)}$$

Avec $R_{\frac{670}{650}}(\text{TREK1})$ le ratio de fluorescence spécifique à la formation des complexes TREK-1-DHA à reporter en fonction de la concentration de DHA.

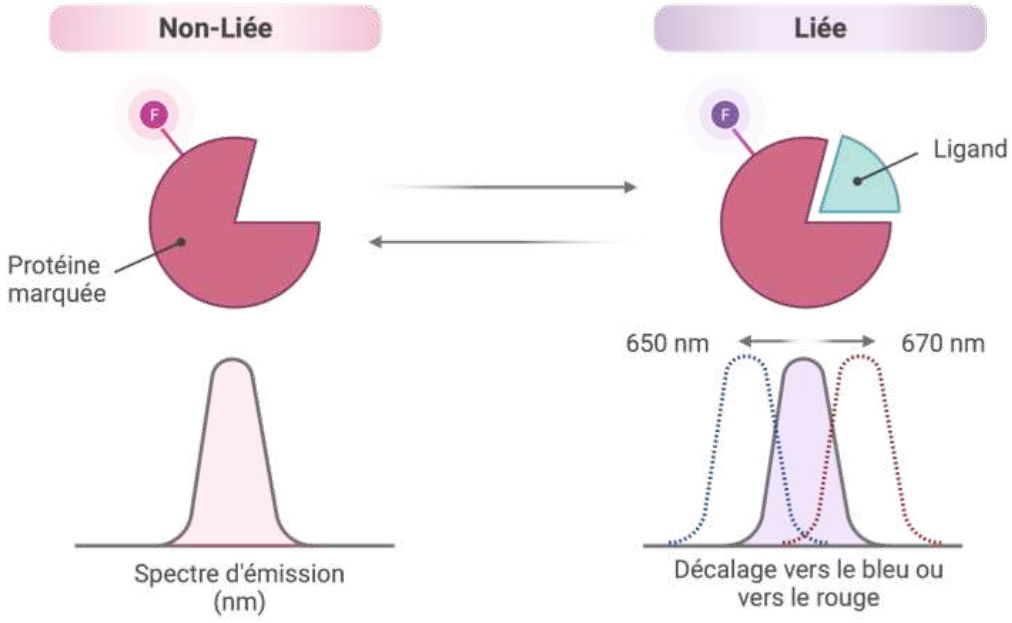

Figure 31

Principe de la mesure du décalage du spectre de fluorescence

La protéine marquée (sur les lysines) par le fluorophore émet selon un spectre d'émission compris entre 650 nm et 670 nm. La liaison avec un ligand modifie ce spectre d'émission en le

décalant vers le bleu (vers 650 nm) ou vers le rouge (vers 670 nm). La modification du ratio 670/650 nous indique la formation d'un complexe protéine-ligand.

F. ANALYSES STATISTIQUES

La grande variabilité de la distribution des paramètres que nous avons étudiés nous a obligé à nous appuyer fortement sur des analyses statistiques pour permettre une meilleure compréhension du mécanisme d'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés. L'analyse statistique de l'ensemble des données a été réalisée sur le logiciel Prism (GraphPad Prism 9).

1. DISTRIBUTION DES DONNEES ET NORMALITE

La manière la plus simple d'avoir une vue d'ensemble sur la distribution des données est de les représenter sous forme d'un histogramme de fréquence où les valeurs numériques sont scindées en intervalles (le « *bin center* » des logiciels) (**Figure 32.A**). Par exemple, sur une gamme de valeurs numériques continues de 0 à 50, on peut choisir de créer des intervalles ([0 ; 5], [5 ;10], [10 ; 15] … ; *bin center* = 5).
Ce type de représentation, nous indique à quelle fréquence on retrouve des données dans chacun des intervalles de notre distribution, d'où le terme de distribution de fréquence. La représentation de la distribution de fréquences peut prendre plusieurs formes (**Figure 32**) :

- Distribution normale
- Distributions asymétriques positive ou négative
- Distribution bimodale ou multimodale

La tendance centrale de la distribution de fréquence nous indique (**Figure 32.B**) :

- Le mode, la valeur la plus fréquente dans la distribution des données
- La moyenne arithmétique μ (influencée par les valeurs extrêmes de la distribution)
- La médiane qui sépare en deux les valeurs ordonnées de l'échantillon (qui n'est pas influencée par les valeurs extrêmes de la distribution)

- La variabilité, quantifiée par l'étendue des valeurs (min-max), la variance (σ^2) et l'écart-type (σ, *standard deviation*) :

(27) $\sigma^2 = \frac{\sum(X-\mu)^2}{N-1}$

(28) $\sigma = \sqrt{\sigma^2}$

La distribution normale :

Avant de faire un test statistique de comparaison de moyennes par exemple, il faut vérifier la distribution des données continues pour réaliser le test adapté. La distribution normale des données est une des conditions d'applications des tests statistiques paramétriques c'est-à-dire qu'avant de comparer la moyenne de deux ou plusieurs groupes, il faut s'assurer que la distribution de chaque groupe suit une loi normale de distribution de paramètres N~(μ ; σ).
Cette distribution normale, illustrée par la **Figure 32.C**, est une distribution symétrique autour d'une valeur qui correspond à la fois au mode, à la moyenne arithmétique et à la médiane. On peut observer cette distribution en faisant un histogramme de fréquence et confirmer notre observation par le test statistique de Shapiro-Wilk.

Test de Shapiro-Wilk :

Le test de Shapiro-Wilk fait l'hypothèse nulle H_0 que les valeurs x_1, x_2… x_x de l'échantillon sont normalement distribuées. Lorsque la p-value de ce test est inférieure à 0,05, l'hypothèse nulle H_0 est rejetée au risque α 5%, alors la normalité de l'échantillon n'est pas vérifiée. Inversement, si la p-value du test est supérieure à 0,05, alors l'hypothèse nulle H_0 n'est pas rejetée au risque α 5%, et les valeurs de l'échantillon sont distribuées selon une loi normale.

Application à nos données :

Nous étudions l'activation du canal TREK-1 par différentes molécules activatrices comme les acides gras poly-insaturés. Ainsi, nous comparons les valeurs continues de courants en conditions initiale (I_0) au courant activé (I_{max}) par chacun des acides gras (comparaison de deux jeux de distribution de données). Nous comparons aussi le degré d'activation du canal TREK-1 induit par chacun des acides gras (comparaison de plusieurs jeux de distribution de données). La normalité n'étant pas vérifiée pour tous les groupes, nous avons effectué pour chaque cas, les tests statistiques non paramétriques (**Figure 33**).

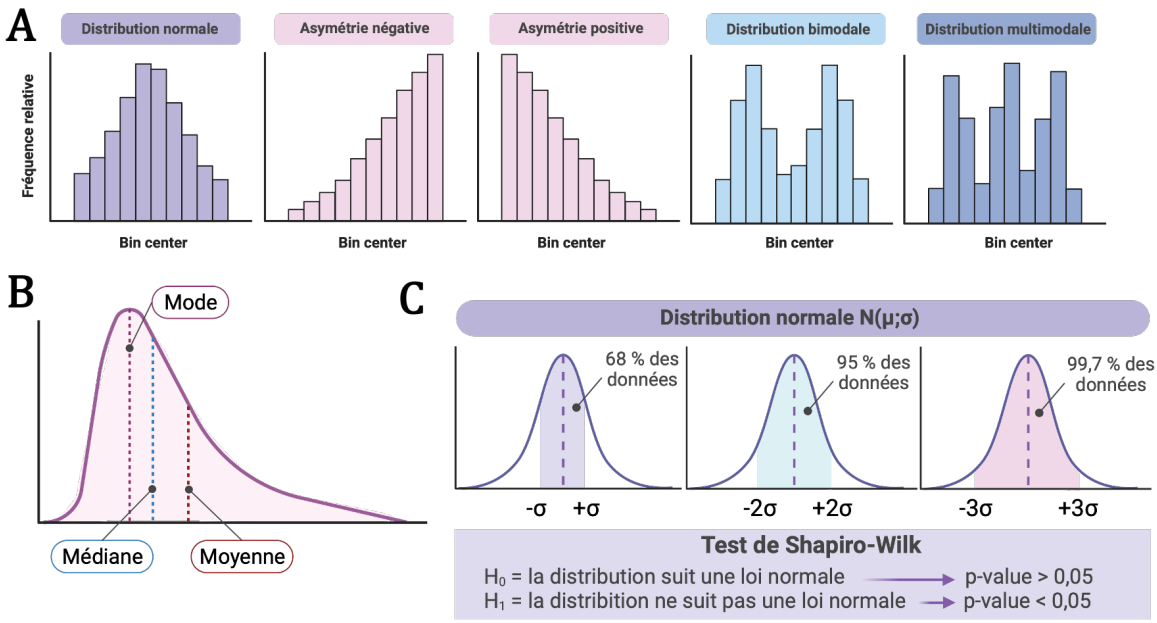

Figure 32

Représentation de la distribution des données d'un échantillon

A. *La distribution des valeurs continues peut prendre plusieurs formes.* ***B.*** *Illustration de la tendance centrale d'une distribution de valeurs continues.* ***C.*** *Dans le cas d'une distribution normale, la distribution des valeurs* x_1, x_2,...x_i *de l'échantillon suit une loi normale de paramètre* $N\sim(\mu;\sigma)$.

2. TESTS STATISTIQUES DE COMPARAISONS DE MOYENNES NON PARAMETRIQUES

La **Figure 33** illustre les tests statistiques non paramétriques réalisables avec nos différents jeux de données et leurs équivalents paramétriques respectifs. Comme la normalité de nos échantillons n'était pas toujours vérifiée, nous avons toujours analysé nos données avec les tests non paramétriques. Les trois tests non paramétriques de comparaisons des distributions des jeux de données (**Figure 33**) ne nécessitent pas l'estimation de la moyenne et de la variance des distributions et ne comparent même pas les valeurs des échantillons ; ils raisonnent uniquement sur les rangs attribués aux valeurs et comparent la somme des rangs.

Dans les tests non paramétriques, ce n'est donc pas les moyennes qui sont comparées, mais les rangs. Ainsi, la condition d'application de ce test, n'est pas que les valeurs suivent une distribution normale, mais seulement que les données soient ordinales (on peut les trier). Tout simplement, les données des groupes à comparer sont combinées et ordonnées pour déterminer les rangs des valeurs individuelles et la somme des rangs permets le calcul de la statistique (**Figure 34**).

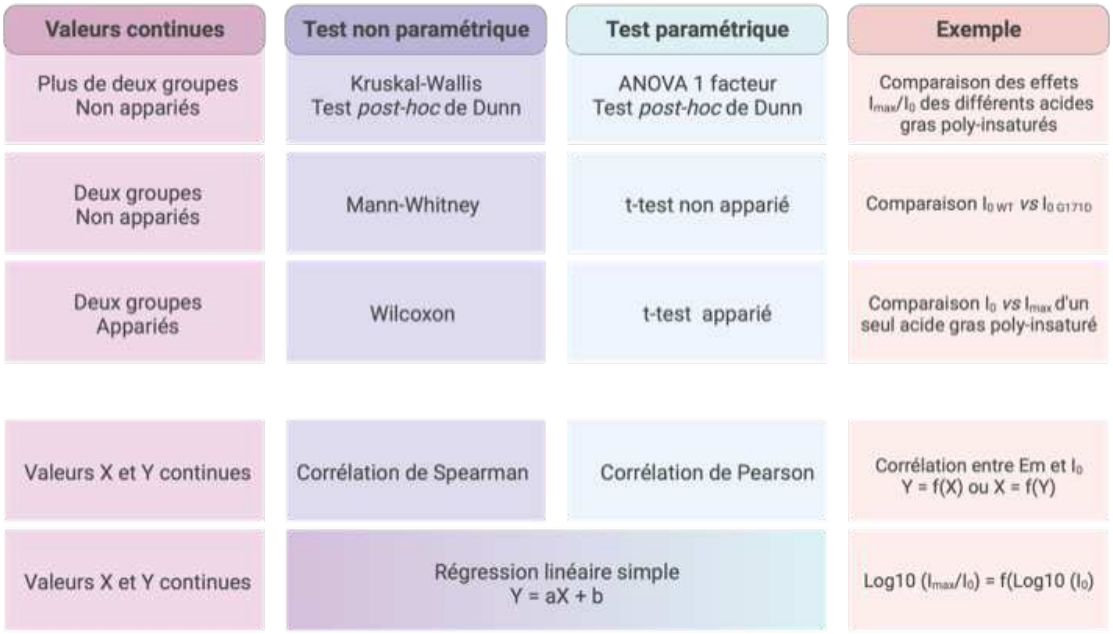

Figure 33

Tests non paramétriques utilisés pour la comparaison des données et l'analyse de la relation entre deux variables X et Y

Les trois tests statistiques de comparaison de distributions que nous avons utilisées sont :

- **Le test de Mann-Whitney** : comparaison de deux jeux de données non appariées
- **Le test de Kruskal-Wallis** : comparaison de plus de deux jeux de données non appariées
- **Le test de Wilcoxon** : comparaison de deux jeux de données appariées

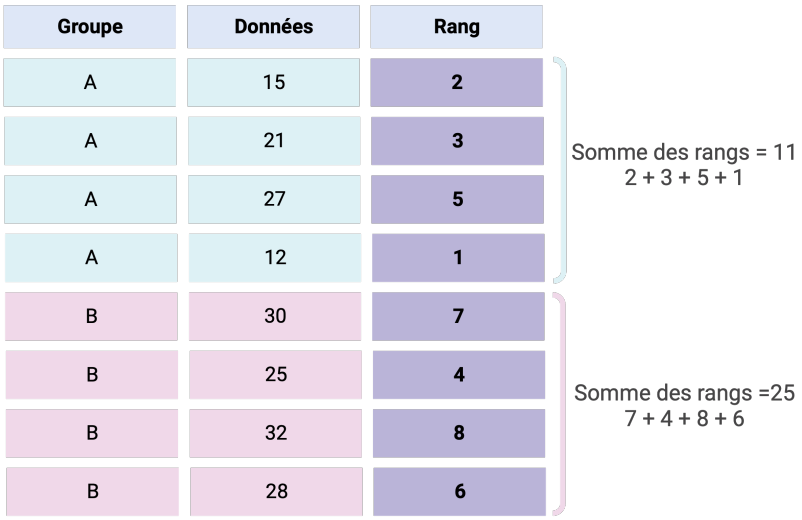

Figure 34

Principe d'organisation en rangs pour la comparaison de jeux de données par des tests non paramétriques

La comparaison des distributions des jeux de données est utilisée par les tests statistiques non paramétriques pour déterminer si les distributions appartiennent ou non à la même population. Cette comparaison des distributions repose sur l'organisation en rangs des valeurs combinées de tous les groupes qui sont alors ordonnées en rangs, comme présenté. La somme des rangs au sein de chaque groupe permet de déterminer la statistique des tests statistiques non paramétriques.

3. RELATIONS ENTRE DEUX VARIABLES X ET Y

Nous avons également dû vérifier l'existence de corrélation ou de relation entre des variables continues X et Y (**Figure 33**).

Pour cela, nous avons utilisés deux tests statistiques :

- **Le test de corrélation de Spearman** : test de corrélation non paramétrique

Le test de Spearman permet de déterminer si les variables X et Y sont liées de telle sorte que Y = f(X) ou X = f(Y). Ce test n'indique en aucun cas que la variable Y est expliquée par la variable X ; il n'y a pas de variable dépendante *vs* indépendante.
La p-value de ce test nous indique s'il existe ou non une corrélation entre les deux variables et le coefficient de corrélation r ($-1 < r < 1$) nous indique le sens de cette corrélation. Plus la valeur r se rapproche de 0, moins il y a de corrélation entre les deux variables. Si la valeur r se rapproche de 1, la corrélation est positive et si elle se rapproche de -1, la corrélation est négative.

- **La régression linéaire simple** :

L'objectif de la régression linéaire simple est d'expliquer la variable Y par la variable X. La variable Y est donc la variable dépendante que nous cherchons à expliquer et X est la variable indépendante par laquelle nous pourrions expliquer Y. La condition d'application du test de régression linéaire est qu'il doit exister une relation de corrélation entre les variables X et Y.
La régression linéaire nécessite la représentation des données par un nuage de points, telles que : $Y_i = f(X_i)$.
S'il existe une relation linéaire (positive ou négative) entre X et Y alors on peut tracer la droite de régression ou la droite des moindres carrées. Cette droite est celle qui s'ajuste le mieux au modèle en passant au plus proche des points en minimisant la somme des carrés des écarts verticaux des points à la droite (**Figure 35**).
Cette droite prend alors l'équation $Y = aX + b$. La p-value du test de régression nous indique s'il existe ou non une relation de type $Y=f(X)$ entre les deux variables et le coefficient de détermination R^2 correspond au pouvoir explicatif de X sur Y, c'est-à-dire qu'un R^2 de 0,62 explique 62% de la dispersion des points Y_i par X_i.

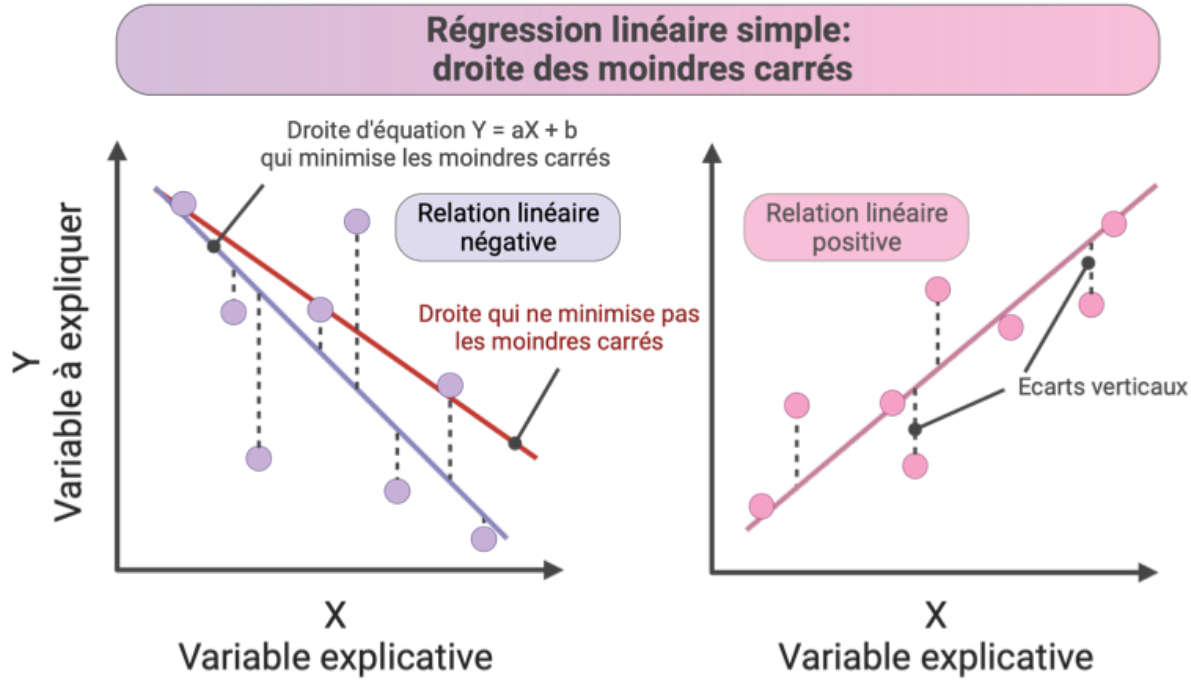

Figure 35

Régression linéaire simple et droite des moindres carrés

Les pointillés représentent les écarts verticaux entre les points et la droite de régression. La droite de régression qui présente la somme des carrés des écarts verticaux minimisée est le modèle qui explique au mieux la dispersion des Y_i par X_i.

CHAPITRE 5 : PROBLEMATIQUES, RESULTATS ET DISCUSSION

A. ACTIVATION DE TREK-1 PAR LES ACIDES GRAS POLY-INSATURES

Cette première partie des résultats permet de mieux appréhender le mécanisme d'action des acides gras poly-insaturés dans l'activation du canal TREK-1. Aujourd'hui, nos résultats nous poussent à considérer l'hypothèse selon laquelle TREK-1 est activé par les acides gras poly-insaturés non *via* un mécanisme mécano-sensible impliquant des changements de la courbure ou de fluidité de la membrane mais plutôt *via* un mécanisme d'interaction directe avec la protéine TREK-1.

1. CONTEXTUALISATION : L'ORIGINE DE LHYPOTHESE DE L'ACTIVATION *VIA* UNE VOIE MECANO-SENSIBLE

L'étude de l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés a commencé au milieu des années 90, juste après sa découverte en 1996 (Fink et al., 1996). C'est en 1998, que la première publication rapporte l'activation de TREK-1 par l'acide arachidonique (AA, C20:4 $^{\Delta 5,8,11,14}$) : un travail sur des cellules COS transfectées de manière transitoire, montrant que l'acide arachidonique à 10 µM permet une augmentation du courant de l'ordre de 530 ± 78 %, en configuration cellule-entière. TREK-1 est également activé par l'AA en patch excisé en configuration *inside-out* (Patel et al., 1998). C'est dans cette première étude qu'est émise l'hypothèse selon laquelle TREK-1 serait activé par les acides gras poly-insaturés, comme l'acide arachidonique, *via* une voie mécano-sensible.

TREK-1 est un canal mécano-sensible (Patel et al., 1998), comme décrit dans la partie « **Mécano-sensibilité** ». *Mais d'où vient l'hypothèse selon laquelle les acides gras poly-insaturés activeraient le canal TREK-1 en empruntant une voie mécano-sensible ?*

Cette hypothèse reprend les travaux antérieurs de Sheetz et Singer en 1974 et la *bilayer couple-hypothesis* ; une étude des modifications des propriétés physiques de la membrane des

érythrocytes. Les deux feuillets de la membrane sont asymétriques et peuvent répondre différemment à des perturbations. Des composés amphipathiques (molécule avec un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe, cationiques, anioniques ou neutres à pH physiologique) sont capables de courber la membrane en élargissant un des feuillets de la membrane par rapport à l'autre. Ainsi, les composés amphipatiques anioniques et neutres produisent des crénelages de la membrane en s'insérant préférentiellement dans le feuillet externe tandis que les composés amphipatiques cationiques produisent des invaginations en s'insérant préférentiellement dans le feuillet interne, chargé négativement (Sheetz et Singer et al., 1974) (**Figure 19**). N'ayant pas trouvé de traduction française appropriée, les molécules s'insérant dans le feuillet externe sont appelées en anglais des « *crenators* » et les molécules s'insérant dans le feuillet interne sont des « *cup-formers* ». Ces courbures induites de la membrane sont connues pour moduler l'activité des canaux cationiques mécano-sensibles d'*Escherichia Coli* (Martinac et al., 1990).

Les travaux de Patel et al., en 1998, ont montré que TREK-1 est non seulement activé par les pressions négatives (**Figure 36.A**), par l'acide arachidonique ($C20:4^{\Delta 5,8,11,14}$), mais qu'il est aussi activé par le TNP (trinitrophénol) et inhibé par la CPZ (chlorpromazine) (**Figure 36.B**), qui sont respectivement un *crenator* et un *cup-former*. Comme le TNP, les acides gras libres sont des molécules amphipathiques anioniques qui devraient s'insèrent dans le feuillet externe de la membrane et modifier la courbure (Deuticke., 1968 ; Sheetz et Singer et al., 1974) (**Figure 19**).

La même année, les travaux de Fink et al.,1998 sur le canal TRAAK, un des trois membres de la sous-famille mécano-sensible TREK, montrent que l'activation de TRAAK par les acides gras est corrélée positivement avec la longueur de la chaîne carbonée (**Figure 22**). Ainsi, en se basant sur ces résultats, l'hypothèse est que plus la chaîne carbonée des acides gras est longue, plus elle est hydrophobe et s'insère dans la membrane en modifiant ses propriétés physiques de fluidité et/ou de courbure.
C'est donc de ces principaux travaux (Fink et al., 1996 ; Patel et al., 1998 ; Fink et al., 1998 ; Maingret et al., 2000) qu'est née l'hypothèse selon laquelle une voie mécano-sensible permettait aux acides gras poly-insaturés d'activer le canal TREK-1 : en s'insérant dans la membrane, les acides gras en modifient la courbure, qui serait alors ressentie par les canaux mécano-sensibles de la sous-famille TREK (Patel et al., 2001).

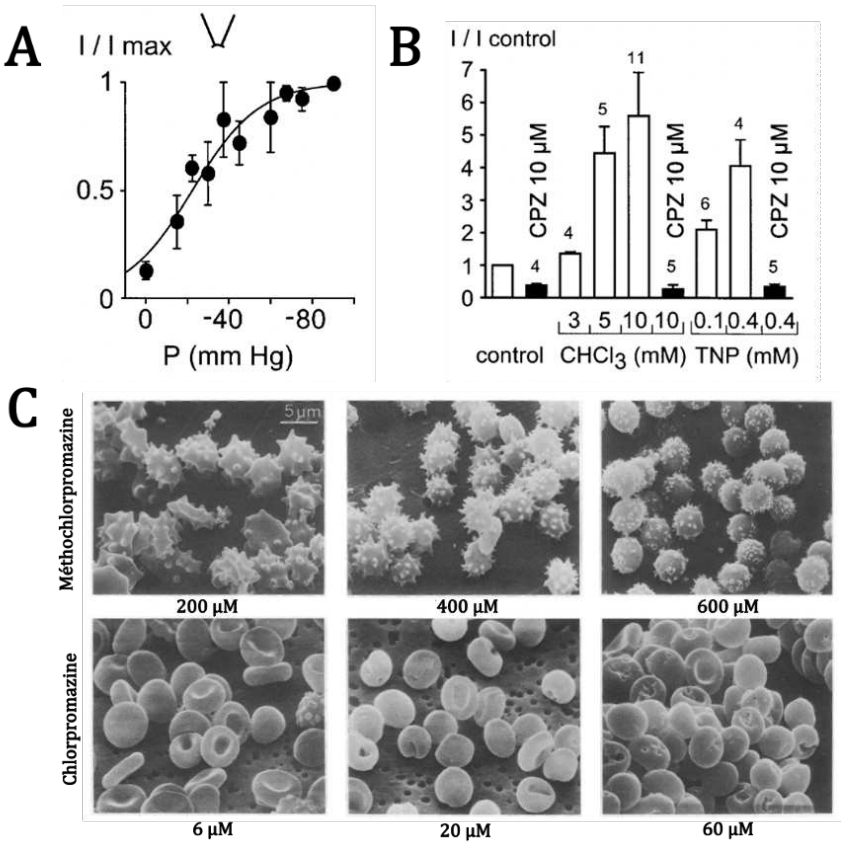

Figure 36

Origine de l'hypothèse de l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés via une voie mécano-sensible

A. *Activation de TREK-1 par les pressions négatives en configuration inside-out.* ***B.*** *Effets inhibiteur de la chlorpromazine (CPZ) 10 µM et activateur du trinitrophénol (TNP) aux concentrations indiquées, sur TREK-1.* ***C.*** *Microscopie électronique montrant la courbure de la membrane des érythrocytes induite par la méthochlorpromazine (crenator) et la chlorpromazine (cup-former).* Figure adaptée : A et B de Patel et al., 1998 et C de Sheetz et Singer., 1974.

2. ACTIVATION DE TREK-1 PAR LES ACIDES GRAS POLY-INSATURES *VIA* UN MECANISME DIRECT D'INTERACTION ACIDE GRAS-PROTEINE

Pour reprendre les travaux faits sur TRAAK, montrant une corrélation positive entre la longueur de l'acides gras et l'activation du canal (Fink et al., 1998), nous avons testé l'effet de plusieurs acides gras à 10 µM sur des cellules surexprimant de manière stable le canal TREK-1 (HEK hTREK-1 #1) grâce à la technique de patch-clamp, en configuration cellule-entière.

La longueur de la chaîne carbonée des acides gras (saturé, mono-insaturé et poly-insaturé) varie de 18 à 22 carbones avec de 0 à 6 insaturations (**Figure 37**). Toutes les insaturations des acides gras testés dans cette partie sont en configuration Cis (Z). Les acides gras sont identifiés par leur nomenclature systématique.

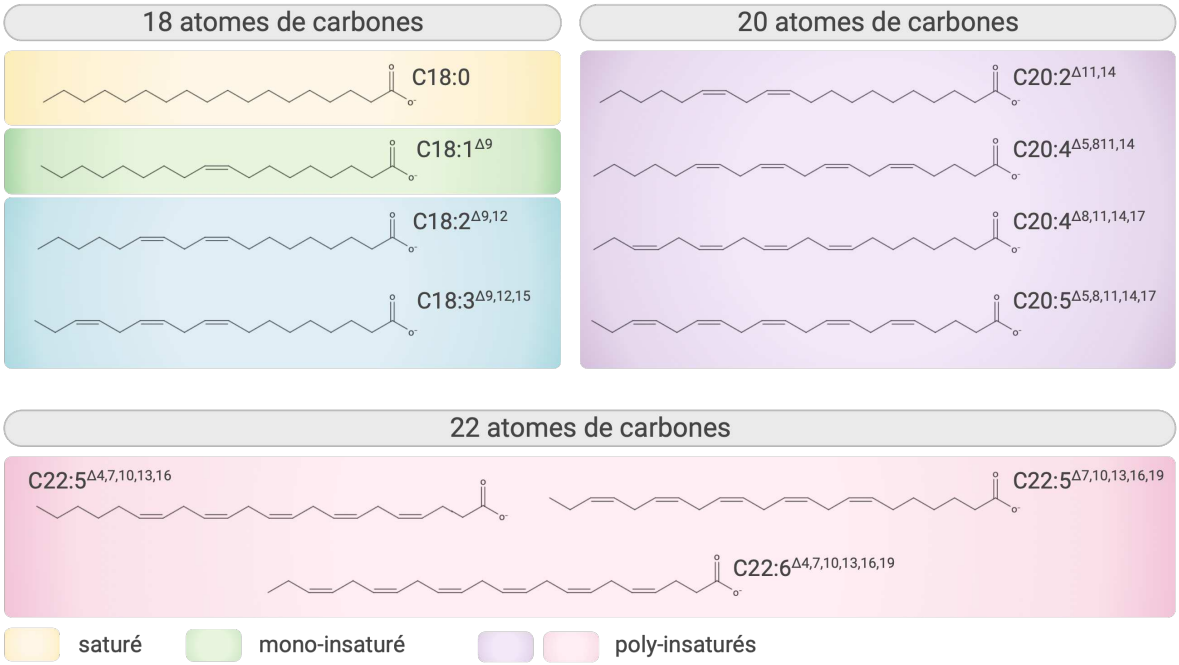

Figure 37

Formules chimiques linéaires des acides gras testés sur le canal TREK-1

Les acides gras testés sur TREK-1 ont entre 18 et 22 atomes de carbones avec de 0 à 6 insaturations. Les nomenclatures systématiques sont données pour chacun des acides gras saturé, mono-insaturé et poly-insaturés.

a. L'activation de TREK-1 n'est pas corrélée à la longueur de la chaîne carbonée des acides gras poly-insaturés

Les acides gras sont perfusés à une concentration de 10 µM sur les cellules HEK hTREK-1 #1 et l'augmentation progressive du courant est suivie grâce à une rampe dépolarisante (de -100 mV à +30 mV) répétée à une fréquence de 0,1 Hz (**Figure 37**). La densité de courant initiale (I_0) et le courant activé à l'état stable (I_{max}) par les acides gras à 0 mV sont représentés sur la **Figure 39** et les statistiques descriptives sont données dans le **Tableau 3**.

L'acide gras saturé C18:0 (acide stéarique) et l'acide gras poly-insaturé C18:3$^{\Delta 9,12,15}$ (acide α-linolénique) n'ont pas activé le canal TREK-1, malgré plus de 3 minutes de perfusion.

Le degré d'activation de TREK-1 (I_{max}/I_0), est calculé comme que le rapport du courant maximal activé (I_{max}) sur le courant initial (I_0). Ce degré d'activation diffère selon l'acide gras considéré (**Tableau 3**). Les trois acides gras produisant la plus grande activation de TREK-1 sont le C18:2$^{\Delta 9,12}$ (I_{max}/I_0 = 24,76 ± 3,33 ; moyenne ± SEM), le C22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$ (I_{max}/I_0 = 26,13 ± 8,25) et le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ (I_{max}/I_0 = 29,79 ± 4,37) (**Tableau 3** et **Figure 40**).

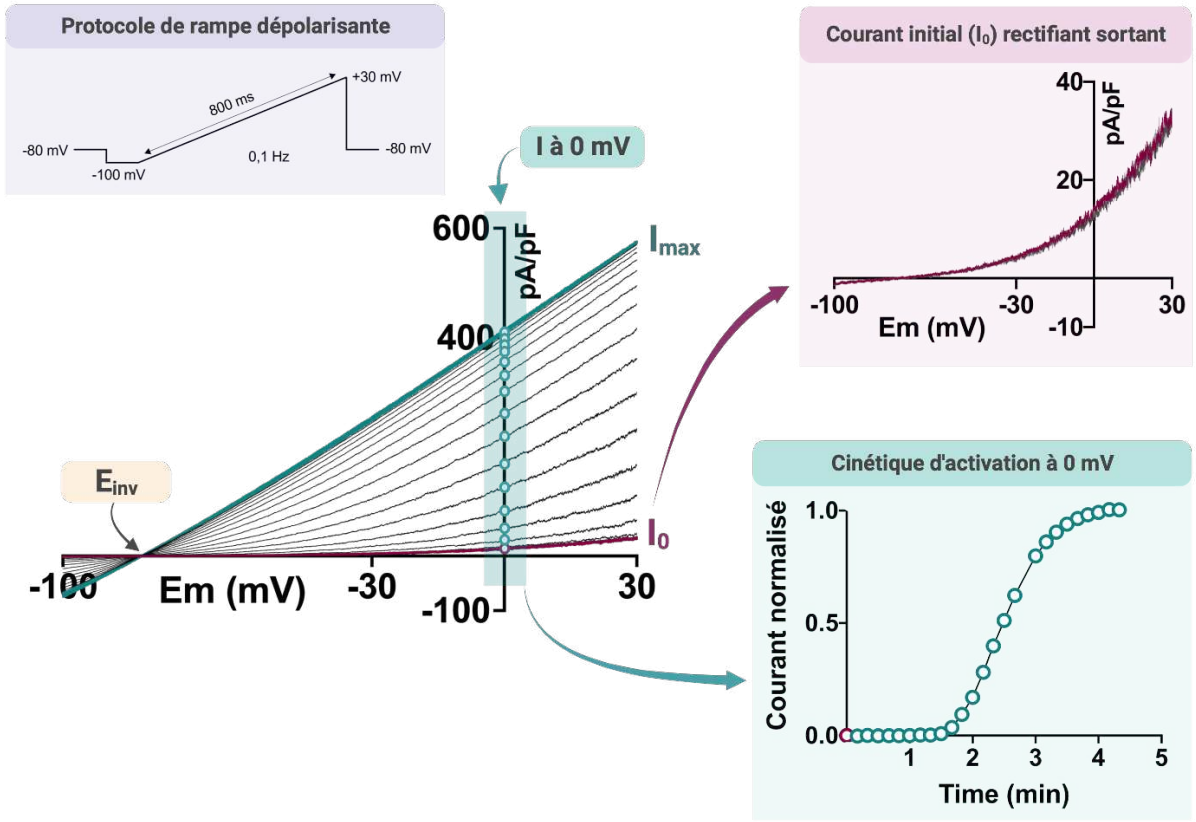

Figure 38

Illustration du protocole de dépolarisation et des paramètres électrophysiologiques étudiés

Le courant TREK-1 est enregistré selon une rampe dépolarisante entre -100 mV et +30 mV à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV. Cette rampe dépolarisante se répète toutes les 10 secondes (0,1 Hz) donnant accès au courant initial (I_0) avant perfusion des acides gras poly-insaturés, à la cinétique d'activation et de réversibilité et au courant maximal activé à l'état stable (I_{max}). Un courant stable est considéré lorsque 3 traces successives ne montrent aucune variation (augmentation ou diminution) de courant. Les valeurs d'amplitudes d'activation (I_{max}/I_0) et les cinétiques d'activation et de réversibilité sont données pour un voltage de 0 mV.

	n	**I_0** pA/pF	**I_{max}** pA/pF	**I_{max}/I_0**
C18:0	4	18,70 ± 6,15	18,42 ± 5,55	1,00 ± 1,13
C18:1 $^{\Delta 9}$	12	22,14 ± 6,71	113,1 ± 24,61	7,43 ± 1,89
C18:2 $^{\Delta 9,12}$	21	16,51 ± 2,66	353,7 ± 22,38	24,76 ± 3,33
C18:3 $^{\Delta 9,12,15}$	12	14,88 ± 2,66	20,72 ± 4,24	1,36 ± 0,11
C20:2 $^{\Delta 11,14}$	7	17,65 ± 2,97	166,1 ± 16,23	10,05 ± 1,20
C20:4 $^{\Delta 5,8,11,14}$	17	15,21 ± 2,27	199,5 ± 23,08	15,66 ± 2,13
C20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$	13	16,43 ± 3,73	119,2 ± 15,45	10,93 ± 2,01
C20:5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$	17	16,44 ± 3,10	211,7 ± 21,03	17,40 ± 2,76
C22:5 $^{\Delta 4,7,10,13,16}$	11	15,92 ± 3,09	245,3 ± 21,41	26,13 ± 8,25
C22:5 $^{\Delta 7,10,13,16,19}$	12	12,63 ± 2,32	147,1 ± 26,56	13,25 ± 2,98
C22:6 $^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$	20	16,57 ± 4,63	276,8 ± 24,49	29,79 ± 4,37

Tableau 3

Statistiques descriptives de l'activation du canal TREK-1 par les acides gras poly-insaturés

La nomenclature systématique des acides gras est donnée dans la colonne de gauche. I_0 représente le courant initial avant perfusion des acides gras, I_{max} la densité de courant maximale activée à l'état stable par un acide gras et I_{max}/I_0 le degré d'activation de TREK-1. Les données sont présentées en moyenne ± SEM et n donne la taille de l'échantillon.

Contrairement à TRAAK (Fink et al., 1998 ; revue de Patel et al., 2001), il n'existe pas de corrélation entre la longueur de la chaîne carbonée des acides gras insaturés et le degré d'activation de TREK-1 (**Figure 40**, corrélation de Spearman : p-value = 0,11) ainsi qu'avec la

densité de courant maximale activée par les acides gras poly-insaturés (**Figure 40,** p-value = 0,46).

Le C18:2$^{\Delta 9,12}$ est l'un des trois plus gros activateurs de TREK-1 tandis que le C18:3$^{\Delta 9,12,15}$ n'active pas TREK-1 (**Figure 40).**

Au sein des acides gras à 22 atomes de carbones, le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ (I_{max}/I_0 = 29,79 ± 4,37) est l'un des plus gros activateurs alors que le C22:5$^{\Delta 7,10,13,16,19}$ (I_{max}/I_0 = 13,25 ± 2,98) est plus de deux fois moins efficace pour activer TREK-1 (**Figure 40**).

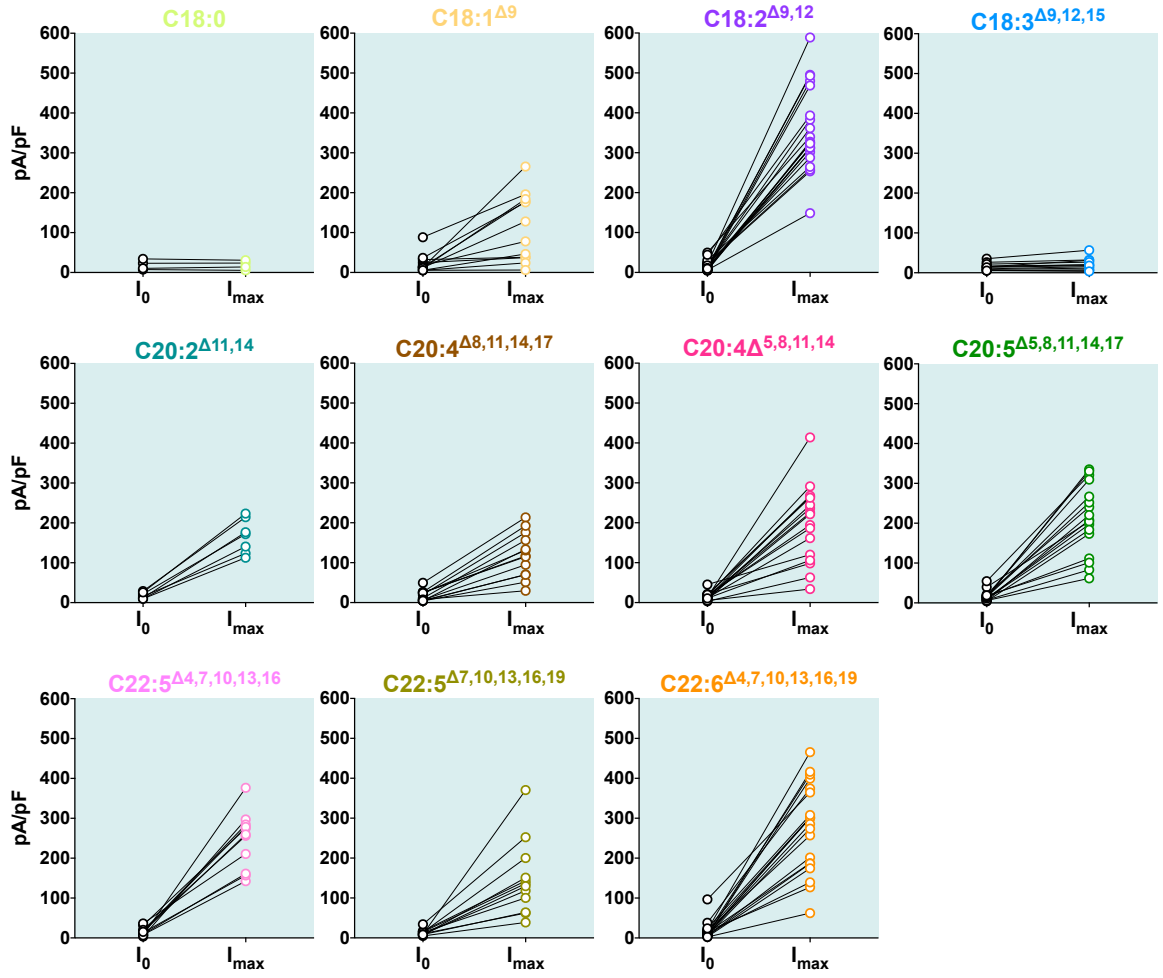

Figure 39

Augmentation du courant TREK-1 en réponse aux acides gras

Les densités de courant initial à (I_0) et de courant activé (I_{max}) par les acides gras sont représentées, à 0 mV. Les nomenclatures systématiques des acides gras sont indiquées au-dessus de chaque graphique. Les acides gras sont perfusés à une concentration de 10 µM

jusqu'à atteindre un état stable. Les données individuelles sont représentées, le n est indiqué dans le ***Tableau 3****.*

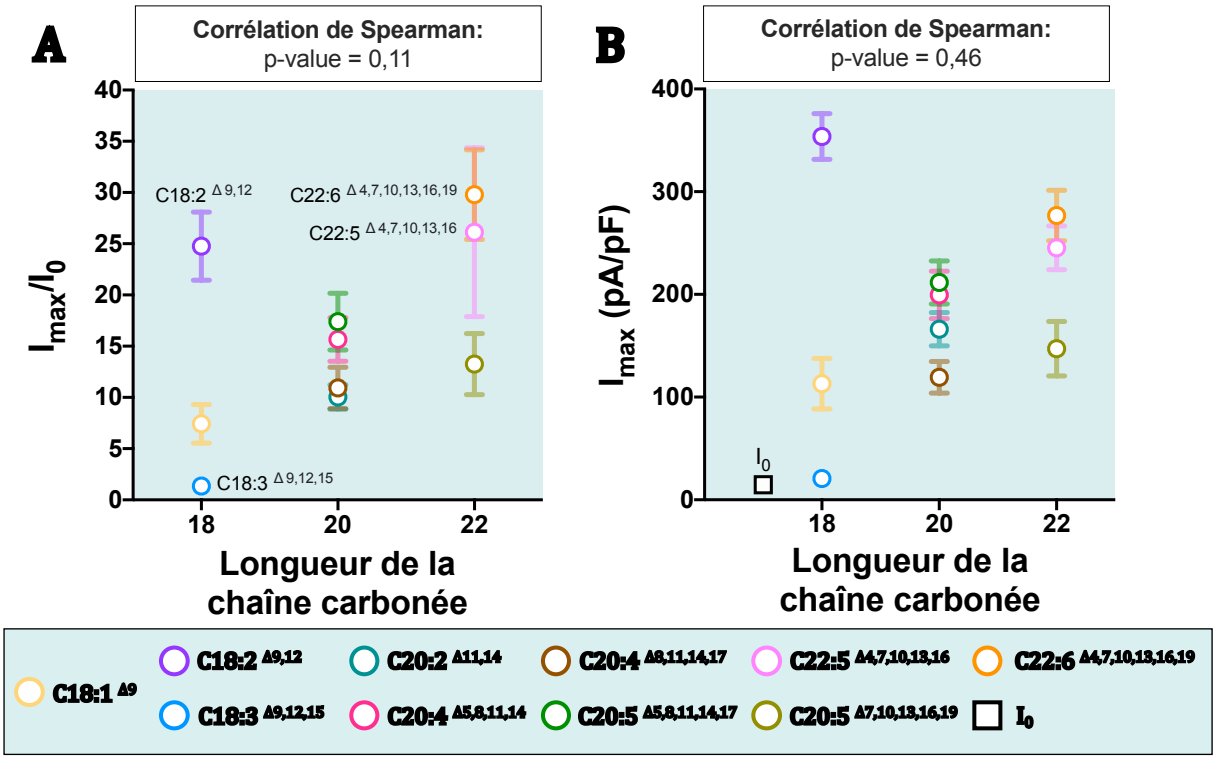

Figure 40

L'activation de TREK-1 est indépendante de la longueur des acides gras insaturés

A. *Degré d'activation de TREK-1 (I_{max}/I_0) et* ***B.*** *densité de courant maximale activée (I_{max}) par chacun des acides gras, représentés (moyenne ± SEM) en fonction de la longueur de la chaîne carbonée. Il n'existe pas de corrélation entre la longueur de la chaîne carbonée et le degré d'activation de TREK-1 (test de corrélation de Spearman : p-value = 0,19) ou la densité de courant maximale activée (p-value = 0,63).*

Puisque le degré d'activation de TREK-1 n'est pas corrélé avec la longueur des acide gras libres, et donc leur faculté à s'insérer dans la membrane pour modifier ses propriétés biophysiques, l'activation de TREK-1 par les acides gras ne passe probablement pas par une voie mécano-sensible, mais *via* un autre mécanisme.

b. Les acides gras se comportent comme des activateurs directs de TREK-1

Puisque l'activation de TREK-1 n'est pas corrélée comme TRAAK à la longueur de la chaîne carbonée des acides gras (Fink et al., 1998 ; revue de Patel et al., 2001), nous avons exploré la possibilité d'une interaction directe entre les acides gras et le canal TREK-1.
Pour cela, nous avons comparé les effets d'un activateur direct, le ML402 dont le site de liaison est connu (Lolicato et al., 2017) (**Figure 16**), aux effets des acides gras insaturés. Nous avons comparé les cinétiques d'activation puis de réversibilité.

b1. Cinétique d'activation de TREK-1 et comparaison avec un activateur direct

Le ML402, active TREK-1 avec un degré d'activation de 10,06 ± 1,02 (I_{max}/I_0) et une densité maximale de courant de 83,77 ± 16,18 pA/pF à 0 mV (**Figure 41.A**). Le ML402 produit un effet direct correspondant aux effets du C20:2$^{\Delta 11,14}$ (I_{max}/I_0 = 10,05 ± 1,20) et du C20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$ (I_{max}/I_0 = 10,93 ± 2,01). L'effet du ML402 reste toutefois plus faible que les plus forts activateurs de TREK-1, le C18:2$^{\Delta 9,12}$ (I_{max}/I_0 = 24,76 ± 3,33) et le C22:6 $^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ (I_{max}/I_0 = 29,79 ± 4,37) (**Tableau 3**).
La **Figure 41.B** illustre l'activation progressive de TREK-1 par le ML402 à 10 µM selon une rampe dépolarisante de -100 mV à +30 mV, répétée toutes les 10 secondes. Cette cinétique d'activation est reportée sur la **Figure 41.C** à 0 mV. On observe que le début de l'effet du ML402 débute à environ 1 minute de perfusion et se stabilise progressivement autour de 4 minutes de perfusion (**Figure 41.C**). L'état stable est considéré atteint quand 3 traces successives ne montrent pas d'augmentation du courant.
Le lissage de la courbe d'activation par une équation sigmoïde nous donne accès au temps de demi-activation de TREK-1 par le ML402 : T_{50} = 1,85 min. Les acides gras présentent une cinétique d'activation similaire à celle du ML402 : l'effet de chacun des acides gras démarre après une minute de perfusion et se stabilise après quelques minutes (**Figure 41.F-G**). Le C18:2$^{\Delta 9,12}$ et le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$, les deux plus forts activateurs, ont un temps de demi-activation tout à fait semblable au ML402, comme indiqué sur la **Figure 41** ou dans le **Tableau 4.**

	n	Demi-activation min
C18 :2 $^{\Delta 9,12}$	21	1,86 ± 0,16
C20 :2 $^{\Delta 11,14}$	7	4,61 ± 0,30
C20 :4 $^{\Delta 5,8,11,14}$	16	3,97 ± 0,31
C20 :4 $^{\Delta 8,11,14,17}$	12	4,56 ± 0,24
C20 :5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$	17	3,18 ± 0,30
C22 :5 $^{\Delta 4,7,10,13,16}$	11	3,12 ± 0,30
C22 :5 $^{\Delta 7,10,13,16,19}$	12	4,18 ± 0,35
C22 :6 $^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$	20	2,26 ± 0,19
ML402	17	2,11 ± 0,16

Tableau 4

Statistiques descriptives des cinétiques d'activation de TREK-1

Les valeurs temps de demi-activation (minutes) sont exprimées comme la moyenne ± SEM.

Les temps de demi-activation sont reportés dans le **Tableau 4**, ils correspondent à la moyenne du temps de demi-activation ± SEM, calculé pour chaque cellule individuelle. Ainsi, on n'observe pas de corrélation entre le temps de demi-activation de TREK-1 et la longueur de la chaîne carbonée des acides gras (**Figure 42.A**), ce à quoi nous aurions pu nous attendre si l'activation de TREK-1 dépendait de la capacité des acides gras insaturés à s'insérer dans la membrane et à modifier ses propriétés biophysiques. Par contre, il existe une relation positive entre le degré d'activation de TREK-1 et le temps de demi-activation telle que : Temps de demi-activation = f (I_{max}/I_0) (p-value = 0,0022, r = -0,93, **Figure 42.B**).

On peut maintenant supposer qu'il existe au moins un site d'interaction entre TREK-1 et les acides gras insaturés, pour lequel les acides gras présenteraient des affinités différentes, leur permettant d'activer plus ou moins rapidement et fortement le canal TREK-1. Ce site d'interaction ne correspond toutefois pas au site de liaison du ML402, qui lorsqu'il est muté (K271Q) n'empêche pas l'activation par le C20:4$^{\Delta 5,8,11,14}$ (acide arachidonique, Lolicato et al., 2017) (voir partie « **Activateurs pharmacologiques de TREK-1** »).

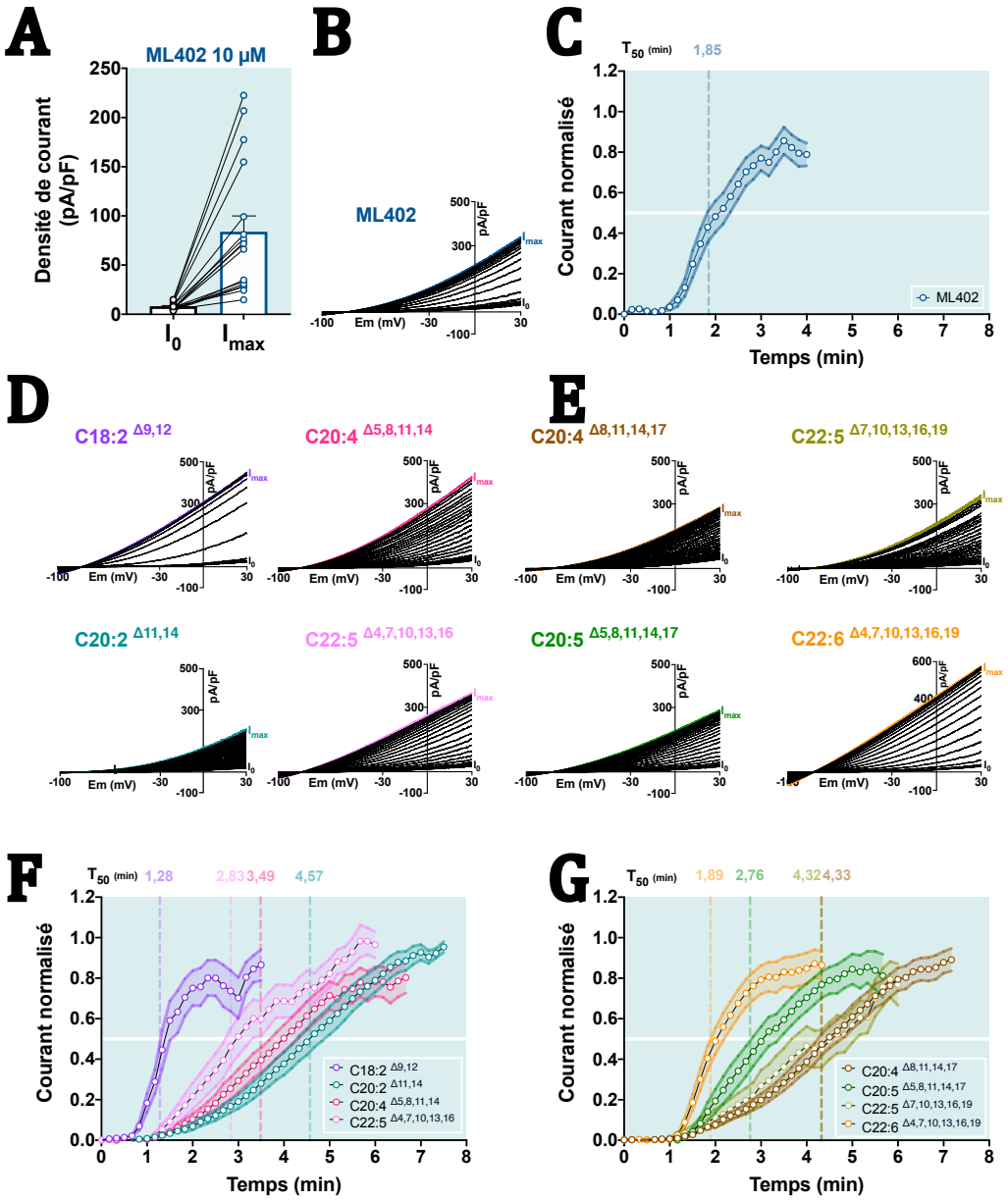

Figure 41

Comparaison des cinétiques d'activation de TREK-1 par un activateur direct (ML402) et les acides gras poly-insaturés

A. *Densité de courant initiale et activée par le ML402 10 µM à 0 mV (I_0 = 7,99 ± 0,90 pA/pF vs I_{max} = 83,77 ± 16,18 pA/pF ; n = 17 ; p-value < 0,0001 ; test apparié de Wilcoxon).* ***B.*** *Traces représentatives de l'activation progressive de TREK-1 par le ML402. L'état stable est considéré à partir de 3 traces successives stables.* ***C.*** *Cinétique d'activation de TREK-1 par le ML402 (moyenne ± SEM) à 0 mV. Le temps (T_{50} en min) indiqué au-dessus correspond au temps de demi-activation obtenu par lissage de la courbe de cinétique avec une équation sigmoïdale.* ***D. et E.*** *Traces représentatives de l'activation de TREK-1 par les différents acides*

gras poly-insaturés à 10 µM. Les acides gras poly-insaturés sont identifiés selon leur nomenclature systématique et séparés selon s'ils appartiennent aux ***D.*** *acides gras Oméga-6 ou aux* ***E.*** *acides gras Oméga-3.* ***F. et G.*** *correspondent aux cinétiques d'activation de TREK-1 par les différents acides gras poly-insaturés* ***F.*** *Oméga-6 et* ***G.*** *Oméga-3, à 0 mV. Les temps indiqués (T_{50} en min) correspondent aux temps de demi-activation pour chacun des acides gras, après lissage de la courbe par une équation sigmoïde.*

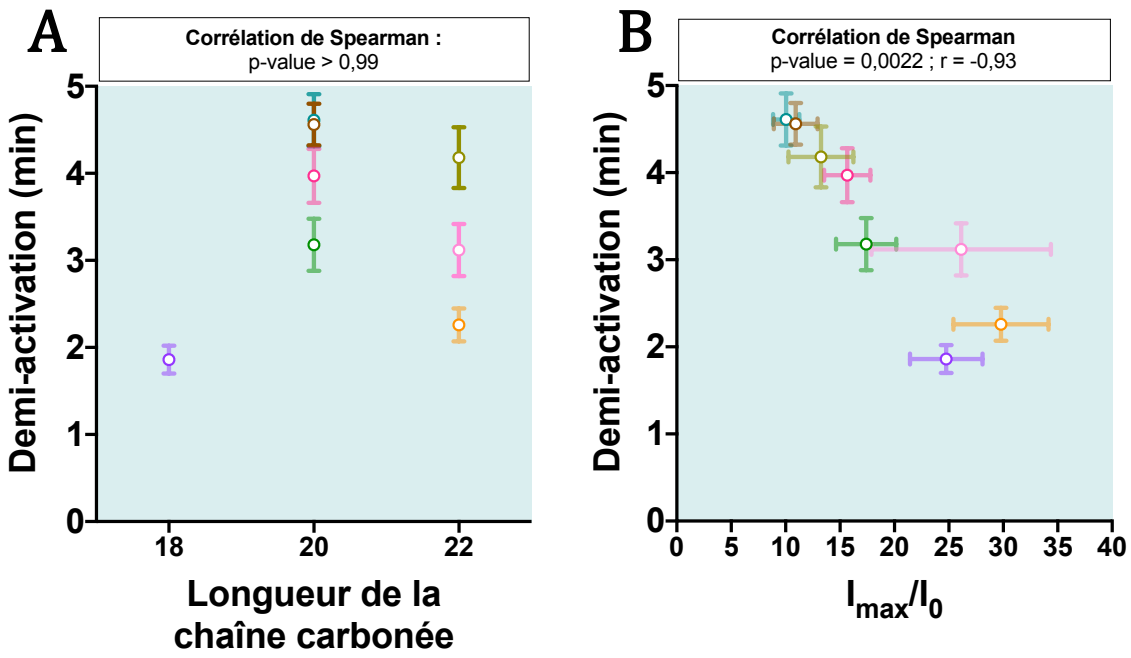

Figure 42

Demi-activation de TREK-1 activé par les acides gras poly-insaturés

A. *Le temps de demi-activation de TREK-1 n'est pas corrélé avec la longueur de la chaîne carbonée des acides gras poly-insaturés (test de corrélation de Spearman : p-value >0,99).* ***B.*** *Il existe une corrélation négative entre le temps de demi-activation et le degré d'activation de TREK-1 produit par les différents acides gras (test de corrélation de Spearman : p-value = 0,0022 et r = -0,93). Les données sont représentées en moyenne ± SEM.*

c2. Cinétique de réversibilité immédiate et totale de l'activation de TREK-1

La réversibilité de l'activation de TREK-1 a été analysée pour le ML402 en comparaison de 3 acides gras poly-insaturés : le C18:$2^{\Delta 9,12}$, le C22:$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ et le C20:$5^{\Delta 5,8,11,14,17}$, les plus forts activateurs des groupes d'acides gras poly-insaturés à 18, 20 et 22 atomes de carbones respectivement.

L'activation de TREK-1 par les acides gras est immédiatement et totalement réversible (**Figure 43.A-B**) et n'est pas corrélée à la longueur des acides gras poly-insaturés (**Figure 43.C**). Le rinçage des acides gras poly-insaturés est réalisé avec le même milieu extracellulaire que celui utilisé pour enregistrer le courant initial, dépourvu d'albumine de sérum bovin (BSA). Or, lorsque les acides gras exercent leurs effets en s'insérant dans la membrane, la réversibilité de leurs effets n'a pas lieu en absence de BSA, une albumine à haute affinité pour les acides gras, permettant de les extraire de la membrane (Xiao et al., 1995 ; Leifert et al., 1999).
Les travaux de Leifert en 1999 montrent la régulation négative du canal sodique voltage-dépendant cardiaque par certains acides gras poly-insaturés oméga-3. Alors que les acides gras C18:$3^{\Delta 9,12,15}$, C22:$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ et C20:$5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ réduisent la conductance maximale du canal et décalent sa courbe I-V vers des potentiels dépolarisés, les acides gras C18:$2^{\Delta 9,12}$, C18:$1^{\Delta 9}$, et le C18:0 n'ont aucun effet sur $Na_v1.5$. L'effet de ces acides gras (C18:$2^{\Delta 9,12,15}$, C22:$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ et C20:$5^{\Delta 5,8,11,14,17}$) passe *via* un mécanisme de fluidification de la membrane et n'est réversible qu'en présence de BSA.

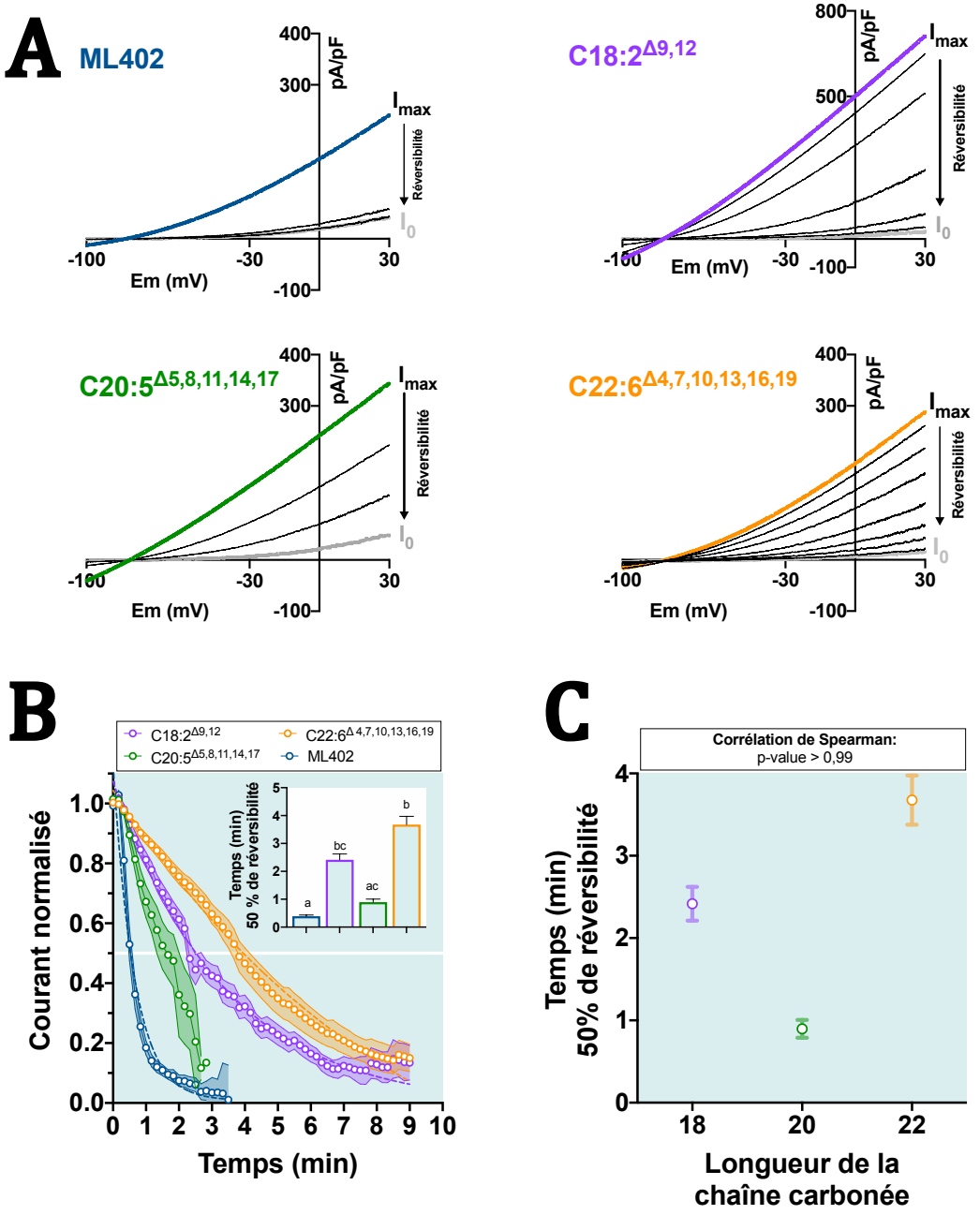

Figure 43

Cinétique de réversibilité des effets des acides gras poly-insaturés et du ML402

A. *Illustration de la réversibilité du courant TREK-1 après son activation par le ML402 et 3 acides gras poly-insaturés, avec une trace toutes les minutes.* ***B.*** *Cinétique de réversibilité du courant TREK-1 pour chacun des composés à 0 mV. Le courant est normalisé et exprimé en moyenne ± SEM. La cinétique de réversibilité est lissée avec une équation exponentielle décroissante (ligne en pointillée), excepté pour le C20:5$^{\Delta 5,8,11,14,17}$. Les groupes sont comparés avec un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn: les groupes qui ne portent pas*

la même lettre son statistiquement différents. ***C.*** *Absence de corrélation entre le temps nécessaire pour avoir 50 % de réversibilité et la longueur des acides gras poly-insaturés.*

c. Étude de la fluidification de la membrane par les acides gras poly-insaturés

Nous avons défini précédemment la membrane plasmique comme une mosaïque fluide et dynamique dans laquelle les acides gras libres sont capables de s'insérer du fait de leur caractéristique amphipathique. Lorsque des acides gras insaturés s'insèrent dans la membrane, ses propriétés biophysiques sont modifiées (Bruno et al., 2007) : elle se courbe (Sheetz and Singer., 1974) et se fluidifie (Leifert et al., 1999).

Ainsi, en s'inspirant des travaux de Leifert et al., en 1999, nous avons évalué les modifications de fluidité de la membrane en présence des acides gras poly-insaturés : C18:$2^{\Delta 9,12}$, C18:$3^{\Delta 9,12,15}$ et C22:$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$. Le C18:$2^{\Delta 9,12}$ et le C22:$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ sont des activateurs de TREK-1 tandis que le C18:$3^{\Delta 9,12,15}$ n'a pas permis d'activation du canal (**Figure 39**). Le principe de fonctionnement la sonde fluorescente, l'acide pyrènedécanoïque, est détaillé dans la partie du matériel et méthode « **Étude de la fluidification membranaire par les acides gras poly-insaturés** ». Brièvement, la diminution du ratio 405/470 nm d'émission de la sonde fluorescente, nous indique une augmentation de la mobilité latérale au sien de la membrane, favorisant la dimérisation de la sonde qui est proportionnelle à la fluidification de la membrane (**Figure 30** et **Figure 44.A**).

La membrane des cellules HEK hTREK-1 #1 n'a pas été fluidifiée par les acides gras C18:$2^{\Delta 9,12}$, C18:$3^{\Delta 9,12,15}$ et C22:$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ à 10 µM, une concentration qui active le canal TREK-1 (**Figure 44.B-D**). Le C18:$2^{\Delta 9,12}$ et le C22:$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ à 10 µM sont les deux plus gros activateurs de TREK-1, en augmentant de plus de 20 fois le courant et produisent une activation concentration dépendante (**Figure 45**). Cette activation commence dès 1 minute de perfusion des acides gras poly-insaturés et se stabilise dans l'ordre de quelques minutes (**Figure 41**). Or, nous n'avons observé aucune variation concernant les propriétés physiques de fluidité de la membrane à 10 µM, même après 50 minutes d'incubation. Ainsi, l'activation de TREK-1 par les acides gras ne met pas en jeu les propriétés de fluidité de la membrane.

Dans la littérature, très peu de travaux se concentrent sur la fluidification de la membrane par les acides gras libres. Cependant, l'étude de Klausner en 1980 montre une fluidification de la membrane de lymphocytes en présence de C18:2$^{\Delta 9,12}$ à une concentration de 30 µg/mL (soit 106,97 µM en considérant le poids moléculaire de 280,45 g/mol) après une période de 20 minutes d'incubation (Klausner et al., 1980). Ainsi, pour témoin positif de la fluidification membranaire, nous avons évalué la fluidité de la membrane en réponse à 100 µM de C18:2$^{\Delta 9,12}$, C18:3$^{\Delta 9,12,15}$ et C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$. A 100 µM, la fluidité de la membrane augmente dès 2 minutes d'incubation pour le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ et à partir de 10 minutes pour les C18:2$^{\Delta 9,12}$ et C18:3$^{\Delta 9,12,15}$ (**Figure 44.B-D**). La différence de cinétique pourrait s'expliquer par le fait que la chaîne aliphatique, hydrophobe, plus longue pour C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ faciliterait son insertion dans la membrane en comparaison du C18:2$^{\Delta 9,12}$ et C18:3$^{\Delta 9,12,15}$.

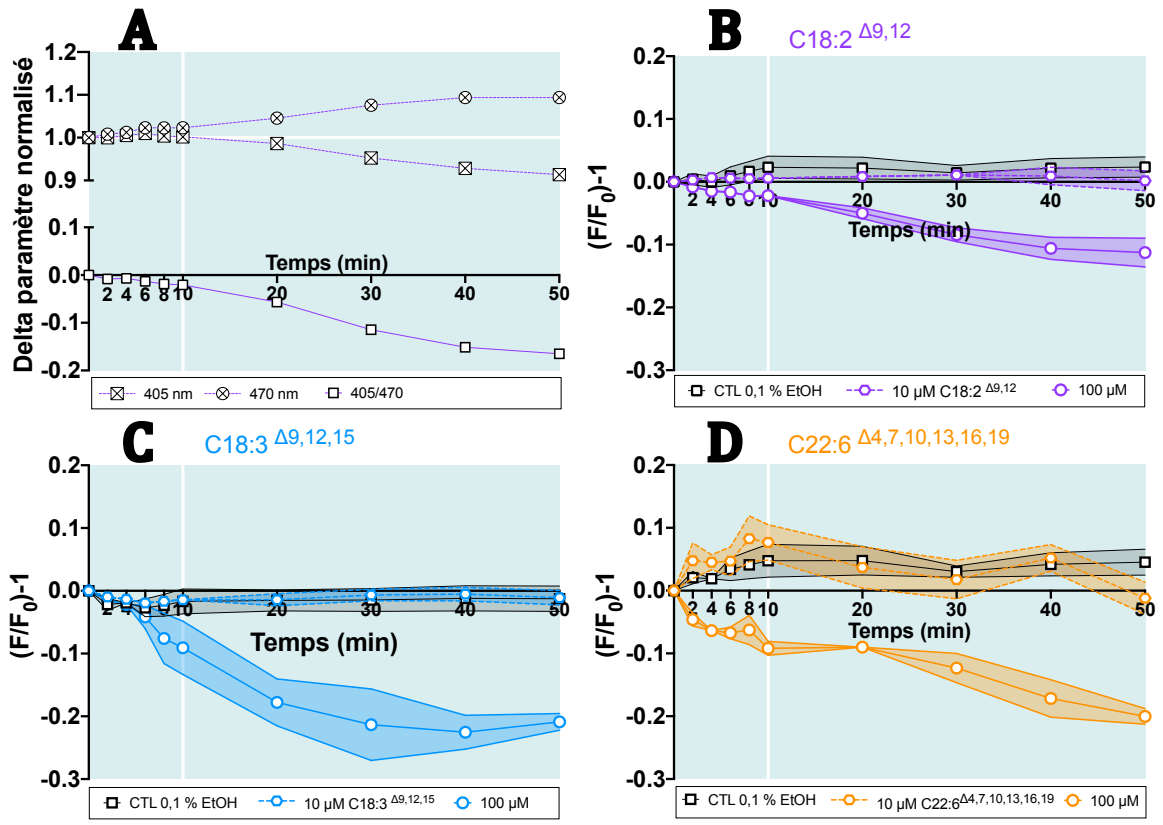

Figure 44

Évaluation de la fluidité de la membrane en réponse aux acides gras poly-insaturés

A. *Illustration de l'évolution des intensités de fluorescence normalisées à 405 nm, à 470 nm et évolution du ratio 405/470 avec 100 µM de C18:2$^{\Delta 9,12}$ durant 50 minutes. Les intensités de fluorescence à 405 nm et 470 nm varient de manière opposée et symétrique. Ces intensités de fluorescence sont normalisées par rapport à leur fluorescence respective au T_0. Le ratio est calculé comme :* $\frac{F}{F_0} - 1$. *La diminution du ratio indique une fluidification de la membrane* ***B-D.*** *Évolution de la fluidité membranaire avec 10 µM ou 100 µM de* ***B.*** *C18:2$^{\Delta 9,12}$,* ***C.*** *C18:3$^{\Delta 9,12,15}$ et* ***D.*** *C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$. Les données sont représentées en moyenne ± SEM. Les contrôles (CTL, noir) sont réalisés avec 0,1 % d'éthanol absolu, correspondant au volume de solvant des acides gras.*

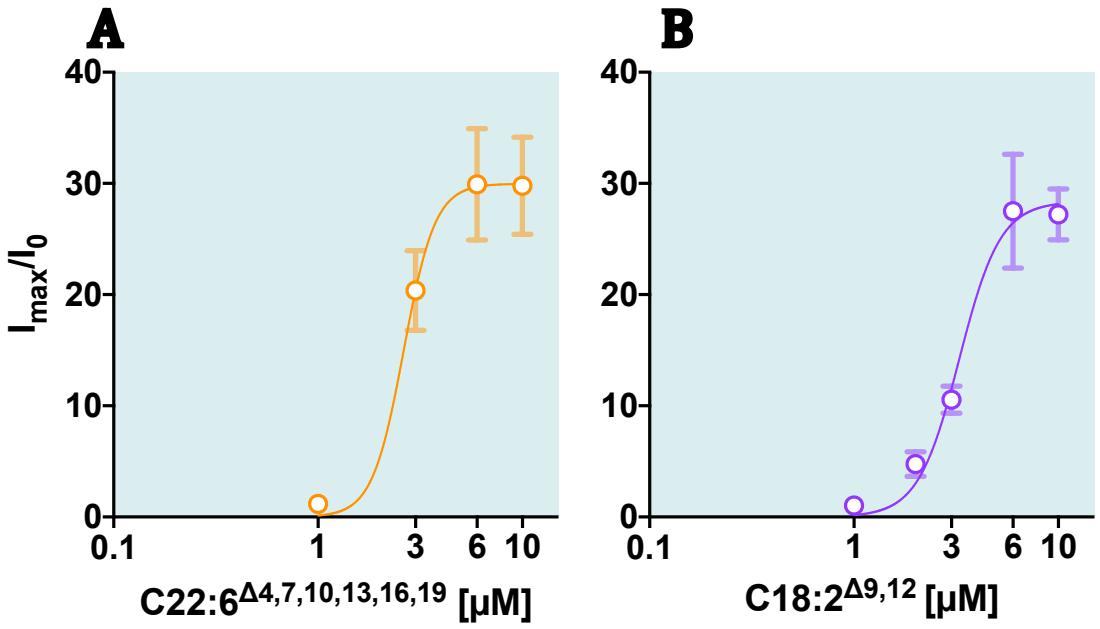

Figure 45

Effet dose-réponse des acides gras poly-insaturés sur le canal TREK-1

*L'activation de TREK-1 par **A.** le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ et **B.** le C18:2$^{\Delta9,12}$ est dose dépendante. Avec un plateau d'activation atteint à 6 µM pour ces deux acides gras. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Le lissage par une équation de Hill donne un K_D de 2,63 µM pour le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ et de 3,27 µM pour le C18:2$^{\Delta9,12}$.*

d. Étude de l'impact de la courbure membranaire sur TREK-1

Après l'impact de la fluidité membranaire, nous avons évalué l'impact de la courbure de la membrane sur l'activité de TREK-1, en configuration *inside-out* sur les cellules HEK hTREK-1 #1.

A l'échelle de la cellule entière, des courbures de la membrane peuvent être induites pharmacologiquement à l'aide de molécules amphipathiques s'insérant préférentiellement dans le feuillet externe ou le feuillet interne de la membrane (Sheetz and Singer., 1974) (**Figure 19**). En s'insérant, ces molécules vont enrichir localement la membrane, et étendre la surface du feuillet externe ou interne dans lequel elles s'insèrent. Cette insertion préférentielle est responsable d'une courbure convexe ou concave de la membrane : lorsque le feuillet externe

est étendu, la membrane devient crénelée (courbure convexe) et on parle alors de *crenators* ; lorsque la surface du feuillet interne s'étend, la membrane s'invagine (courbure concave) et on parle de molécules *cup-formers*. Certaines de ces molécules sont des modulateurs connus du canal TREK-1, comme le TNP et la CPZ (**Figure 19** et **Figure 36**).

Les acides gras sont des molécules amphipathiques anioniques qui devraient se comporter comme le TNP, c'est-à-dire qu'ils devraient s'insérer préférentiellement dans le feuillet externe en raison de l'asymétrie de charge. Nous avons travaillé en configuration *inside-out*, nous permettant de perfuser les acides gras par le feuillet interne de la membrane (**Figure 46.A**). En condition iso-potassique, le potentiel de membrane est maintenu à +30 mV devant favoriser l'insertion préférentielle dans le feuillet interne. Les acides gras C18:$2^{\Delta 9,12}$ et C22:$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ sont perfusés à une concentration de 5 µM et les cinétiques d'activation pour ces deux acides gras sont reportées dans la **Figure 46.B-C** et le **Tableau 5**. Le feuillet d'insertion des acides gras ne semble donc pas avoir d'impact sur l'activation de TREK-1 puisqu'il est aussi bien activé en configurations cellule-entière qu'*inside-out*.

Les encadrés de la **Figure 46.B-C** illustrent bien le mode de fonctionnement caractéristique de TREK-1 par *burst* d'ouverture avec un phénomène de *flickering* en patch excisé (Li et al., 2006). En raison d'un grand nombre de canaux présents sous la pipette de patch, l'analyse des expériences en configuration *inside-out* ne permet pas de donner une valeur numérique de Po du canal. Cependant, ces expériences suggèrent qu'il existe une fraction de canaux « silencieux » dans les conditions initiales, donc activables, probablement en raison d'une Po très faible (**Figure 46**). Cette fraction de canaux « silencieux » est révélée par l'activation par les C18:$2^{\Delta 9,12}$ et C22:$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ (**Figure 46.B-C**).

Comme les acides gras poly-insaturés, le ML402 active TREK-1 en configuration cellule-entière et en configuration *inside-out* (**Figure 47** et **Tableau 5**).

	n	**État-stable** min	**50% de rinçage** s
C18 :2 $^{\Delta 9,12}$	4	4,6 ± 0,4	18,3 ± 6,3
C22 :6 $^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$	6	2,9 ± 0,3	18,3 ± 4,2
ML402	6	2,6 ± 0,6	15,5 ± 7,6

Tableau 5

Statistiques descriptives des cinétiques d'activation et de réversibilité du canal TREK-1 en configuration inside-out

Les acides gras insaturés sont perfusés à une concentration de 5 µM et le ML402 à 10 µM. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM et le temps pour atteindre l'état stable d'activation est indiqué en minutes tandis que le temps pour atteindre 50 % de réversibilité du courant est indiqué en secondes.

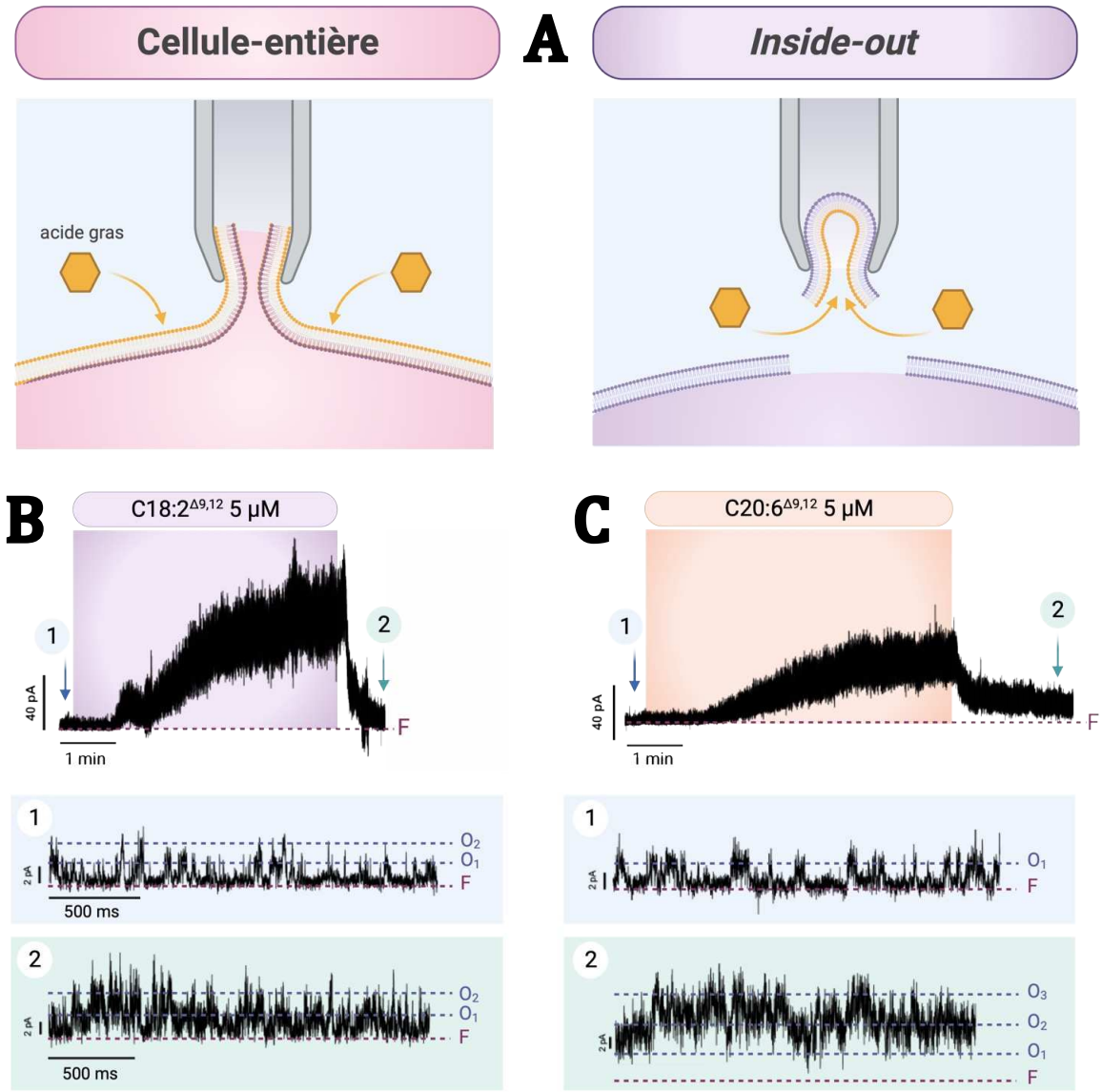

Figure 46

Activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés en configuration inside-out

A. *En configuration cellule-entière, les acides gras poly-insaturés arrivent par le feuillet externe de la membrane tandis qu'en configuration inside-out, les acides gras arrivent par le feuillet interne de la membrane.* ***B.*** *Cinétiques représentatives de l'activation et de la*

réversibilité du canal TREK-1 activé par 5 µM de C18:2$^{\Delta 9,12}$ et ***C.*** *5 µM de C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$, en configuration inside-out, en conditions iso-potassique, à +30 mV. Les encadrés (1) et (2) agrandissent le courant initial (1) et le courant après le rinçage des acides gras (2), indiqués respectivement par les flèches bleues et vertes.*

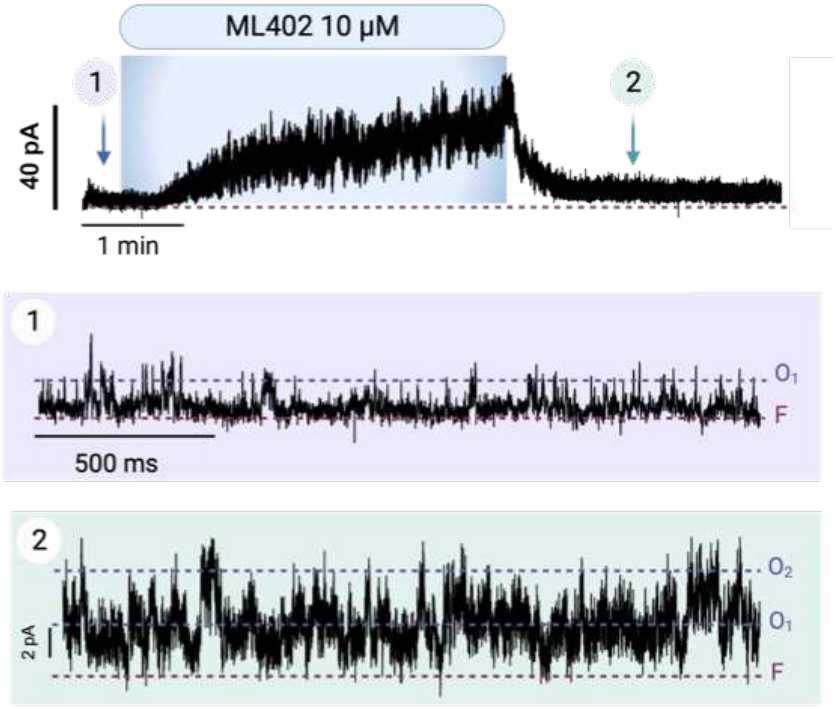

Figure 47

Activation de TREK-1 par le ML402 en configuration inside-out

Cinétiques représentatives de l'activation et la réversibilité de l'activation du canal TREK-1 activé par 10 µM de ML402, en configuration inside-out, en conditions iso-potassique, à + 30 mV. Les encadrés (1) et (2) agrandissent le courant initial (1) et le courant après le rinçage (2), indiqués respectivement par les flèches bleues et vertes.

e. Étude de l'affinité d'interaction du complexe TREK-1-acide gras poly-insaturés

Nous avons émis l'hypothèse d'une interaction entre TREK-1 et les acide gras poly-insaturés et nous avons exploré l'affinité de ce complexe TREK-1-acide gras *via* la mesure d'affinité par décalage du spectre de fluorescence.

e1. Mesure d'affinité selon la méthode du déplacement spectrale de fluorescence

Pour évaluer la force d'interaction ou affinité entre TREK-1 et le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ nous avons utilisé une méthode biophysique basée sur le déplacement spectrale de fluorescence (« *Spectral Shift measurement* » ou SpS). Le principe de la technique est détaillé dans la section du matériel et méthode « **Mesure d'affinité protéine-acide gras** ».

Brièvement, des microsomes issus des cellules HEK hTREK-1 #1 et de cellules HEK 293T ont été purifiés ; ces microsomes correspondent à des fragments de la membrane plasmique obtenus après lyses osmotiques et mécanique (seringues à insuline) des cellules et des cycles de centrifugations. Les protéines de ces deux types de microsomes ont été marquées par un fluorophore. Lorsque la protéine forme un complexe avec son ligand, la longueur d'onde d'émission de la sonde se décale vers le bleu (vers 650 nm) ou vers le rouge (vers 670 nm). La mesure d'affinité par SpS a donc été réalisée selon une gamme de dilution de C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$, de 1 mM à 30,5 nM, en présence de microsomes issus des cellules HEK hTREK-1 #1 ou de microsomes issus de cellules HEK 293T comme condition contrôle.

L'analyse des données de décalage du spectre de fluorescence après normalisation de la fluorescence selon les **équations (25)** et **(26)** de la partie « **Analyses des données de fluorescence** » permet d'obtenir la courbe d'affinité spécifique de TREK-1 selon la concentration de C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ (**Figure 48**). La constante de dissociation (K_D) du C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ pour TREK-1 est de 44 µM.

Cette valeur de K_D est plus importante que ce à quoi nous aurions pu nous attendre étant donné que le lissage des courbes dose-réponse avec une équation de Hill du C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ donne un K_D de 2,63 µM et de 3,27 µM pour le C18:2$^{\Delta9,12}$ (**Figure 45**).

Ces résultats suggèrent qu'il existe bien interaction des acides gras poly-insaturés avec le canal TREK-1, mais que cette interaction nécessite probablement une insertion des acides gras insaturés dans la membrane pour atteindre leur site de liaison sur le canal TREK-1.

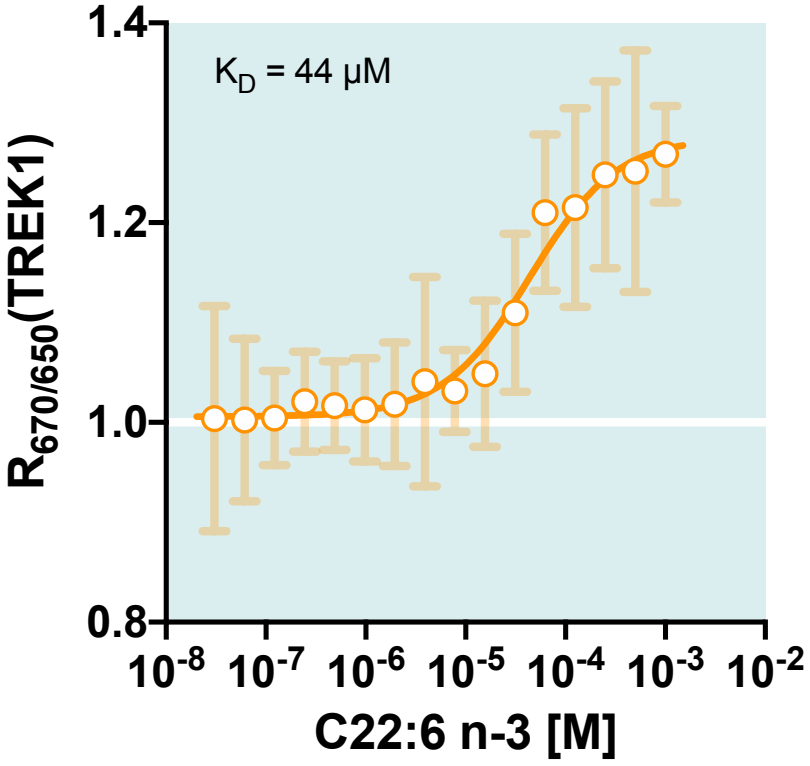

Figure 48

Mesure d'affinité par décalage du spectre de fluorescence du complexe TREK-1-C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$

Le ratio $R\frac{670}{650}$(TREK1) représente l'affinité de liaison du C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ (de 1 mM à 30,5 nM) pour le canal TREK-1 (n = 5-9). Ce ratio de fluorescence est normalisé par rapport à la fluorescence contrôle des microsomes issus des cellules HEK 293T comme décrit par les ***Équations (26)*** *et* ***(27)*** *du matériel et méthode.*

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans cette étude, nous confrontons les hypothèses sur le mécanisme d'action des acides gras poly-insaturés dans l'activation du canal TREK-1 : une activation mécano-sensible due à une

modification de tension membranaire consécutive de leur insertion dans la membrane ou une activation *via* une interaction directe.

Dans la littérature, le fonctionnement de nombreuses protéines est modifié par les acides gras poly-insaturés. Parmi ces protéines, on retrouve des récepteurs ionotropiques neuronaux modulé par l'acide docosahexaénoïque (C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$, DHA) comme le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (Bouzat et Barrantes., 1993) ou le récepteur $GABA_A$ perméable aux ions chlorures (Nabekura et al., 1998). Les canaux ioniques voltage-dépendants sont aussi régulés par les acides gras poly-insaturés et plus particulièrement par les Oméga-3. Ce sont notamment les travaux d'Alexander Leaf (Leaf et Xiao., 2022 pour revue), entre 1994 et 1998 qui montrent l'intérêt de l'EPA (acide eicosapentaénoïque, C20:5$^{\Delta 5,8,11,14,17}$) et du DHA dans la régulation du canal calcique de type L (Xiao et al., 1997) et du canal sodique voltage-dépendant cardiaque (Xiao et al., 1995). Des études plus récentes montrent que le canal potassique voltage-dépendant $K_V7.1$ est régulé par les acides gras poly-insaturés et que cette régulation implique une interaction entre les acides gras insaturés et le canal, en s'insérant dans la membrane au contact du segment transmembranaire S4 (Liin et al., 2015).

Nos expériences en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp ont montré que TREK-1 n'est pas activé par les acides gras saturés, comme le C18:0. Mais il est activé par le C18:1$^{\Delta 9}$ et l'effet du C18:2$^{\Delta 9,12}$ est plus de 3 fois supérieur à celui du C18:1$^{\Delta 9}$. Le C18:3$^{\Delta 9,12,15}$ quant à lui n'active pas le canal TREK-1. Pourtant, ces quatre acides gras (C18:0, C18:1$^{\Delta 9}$, C18:2$^{\Delta 9,12}$ et C18:3$^{\Delta 9,12,15}$) ont le même nombre de carbones, la même tête polaire, c'est-à-dire les mêmes propriétés hydrophobes ; ils devraient donc s'insérer dans la membrane de la même manière et former des courbures équivalentes.

De la même manière, comment expliquer que le C22:5$^{\Delta 7,10,13,16,19}$ et le C22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$ n'aient pas les mêmes effets sur TREK-1 alors qu'ils présentent le même nombre de carbones et d'insaturations ? Il n'y a effectivement pas de corrélation entre la longueur de la chaîne carbonée des acides gras insaturés et l'activation de TREK-1, alors que leur capacité d'insertion dans la membrane augmente.

Aux vues de ces résultats, qui diffèrent de ceux obtenus sur l'activation de TRAAK par les acides gras (**Figure 22**, Fink et al., 1998 ; revue de Patel et al., 2001), nous avons vérifié si les modifications biophysiques de la membrane (fluidité et courbure) étaient corrélées avec l'activation de TREK-1.

En ce qui concerne la fluidification de la membrane, la membrane des cellules HEK hTREK-1 #1 n'a pas été fluidifiée par les acides gras C18:2$^{\Delta 9,12}$, C18:3$^{\Delta 9,12,15}$ et C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ à 10 µM. Pourtant, 10 µM d'acides gras poly-insaturés est une concentration qui active le canal TREK-1. A cette concentration, le C18:2$^{\Delta 9,12}$ et le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ à 10 µM sont les deux plus gros activateurs de TREK-1, en augmentant de plus de 20 fois le courant (**Figure 45**). L'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés débute dès 1 minute de perfusion et se stabilise dans l'ordre de quelques minutes (**Figure 41**). Or, il n'y a pas d'augmentation de la fluidité de la membrane à 10 µM dans une cinétique de quelques minutes, correspondant à la cinétique d'activation de TREK-1. De plus, la fluidification n'apparaît pas, même après 50 minutes d'incubation. Ainsi, on peut supposer qu'à cette concentration (10 µM) la fluidification de la membrane nécessite une période d'incubation plus longue ou que la concentration en acides gras poly-insaturés n'est pas suffisante pour fluidifier la membrane.

Dans la littérature, l'étude de Leifert et al., en 1999 observait une inhibition du canal sodique cardiaque par les acides gras poly-insaturés. En même temps, et contrairement à nous, il était aussi observé une fluidification de la membrane des cardiomyocytes ventriculaires de rat par 20 µM d'acides gras poly-insaturés, dont le C18:3$^{\Delta 9,12,15}$ et C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$. Il n'y avait cependant pas de fluidification de la membrane par le C18:2$^{\Delta 9,12}$. Les différences méthodologiques entre les travaux de Leifert et al et les nôtres peuvent expliquer la divergence de nos résultats. Dans leur étude, les cardiomyocytes sont exposés à 20 µM de chacun des acides gras et aucune donnée de cinétique n'est rapportée, si bien que nous ne savons pas au bout de combien de temps d'incubation la fluidification survient (Leifert et al., 1999). Les travaux de Leaf sur ce même canal sodique cardiaque indiquent que si l'état stable d'inhibition avait été attendu, la réversibilité de l'effet inhibiteur de l'EPA n'était permise qu'en présence de BSA (Xiao et al., 1995). Si l'état stable de l'inhibition par l'EPA n'était pas attendu, alors le rinçage pouvait se faire en l'absence de BSA. Ainsi, l'attente de l'état stable d'inhibition du canal permettait une plus longue période d'incubation, durant laquelle les acides gras insaturés avaient le temps de s'insérer dans la membrane. Alors, débuter le rinçage avant l'obtention de l'état stable diminuait la période d'incubation et les acides gras insaturés n'avaient pas le temps de s'insérer dans le sarcolemme. Finalement, la fluidification de la membrane ne semble donc pas être la médiatrice de l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés.

TREK-1 est un canal mécano-sensible activé par les pressions négatives et la courbure convexe de la membrane et inhibé par la courbure concave de la membrane (**Figure 19**). Nous nous sommes donc concentrés sur l'étude d'une possible influence de la courbure de la membrane

dans la réponse de TREK-1 aux acides gras poly-insaturés. Nos expériences en configuration *inside-out* de la technique de patch-clamp montrent que TREK-1 est activé par les acides gras poly-insaturés depuis les deux feuillets de la membrane. Ainsi, le feuillet membranaire d'insertion des acides gras insaturés n'a pas d'impact sur l'activation du canal TREK-1 tandis que la littérature établit qu'il est activé par la courbure convexe et inhibé par la courbure concave. Ainsi, même si une concentration de 10 µM d'acide gras est suffisante pour modifier les propriétés biophysique de la membrane, la courbure induite par les acides gras ne semble pas être nécessaire à son activation.

Dans la littérature, le TNP (*crenator*) en configuration cellule-entière provoque une augmentation du courant TREK-1 dans des cellules COS (Patel et al., 1998 ; TNP 100 µM : I/I_0 ~ 2 fois plus de courant et TNP 400 µM : I/I_0 ~ 4 fois plus de courant) pour une concentration 10 fois supérieure à celle que nous avons utilisée pour nos expériences. Ces informations amènent à se poser la question suivante : *est-ce que les acides gras poly-insaturés sont des crenators efficaces à une concentration de 10 µM ?* Comme aucune fluidification de la membrane n'est observée à 10 µM (**Figure 44**), on peut se demander si *l'insertion des acides gras poly-insaturés dans la membrane à 10 µM est suffisante pour modifier les propriétés biophysiques de la membrane, dans un laps de temps de quelques minutes ?*

Par ailleurs, le TNP et la CPZ augmentent tous deux la probabilité d'ouverture du canal mécano-sensible Msc d'*Escherichia Coli*, suggérant que les effets de ces molécules amphipathiques ne dépendent pas du feuillet dans lequel elles s'insèrent, mais plutôt de l'augmentation de la tension membranaire en réponse à la déformation de la membrane (Markin et Martinac., 1991). L'augmentation de la probabilité d'ouverture du canal Msc survient après 20 minutes d'incubation avec 20 µM de CPZ et 500 µM de TNP tandis que l'activation de TREK-1 par les acides gras survient autour d'une minute d'application et se stabilise autour de 5 min suggérant des mécanismes différents. Aussi, l'activation de TREK-1 et du canal Msc est permise par une concentration de TNP 10 à 50 fois supérieure (Patel et al., 1998 : 100 µM et 400 µM ; Markin et Martinac., 1991 : 500 µM) à la concentration en acide gras poly-insaturés (10 µM).

Pour finir, nos expériences en configuration *inside-out* confortent l'hypothèse plus probable d'une interaction directe entre les acides gras insaturés et le canal TREK-1. L'ensemble des résultats obtenus en configurations cellule-entière et *inside-out* nous permettent de discuter de l'accessibilité du ou des sites d'interactions. L'étude de l'affinité TREK-1-acide gras par décalage du spectre de fluorescence établie un K_D de l'ordre de la dizaine de µM (44 µM) et montre une interaction des acides gras insaturés avec TREK-1. En conclusion, il est fortement

possible que les acides gras poly-insaturés interagissent avec le canal TREK-1 et que leur(s) site(s) d'interaction(s) soit accessible depuis la face interne et externe de la membrane.

Notons que les effets des acides gras insaturés sur TREK-1 sont immédiatement et totalement réversibles, avec un milieu dépourvu de BSA dans les deux configurations de patch-clamp (cellule-entière et *inside-out*). Ceci suggère une fois encore que ce n'est pas l'insertion membranaire des acides gras insaturés qui déclenche l'activation de TREK-1, mais plutôt une liaison affine, non covalente et donc réversible au rinçage, entre le canal et les acides gras insaturés. L'activation de TREK-1 par les acides gras en configuration *inside-out* suggère aussi qu'elle ne fait pas intervenir de récepteur membranaire, de voie intracellulaire ou de métabolites enzymatiques des acides gras insaturés.

Les acides gras insaturés se comportent donc comme des activateurs directs du canal TREK-1. Ils présentent des cinétiques d'activation et de réversibilité comparables aux cinétiques du ML402, un activateur direct. Le ou les site(s) d'interaction des acides gras insaturés avec TREK-1 serai(en)t donc comme le ML402 accessible(s) au travers de la membrane, à partir des deux feuillets externe (configuration cellule-entière) et interne (configuration *inside-out*) de la membrane.

Nous proposons finalement un mécanisme d'action des acides gras insaturés en deux temps : (1) les acides gras poly-insaturés entrent par la membrane, grâce à leur propriété hydrophobe, pour (2) rejoindre leur site d'interaction avec le canal TREK-1. L'interaction des acide gras poly-insaturés avec TREK-1 serait de nature non-covalente et leur interaction avec la membrane ne modifie pas ses propriétés biophysiques à des concentrations inférieures ou égale à 10 µM, expliquant la réversibilité rapide et total de l'effet (**Figure 43**). Toutefois, il reste encore à déterminer la ou les caractéristiques indispensables aux acides gras insaturés pour interagir et activer le canal TREK-1 et déterminer le site d'interaction.

B. VARIABILITE DE LA REPONSE AUX ACIDES GRAS ET MECANISME D'ACTION

Au cours de ma thèse, nous avons été surpris par la grande variabilité observée dans le degré d'activation de TREK-1 (I_{max}/I_0) par les acides gras poly-insaturés dans les cellules HEK hTREK-1, en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp. Vous avez peut-être déjà pris connaissance de cette variabilité dans la **Figure 40** et dans la **Figure 45.**

Cette partie est donc dédiée à l'analyse de la variabilité de l'activation de TREK-1 par les acides gras. En comparant deux modèles de surexpression stable de TREK-1 (HEK hTREK-1 #1 : Moha ou Maati et al., 2011 et HEK hTREK-1 #2 : Andharai et al., 2017) et un modèle de transfection transitoire dans des cellules HEK 293T avec le canal TREK-1_{WT} et un mutant gain de fonction du canal TREK-1_{G171D}, nous étudierons l'origine de cette variabilité. Toutes les cellules ont été cultivées dans les mêmes conditions.

1. METHODE D'ANALYSE DE LA VARIABILITE DANS UN MODELE DE SUREXPRESSION STABLE

La variabilité dans le degré d'activation de TREK-1 complique la discrimination statistique des effets de chacun des acides gras poly-insaturés (**Figure 49**). Au-delà de compliquer l'analyse statistique, la variabilité peut provenir d'« erreurs » survenues lors de l'expérimentation ou être intrinsèque au mécanisme d'action d'activation du canal par les acides gras poly-insaturés ; il était donc indispensable d'identifier son origine.

Malgré des critères d'inclusion strictes et des conditions d'expérimentations contrôlées (voir section du matériel et méthode « **Patch-clamp en configuration cellule-entière** »), la variabilité était toujours présente.

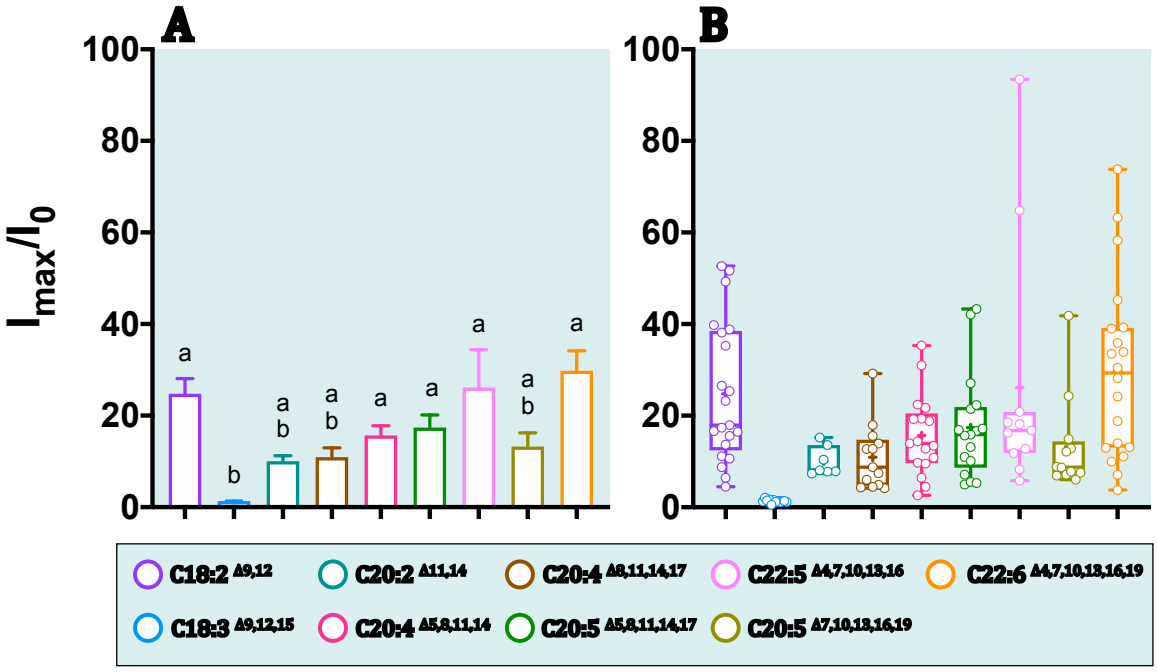

Figure 49

Variabilité du degré d'activation du canal TREK-1 par les acides gras

A. *Graphique illustrant la moyenne + SEM du degré d'activation de TREK-1 par chacun des acides gras à 0 mV en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp (cellule HEK hTREK-1 #1). Les groupes sont comparés avec un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn : les groupes qui ne portent pas la même lettre son statistiquement différents.* ***B.*** *Les boîtes à moustaches avec les données individuelles illustrent la variabilité dans la réponse de TREK-1 aux acides gras à 0 mV. La médiane est représentée par une ligne, la moyenne par une croix et les barres d'erreurs représentent les valeurs minimale et maximale.*

a. Variabilité du courant initial

Pour identifier l'origine de cette variabilité, nous avons détaillé les paramètres électrophysiologiques initiaux : le potentiel de membrane initial (Em_0 en mV) et le courant initial (I_0 en pA/pF).

a1. TREK-1 participe à l'établissement du potentiel de membrane

La première chose remarquable est que le potentiel de membrane initial (Em_0) des cellules HEK hTREK-1 #1 varie largement entre -82 mv et -53 mV (valeurs min et max ; n = 130), tout comme le courant initial (I_0) à 0 mV, entre 2,37 pA/pF et 54,41 pA/pF (valeurs min et max ; n = 130). Toutes les statistiques descriptives sont données dans le **Tableau 6** et la dispersion de ces paramètres est illustrée dans la **Figure 50.A-B.**

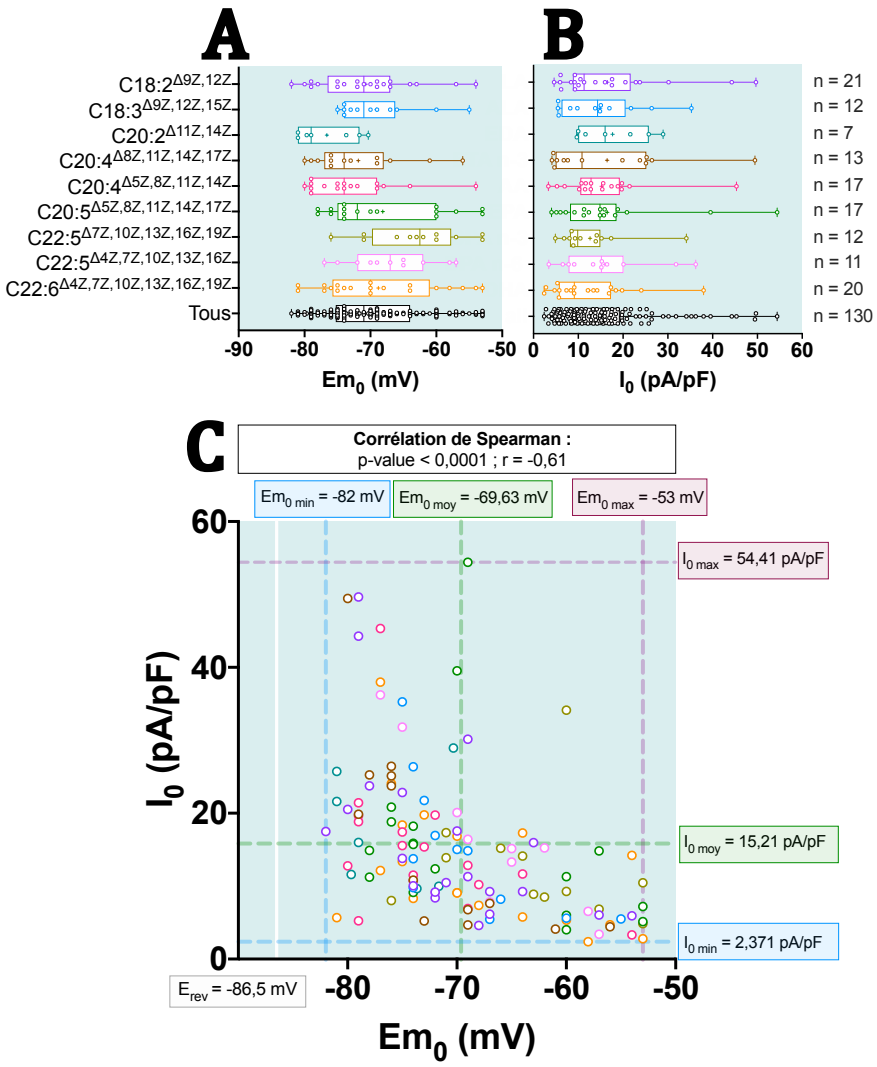

Figure 50

Variabilité initiale associée à la lignée stable de cellules HEK surexprimant TREK-1

A-B. *Boîtes à moustaches illustrant la dispersion des points pour* ***A.*** *le potentiel de membrane (Em_0 en mV) et* ***B.*** *la densité de courant initiale (I_0 en pA/pF) avant la perfusion de chacun des acides gras poly-insaturés. La médiane est représentée par la ligne, la moyenne par une croix*

et les barres d'erreurs représentent les valeurs minimale et maximale. Les groupes ont été comparés avec un test de Kruskal-Wallis et il n'apparaît aucune différence statistique. ***C.*** *Le potentiel de membrane et la densité de courant initiale sont corrélés (corrélation de Spearman : p-value < 0,0001 et r = -0,61).*

Une hypothèse que nous avons émise pour expliquer la variabilité du I_0 et de Em_0 était que le courant initial n'était pas uniquement porté par TREK-1.
Dans nos conditions, le potentiel d'équilibre théorique du potassium est :

(29) $E_K = 58.\log\frac{5}{155} = -86{,}498$ mV

Le potentiel de membrane moyen Em_0 de ces cellules HEK hTREK-1 est de -69,63 ± 0,69 mV et le courant initial I_0 à 0 mV est de 15,83 ± 1,11 pA/pF (moyenne ± SEM ; n = 130) (**Figure 50.A-B** et **Tableau 6**).
Le I_0 des cellules HEK hTREK-1 présente la rectification sortante caractéristique du canal TREK-1 (**Figure 51.C**). En présence de 10 µM de Norfluoxétine (NrFlx), un métabolite de la fluoxétine inhibiteur de TREK-1 (Kennard et al., 2005 ; IC_{50} NrFlx = 9 ± 1 µM), le courant initial des cellules HEK hTREK-1 diminue de 56,04 ± 4,53 % (**Figure 51.A**). Cette diminution du courant s'accompagne de la perte de la rectification sortante et d'une dépolarisation des cellules (**Figure 51.B**). Ainsi, le I_0 des cellules HEK hTREK-1 est principalement porté par le canal TREK-1.
Il est à noter que d'autres canaux sont inhibés par la fluoxétine ou son métabolite la norfluoxétine : le canal cationique non sélectif TRPC6 (fluoxétine, Boekell et al., 2022), et les canaux potassiques voltage-dépendants K_v2.1 (*KCNB1*, fluoxétine : IC_{50} = 51.3 µM ; Chen et al., 2015, Wang et al., 2020), K_v3.1 (*KCNC1*, norfluoxétine : IC_{50} = 0.80 ± 0.06 µM ; Choi et al., 2001) et K_v11.1 (hERG, *KCNH2*, norfluoxétine ; Rajamani et al., 2006).

Les cellules HEK hTREK-1 sont hyperpolarisées (Em_0 = -69,63 ± 0,69 mV) en comparaison de cellules natives HEK 293T sans surexpression de TREK-1 qui présentent un potentiel de membrane de -34,17 ± 2,4 mV et un courant initial de 4,89 ± 0,92 pA/pF à 0 mV (n = 8) (**Tableau 6**).

Dans les cellules HEK 293T aucune conductance n'est activée par 10 µM de C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$, un des plus gros activateur de TREK-1, même en respectant une période minimale de 3 min de perfusion. Dans les cellules HEK hTREK-1 le courant TREK-1 est activé par les acides gras poly-insaturés et son activation s'accompagne d'une hyperpolarisation membranaire (**Figure 51**). La **Figure 52.B** illustre l'hyperpolarisation du potentiel de membrane lors de la perfusion de 10 µM de C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$. Tous les acides gras induisent une hyperpolarisation de la membrane (**Figure 52.A**), sauf le C18:3$^{\Delta 9,12,15}$ qui n'active pas le canal TREK-1 (**Figure 39**). Ainsi, la surexpression de TREK-1 dans les cellules HEK, mène le potentiel de membrane des cellules plus proche du potentiel théorique du potassium (E_K), sans l'atteindre totalement (-69,63 ± 0,69 mV). Ainsi, le canal TREK-1 permet par son activité initiale l'hyperpolarisation du potentiel de repos des cellules. Le potentiel d'équilibre du potassium n'est pas atteint en raison des autres conductances (Cl^- et Na^+) présentes dans les cellules HEK. La perfusion d'acides gras poly-insaturés accentue l'hyperpolarisation jusqu'à -80,34 ± 0,50 mV (n = 130) (**Figure 52.A**).

Cette accentuation de l'hyperpolarisation suggère qu'en condition initiale, une fraction des canaux TREK-1 n'est pas active (faible Po) et que l'activation de TREK-1 par son environnement est indispensable pour faire tendre le potentiel de membrane du potentiel d'équilibre théorique du potassium.

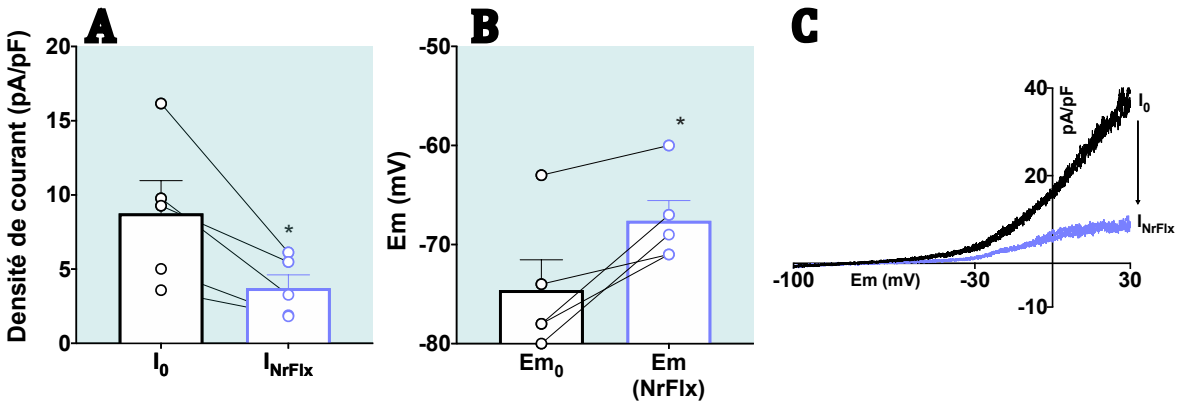

Figure 51

Inhibition du courant TREK-1 par la Norfluoxétine

A. *La norfluoxétine à 10 µM (IC_{50} = 9 ±1 µM) inhibe 56,04 ± 4,53 % du courant initial à 0 mV.* ***B.*** *Cette inhibition de TREK-1 est corrélée avec une dépolarisation du potentiel de membrane qui passe de -74,60 ± 3,06 mV à -67,60 ± 2,04 mV.* ***C.*** *L'inhibition du courant est associée à la perte de la rectification sortante caractéristique du canal TREK-1.*

Cellules HEK hTREK-1 #1			
	Em_0	**I_0**	**Cm**
n = 130	mV	pA/pF	pF
Moyenne	-69,63	15,21	27,16
SD	7,85	12,61	2,90
SEM	0,69	0,92	0,25
IC 95 %	[−70,99 ; −68,26]	[13,65 ; 18,02]	[26,65; 27,661]
Médiane	-71	13,08	27
Max	-53	54,41	35
Min	-82	2,37	20
Cellules HEK 293 T			
	Em_0	**I_0**	**Cm**
n = 8	mV	pA/pF	pF
Moyenne	-34,17	4,89	24,50
SD	5,88	2,59	2,93
SEM	2,40	0,92	1,04
IC 95 %	[−40,34 ; −28,00]	[2,72 ; 7,06]	[22,05 ; 26,95]
Médiane	-35	4,28	24,50
Max	-25	10,49	30
Min	-40	2,92	20

Tableau 6

Statistiques descriptives des paramètres électrophysiologiques initiaux

Em_0 correspond au potentiel de membrane initial en mV, I_0 à la densité de courant initial exprimée en pA/pF et Cm à la capacitant membranaire en pF. SD correspond à l'écart-type (standard error), SEM à l'erreur type de la moyenne (standard error of the mean), IC à l'intervalle de confiance 95% de la moyenne, Coeff Var au coefficient de variation, Max à la valeur maximale et min à la valeur minimale.

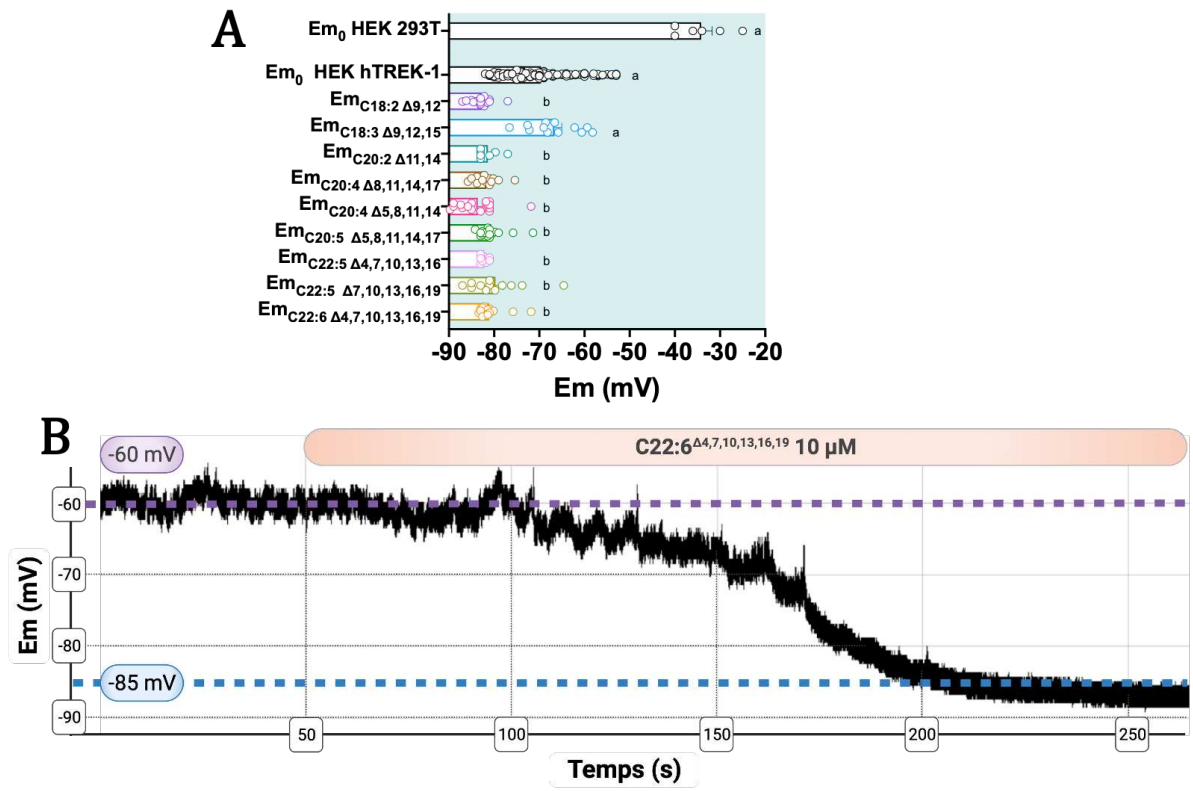

Figure 52

Hyperpolarisation du potentiel de membrane des cellules HEK hTREK-1 par le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$

A. *Potentiel de membrane des cellules HEK hTREK-1 suite à l'application des différents acides gras poly-insaturés.* ***Em$_0$*** *correspond au potentiel de membrane initial, avant perfusion des acides gras poly-insaturés (10 µM).* ***B.*** *Exemple d'hyperpolarisation du potentiel de membrane d'une cellule HEK hTREK-1 avec la perfusion de 10 µM de C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$. Enregistrement en configuration cellule-entière en current-clamp.*

a2. Variabilité du courant initial et expression de TREK-1

Après avoir vérifié que le courant était bien porté par le canal TREK-1 nous avons supposé que la variabilité du courant initial I_0 était due à une variabilité de l'expression du canal TREK-1. Cette différence d'expression surviendrait alors selon les cellules au sein d'un même passage.

Si tel était le cas, nous nous attendions à avoir une corrélation entre le courant initial I_0 et le courant maximale activé I_{max} par chacun des acides gras. Autrement dit, les cellules avec une

faible expression de TREK-1, donc un faible I_0, produirait un I_{max} faible en réponse aux acides gras. Réciproquement, plus le I_0 serait élevé et plus le I_{max} serait élevé, de façon proportionnelle à l'expression de TREK-1. A noter que nous travaillons déjà sur les densités de courant (pA/pF) pour I_0 et I_{max}, retirant ainsi la variabilité due à la taille de la cellule.

Cependant, cette corrélation entre le I_{max} des acides gras poly-insaturés et le I_0 n'existe pas, sauf pour le C20:$2^{\Delta 11,14}$ et le C20:$4^{\Delta 8,11,14,17}$ (**Figure 53.B**), deux des acides gras induisant la plus faible activation du canal TREK-1 (**Figure 53.A**). Ainsi, cette analyse ne nous permet pas de relier l'activité initiale (I_0) de TREK-1 à son niveau d'expression, mais nous renseigne probablement sur le mode d'action des acides gras poly-insaturés dans l'activation de TREK-1.

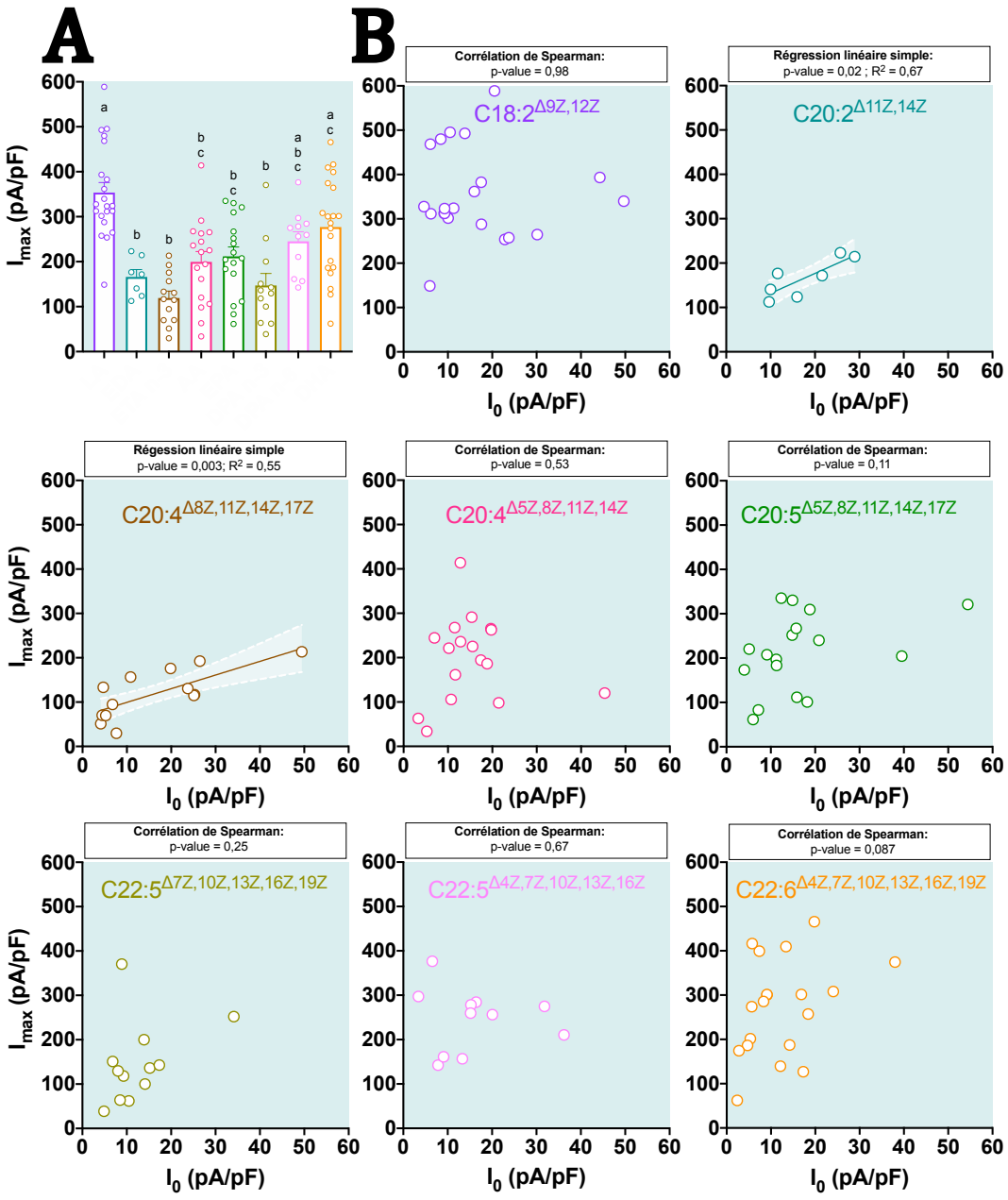

Figure 53

Hétérogénéité du courant initial et du courant maximal activé par les acides gras poly-insaturés

A. *Le graphique illustre la densité de courant maximale (I_{max}) activée par les acides gras à l'état stable dans la lignée HEK hTREK-1 à 0 mV. Les groupes sont comparés avec un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn : les groupes qui ne portent pas la même lettre sont statistiquement différents.* ***B.*** *Les nuages de points illustrent l'absence de relation entre le*

courant initial (I_0) et le courant maximal (I_{max}) activé par les acides gras à 0 mV, sauf pour le C20:2$^{\Delta 11,14}$ et le C20:4$^{\Delta 8,11,14,17}$.

b. Les acides gras poly-insaturés permettent une activation des canaux TREK-1 « silencieux » en condition initiale

b.1 Deux types d'activateurs de TREK-1

Pour mieux appréhender le mode d'action des acides gras poly-insaturés dans l'activation de TREK-1, nous avons comparé la variabilité de l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés à la variabilité de l'activation de TREK-1 par un autre activateur, le ML402. L'EC_{50} du ML402, un activateur direct du canal TREK-1, est de 13,7 ± 7,0 µM (Lolicato et al., 2017).

Contrairement aux acides gras, il existe une relation linéaire entre l'activité initial I_0 de TREK-1 et le courant maximal I_{max} activé par le ML402 10 µM à son EC_{50} et 30 µM, au-delà de son EC_{50} (régressions linéaires simples : 10 µM, p-value < 0,0001 et R^2 = 0,85 ; 30 µM, p-value < 0,0001 et R^2 = 0,85) (**Figure 54.A-B**). La relation positive entre l'activité initial I_0 de TREK-1 et le courant maximal I_{max} activé par le ML402 suggère qu'il existe une différence dans le mode d'action du ML402 et des acides gras poly-insaturés.
Le ML402 à 30 µM (~3 fois l'EC_{50}) produit un I_{max}/I_0 de 9,51 ± 1,14, proche des deux acides gras produisant une faible activation de TREK-1 (C20:2$^{\Delta 11,14}$ et le C20:4$^{\Delta 8,11,14,17}$). Comme le ML402, ces deux acides gras poly-insaturés, présentent une corrélation positive entre le I_0 et le I_{max} (**Figure 53**). Ainsi, les activateurs produisant une plus faible activation de TREK-1 pourraient fonctionner selon un même mécanisme d'activation du canal.
L'absence de corrélation entre les deux paramètres I_0 et I_{max} (**Figure 53**) pour la majorité des acides gras poly-insaturés suppose que la conséquence de leur interaction avec le canal TREK-1 est différente de celle du ML402.

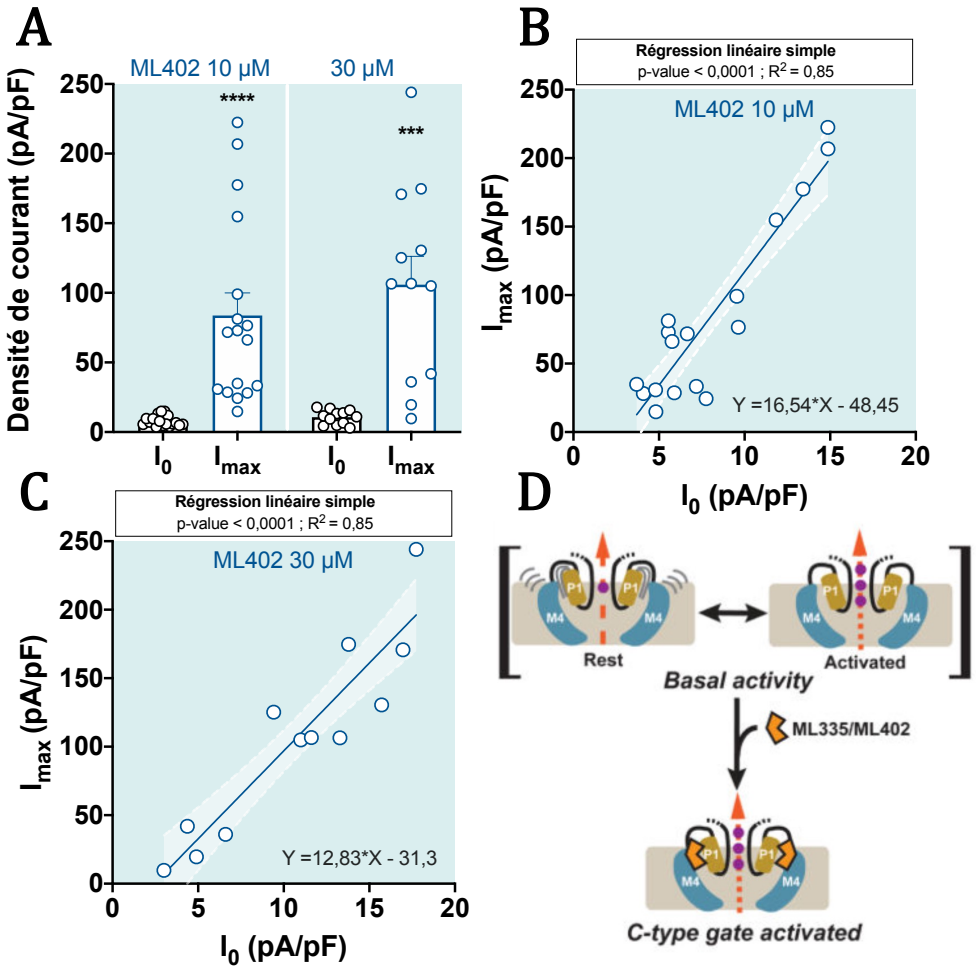

Figure 54

Mode d'action du ML402

A. *TREK-1 est activé par le ML402 à 10 µM : I_0 = 7,99 ± 0,90 pA/pF vs I_{max} = 83,77 ±16,18 pA/pF à 0 mV (p-value < 0,0001); et à 30 µM : I_0 = 10,70 ± 1,46 pA/pF vs I_{max} = 105,90 ±20,35 pA/pF (p-value < 0,000). Les groupes ont été comparés avec un test apparié de Wilcoxon.* ***B-C.*** *Il existe une relation linéaire entre l'activité initiale de TREK-1 (I_0) et la densité maximale de courant activée par le ML402 (I_{max}) à* ***B.*** *10 µM (régression linaire simple = p-value <0,0001, R^2 = 0,85) et à* ***C.*** *30 µM (p-value <0,0001, R^2 = 0,85 de ML402). L'intervalle de confiance 90% est représenté et l'équation de la droite de régression est indiquée.* ***D.*** *Modèle de l'activation de TREK-1 par le ML402* issue de Lolicato et al., 2017. *Le ML402 stabilise le filtre de sélectivité (« C-type gate ») en stabilisant l'interface P1/M4, activant ainsi le canal. P1 et M4 illustre les hélices du domaine pore P1 et du segment transmembranaire M4, respectivement.*

Hypothèses de travail :

(1) Si des activateurs de TREK-1 agissent sur la fraction de canaux déjà actifs en condition initiale, nous devrions retrouver une relation positive entre l'activité initiale (I_0) et la réponse I_{max}. C'est en effet le cas du ML402 où nous avons montré précédemment que I_{max} variait proportionnellement au I_0 selon une pente positive (**Figure 54**). La pente de cette relation pourrait alors correspondre à une augmentation de la conductance unitaire (γ) des canaux déjà actifs et/ou de la probabilité d'ouverture, expliquant aussi qu'elle ne passe pas par l'ordonnée à l'origine.

(2) Si au contraire, certains acides gras poly-insaturés agissent en augmentant principalement le nombre de canaux actifs (N.Po) issues de la fraction de canaux « silencieux » en condition initiale, alors la relation entre I_{max}/I_0 et I_0 devrait être négative. Autrement dit, plus l'activité initiale est faible, plus il y a de canaux à recruter, plus il y a de canaux recrutés, plus la réponse I_{max}/I_0 aux acides gras poly-insaturés est grande (**Figure 55**).

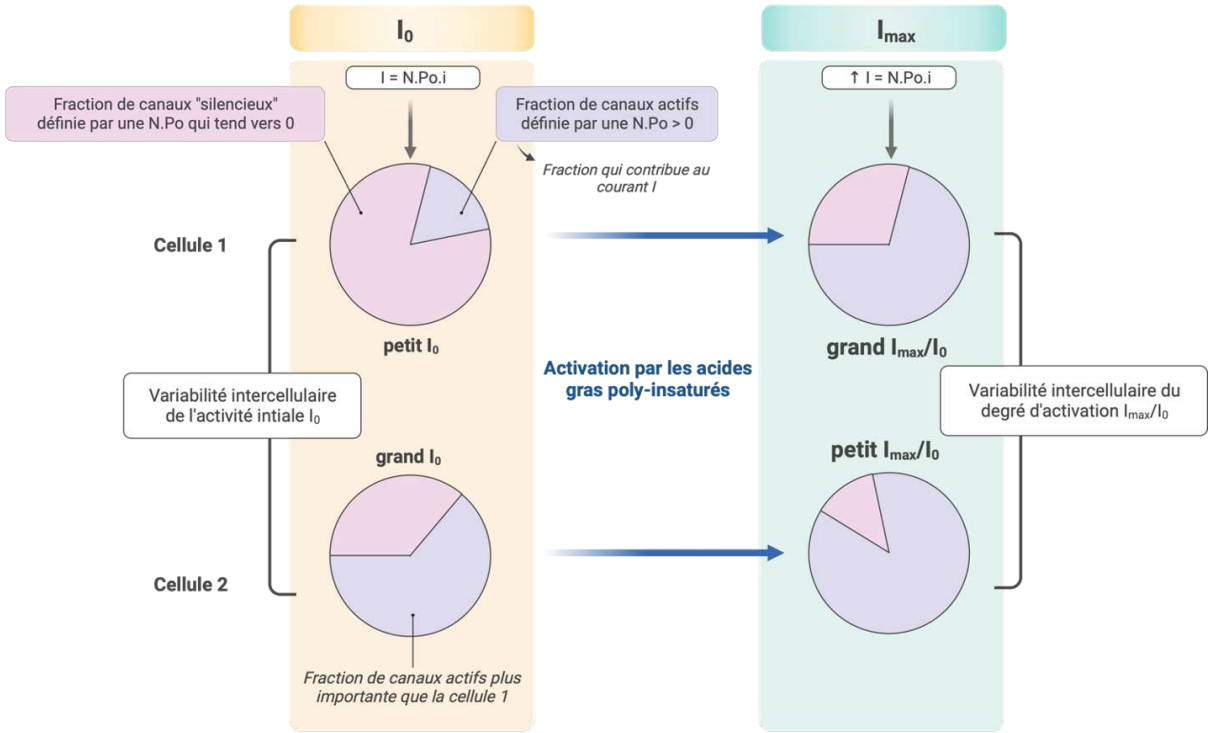

Figure 55

Illustration des hypothèses de travail

La variabilité des degrés d'activation de TREK-1 (I_{max}/I_0) est expliquée par la taille de la fraction de canaux actifs (N.Po > 0, violet) et de la taille de la fraction de canaux « silencieux » (N.Po tend vers 0, rose) dans les cellules, en condition initiale. L'activation par les acides gras poly-insaturés, augmente le courant TREK-1 via la conversion d'au moins une partie des canaux de la fraction des canaux « silencieux », en canaux actifs ; c'est-à-dire que la taille de la fraction de canaux actifs augmente. Dans cet exemple, la cellule 1 a un I_0 inférieur au I_0 de la cellule 2 puisque la taille de sa fraction active est plus faible que celle de la cellule 2 vis-à-vis de la fraction de canaux « silencieux ». Ainsi, le nombre de canaux recrutables (silencieux vers actif) par l'activation par les acides gras poly-insaturés est plus grand dans la cellule 1, expliquant la différence du rapport I_{max}/I_0 dans ces deux cellules.

Confrontation des hypothèses de travail à l'expérimentation :

Ainsi, les nuages de points représentant la réponse I_{max}/I_0 aux acides gras poly-insaturés ou au ML402 en fonction de l'activité initiale I_0 de TREK-1 illustrent la relation existante entre ces deux paramètres (**Figure 56**).

(1) Pour le ML402, nous avons montré précédemment que I_{max} variait proportionnellement au I_0 selon une pente positive (**Figure 54**). De plus, il semblerait y avoir une corrélation positive des deux paramètres I_{max}/I_0 et I_0, mais le test de corrélation de Spearman n'a pas pu le mettre en évidence (corrélation de Spearman : p-value = 0,12) (**Figure 56**).

(2) Pour les acides gras poly-insaturés, il existe une relation exponentielle décroissante entre ces deux paramètres (I_{max}/I_0 et I_0), comme prédit précédemment par l'hypothèse **(2)** (**Figure 56**). Cette relation exponentielle décroissante est bien visible pour les 3 plus forts activateurs du canal TREK-1 : C18:$2^{\Delta 9,12}$, C22:$5^{\Delta 4,7,10,13,16}$ et C22:$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$. Une telle relation nous indique que « plus l'activité initiale est faible, plus il y a de canaux à recruter, plus il y a de canaux recrutés, plus la réponse aux acides gras poly-insaturés est grande » et inversement.

Traitement et interprétation des données de l'expérimentation :

Si une fonction exponentielle décroissante relie bien la réponse aux acides gras poly-insaturés et l'activité initiale de TREK-1, alors la transformation des données individuelles par une fonction logarithme (Log10), doit permettre de linéariser la relation.
Les transformations logarithmiques sont illustrées dans la **Figure 57.A** pour chacun des acides gras poly-insaturés. Les régressions linaires simples calculées nous confirment l'existence d'une relation inversement proportionnelle entre la réponse aux acides gras poly-insaturés et l'activité initiale de TREK-1 telle que : $Log_{10}(I_{max}/I_0) = f(Log_{10}(I_0))$, à l'exception du C22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$ (corrélation de Spearman : p-value = 0,55).

Le R^2 (ou coefficient de détermination) correspond au pouvoir explicatif de la droite de régression ; autrement dit, un R^2 de 0,5 détermine que la moitié de la variation observée dans le modèle peut être expliquée par les points. Par exemple, pour le C18:2$^{\Delta9,12}$ (R^2 = 0,78) la variabilité de la réponse I_{max}/I_0 est expliqué à 78% par le I_0. Ainsi, les droites de régressions des acides gras ont un R^2 compris entre 0,5 pour le C20:4$^{\Delta5,8,11,14}$ et 0,84 pour le C22:5$^{\Delta4,7,10,13,16}$ (**Figure 57.A-B**).

Si le R^2 nous renseigne sur le pouvoir explicatif de la relation, la pente de la droite de régression nous informe de la sensibilité de I_{max}/I_0 (Y, variable à expliquer) à I_0 (X, variable explicative). Dans notre cas, la pente nous renseigne sur la sensibilité de la réponse (Y) à la fraction de canaux recrutables (X). Ainsi, la comparaison systématique des pentes données dans l'équation des droites (Y = aX + b ou « a » correspond à la pente) (**Figure 57** et **Tableau 7**) et la superposition des droites (**Figure 56**) nous montre que les acides gras présentent relativement la même pente, comprise entre -0,5264 pour le C20:2$^{\Delta11Z,14Z}$ et -1,073 pour le C22:5$^{\Delta4,7,10,13,16}$ (**Tableau 7**).

Pour finir, l'étude du second paramètre de la droite de régression Y = aX + b, où « b » correspond à la différence de l'ordonnée à l'origine ou « Y-intercept » de la droite, nous montre que les acides gras poly-insaturés ne présentent pas la même valeur de Y-intercepts. Plus le Y-intercept est élevé, plus l'acide gras active le canal TREK-1 (**Figure 57** et **Tableau 7**). La comparaison systématique des Y-intercepts montre que les acides gras poly-insaturés permettent une augmentation plus ou moins importante de la N.Po de la fraction active (passage de fraction silencieuse à fraction active) (**Figure 57**). D'où des acides gras poly-insaturés plus

ou moins activateurs du canal TREK-1. Ainsi, les trois plus gros activateurs du canal TREK-1 sont le C18:2$^{\Delta 9,12}$ (b =2,354 $\pm$ 0,1334), le C22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$ (b =2,462 $\pm$ 0,1795) et le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$(b = 2,133 $\pm$ 0,1314) (**Tableau 7**).

La discrimination des effets des acides gras poly-insaturés pouvant s'effectuer sur le principe suivant (**Figure 56** et **Tableau 7**):

- **Activateur fort** : Y-intercept > 2 : C18:2$^{\Delta 9,12}$, C22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$ et C22 :6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$
- **Activateur intermédiaire** : 1,7 < Y-intercept < 2 : C20:4$^{\Delta 5,8,11,14}$ et C20:5$^{\Delta 5,8,11,14,17}$
- **Activateur faible** : Y-intercept < 1,7 : C20:2$^{\Delta 11,14}$ et C20:4$^{\Delta 8,11,14,17}$

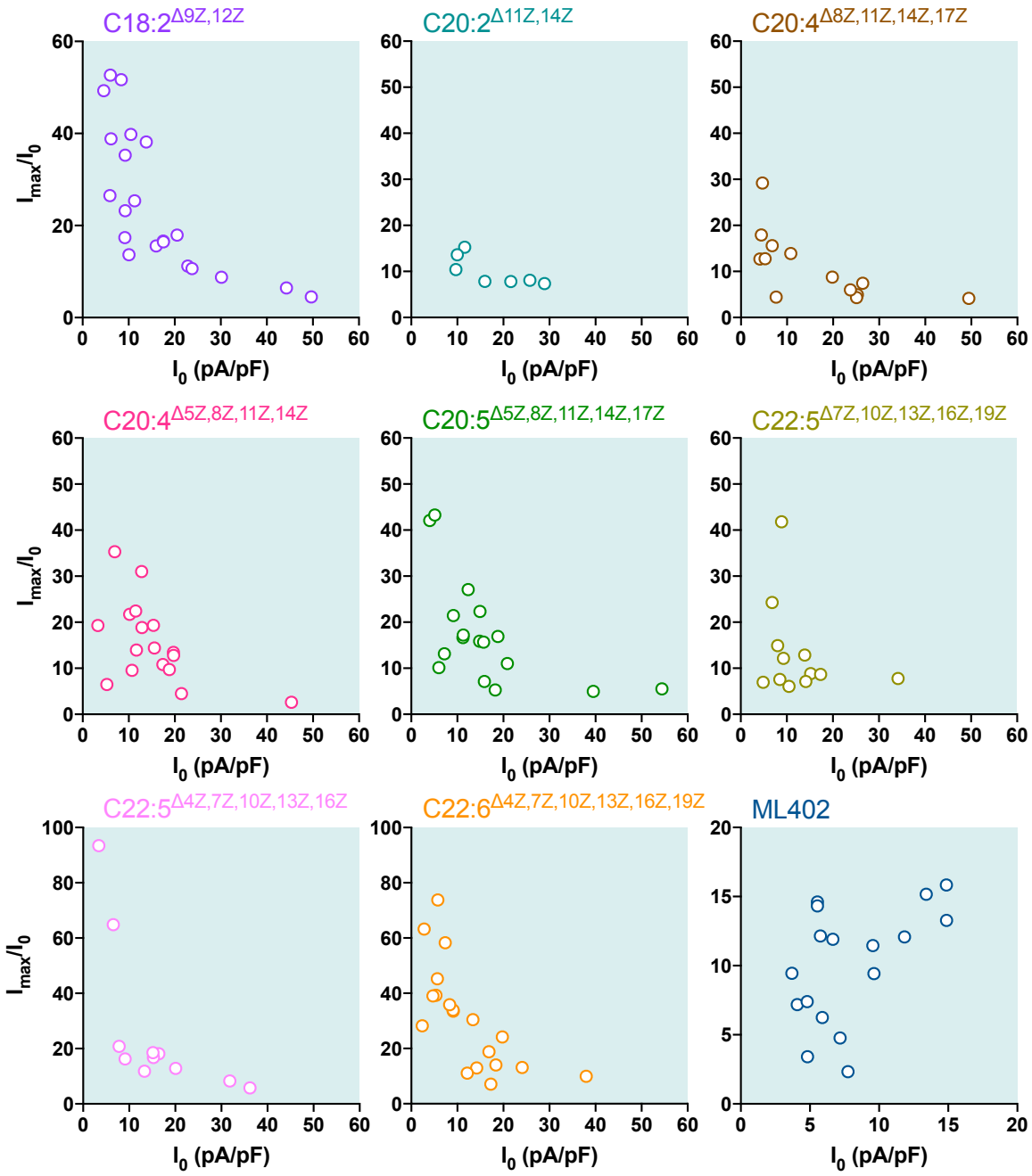

Figure 56

Relation entre l'activité initiale de TREK-1 et la réponse aux acides gras poly-insaturés et au ML402

Les nuages de points représentent pour chacun des composés la relation entre l'activité initiale du canal TREK-1 (I_0) et la réponse I_{max}/I_0 aux acides gras et au ML402 à 0 mV, pour une concentration de 10 µM.

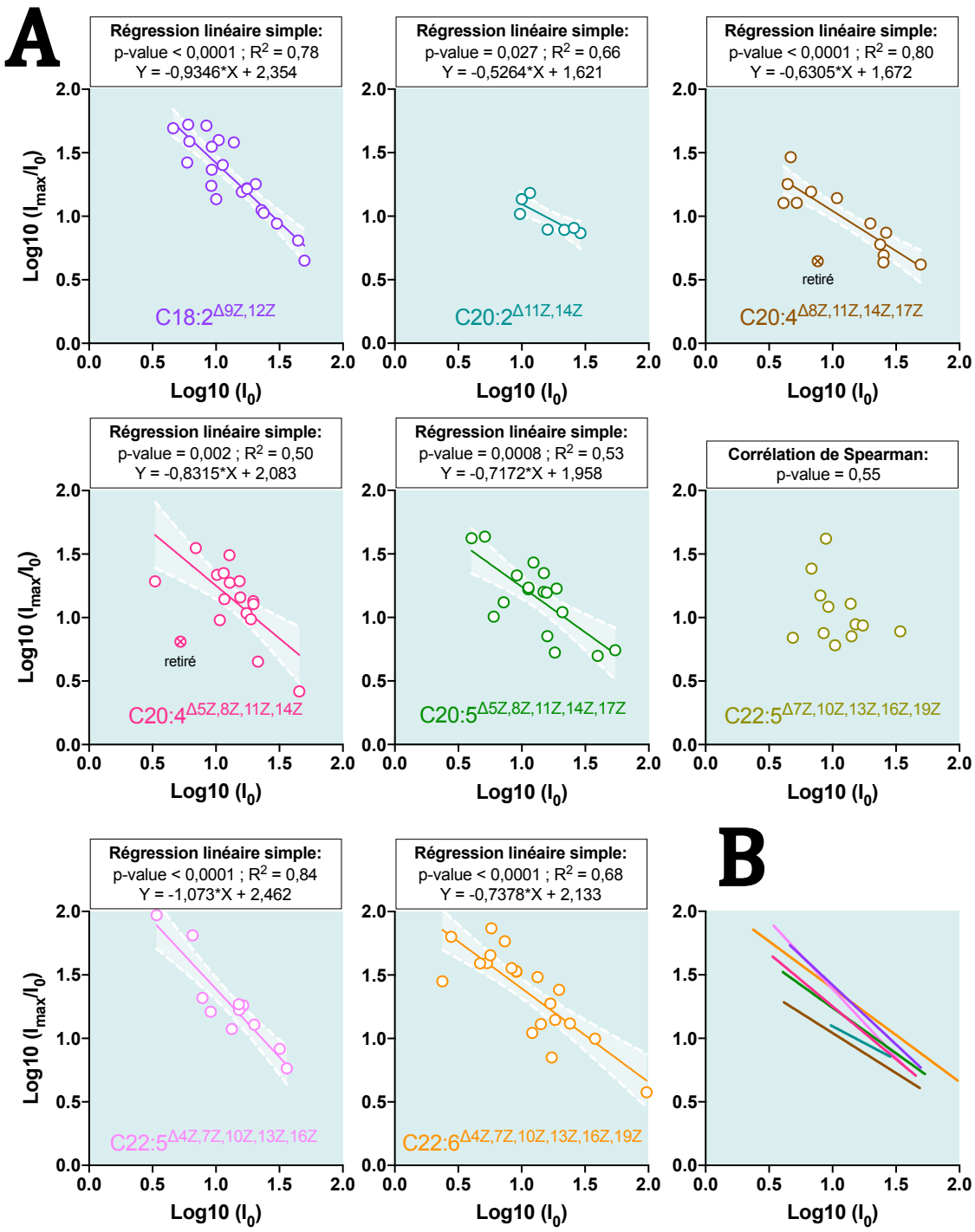

Figure 57

Relation linéaire négative entre l'activité initiale de TREK-1 et la réponse aux acides gras poly-insaturés

A. *Les données I_{max}/I_0 et I_0 ont été normalisées par une fonction logarithmique (Log_{10}) et la relation logarithmique pour chacun des acides gras est illustrée. La droite de régression linéaire est représentée pour chacun des acides gras poly-insaturés avec la p-value, le R^2 et*

l'équation de la droite. L'intervalle de confiance 90% est représenté. ***B.*** *Superposition des droites de régressions de chacun des acides gras, sauf le C22:5$^{\Delta 7,10,13,16,19}$.*

Y = aX + b	***a*** Pente	**b** Y-intercept	***R^2***	***p-Value***
C18 :2 $^{\Delta 9,12}$	-0,9347 ± 0,1152	2,354 ± 0,1334	0,78	<0,0001
C20 :2 $^{\Delta 11,14}$	-0,5264 ± 0,1702	1,621 ± 0,2081	0,66	0,0271
C20 :4 $^{\Delta 8,11,14,17}$	-0,6305 ± 0,0999	1,672 ± 0,1150	0,80	<0,0001
C20 :4 $^{\Delta 5,8,11,14}$	-0,8315 ± 0,2235	2,083 ± 0,2599	0,50	0,0023
C20 :5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$	-0,7172 ± 0,1727	1,958 ± 0,1994	0,53	0,0008
C22 :5 $^{\Delta 4,7,10,13,16}$	-1,073 ± 0,1559	2,462 ± 0,1795	0,84	<0,0001
C22 :5 $^{\Delta 7,10,13,16,19}$	-	-	-	0,5577
C22 :6 $^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$	-0,7378 ± 0,1191	2,133 ± 0,1314	0,68	<0,0001

Tableau 7

Paramètres de la droite de régression : Log10(I_{max}/I_0=f(Log10(I_0))

La droite de régression s'exprime sous la forme Y = aX + B où « a » correspond à la pente de la droite et « b » à l'Y-intercept de la droite. L'erreur de « a » et « b » correspond à l'erreur standard. Le R^2 et la p-value de la régression sont indiqués.

b.2 Le mode « *leak* » de TREK-1 activé par les acides gras poly-insaturés

<u>La N.Po en configuration *inside-out*</u> :

Nous avons vu précédemment que l'analyse précise de la Po de TREK-1 en configuration *inside-out* n'était pas possible en raison d'un grand nombre de canaux présents sous la pipette de patch (6 MΩ < Rp < 10 MΩ) (**Figure 46**). Cependant, nous avions pu conclure que les acides gras poly-insaturés permettaient une augmentation de la N.Po, révélant un certain nombre de canaux « silencieux » dans les conditions initiales.

Comment cette « modification de la N.Po » se traduit-elle en configuration cellule entière ?

Le courant TREK-1 est caractérisé par une rectification sortante en configuration cellule-entière, comme prédit par l'équation de GHK. Les acides gras poly-insaturés activent progressivement le canal TREK-1 avec un état-stable atteint autour de 5 min (**Figure 41**). Au cours de cette activation progressive en configuration cellule-entière, certains acides gras poly-insaturés (10 µM) conduisent à la perte de la rectification sortante, c'est-à-dire à la linéarisation du courant entre -100 mV et + 30 mV.

Nous pouvons observer facilement ce phénomène de linéarisation du courant sur la **Figure 58** pour le C18:$2^{\Delta 9,12}$, le C22:$5^{\Delta 4,7,10,13,16}$ et le C22 :$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$, les activateurs forts du canal TREK-1.

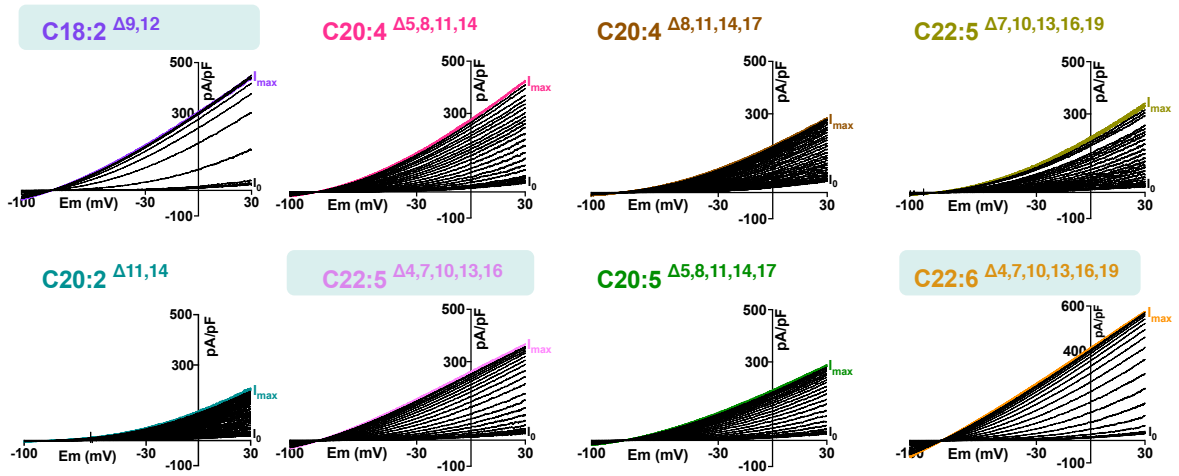

Figure 58

Illustration de la perte de rectification sortante du courant macroscopique TREK-1

Traces représentatives du courant TREK-1 entre -100 mV et + 30 mV activé par la perfusion des différents acides gras poly-insaturés à une concentration de 10 µM, en configuration cellule-entière dans un modèle de cellule HEK hTREK-1 #1. Le courant TREK-1 présente une rectification sortante caractéristique en condition initiale (I_0). Il y a un phénomène visible de perte de rectification sortante ou de linéarisation du courant TREK-1 pour le C18:$2^{\Delta 9,12}$, le C22:$5^{\Delta 4,7,10,13,16}$ et le C22:$6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$.

Calcul du coefficient de linéarité du courant :

Pour étudier ce phénomène de linéarisation, nous avons calculé un coefficient de linéarité, une valeur numérique calculée, correspondant au rapport des pentes à -100 mV et + 30 mV (**Figure 59.A**), tel que :

(30) Pente d'une droite = $\frac{\Delta Y}{\Delta X}$

Donc :

(31) $Pente_{-100\ mV} = \frac{I_{-100\ mV}}{-100-E_{Rev}}$

(32) $Pente_{+30\ mV} = \frac{I_{+30\ mV}}{+30-E_{Rev}}$

(33) Rapport des pentes = $\frac{Pente_{-100\ mV}}{Pente_{+30\ mV}}$

Avec $I_{-100\ mV}$ et $I_{+30\ mV}$ les valeurs de courants à -100 mV (entre -99 mV et -100 mV pour sortir du bruit) et à + 30 mV (entre 29 mV et 30 mV). E_{Rev} correspond au potentiel d'inversion (**Figure 59.A**).

En prenant le rapport $\frac{pente_{-100\ mV}}{pente_{+30\ mV}}$ et non le rapport inverse $\frac{pente_{+30\ mV}}{pente_{-100\ mV}}$ le domaine de définition du rapport des pentes varie dans l'intervalle]0 ;1] en prenant en compte que le courant ne rectifie jamais dans le sens entrant. Un coefficient de linéarité supérieur à 1 a été observé au cours des expérimentations lorsque la résistance série (Rs) augmentait ; les cellules ont alors été écartées de l'analyse.

De voltage-dépendant à « *leak* » : protocole de rampe dépolarisante

Ainsi, le coefficient de linéarité du courant initial (I_0) rectifiant sortant caractéristique du courant macroscopique porté par TREK-1 est de 0,134 ± 0,005 (n = 130) (**Figure 59.B**). La perfusion des acides gras poly-insaturés, à 10 µM, induit une augmentation du courant TREK-

1 qui est associée à une perte de la rectification sortante à l'état-stable pour les activateurs forts de TREK-1, le C18:2$^{\Delta 9,12}$, le C22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$ et le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ (**Figure 58**) se traduisant par un coefficient de linéarité supérieur à 0,5 : 0,53 ± 0,03, 0,58 ± 0,04 et 0,58 ± 0,05 respectivement (**Figure 59.C**, **Tableau 8**). Cette perte de la rectification sortante est positivement corrélée à la densité de courant (I_{max}) (**Figure 59.D**).

La perte de rectification augmente progressivement avec l'augmentation du courant (**Figure 60**). Il faut atteindre un seuil d'environ 300 pA/pF pour perdre la rectification sortante (**Figure 59.D**).

Ainsi, tous les acides gras ne permettraient pas ce phénomène de linéarisation du courant puisqu'ils ne permettent pas d'activer le canal TREK-1 jusqu'à cette densité de courant seuil.

Comme pour les acides gras produisant une activation intermédiaire ou faible du canal TREK-1, le ML402 (10 µM) n'induit pas de perte de la rectification sortant du courant TREK-1 (Coefficient de linéarisation = 0,21± 0,02 après activation) (**Tableau 8**).

Ainsi, ces résultats suggèrent que les acides gras poly-insaturés qui sont des activateurs forts de TREK-1 (C18:2$^{\Delta 9,12}$, le C22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$ et le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$) font basculer le canal dans un mode « *leak* ». Le courant ne présente alors plus la rectification sortante prédite par l'équation de GHK et devient linéaire en configuration cellule-entière et en conditions physiologiques (**Figure 58**).

Coefficient de linéarité	**Du courant initial (I_0)**	**Du courant activé (I_{max})**
C18:2 $^{\Delta 9,12}$	0,12 ± 0,008	0,53 ± 0,03
C20:2 $^{\Delta 11,14}$	0,09 ± 0,006	0,23 ± 0,03
C20:4 $^{\Delta 5,8,11,14}$	0,12 ± 0,009	0,27 ± 0,02
C20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$	0,12 ± 0,010	0,17 ± 0,02
C20:5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$	0,13 ± 0,009	0,34 ± 0,04
C22:5 $^{\Delta 4,7,10,13,16}$	0,19 ± 0,06	0,58 ± 0,04
C22:5 $^{\Delta 7,10,13,16,19}$	0,17 ± 0,03	0,20 ± 0,02
C22:6 $^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$	0,13 ± 0,009	0,58 ± 0,05
ML402	0,10 ± 0,01	0,21 ± 0,02

Tableau 8

Coefficient de linéarité du courant macroscopique TREK-1

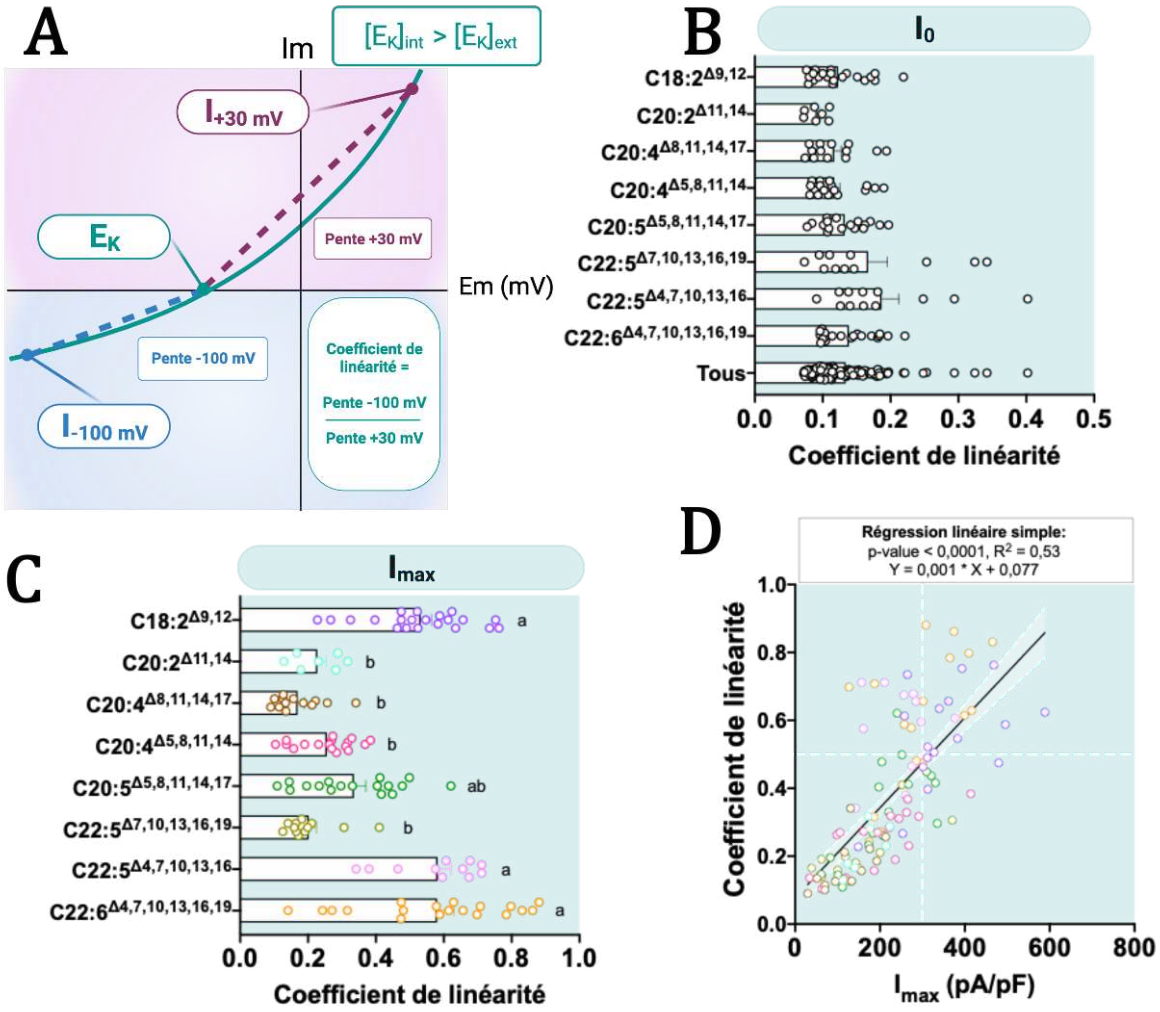

Figure 59

Perte de la rectification sortante du courant macroscopique TREK-1 et coefficient de linéarité

A. *Illustration de la méthode de calcul du coefficient de linéarité, basée sur le rapport des pentes à -100 mV et +30 mV.* ***B.*** *Coefficient de linéarité du courant initial (I_0) avant la perfusion des acides gras poly-insaturés.* ***C.*** *Coefficient de linéarité du courant maximal à l'état-stable (I_{max}) activé par chacun des acides gras poly-insaturés (10 µM). Les groupes sont comparés avec un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn : les groupes qui ne portent pas la même lettre sont statistiquement différents. Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.* ***D.*** *La perte de la rectification sortante est corrélée positivement à la densité de courant (I_{max}) à 0 mV.*

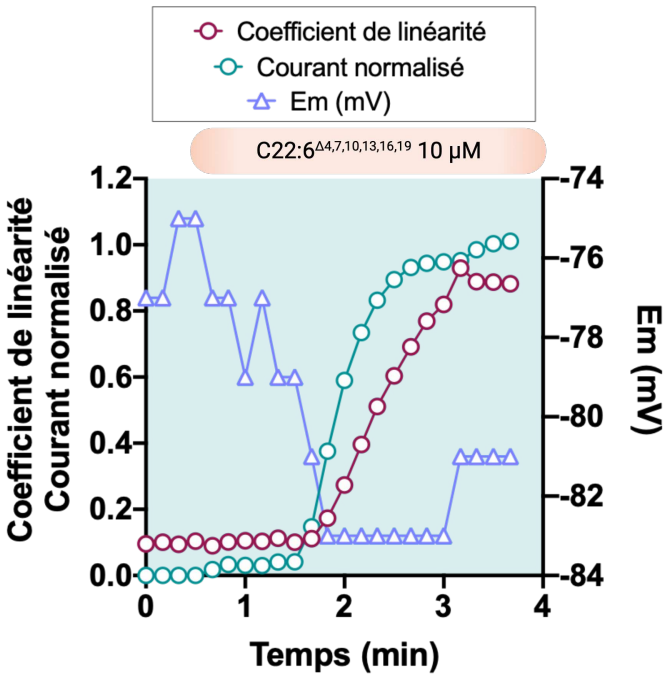

Figure 60

Perte progressive de la rectification sortante avec l'augmentation du courant TREK-1

Cinétique représentative de la perte progressive de la rectification sortante du courant macroscopique porté par TREK-1 (rouge : coefficient de linéarité) associée à l'augmentation progressive du courant (courant normalisé, vert) par 10 µM de C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$. Le potentiel de membrane utilisé pour le calcul du coefficient de linéarité s'hyperpolarise au cours de l'activation du canal TEK-1.

<u>De voltage-dépendant à « *leak* »</u> : protocole de *step* dépolarisant

Le courant initial (I_0) de TREK-1, enregistré en configuration cellule-entière avec un protocole de *steps* dépolarisants présente une composante instantanée qui reflète l'altération du gradient électrochimique, suivie d'une composante temps-dépendante représentant la voltage-dépendance de l'activation (**Figure 61.A**). Cette composante temps-dépendante est le reflet de la dépendance de la Po au voltage (Li et al., 2006). En présence des acides gras poly-insaturés qui produisent pas une faible activation de TREK-1, comme le C22:5 $^{\Delta 7,10,13,16,19}$, on observe une perte partielle de la composante voltage-dépendante du courant (**Figure 61.B**). En présence d'acides gras poly-insaturés qui produisent une forte activation de TREK-1 (C18:2$^{\Delta 9,12}$,

C22:5$^{\Delta4,7,10,13,16}$ et C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$), la voltage-dépendance de TREK-1 disparait progressivement et totalement (**Figure 61.C**). Ainsi les acides gras poly-insaturés font basculer de manière réversible le fonctionnement voltage-dépendant de TREK-1 vers un fonctionnement en mode « *leak* » associée à une perte de la rectification sortante (**Figure 61.D**). Les acides gras poly-insaturés capables d'activer fortement le canal TREK-1 sont ceux qui permettent la disparition ou la conversion totale de la composante voltage-dépendante en composante instantanée.

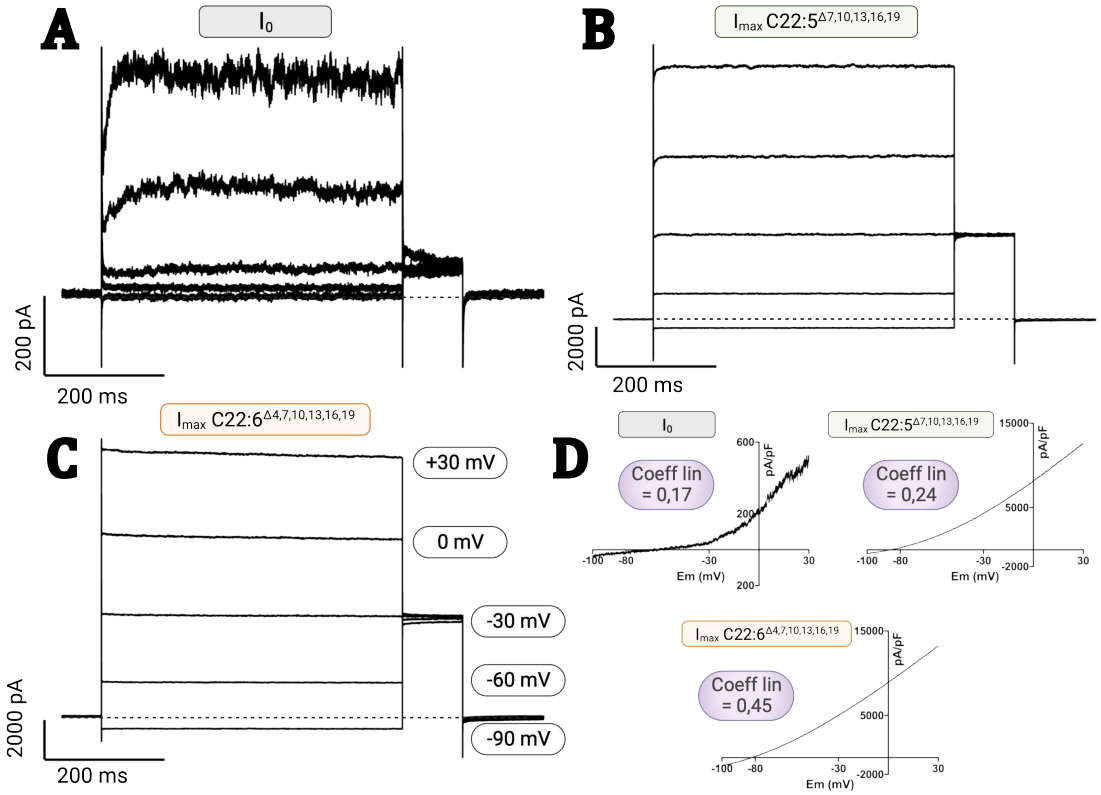

Figure 61

Illustration des composantes instantanée et temps-dépendante du courant TREK-1

A. *Courant initial (I_0),* ***B.*** *courant maximal activé par 10 µM de C22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$ (I_{max} C22:5$^{\Delta7,10,13,16,19}$) et* ***C.*** *courant maximal activé par 10 µM de C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ (I_{max} C22:5$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$) induits par un protocole de dépolarisation en steps de -90 mV à +30 mV avec un delta de 30 mV, à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV en configuration cellule-*

entière de la technique de patch-clamp. ***D.*** *Courbes courant-voltage correspondantes, induites par un protocole de rampe dépolarisante, de -100 mV à +30 mV à l'état initial ou à l'état-stable de l'activation par le C22:5$^{\Delta 7,10,13,16,19}$ et le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,}$19. Le « coeff lin » indiqué correspond coefficient de linéarité de chacune des courbes courant-voltage.*

2. COMPARAISON DES MODELES D'EXPRESSIONS STABLES ET D'EXPRESSION TRANSITOIRE DU CANAL TREK-1

Nous avons vérifié si l'hétérogénéité de l'activité initiale (I_0) et du degré d'activation de TREK-1 (I_{max}/I_0) étaient retrouvées dans un autre modèle de surexpression stable du canal TREK-1 (HEK hTREK-1 #2 : Andharai et al., 2017) et dans un modèle de transfection transitoire de cellules HEK 293T. Pour cette partie, nous avons travaillé en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp.

L'activité initiale I_0 de TREK-1 est en moyenne plus élevée dans le modèle de transfection transitoire (pIRES2 *KCNK2* WT, 10 ng) (**Figure 62.A**). La lignée cellulaire HEK hTREK-1 #2 (Andharai et al., 2017) est la lignée qui présente la plus faible dispersion de l'activité initiale de TREK-1 (**Figure 62.A-B**).

Ensuite, nous avons regardé si le mode d'action des acides gras poly-insaturés pour activer TREK-1 précédemment détaillé, se vérifiait dans chacun des modèles de surexpression. La **Figure 63** superpose les relations logarithmiques $Log_{10}(I_{max}/I_0) = f(Log_{10}(I_0)$ de l'activation de TREK-1 par 10 µM de C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$. La superposition sensible des droites indique que le mécanisme d'action des acides gras poly-insaturés est identique dans chacun des modèles d'expressions. Avec une variabilité d'activité initiale et donc de réponse aux acides gras plus faibles, la lignée de surexpression stable #2 (Andharai et al., 2017) semble être la plus appropriée pour comparer les effets de molécules dont l'activation dépend de l'activité initiale de TREK-1.

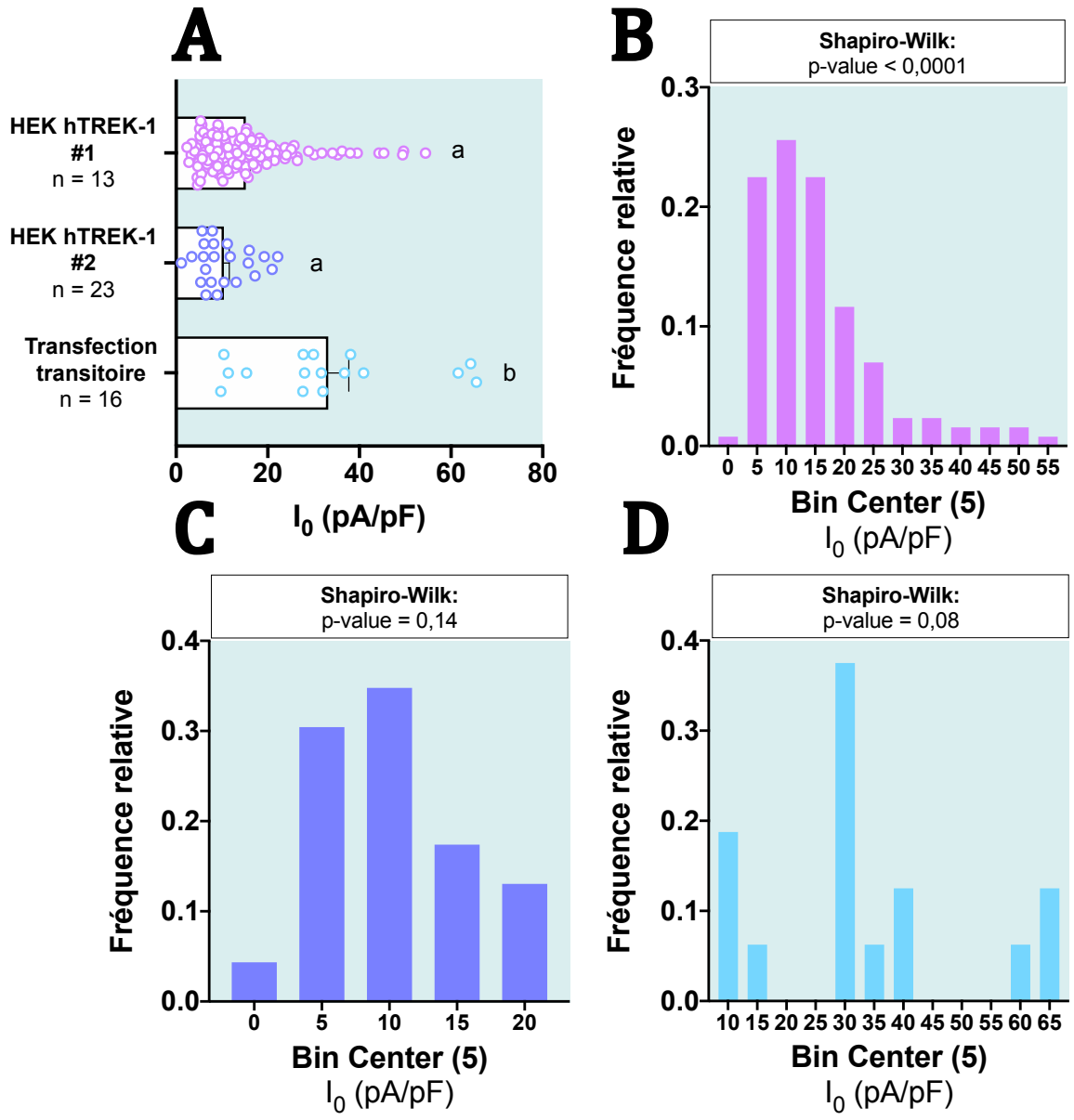

Figure 62

Dispersion de l'activité initiale du canal TREK-1 dans des modèles de surexpression stables ou transitoire

A. *La transfection transitoire présente une activité initiale de TREK-1 plus élevée que les lignées cellulaires stables :* $I_{0\ \#1}$ *= 15,21 ± 0,92 pA/pF ;* $I_{0\ \#2}$ *= 10,42 ± 1,19 pA/pF et* $I_{0\ transfection}$ *= 33,20 ± 4,51. Les groupes sont comparés avec un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn : les groupes qui ne portent pas la même lettre sont statistiquement différents. Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.* ***B-D.*** *Les histogrammes de fréquences relatives montrent la dispersion du courant initial* I_0*. La normalité est déterminée par un test de Shapiro-Wilk. Le code couleur de* ***A*** *est respecté.*

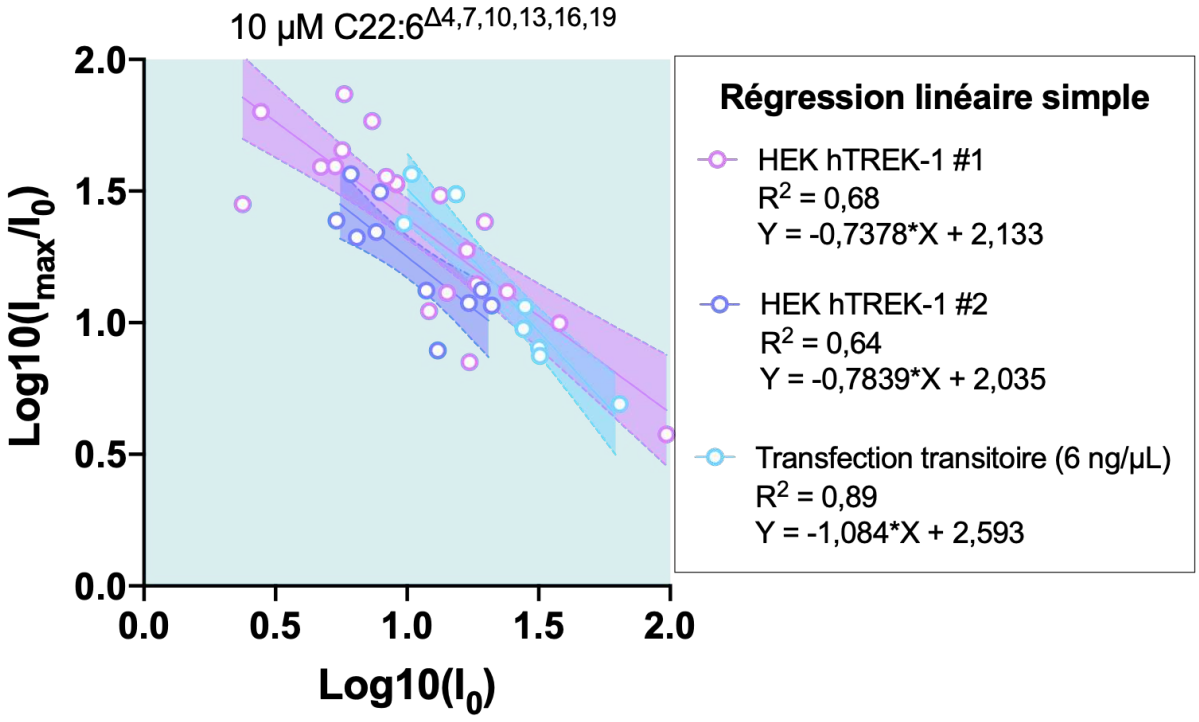

Figure 63

Relation linéaire négative entre l'activité initiale de TREK-1 et la réponse aux acides gras poly-insaturés dans différents modèles de surexpression de TREK-1

L'activation de TREK-1 est réalisée avec 10 µM de C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$. Le graphique présente la relation logarithmique qui lie la réponse I_{max}/I_0 à l'activité initiale de TREK-1 I_0, pour chacune des lignées stables (#1 et #2) et transitoire (pIRES2 KCNK2 WT, 6 ng/µL). La droite de régression linéaire est représentée pour chacun des modèles d'expression avec le R^2 et l'équation de la droite de régression. L'intervalle de confiance 90% est représenté.

3. LA MUTATION G171D DU CANAL TREK-1

Les résultats précédemment détaillés autour de la variabilité des effets des acides gras poly-insaturés nous ont conduit à faire plusieurs hypothèses sur les mécanismes d'action mis en jeu lors de l'activation de TREK-1 : **(1)** l'hétérogénéité de l'activité initiale de TREK-1 pourrait être liée aux fractions de canaux actifs et « silencieux » à la membrane, qui diffèrent selon les cellules ; **(2)** les acides gras poly-insaturés permettent une augmentation de la N.Po expliquant l'absence de relation entre le I_0 et le I_{max} et la relation négative qui lie le I_{max}/I_0 au I_0. **(3)** Les acides gras poly-insaturés qui sont de forts activateurs de TREK-1 le font basculer dans un mode « *leak* ».

L'objectif de cette partie est donc d'approfondir ces hypothèses en comparant le comportement du canal TREK-1 WT et celui du canal muté G171D lors de la perfusion de C22:$6^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ à 10 µM. La mutation gain de fonction G171D est responsable d'une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux TREK-1 G171D (Ben Soussia et al., 2019).
Pour cette partie, nous avons travaillé en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp sur des cellules transfectées transitoirement soit avec le canal TREK-1 WT, soit avec le canal TREK-1 G171D. Aussi, nous avons fait le choix de nous focaliser sur l'activation par le C22:$6^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ puisque nous avons précédemment déterminé qu'il est l'un des activateurs les plus fort du canal TREK-1.

a. Mutant G171D du canal TREK-1

La mutation gain de fonction G171D, située dans le segment transmembranaire 2 du canal TREK-1, augmente son activité initiale I_0 (cellule-entière) en augmentant sa probabilité d'ouverture (cellule-attachée) (Ben Soussia et al., 2019). L'expression du canal TREK-1 à la membrane et sa conductance unitaire ne sont pas altérées par la mutation (Ben Soussia et al., 2019).

- **Hypothèse 1** : il y a une fraction de canaux TREK-1 actifs et une fraction de canaux TREK-1 « silencieux » en condition initiale

Nous avons transfecté des cellules HEK 293T avec le canal TREK-1 WT ou le canal TREK-1 G171D (6 ng/µL). La **Figure 64.A** montre que l'activité initiale de TREK-1 en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp est plus élevée pour le G171D que pour le WT : $I_{0\ WT}$ = 33,20 ± 4,51 pA/pF (n = 16) *vs* $I_{0\ G171D}$ = 90,65 ± 14,17 pA/pF (n = 9 ; p-value <0,0001). Cette différence est expliquée par l'augmentation de la probabilité d'ouverture de TREK-1 en raison de la mutation gain de fonction G171D (Ben Soussia et al., 2019). Cette activité initiale plus élevée s'accompagne d'une hyperpolarisation accentuée du potentiel de membrane des cellules : $Em_{0\ WT}$ = -72,11 ± 1,64 mV *vs* $Em_{0\ G171D}$ = -80,33 ± 0,47 mV (p-value = 0,0005) (**Figure 64.B**). Ainsi, comme il a déjà été évoqué précédemment, l'activité initiale de TREK-1 est impliquée dans l'établissement du potentiel de membrane au voisinage du potentiel d'équilibre du potassium (E_K = -86,5 mV). Cependant, la différence de potentiel de membrane entre les cellules WT et G171D confirme qu'une fraction des canaux TREK-1 WT n'est pas active initialement, probablement en raison d'une probabilité d'ouverture très faible, réduisant la conductance potassique relative et donc la valeur absolue du potentiel de membrane.

La **Figure 63.C** montre que la mutation G171D du canal TREK-1 n'empêche pas son activation par le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$: $I_{0\ G171D}$ = 90,65 ± 14,17 pA/pF *vs* $I_{max\ G171D}$ = 146,20 ± 18,11 pA/pF (p-value < 0,0001). Le résidu Gly171 situé dans le deuxième segment transmembranaire n'est pas impliqué dans l'interaction des acides gras poly-insaturés avec le canal TREK-1. Cependant, le potentiel de membrane des cellules transfectées avec TREK-1 G171D n'est pas modifié par l'activation par le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ ($Em_{0\ G171D}$ = -80,33 ± 0,47 mV *vs* $Em_{G171D+C22:6}$ = -82,11 ± 0,48 mV ; **Figure 64.D**) tandis qu'elle conduit à une hyperpolarisation des cellules transfectée avec le canal TREK-1 WT ($Em_{0\ WT}$ = -72,11 ± 1,64 mV *vs* $Em_{WT+C22:6}$ = -84,25 ± 0,62 mV). Ainsi, l'activation par le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ conduit le potentiel de membrane des cellules TREK-1 WT à tendre vers E_K, alors que cette valeur de potentiel est déjà très proche d'être atteinte pour les cellules G171D avant même l'activation par le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$. Le potentiel d'équilibre théorique du potassium ne peut pas réellement être atteint en raison des autres conductances des cellules HEK.

Ainsi, il existe une fraction de canaux TREK-1 WT qui ne participent pas à l'établissement du potentiel de membrane dans des conditions initiales (sans modulation). Cette fraction de canaux « silencieux » est révélée par l'activation par le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ ou la mutation G171D.

- Hypothèse 2 : les acides gras poly-insaturés permettent une augmentation de la N.Po de la fraction de canaux « silencieux » en condition initiale

Nous avons vu précédemment que contrairement au ML402, lors de l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés, le courant maximal activé I_{max} n'était pas proportionnel au courant initial I_0 et qu'il existait une relation négative entre la réponse aux acides gras poly-insaturés I_{max}/I_0 et l'activité initiale I_0 du canal TREK-1. Nous avions donc émis l'hypothèse selon laquelle l'augmentation du courant induite par les acides gras poly-insaturés opérait *via* le recrutement de canaux de la fraction « silencieuse » de canaux TREK-1 à la membrane.
En plus d'expliquer l'absence de corrélation entre le I_0 et le I_{max}, cette hypothèse expliquerait également la relation négative qui lie le I_{max}/I_0 au I_0. Autrement dit, si un acide gras recrute les canaux de la fraction de canaux « silencieux » en partant d'un I_0 faible (peu de canaux actifs, donc beaucoup de canaux recrutables), la réponse normalisée I_{max}/I_0 sera alors bien plus importante que si le I_0 était élevé (beaucoup de canaux actifs, donc moins de canaux recrutables).
La mutation gain de fonction G171D de TREK-1 augmente la probabilité d'ouverture du canal, augmentant ainsi la fraction de canaux actifs initialement. Cette augmentation de la Po résulte d'une mutation et ne fait donc pas intervenir une modulation de l'activité du canal par des stimuli de son environnement (modification de pH, phospholipides, acide gras poly-insaturés).

Ainsi, pour vérifier l'hypothèse 2, nous nous attendons à ce que le courant maximal activé du mutant G171D ($I_{max\ G171D}$) par le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ soit cette fois-ci corrélé au courant initial $I_{0\ G171D}$. En effet, si tous les canaux sont rendus actifs par la mutation, la fraction de canaux « silencieux » recrutables tend vers 0. Alors l'augmentation induite par le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ sera plus faible (I_{max}/I_0) et proportionnelle à l'activité initiale.
Nous avons vu qu'à 10 µM, le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ induisait une augmentation du courant TREK-1 G171D : $I_{0\ G171D}$ = 90,65 ± 14,17 pA/pF *vs* $I_{max\ G171D}$ = 146,20 ± 18,11 pA/pF (**Figure 64**). Comme prédit, cette augmentation de courant est très faible : $I_{max}/ I_{0\ WT}$ = 16,58 ± 4,29 *vs* $I_{max}/ I_{0\ G171D}$ = 1,67 ± 0,14 (**Figure 64.A**). Et comme attendu, il n'y a cette fois pas de relation négative entre $I_{max}/ I_{0\ G171D}$ et $I_{0\ G171D}$ (**Figure 64.B**) puisque la fraction de canaux « silencieux » recrutables tend vers 0. De plus, nous trouvons cette fois une relation positive entre l'activité initiale $I_{0\ G171D}$ et l'activité maximale $I_{max\ G171D}$ à 0 mV du mutant G171D activé par le C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ (**Figure 65.C**) contrairement au canal TREK-1 WT (**Figure 65.D**).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montrent : **(1)** qu'il existe comme les canaux calciques voltage-dépendants (Schwartz et al., 1985) une fraction de canaux TREK-1 WT « silencieux » à la membrane et **(2)** que cette fraction de canaux « silencieux » est recrutable par des stimuli de l'environnement, comme les acides gras poly-insaturés.

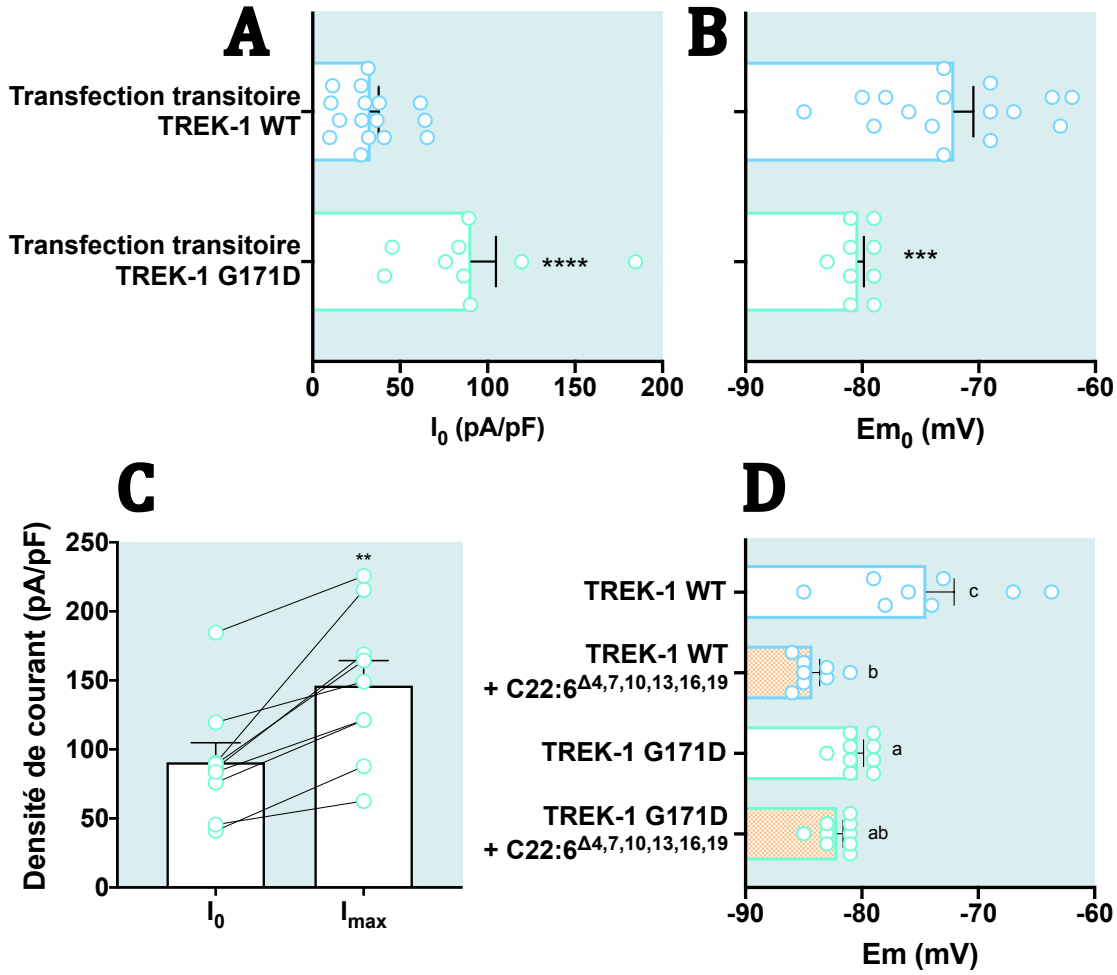

Figure 64

Maintien du potentiel de membrane par TREK-1 WT et G171D

A. *L'activité initiale du mutant TREK-1 G171D est supérieure à l'activité du canal WT à 0 mV : $I_{0\ WT}$ = 33,20 ± 4,51 pA/pF (n = 9) vs $I_{0\ G171D}$ = 90,65 ± 14,17 pA/pF (n = 16 ; p-value <0,0001).* ***B.*** *Les cellules transfectées avec le mutant G171D de TREK-1 sont hyperpolarisées par rapport aux cellules transfectées avec le canal WT : $Em_{0\ WT}$ = -72,11 ± 1,64 mV vs $Em_{0\ G171D}$ = -80,33 ± 0,47 mV (p-value = 0,0005).* ***A-B.*** *Les groupes sont comparés avec un test de Mann-Whitney.* ***C.*** *Le courant TREK-1 augmente en réponse au C22:6$^{\Delta4,7,10,13,16,19}$ 10 µM à 0 mV : $I_{0\ G171D}$ = 90,65 ± 14,17 pA/pF vs $I_{max\ G171D}$ = 146,20 ± 18,11 pA/pF (p-value = 0,003). Les groupes sont comparés avec un test apparié de Wilcoxon.* ***D.*** *Hyperpolarisation du potentiel*

de membrane en présence de 10 µM de C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$: $Em_{WT+C22:6}$ = -84,25 ± 0,62 et $Em_{G171D+C22:6}$ = -82,11 ± 0,48. Les groupes sont comparés avec un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn: les groupes qui ne portent pas la même lettre sont statistiquement différents. Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.

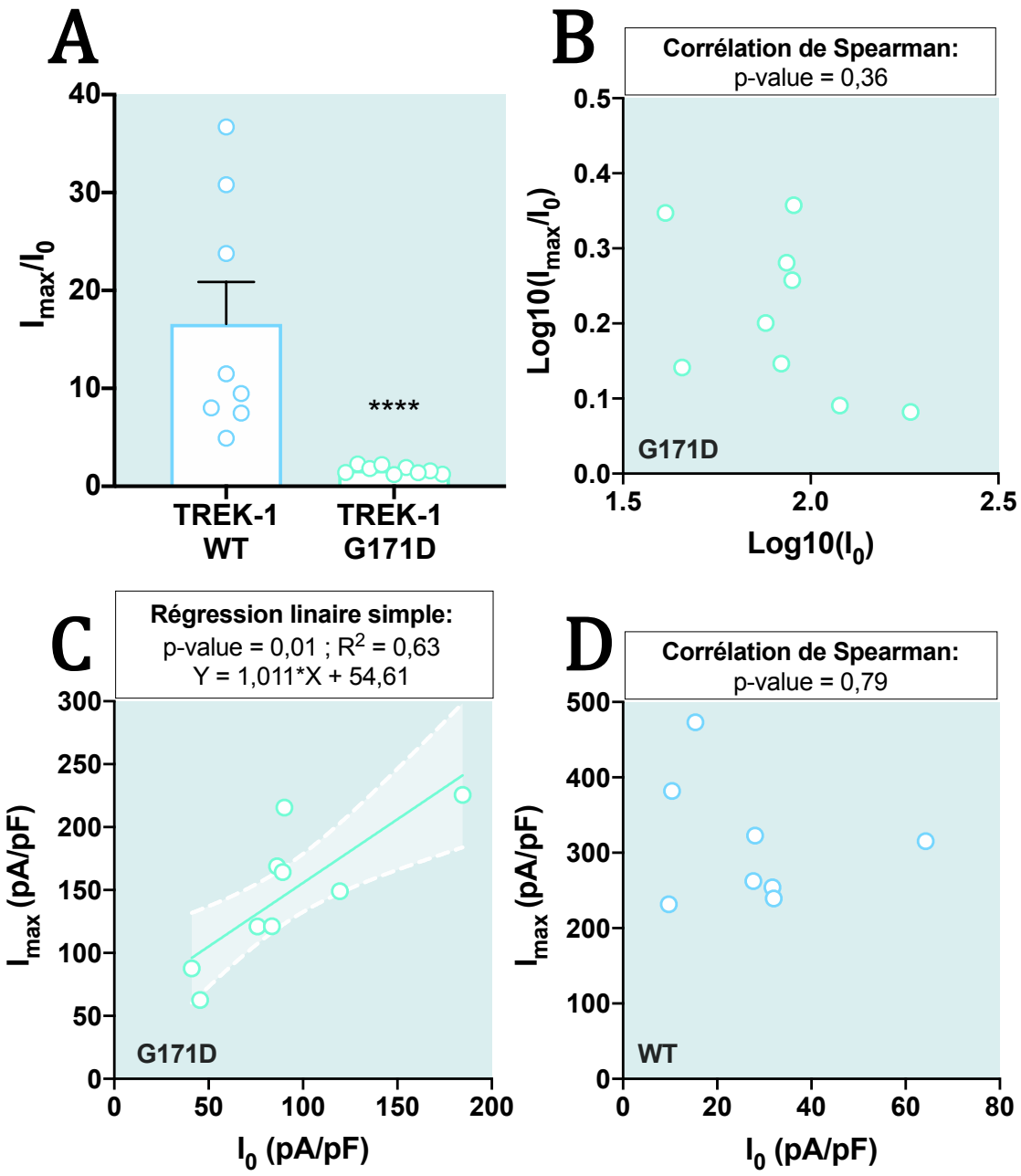

Figure 65

Activation du mutant TREK-1 G171D par le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$

A. *Degré d'activation du canal par 10 µM de C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ à 0 mV dans les cellules transfectées avec TREK-1 WT ou G171D : $I_{max}/I_{0\ WT}$ = 16,58 ± 4,28 vs $I_{max}/I_{0\ G171D}$ = 1,67 ± 0,14 (p-value < 0,0001). Les groupes sont comparés avec un test de Mann-Whitney. Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.* ***B.*** *Il n'y a pas de corrélation entre le degré d'activation I_{max}/I_0 et l'activité initiale I_0 du mutant G171D de TREK-1.* ***C.*** *Le courant maximal activé par le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ I_{max} est lié à l'activité initiale I_0 pour le mutant TREK-1 G171D.* ***D.*** *Il n'y a pas de relation entre le courant maximal activé par le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ I_{max} et l'activité initiale I_0 du TREK-1 WT à 0 mV.*

b. Fraction de canaux TREK-1 « silencieux » : du mode voltage-dépendant au mode « *leak* »

Au cours de cette partie sur la partie sur la « **Variabilité de la réponse aux acides gras et mécanisme d'action** », nous avons montré que l'effet des acides gras poly-insaturés était inversement proportionnel à l'activité initiale I_0 de TREK-1. Nous avons conclu qu'il existait une fraction de canaux TREK-1 actifs et une fraction de canaux « silencieux » à l'état initial, et que les acides gras poly-insaturés recrutaient la fraction de canaux « silencieux » pour permettre l'augmentation du courant TREK-1 en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp.

Le canal TREK-1 n'est pas vraiment un canal de fuite idéal puisqu'il présente une voltage-dépendance de sa probabilité d'ouverture (Li et al., 2006) et que la dépolarisation en *step* produit une composante de courant instantanée et une composante de courant voltage-dépendante (Bockenhauer et al., 2001). Cependant, nous avons vu que l'activation par certains stimuli, comme le C18:2$^{\Delta 9,12}$, le C22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$ et le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$, fait basculer le canal d'un mode voltage-dépendant à un mode « *leak* ». Ainsi, les acides gras poly-insaturés activent le canal TREK-1 en faisant basculer une fraction de la N.Po de voltage-dépendante à indépendante du voltage. Cette perte de la composante voltage-dépendante, mène à la perte progressive de la rectification du courant TREK-1 au cours de son activation.

En configuration cellule-entière, la mutant G171D du canal TREK-1 présente une perte de la rectification sortante du courant en condition initiale. Le coefficient de linéarité du courant initial (I_0) du mutant G171D est de 0,42 ± 0,04 *vs* 0,14 ± 0,01 pour le canal TREK-1 WT (**Figure 66**). La mutation G171D, fait donc basculer TREK-1 dans le mode « *leak* » qui ne suit plus la rectification prédite par l'équation de GHK.

Ainsi, les acides gras qui activent TREK-1 en le faisant basculer du mode voltage-dépendant à « *leak* » deviennent moins efficient sur le canal TREK-1 avec la G171D (**Figure 65**). Le coefficient de linéarité n'est pas modifié pour le mutant G171D au cours de l'activation par le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$, contrairement au canal WT (**Figure 66**).

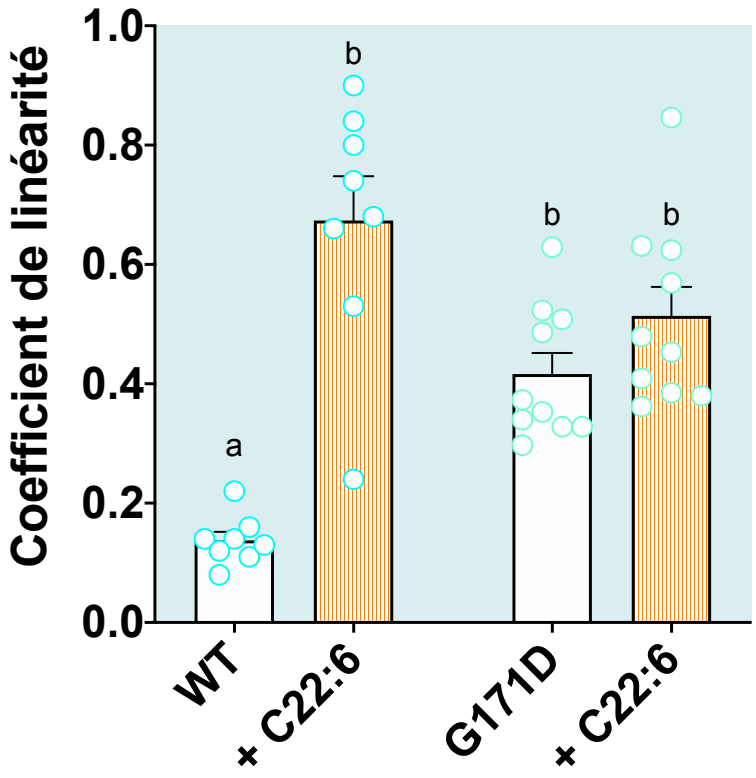

Figure 65

Perte de la rectification sortante du mutant G171D du canal TREK-1

Coefficient de linéarité du canal TREK-1 WT et G171D à l'état initial et activés par le C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ (10 µM), en configuration cellule entière de la technique de patch-clamp. Les groupes sont comparés avec un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn : les groupes qui ne portent pas la même lettre sont statistiquement différents.

4. DISCUSSION ET CONCLUSION

Au début de cette partie, nous nous proposions de vérifier un ensemble d'hypothèses sur le mécanisme mis en jeu dans l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés grâce au mutant G171D du canal TREK-1.

(1) La variabilité de l'activité initiale de TREK-1 serait liée aux fractions de canaux actifs et « silencieux » à la membrane, qui diffèrent selon les cellules.
(2) Les acides gras poly-insaturés permettraient une augmentation de la N.Po depuis la fraction de canaux « silencieux », expliquant l'absence de relation entre le I_0 et le I_{max} et la relation négative qui lie le I_{max}/I_0 au I_0.
(3) Les acides gras poly-insaturés qui sont de forts activateurs de TREK-1 le font basculer dans un mode « *leak* ».

Recrutement des canaux TREK-1 par les acides gras poly-insaturés :

En comparant les effets du ML402 à ceux des acides gras poly-insaturés sur le canal TREK-1, nous avons constaté qu'il existe au moins deux types d'activateurs de TREK-1. La différence de ces deux types d'activateurs s'illustre dans la variabilité de la réponse induite I_{max}/I_0.
Dans le cas des acides gras poly-insaturés, la réponse I_{max}/I_0 présente une large variabilité. Après avoir écarté une différence d'expression du canal TREK-1 ou l'implication d'autres conductances du modèle nous avons trouvé l'origine de la variabilité dans la variabilité de l'activité initiale I_0 de TREK-1. Pour expliquer la variabilité de ce paramètre initial, nous proposons qu'il y a, en condition initiale, deux fractions de canaux distinctes (N_1 et N_2), actifs et « silencieux », chacune définie par une Po : Po fraction active > Po fraction « silencieuse ». C'est la fraction de canaux actifs qui contribue au courant initial I_0 et à l'hyperpolarisation du potentiel de membrane Em_0. La seconde hyperpolarisation consécutive de l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés confirme qu'en condition initiale, une fraction de canaux ne participe pas à l'établissement d'Em_0 au voisinage d'E_K.
Dans la littérature, une étude des canaux calciques voltage-dépendants du muscle squelettique (muscle Sartorius de grenouille), aussi appelés récepteurs aux dihydropyridines, montre que seulement une fraction des canaux sont disponibles. Il y aurait alors 35 à 50 fois plus de

récepteurs aux dihydropyridines que de canaux activables par la dépolarisation (Schwartz et al., 1985). En 1995, une partie des travaux de thèse d'Alain Lacampagne sur les mouvements de charges des canaux sodiques et calciques voltage-dépendants des cellules cardiaques montre également que seulement une fraction des canaux présents à la membrane produit un courant.

L'amplitude de l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés présente une variabilité qui est liée et expliquée par la variabilité de cette activité initiale I_0 de TREK-1, telle que : $Log10(Imax/I_0)=f(Log10\ (I_0))$. Cette relation négative entre ces deux paramètres suggère que acides gras poly-insaturés n'agissent pas seulement en augmentant la Po et/ou la conductance des canaux de la fraction active, mais en convertissant également une partie (ou la totalité) de la fraction de canaux « silencieux » en canaux actifs. Ainsi, de nouveaux canaux sont recrutés au cours de l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés, pour augmenter la N.Po de la fraction active.

Le mutant gain de fonction G171D de TREK-1 associé à une augmentation de la probabilité d'ouverture, produit un courant initial I_0 supérieur au courant WT. Bien qu'il soit toujours activable par les acides gras poly-insaturés, cette activation est très faible en comparaison du canal WT ($I_{max}/I_{0\ WT} = 16,58 \pm 4,28$ *vs* $I_{max}/I_{0\ G171D} = 1,67 \pm 0,14$). Ces résultats suggèrent que les acides gras poly-insaturés activent le canal TREK-1 *via* un mécanisme de recrutement des canaux « silencieux » principalement.

Une telle relation entre I_{max}/I_0 et I_0 n'est pas observé pour le ML402, suggérant un mécanisme d'action différent de celui des acides gras. Le ML402 est un activateur direct de TREK-1 qui stabilise l'ouverture du pore en se fixant dans une poche à l'arrière du filtre de sélectivité (Lolicato et al., 2017 ; **Figure 16**). Cette poche se situe plus précisément à l'interface entre l'hélice du pore P1 et l'hélice du segment transmembranaire M4 où la liaison du ML402 engage 3 acides aminés : Phe 134 (P1), Lys 271 (M4) et Trp 275 (M4). La fixation du ML402 dans la poche, à une densité de deux ML402 par canal, stabilise l'interface P1/M4, qui à son tour stabilise l'ouverture du canal via le « *C-type gate* » (Lolicato et al., 2017) (**Figure 53.D**). L'activation I_{max} induite par le ML402 est proportionnelle à l'activité initiale I_0 du canal TREK-1, suggérant qu'il permet une activation de canaux déjà actifs à la membrane. Comme la droite de régression qui lie le I_{max} au I_0 ($I_{max} = f(I_0)$) ne passe pas par l'origine, cette activation implique probablement une augmentation simultanée de la conductance et de la probabilité d'ouverture de canaux participant déjà à la N.Po en condition initiale.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montrent : **(1)** qu'il existe comme les canaux calciques voltage-dépendants (Schwartz et al., 1985) une fraction de canaux TREK-1 WT « silencieux » à la membrane et **(2)** que cette fraction de canaux « silencieux » est recrutable par des stimuli de l'environnement, comme les acides gras poly-insaturés

Conversion de la composante voltage-dépendante de TREK-1 en composante instantanée :

L'ensemble de nos résultats propose que les acides gras n'activent pas uniquement TREK-1 *via* une augmentation de la N.Po, mais aussi par une conversion d'une fraction de la N.Po d'un mode voltage-dépendant à « *leak* ». Cette conversion se traduit par une perte de la rectification sortante du courant en configuration cellule-entière, au cours de l'activation et une perte de la composante voltage-dépendante du courant lors d'une dépolarisation en *step*. Lorsque le canal est converti en mode « *leak* » par une mutation (G171D), l'efficience des acides gras poly-insaturés à activer le canal TREK-1 diminue.
Il existe donc une relation entre les fractions active et « silencieuse » de canaux et les modes voltage-dépendant et « *leak* » du canal TREK-1. La compréhension de cette relation méride davantage d'investigation pour compléter note compréhension du mécanisme d'action des acides gras poly-insaturés dans l'activation du canal TREK-1.

Ce basculement de voltage-dépendant à « *leak* » a déjà été observé et discuté dans la littérature. Les auteurs proposent que les processus de phosphorylation du domaine C-terminal peuvent conduire TREK-1 à passer d'un fonctionnement à l'autre (Bockenhauer et al., 2001). Les phosphorylations du résidu S333 du domaine C-terminal conduiraient le canal TREK-1 vers un fonctionnement voltage-dépendant. La phosphorylation de TREK-1 inhibe le canal, suggérant que le passage de « *leak* » à voltage-dépendant est associé à une augmentation de la fraction de canaux « silencieux » à la membrane. Ainsi, il existerait en condition physiologique une fraction de canaux déphosphorylés (« *leak* ») et une seconde fraction de canaux phosphorylés (voltage-dépendant), expliquant les deux composantes du courant macroscopique induites par une dépolarisation en *step* : (1) la composante instantanée (canal déphosphorylé, « *leak* ») et (2) la composante temps-dépendante (canal phosphorylé) (Kennard et al., 2005 ; Bockenhauer et al., 2001). D'autres modulateurs comme l'interaction du PIP_2 avec le domaine C-terminal et

la protonation du résidu E306 du domaine C-terminal font également basculer TREK-1 dans un mode « *leak* ». Des mutations sont également responsables de l'induction de ce mode « *leak* » comme la mutation E306A (Honoré et al., 2007).
Pour être fonctionnel, le domaine C-terminal de TREK-1 a besoin d'interagir avec les têtes polaires des phospholipides de la membrane. Nous avons vu que TREK-1 interagissait avec la membrane *via* des interactions électrostatiques entre la tête polaire des phospholipides et 5 résidus chargés positivement de son domaine C-terminal (**Figure 21**). Le découplage entre les phospholipides et TREK-1 par la polylysine par exemple, inhibe le canal TREK-1. Les phosphorylations des résidus S300 et S333 du domaine C-terminal, masquent les charges positives des sérines en les remplaçant pas les charges négatives du phosphate. Ce changement de polarité altère l'interaction électrostatique entre le domaine C-terminal (+) et les phospholipides (-), faisant changer TREK-1 vers le mode voltage-dépendant (Bockenhauer et al., 2001).

Le modèle de Hodgkin et Huxley que nous proposons :

En s'appuyant sur la littérature et avec l'ensemble de ces nouveaux résultats, nous suggérons que les acides gras poly-insaturés interagissent avec TREK-1 et qu'ils pourraient établir des interactions électrostatiques avec TREK-1 *via* leur tête polaire, comme avec les phospholipides. Nous confronterons cette hypothèse d'interactions électrostatiques dans la partie « **Importance de la géométrie des acides gras pour l'activation du canal TREK-1** ».

La conversion d'un mode voltage-dépendant à un mode « *leak* » serait alors la conséquence de cette interaction. Cette conversion d'un mode à l'autre n'est pas sans rappeler les observations faites sur la coexistence de deux fractions de canaux, actifs et « silencieux » dans les conditions initiales, avant activation.
En condition initiale, la dichotomie faite entre ces deux fractions pourrait s'expliquer par un courant TREK-1 modulable, divisé en deux composantes, dépendante du voltage et « *leak* ». L'activation de TREK-1 par des activateurs comme le ML402 permet une augmentation linéaire de la Po et/ou de la conductance unitaire qui n'altèrerait pas la part relative des deux composantes du courant : relation I_{max} *vs* I_0 linéaire et pas de modification du coefficient de linéarité. Au contraire, les acides gras poly-insaturés, notamment le C18:2$^{\Delta 9,12}$, C22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$ et C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$, convertiraient la composante voltage-dépendante du courant en

composante « *leak* », associée avec une forte augmentation de la N.Po dans toute la gamme de potentiel. Ainsi, TREK-1 existerait dans au moins un état fermé (F) et au moins deux états ouverts (O_1 et O_2) (**Figure 67**).

Pour aller plus loin, des expériences sont en cours pour déterminer le seuil d'apparition de la composante voltage-dépendante du courant et des analyses des constantes de temps et des courant de queues sont en cours de réalisation.

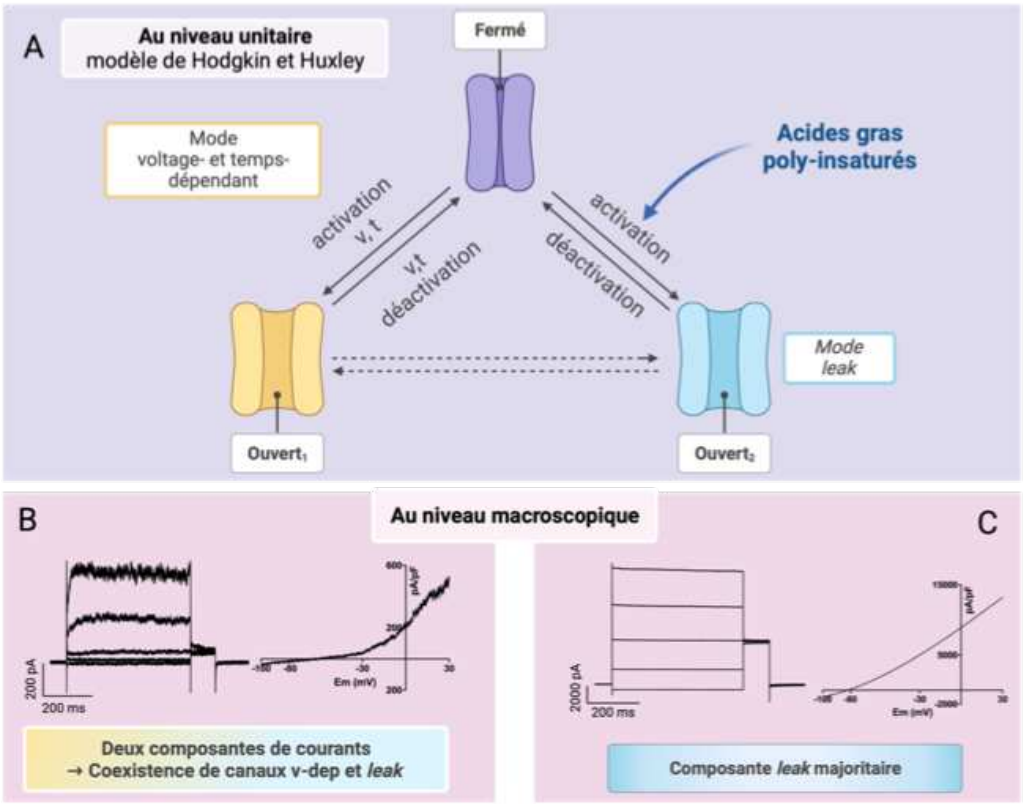

Figure 67

Modèle de Hodgkin et Huxley pour l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés

*TREK-1 existe au moins dans un état Fermé et deux états Ouverts (ouvert$_1$ et ouvert$_2$). **A.** TREK-1 peut fonctionner selon un mode voltage-dépendant. Les transitions F-O_1 et O_1-F dépendent du temps et du voltage. Lorsque TREK-1 bascule en mode « leak », la transition F-O_2 à une constante de réaction qui tend vers +∞. **B.** La transition F-O_1 qui dépend du temps et du voltage au niveau unitaire se traduit au niveau macroscopique par une composante de courant temps-dépendante observable lors de dépolarisation en step. Cette composante de courant peut être lissée avec une équation exponentielle. La transition O_1-F dépendante du temps et du voltage au niveau unitaire va produire un courant de déactivation au niveau macroscopique (courant*

de queue). Lorsque deux fractions de canaux, voltage-dépendante et « leak » coexistent dans la même cellule, la courbe courant-voltage présente une rectification sortante. ***C.*** *La transition F-O_2* qui *est indépendante du voltage au niveau unitaire se traduit au niveau du courant macroscopique par une perte de la composante de courant voltage-dépendant lors de la dépolarisation en step. Au moment de la dépolarisation en step, le courant est instantané et est seulement fonction du changement du gradient électrochimique. La courbe courant-voltage devient linéaire lorsque la fraction majoritaire des canaux fonctionne selon le mode « leak ».*

C. TREK-1 ET LES DERIVES OXYDES DES ACIDES GRAS POLY-INSATURES

Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux dérivés oxydés non enzymatiques des acides gras poly-insaturés et à leur potentielle modulation du canal TREK-1. Nous travaillons dans la lignée de cellule HEK hTREK-1 #1 en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp.

1. CONTEXTUALISATION

Les acides gras poly-insaturés sont hautement sensibles à la peroxydation (l'oxydation des acides gras). Ils peuvent être oxydés selon deux voies : (1) une voie enzymatique qui produit des métabolites oxydés spécifiques et (2) une voie non enzymatique, spontanée, qui produit un large panel de dérivés oxydés plus difficiles à identifier (voir **b2. Oxydation** non enzymatique
Les acides gras poly-insaturés de type Oméga-3 et plus particulièrement l'EPA ($C20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$) et le DHA ($C22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$) ont des propriétés antiarythmiques qu'ils exercent via la modulation de canaux ioniques impliqués dans la genèse et dans la repolarisation du potentiel d'action (Xiao et al., 1998 ; Kang et al., 1997 ; Kang et al., 1995 ; Kang et al., 1994).
L'étude de Roy et al., en 2015 montre que le DHA 10 µM ($C22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$) en condition antioxydante (+ Vitamine E 1 µM (α-tocophérol)) perd ses propriétés antiarythmiques *in cellulo* et *in vivo* (Roy et al., 2015*)*. Aussi, un dérivé oxydé spécifique du DHA, la 4(RS)-4-F_{4t}-NeuroProstane entre 10 nM et 1 µM, exerce les mêmes propriétés antiarythmiques que le DHA en prévenant les arythmies induites par l'ischémie-reperfusion via la régulation de l'homéostasie calcique (Roy et al., 2015) et une hyperpolarisation membranaire (Roy et al., 2017). Si la régulation de l'homéostasie calcique est attribuée à des modifications post-traductionnelles du RyR_2 induites par la 4(RS)-4-F_{4t}-NeuroProstane ($4F_{4t}$-NeuroP) (Roy et al., 2015), l'origine de l'hyperpolarisation membranaire induite par la $4F_{4t}$-NeuroP n'a pas été identifiée.
TREK-1 étant exprimé à la surface des cardiomyocytes (Wiedmann et al., 2021 ; Kelly et al., 2006 ; Tan et al., 2004), nous avons fait l'hypothèse que des métabolites oxydés du DHA, comme la $4F_{4t}$-NeuroP, pouvaient activer le canal TREK-1 pour induire l'hyperpolarisation de

la membrane. Ces métabolites oxydés non enzymatiques sont naturellement et spontanément formés à l'air libre.

2. METABOLITES OXYDES DE L'ACIDE DOCOSAHEXAENOÏQUE ET DE L'ACIDE LINOLEIQUE SUR L'ACTIVITE DU CANAL TREK-1

Dans cette partie, nous travaillons en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp dans le modèle de cellules HEK hTREK-1 #1.

a. La $4F_{4T}$-NeuroP (dérivés oxydés de l'acide docosahexaénoïque)

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de la $4F_{4t}$-NeuroP à 10 µM sur le canal TREK-1 en configuration cellule-entière.

La **Figure 68.A** montre la structure chimique de la $4F_{4t}$-NeuroP. La $4F_{4t}$-NeuroP à 10 µM ne permet pas d'activer le canal TREK-1 (I_0 = 15,57 ± 2,83 pA/pF *vs* $I_{max\text{-}4F4t\text{-}NeuroP}$ = 19,11 ± 2,76 pA/pF à 0mV, p-value = 0,0547 ; **Figure 68.B**) et ne permet pas d'hyperpolariser le potentiel de membrane des cellules HEK hTREK-1 (Em_0 = -72,33 ± 2,08 mV *vs* $Em_{4F4t\text{-}NeuroP}$ = -70,78 ± 2,86 mV, p-value = 0,3516 ; **Figure 68.C**) même en respectant une période de 3 min de perfusion minimale. La **Figure 68.D** montre qu'après 3 minutes de perfusion de $4F_{4t}$-NeuroP, le courant TREK-1 est activé par 10 µM de DHA ($C22:6^{\Delta4,7,10,13,16,19}$).

Ainsi, l'hyperpolarisation induite par la 4F4t-NeuroP dans les cardiomyocytes en post-infarctus du myocarde (Roy et al., 2017) n'est pas liée à l'activation du canal potassique TREK-1.

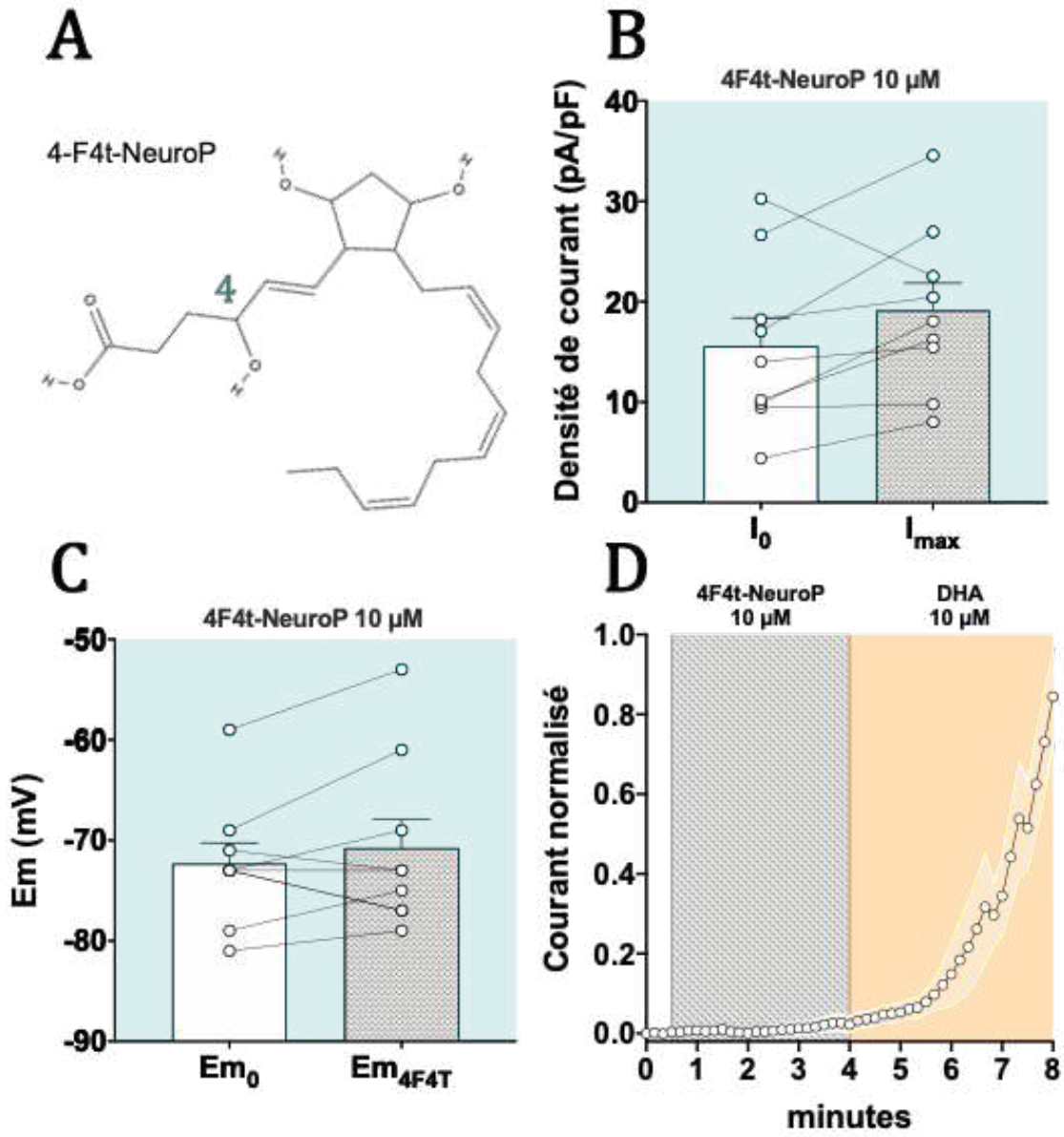

Figure 68

TREK-1 n'est pas activé par la 4F$_{4t}$-NeuroProstane

A. *Structure chimique de la 4F$_{4t}$-NeuroP. Le groupement hydroxyle est situé sur le 4ème carbone en partant de l'extrémité carboxyle de la molécule.* ***B.*** *La 4F$_{4t}$-NeuroP à 10 µM n'active pas le canal TREK-1 : I_0 = 15,57 ± 2,83 pA/pF vs $I_{max\text{-}4F4t\text{-}NeuroP}$ = 19,11 ± 2,76 pA/pF à 0 mV (n = 9 ; test apparié de Wilcoxon, p-value = 0,0547).* ***C.*** *Le potentiel de membrane des cellules HEK hTREK-1 n'est pas modifié par la 4F$_{4t}$-NeuroP : Em_0 = -72,33 ± 2,08 mV vs $Em_{4F4t\text{-}NeuroP}$ = -70,78 ± 2,86 mV (test apparié de Wilcoxon, p-value = 0,3516). Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.* ***D.*** *Cinétique d'activation du canal TREK-1 à 0 mV par 10 µM de DHA (C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$) après 3 minutes de perfusion de 4F$_{4t}$-NeuroP à 10 µM. Les données sont représentées comme la moyenne ± SEM.*

b. Les oxylipines de l'acide linoléique

Dans les parties « **Activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés** » et « **Variabilité de la réponse aux acides gras et mécanisme d'action** », nous avons établi que l'acide linoléique (LA, C18:$2^{\Delta 9,12}$) était l'un des plus fort activateurs de TREK-1. De la même manière que précédemment, nous voulions voir si les dérivés oxydés du LA pouvaient être responsables de l'activation du canal TREK-1.

La **Figure 68.A** montre la structure chimique de chacune des 8 oxylipines du LA d'un mélange commercial : 9S-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid (9(S)-HODE), 9-oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid (9-oxoODE), 13S-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid (13(S)-HODE), 13-oxo-9Z,11E-octadecadienoic acid (13-oxoODE), (±)9,(10)-epoxy-12Z-octadecenoic acid (9,10-EpOME), (±)9,(10)-dihydroxy-12Z-octadecenoic acid (9,10-DiHOME), (±)12(13)epoxy-9Z-octadecenoic acid (12,13-EpOME), 12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid (12,13-DiHOME).

A une concentration de 10 µM et 30 µM totale d'oxylipines, les oxylipines n'ont pas d'effet sur le canal TREK-1 (**Figure 69.B-C**). La masse moléculaire moyenne étant de 300,48 g/mol (min = 296,5 g/mol et max = 314,5 g/mol), la concentration estimée pour chacune des oxylipines (10 µg/mL/oxylipine) est de 1,25 µM et 3,75 µM pour la solution à 10 µM totale et 30 µM totale, respectivement. A noter que le LA à 2 µM et 3 µM active le canal TREK-1 (**Figure 45**).

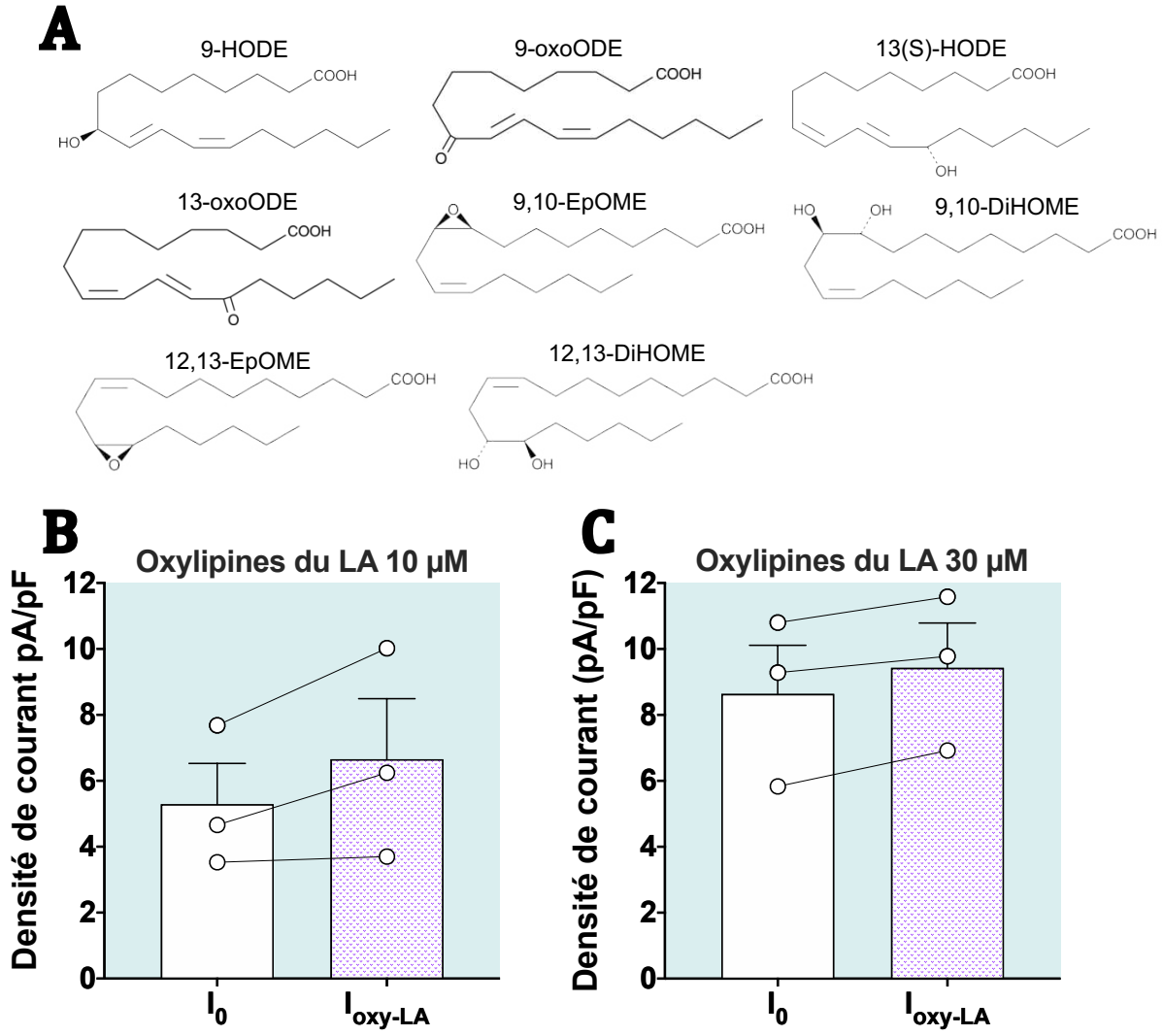

Figure 69

TREK-1 n'est pas activé par les oxylipines de l'acide linoléique

A. *Structures chimiques de 8 oxolypines de l'acide linoléique : 9S-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic (9-HODE), 9-oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid (9-oxoODE), 13S-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid (13(S)-HODE), 13-oxo-9Z,11E-octadecadienoic acid (13-oxoODE), (±)9,(10)-epoxy-12Z-octadecenoic acid (9,10-EpOME), (±)9,(10)-dihydroxy-12Z-octadecenoic acid (9,10-DiHOME), (±)12(13)epoxy-9Z-octadecenoic acid (12,13-EpOME), 12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid (12,13-DiHOME).* ***B.*** *Le mélange de 10 µM de 8 oxylipines de l'acide linoleique (oxy-LA) n'active pas le canal TREK-1 : I_0 = 5,29 ±1,24 pA/pF vs $I_{oxy\text{-}LA}$= 6,65 ± 1,84 pA/pF (p-value = 0,25).* ***C.*** *Le mélange de 30 µM d'oxy-LA n'active pas le canal TREK-1 : I_0 = 8,64 ±1,47 pA/pF vs $I_{oxy\text{-}LA}$= 9,43 ± 1,36 pA/pF (p-value = 0,25). Les groupes sont comparés avec un test apparié de Wilcoxon. Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.*

3. EFFETS DES ACIDES GRAS EN CONDITIONS PRO- ET ANTI-OXYDANTES SUR LE CANAL TREK-1

Nous avons constaté précédemment que la $4F_{4t}$-NeuroP, un dérivé oxydé non enzymatique du DHA, et le mélange commercial d'oxylipines du LA n'avaient pas d'effet sur le canal TREK-1.

Toutefois, l'oxydation non enzymatique des acides gras poly-insaturés est spontanée à l'air libre et ne se réduit pas à la production de ces quelques dérivés. Cependant, il n'était pas envisageable de tester un par un tous les dérivés oxydés non enzymatiques des acides gras poly-insaturés, puisque, d'une part il en existe peut-être plusieurs centaines et que d'autre part, tous ces dérivés ne sont pas commerciaux ou synthétisables.
Comme les propriétés antiarythmiques du DHA sont perdues en conditions antioxydantes (α-tocophérol 1 µM) *in vivo* et *in cellulo* (Roy et al., 2015*),* nous voulions vérifier plus largement dans cette partie si le statut d'oxydation des acides gras poly-insaturés influait sur leur capacité à activer le canal TREK-1. Nous avons alors fait l'hypothèse que si un ou des dérivés oxydés non enzymatiques des acides gras poly-insaturés étaient responsable de l'activation de TREK-1, alors l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés en condition antioxydante devrait être nulle ou à minima diminuée vis-à-vis de l'activation induite par l'acide gras seul. Cette hypothèse repose sur la conjecture de l'oxydation spontanée des acides gras à l'aire libre. Autrement dit, lorsque nous avons testé les effets des acides gras poly-insaturés (1, 2, 3, 6 et 10 µM) sur le canal TREK-1, le statut d'oxydation n'était pas contrôlé. Ainsi, l'oxydation pouvait se produire dans le système de perfusion et nous perfusions alors des métabolites oxydés actifs sans le savoir.

a. Effet de la Vitamine E sur le canal TREK-1

Pour empêcher, ou tout du moins limiter l'oxydation spontanée des acides gras poly-insaturés, nous avons utilisé la vitamine E (α-tocophérol) à une concentration de 1 µM pour 10 µM d'acide gras poly-insaturé. En 2015, les travaux de Roy et al., ont montré que le DHA 10 µM perdait ses propriétés antiarythmiques en présence de 1 µM de vitamine E (α-tocophérol). C'est

cette même étude qui a montré que l'oxydation du DHA était nécessaire pour exercer au moins une partie de ses propriétés antiarythmiques, grâce à la production de la $4F_{4t}$-NeuroP, un de ses dérivés non enzymatiques (Roy et al., 2015).

La Vitamine E est une vitamine liposoluble que l'on retrouve dans les fruits secs oléagineux (amandes, noix, noisettes) ou dans les matières grasses végétales comme l'huile de soja ou de tournesol. Il existe 8 formes naturelles de la vitamine E (4 tocophérols et 4 tocotriénols) ; la forme γ-tocophérol est la forme la plus abondante dans l'alimentation et la forme α-tocophérol est la forme la plus active. Dans l'industrie agro-alimentaire, la vitamine E est utilisée comme conservateur alimentaire (E306/E309 ; https://eur-lex.europa.eu/legal-content) en raison de son puissant pouvoir anti-oxydant. En physiologie, elle est retrouvée dans les membranes biologiques, cytoplasmique et mitochondriale où sont produites les espèces réactives de l'oxygènes et agit en en parallèle de la vitamine C et du glutathion pour réguler la balance oxydative.

La structure chimique de la vitamine E (forme α-tocophérol) est donnée dans la **Figure 69.A**. A 1 µM, la vitamine E (Vit E) ne modifie pas l'activité du canal TREK-1, en respectant une période de 3 minutes de perfusion : I_0 = 11,81 ± 3,28 pA/pF *vs* $I_{Vit\ E}$ = 17,17 ± 5,11 pA/pF (p-value = 0,1562 ; **Figure 70.B**).

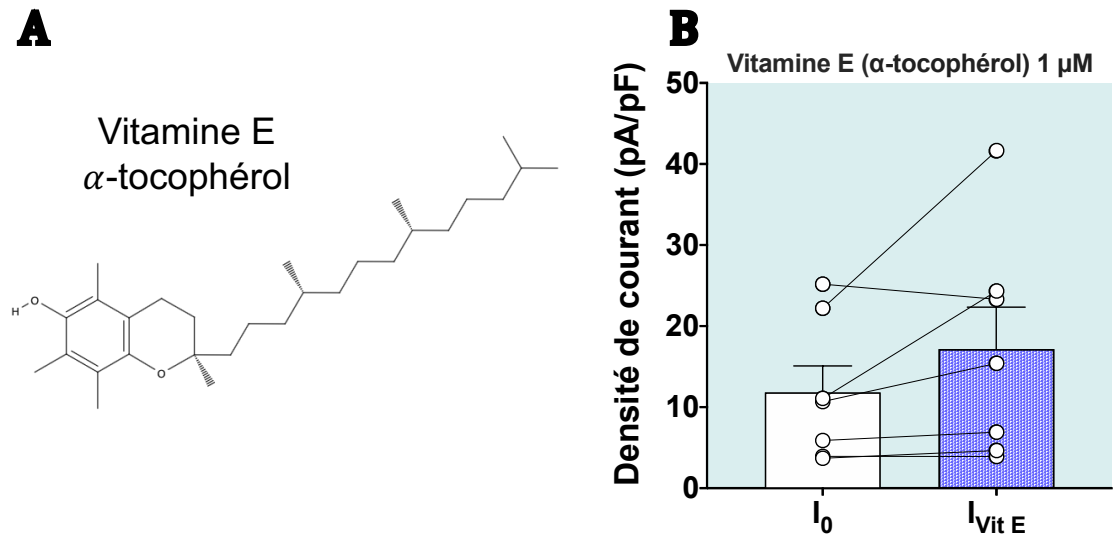

Figure 70

La Vitamine E ne modifie pas l'activité du canal TREK-1

A. *Structure chimique de la forme α-tocophérol de la vitamine E (Vit E).* ***B.*** *La Vit E à 1 µM ne modifie pas l'activité du canal TREK-1 : I_0 = 11,81 ± 3,28 pA/pF vs $I_{Vit\ E}$ = 17,17 ± 5,11*

pA/pF (test apparié de Wilcoxon ; p-value = 0,1562). Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.

b. Conservation de l'effet activateur des acides gras poly-insaturés en condition antioxydante

Pour vérifier l'impact du statut d'oxydation des acides linoléique (C18:2$^{\Delta 9,12}$ ou LA) et docosahexaénoïque (C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ ou DHA) sur leur capacité à activer le canal TREK-1 nous avons comparé les effets de ces acides gras à 10 µM, non protégés de l'oxydation, à ceux des acides gras poly-insaturés protégés de l'oxydation avec 1 µM de vitamine E. L'hypothèse étant que ce sont les dérivés oxydés non enzymatiques produits spontanément via l'oxydation non enzymatique dans le système de perfusion qui sont responsables de l'activation du canal TREK-1. En protégeant l'oxydation des acides gras poly-insaturés grâce à la vitamine E, nous limitons la production des dérivés oxydés et donc nous devrions prévenir l'activation du canal TREK-1 par ces acides gras.

Les **Figure 71** et **Figure 72** montrent la démarche suivie pour comparer les effets de ces acides gras poly-insaturés en tenant compte de la variabilité de l'effet imposé par l'activité initiale I_0 du canal TREK-1 que nous avons détaillé dans la partie « **Variabilité de la réponse aux acides gras et mécanisme d'action** ».
Dans un premier temps, les relations liant l'amplitude de l'activation de TREK-1 par les acides gras (I_{max}/I_0) à l'activité initiale de TREK-1 (I_0) sont représentées dans les **Figure 71.A** et **Figure 72.A**. Les conditions antioxydantes « LA + Vit E » et « DHA + Vit E » n'altèrent pas la relation entre ces deux paramètres et nous retrouvons de ce fait une droite de régression telle que : Y=f(X) ou $Log10(I_{max}/I_0) = Log10(I_0)$.
Faute de cette relation, il faut borner l'activité initiale de TREK-1 (I_0) pour comparer plus précisément les conditions antioxydantes avec les acides gras seul. Les bornes min et max sont représentées sur les **Figure 71.A** et **Figure 72.A** pour l'acide linoléique et l'acide docosahexaénoïque, respectivement. Les points correspondants à l'activité initiale de TREK-1 au-delà de ces bornes sont exclus et les nouvelles droites de régression résultantes sont données dans les **Figure 71.B** et **Figure 72.B** pour le LA et le DHA, respectivement. A nouveau, les

conditions antioxydantes « LA + Vit E » et « DHA + Vit E » n'altèrent pas la relation $Log10(I_{max}/I_0) = Log10(I_0)$.

En conservant les valeurs comprises à l'intérieur des bornes définies, les **Figure 71.C** et **Figure 72.C** montrent l'augmentation de la densité de courant provoquée par le LA seul ou en condition antioxydante (**Figure 71.C**) et le DHA seul ou en condition antioxydante (**Figure 72.C**). Les acides gras poly-insaturés en condition antioxydante sont donc toujours capables d'activer le canal TREK-1 : $I_0 = 30,65 \pm 4,72$ pA/pF *vs* $I_{LA + Vit\ E} = 290,30 \pm 29,12$ pA/pF (p-value = 0,0312) et $I_0 = 21,92 \pm 5,29$ pA/pF *vs* $I_{DHA + Vit\ E} = 202,30 \pm 37,28$ pA/pF à 0 mV (p-value = 0,0010).

L'hypothèse émise plus haut était que si un ou des dérivés oxydés non enzymatiques des acides gras poly-insaturés étaient responsables de l'activation de TREK-1, alors l'activation de TREK-1 par les acides gras en condition antioxydante devrait être **(A)** nulle ou **(B)** à minima diminuée vis-à-vis de l'activation induite par l'acide gras seul. Nous venons de montrer que l'activation de TREK-1 était permise par la condition antioxydante, ce qui nous fait écarter l'hypothèse **(A)**. Pour vérifier l'hypothèse **(B)** selon laquelle la condition antioxydante devrait à minima réduire l'amplitude d'activation du canal TREK-1, les **Figure 71.D** et **Figure 72.D** comparent les amplitudes d'activation I_{max}/I_0 du LA et du DHA en condition antioxydante ou non. Ainsi, l'hypothèse **(B)** est également écartée puisque les conditions « LA » *vs* « LA + Vit E » et « DHA » *vs* « DHA + Vit E » produisent la même activation : $I_{max}/I_{0\ (LA + Vit\ E)} = 11,07 \pm 2,76$ *vs* $I_{max}/I_{0\ (LA)} = 14,80 \pm 1,84$ à 0 mV (p-value = 0,1645, **Figure 71.D**) et $I_{max}/I_{0\ (DHA + Vit\ E)} = 12,26 \pm 2,98$ *vs* $I_{max}/I_{0\ (DHA)} = 12,92 \pm 2,52$ à 0 mV (p-value = 0,8889, **Figure 72.D**).

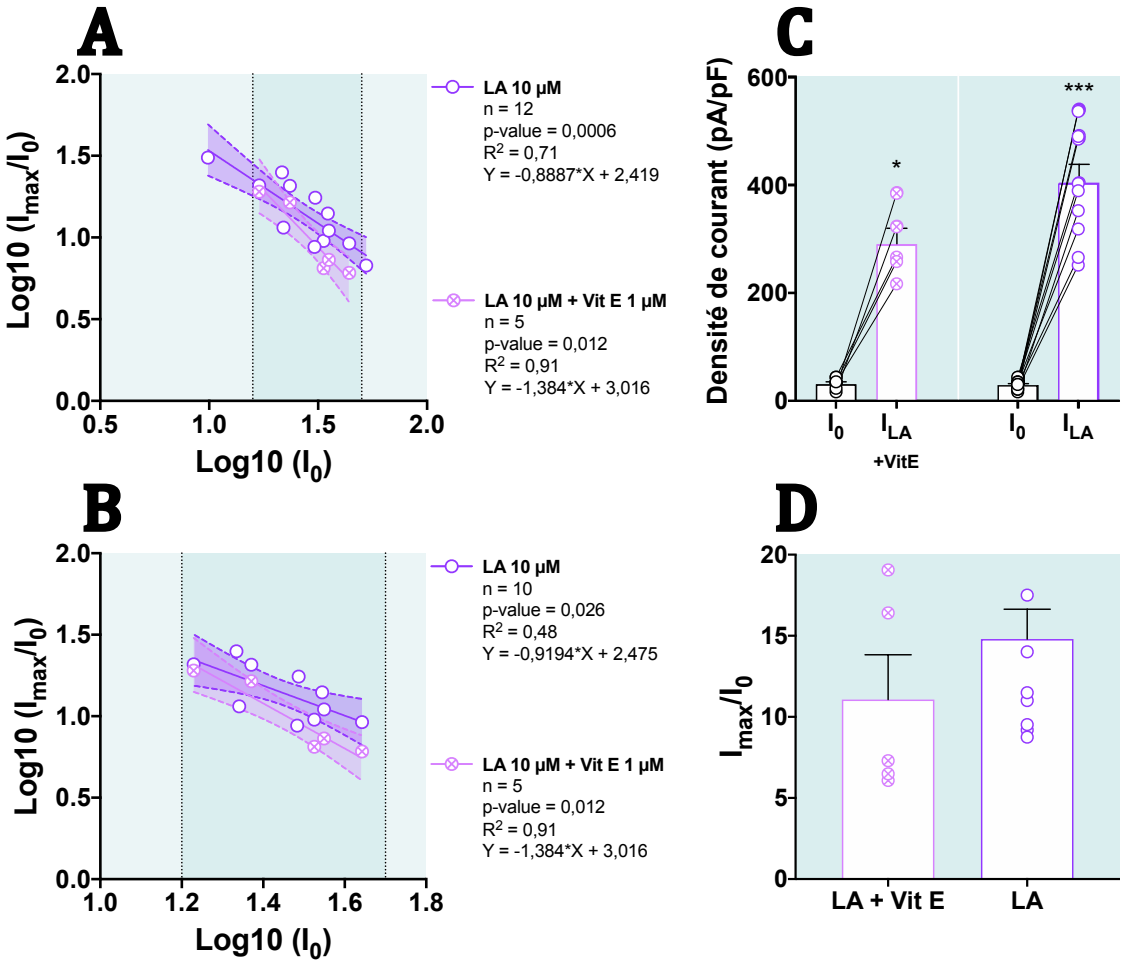

Figure 71

Effet de l'acide linoléique en condition antioxydante

A. *Relation linéaire entre I_{max}/I_0 et I_0 pour l'acide linoléique (LA) à 10 µM et le LA 10 µM en condition antioxydante avec 1 µM de vitamine E (LA + Vit E) à 0 mV ($n_{(LA)}$ = 12 et $n_{(LA + Vit E)}$ = 5).* ***B.*** *Superposition des relations linéaires du LA (n = 10) et du LA + Vit E (n= 5) entre les bornes minimale et maximale de I_0 : $Log10(I_{0\ min})$ = 1,2 et $Log10(I_{0\ max})$ = 1,7. Les paramètres des régressions linéaires sont indiqués : p-value, R^2, l'équation de la droite de régression et les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance 90%.* ***C.*** *Le LA en condition antioxydante (LA + Vit E) active le canal TREK-1 : I_0 = 30,65 ± 4,72 pA/pF vs $I_{LA + Vit E}$ = 290,30 ± 29,12 pA/pF à 0 mV (test apparié de Wilcoxon ; p-value =0,0312 ; n = 5).* ***D.*** *La condition LA + Vit E induit la même activation du canal TREK-1 que le LA seul à 10 µM : $I_{max}/I_{0\ (LA + Vit E)}$ = 11,07 ± 2,76 vs $I_{max}/I_{0\ (LA)}$ = 14,80 ± 1,84 à 0 mV (test de Mann-Whitney ; p-value = 0,1645 ; ($n_{(LA + Vit E)}$ = 5 et $n_{(LA)}$ = 10). Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.*

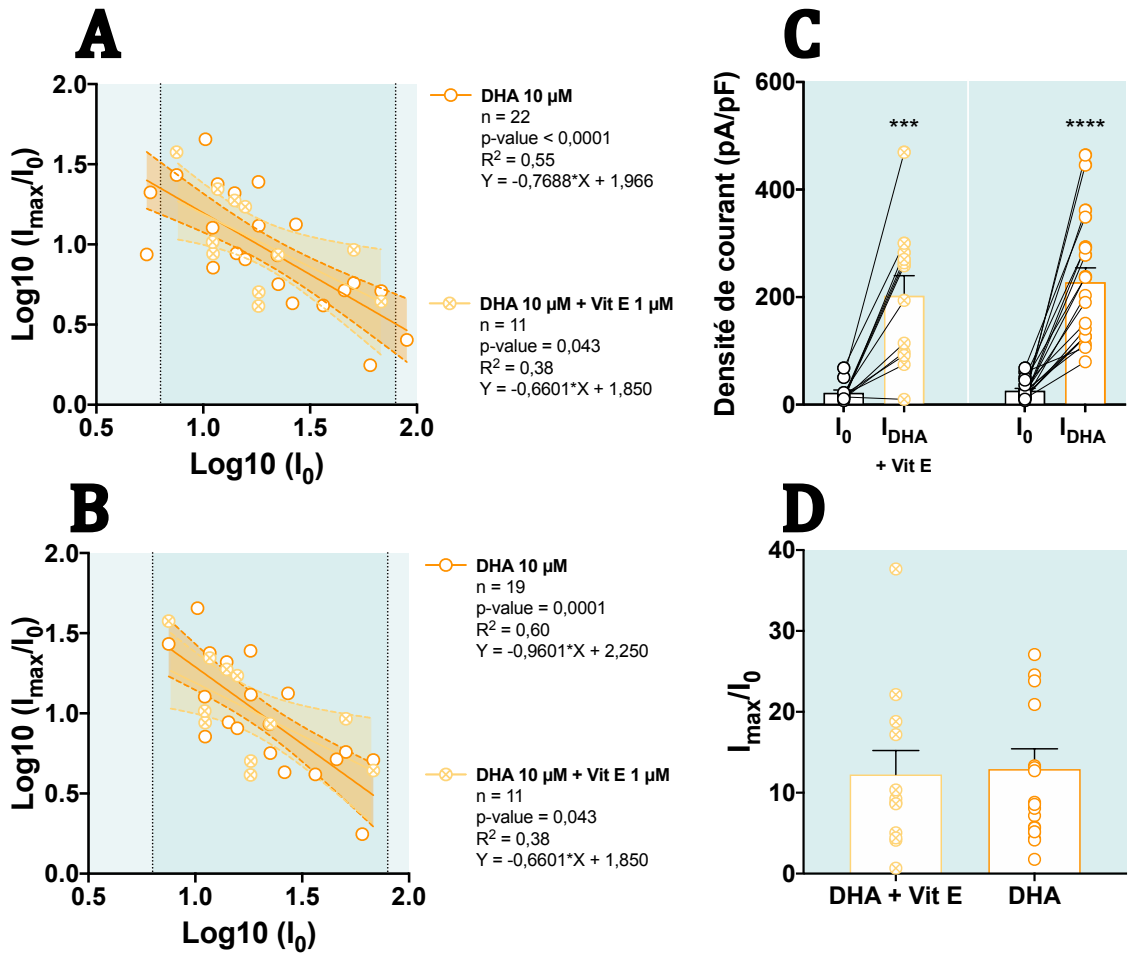

Figure 72

Effet de l'acide docosahexaénoïque en condition antioxydante

A. *Relation linéaire entre I_{max}/I_0 et I_0 pour l'acide docosahexaénoïque (DHA) à 10 µM et le DHA 10 µM en condition antioxydante avec 1 µM de vitamine E (DHA + Vit E) à 0 mV ($n_{(DHA)}$ = 22 et $n_{(DHA + Vit E)}$ = 11).* ***B.*** *Superposition des relations linéaires du DHA (n = 19) et du DHA + Vit E (n= 11) entre les bornes minimale et maximale de I_0 : $Log10(I_{0\ min})$ = 0,8 et $Log10(I_{0\ max})$ = 1,9. Les paramètres des régressions linéaires sont indiqués : p-value, R^2, l'équation de la droite de régression et les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance 90%.* ***C.*** *Le DHA en condition antioxydante (DHA + Vit E) active le canal TREK-1 : I_0 = 21,92 ± 5,29 pA/pF vs $I_{DHA + Vit E}$ = 202,30 ± 37,28 pA/pF à 0 mV (test apparié de Wilcoxon ; p-value =0,0010 ; n = 11).* ***D.*** *La condition DHA + Vit E induit la même activation du canal TREK-1 que le DHA seul à 10 µM : $I_{max}/I_{0\ (DHA + Vit E)}$ = 12,26 ± 2,98 vs $I_{max}/I_{0\ (DHA)}$ = 12,92 ± 2,52 à 0 mV (test de Mann-Whitney ; p-value = 0,8889 ; ($n_{(DHA + Vit E)}$ = 11 et $n_{(DHA)}$ = 19). Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.*

4. L'ACIDE LINOLEIQUE DEUTERE

Nous avons constaté que l'acide linoléique et docosahexaénoïque en condition antioxydante grâce à la vitamine E étaient toujours capables d'activer le canal TREK-1.

Toutefois, une des limites de ces expériences repose sur le caractère spontané de l'oxydation non enzymatique ; dès que l'acide gras est remis en solution, sa peroxydation commence. Si la vitamine E prévient l'oxydation de l'acide gras dans le système de perfusion, elle n'a pas d'impact sur les métabolites oxydés déjà produits en amont.

Nous avons testé l'effet de l'acide linoléique deutéré ((11,11-D_2)-LA ou D,D LA), dont la structure chimique est illustrée dans la **Figure 73.A**. La présence des deux deutériums protège l'acide linoléique de l'oxydation en ralentissant son oxydation. En reprenant les hypothèses précédentes, si l'effet du LA est médié par un ou des métabolites oxydés non enzymatiques, nous nous attendons à ce que le D,D LA, protégé de l'oxydation par les deutériums, produise une activation du canal TREK-1 (A) nulle ou (B) plus faible vis-à-vis du LA non protégé de l'oxydation.

Nous avons constaté que le D,D LA à 10 µM était tout aussi bien capable d'activer le canal TREK-1 bien que son oxydation soit limitée (**Figure 73.B**): I_0 = 15,35 ± 3,57 pA/pF vs $I_{D,D\ LA}$ = 218,00 ± 40,86 pA/pF à 0 mV (p-value = 0,0039). La présence des deutériums sur l'acide linoléique ne modifie pas la relation $Log10(I_{max}/I_0) = Log10(I_0)$ caractéristique de l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés (**Figure 73.C**). Enfin, l'amplitude d'activation de TREK-1 par le D,D LA n'est pas différente de celle induite par le LA à 10 µM (**Figure 73.D**): $I_{max}/I_{0\ (D,D\ LA)}$ = 21,36 ± 6,38 *vs* $I_{max}/I_{0\ (LA)}$ = 19,25 ± 2,79 à 0 mV (p-value = 0,8897).

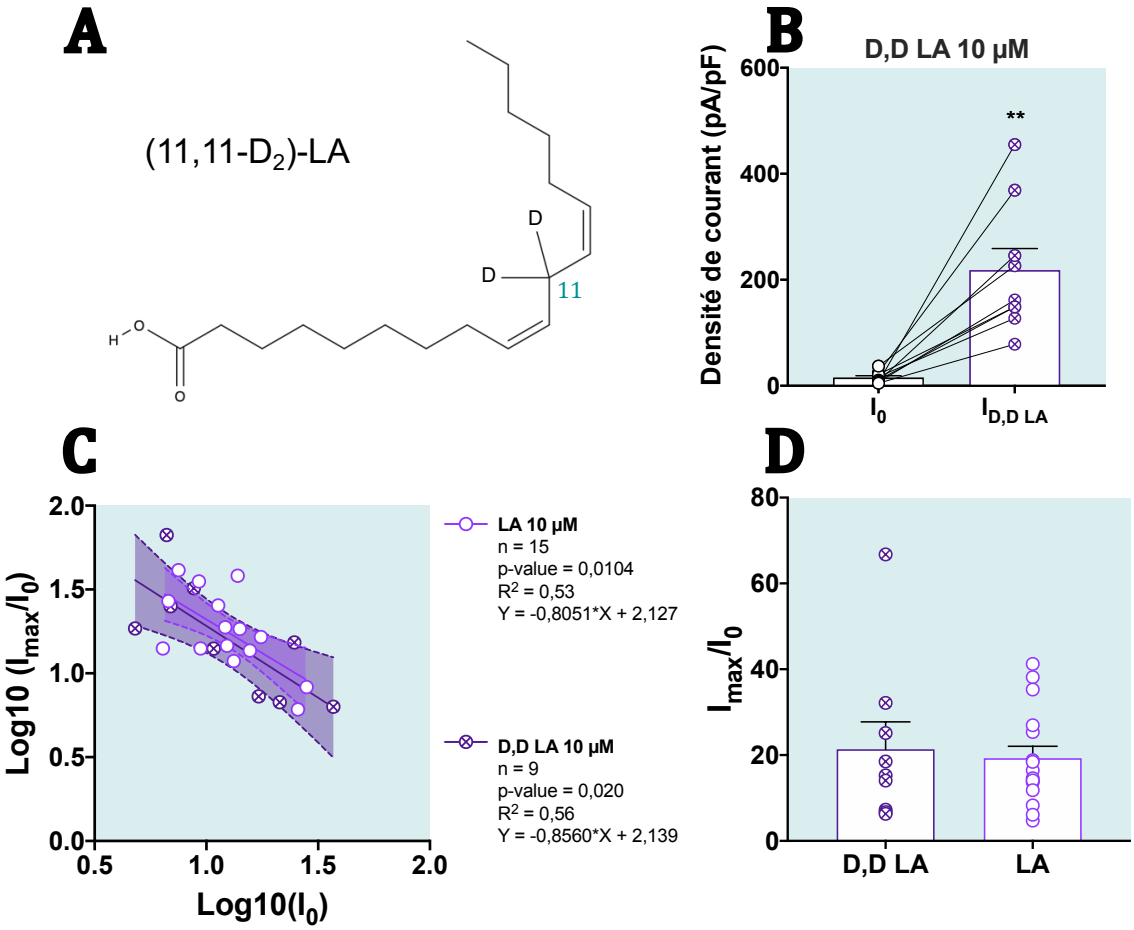

Figure 73

Effet de l'acide linoléique deutéré

A. *Structure chimique de l'acide linoléique deutéré sur le 11ème carbone en partant de l'extrémité carboxyle (D,D LA).* ***B.*** *Augmentation de l'activité du canal TREK-1 en réponse à 10 µM de D,D LA : I_0 = 15,35 ± 3,57 pA/pF vs $I_{D,D\ LA}$ = 218,00 ± 40,86 pA/pF à 0 mV (test apparié de Wilcoxon ; p-value = 0,0039).* ***C.*** *Superposition des relations linéaires du D,D LA (n = 9) et du LA (n= 15). Les paramètres des régressions linéaires sont indiqués : p-value, R^2, l'équation de la droite de régression et les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance 90%.* ***D.*** *Le D,D LA 10 µM induit la même activation du canal TREK-1 que le LA 10 µM : $I_{max}/I_{0\ (D,D\ LA)}$ = 21,36 ± 6,38 vs $I_{max}/I_{0\ (LA)}$ = 19,25 ± 2,79 à 0 mV (test de Mann-Whitney ; p-value = 0,8897). Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.*

5. DISCUSSION ET CONCLUSION

Pour clore la partie « **TREK-1 et les dérivés oxydés des acides gras poly-insaturés** », nous pouvons conclure que l'effet hyperpolarisant de la 4(RS)-4-F_{4t}-NeuroProstane (4F4$_T$-NeuroP) observé dans les cardiomyocytes atriaux murins (Roy et al., 2015 ; Roy et al., 2017), ne passe vraisemblablement pas par l'activation du canal TREK-1 (**Figure 68**). Aussi la prévention de l'oxydation du DHA (DHA 10 µM + Vit E 1 µM), prévenait l'effet antiarythmique du DHA (Roy et al., 2015). Cependant, dans notre étude la prévention de l'oxydation des acides gras poly-insaturés, linoléique (LA) et docosahexaénoïque (DHA), grâce à la vitamine E ne prévient pas l'activation du canal TREK-1 et ne modifie pas la réponse de TREK-1 aux acides gras (**Figure 71** et **Figure 72**). Aussi, l'acide linoléique deutéré (11,11-D_2-LA), dont l'oxydation est ralentie par les deutériums, reste un puissant activateur du canal TREK-1 ; l'amplitude de son effet n'est pas différente de l'amplitude de l'effet de l'acide linoléique (LA) (**Figure 73**).
Au laboratoire, les effets des acides docosahexaénoïque (DHA) deutérés (6,6-D_2-DHA et 6,6-9,9-D_4-DHA et tout deutéré) ont également été testés sur le canal TREK-1 et les activations induites ne sont pas différentes de celle produite par le DHA. Finalement, les métabolites oxydés de manière non enzymatique des acides gras poly-insaturés ne semblent pas être responsables de la modulation du canal TREK-1.

D. IMPORTANCE DE LA GEOMETRIE DES ACIDES GRAS POUR L'ACTIVATION DU CANAL TREK-1

Les acides gras semblent être les vrais acteurs de l'activation de TREK-1, en permettant le basculement d'un mode voltage-dépendant à « *leak* », probablement grâce à une interaction directe avec le canal.

Ainsi, dans cette partie, nous nous concentrons sur les propriétés chimiques essentielles des acides gras pour activer le canal TREK-1. Dans un premier temps, nous verrons l'importance de l'intégrité du groupement carboxyle des acides gras dans l'activation de TREK-1. Ensuite, nous allons voir le rôle essentiel des insaturations dans l'activation du canal TREK-1 en comparant les acides gras saturés et poly-insaturés.
Pour finir, nous aborderons l'importance de la position et de la configuration Cis ou Trans des insaturations pour l'activation du canal TREK-1, en comparant les effets des acides gras conjugués de l'acide linoléique (LA : C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$; LA conjugués CLAs : C18:2$^{\Delta 9Z,11E}$, C18:2$^{\Delta 9E,11E}$ et C18:2$^{\Delta 10E,12Z}$). Les expériences sont réalisées dans le modèle HEK hTREK-1 #2 de surexpression stable du canal TREK-1 (Andharai et al., 2017) en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp.

1. L'EXTREMITE CARBOXYLE DES ACIDES GRAS POLY-INSATURES

a. Les acides gras estérifiés

Pour déterminer l'importance de l'extrémité carboxyle des acides gras, nous avons testé les effets des acides linoléique (C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$) et docosahexaénoïque (C22:6$^{\Delta 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z}$) estérifiés. Ces deux acides gras, sans estérification, sont les deux acides gras que nous avons identifiés comme les activateurs les plus puissants du canal TREK-1. L'estérification à lieu au niveau de l'extrémité carboxyle, sur l'atome d'oxygène qui n'est pas impliqué dans la double liaison. Les structures chimiques de ces acides gras estérifiés sont illustrées dans la **Figure 74**.

Les **Figure 74.B** et **Figure 74.D** montrent que l'estérification de l'extrémité carboxyle empêche ces acides gras d'activer le canal TREK-1 : I_0 = 9,35 ± 1,06 pA/pF *vs* $I_{LA\text{-}Ome}$ = 11,18 ± 1,81 pA/pF (p-value = 0,078) et I_0 = 14,48 ± 2,27 pA/pF *vs* $I_{DHA\text{-}OEt}$ = 9,26 ± 2,22 pA/pF à 0 mV (p-value = 0,0078). Ainsi, le groupement carboxyle semble être indispensable aux acides gras pour activer le canal TREK-1.

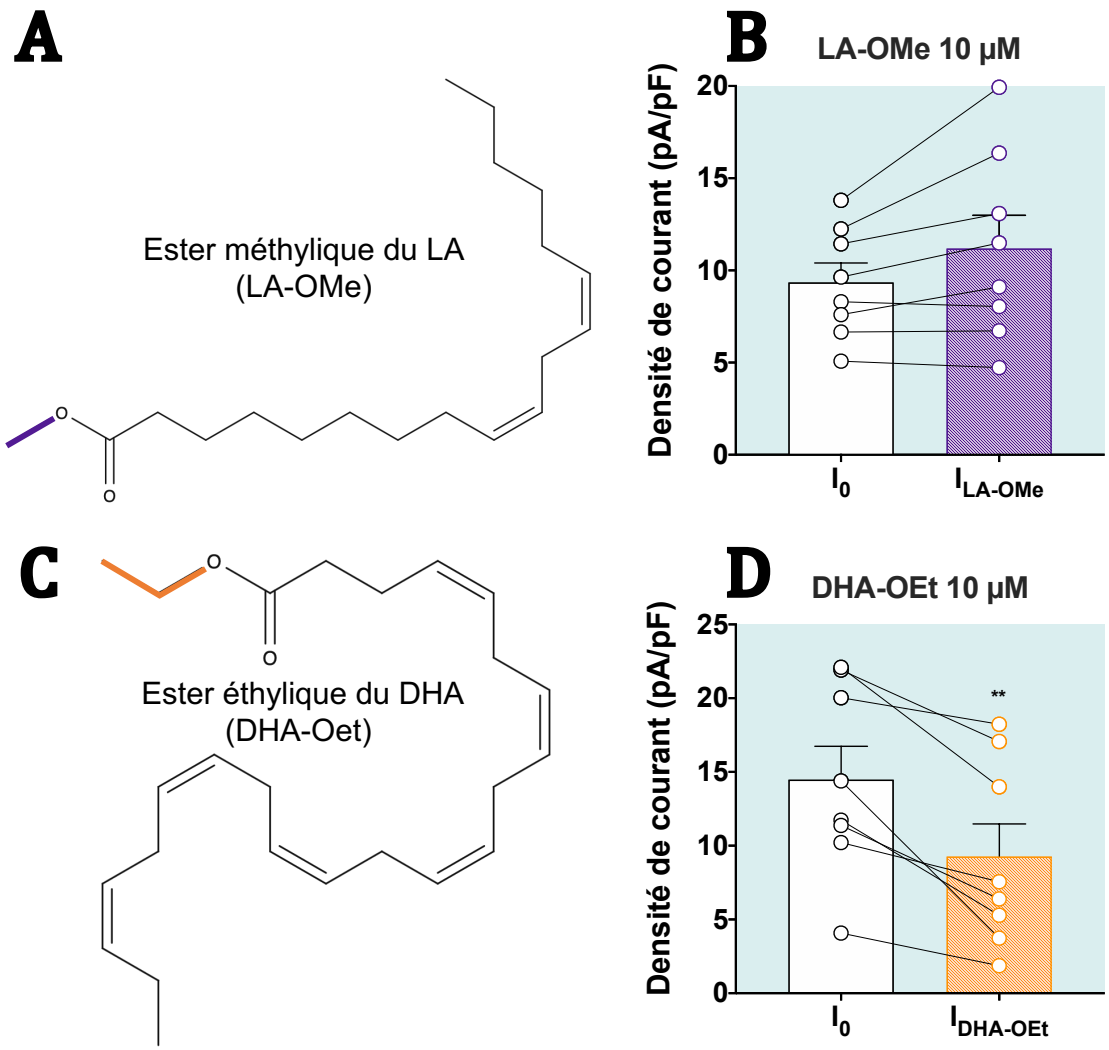

Figure 74

Effet des acides gras estérifiés sur le canal TREK-1

A. *Structure chimique de l'ester méthylique du LA (LA-OMe).* ***B.*** *Le LA-OMe perd sa capacité à activer le canal TREK-1 :* I_0 *= 9,35 ± 1,06 pA/pF vs* $I_{LA\ méthyle\ ester}$ *= 11,18 ± 1,81 pA/pF à 0 mV (test apparié de Wilcoxon ; p-value = 0,0781).* ***C.*** *Structure chimique de l'ester éthylique*

*du DHA (DHA-OEt). **B.** Le DHA-OEt perd sa capacité à activer le canal TREK-1 : I_0 = 14,48 ± 2,27 pA/pF vs $I_{DHA\ éthyle\ ester}$ = 9,26 ± 2,22 pA/pF à 0 mV (test apparié de Wilcoxon ; p-value = 0,0078). Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.*

2. LES INSATURATIONS

Bien que tous les acides gras possèdent une extrémité carboxyle, certains acides gras testés ne sont pas des activateurs du canal TREK-1, comme l'acide stéarique (C18:0) ou l'acide α-linolénique (C18:3$^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$). De ce fait, l'extrémité carboxyle n'est vraisemblablement pas l'unique caractéristique importante des acides gras dans le mécanisme d'interaction et d'activation du canal TREK-1

Puisque l'extrémité carboxyle est un critère nécessaire mais pas suffisant pour activer le canal TREK-1, nous nous sommes penchés sur l'importance de la présence d'insaturations, du nombre et de la position des insaturations sur la chaîne aliphatique des acides gras.

a. Les acides gras à 18 atomes de carbones qui n'activent pas le canal TREK-1

Dans un premier temps, nous avons comparé les effets des acides gras à 18 atomes de carbones, de 0 à 3 insaturations : acide stéarique (C18:0 ; n = 4), acide oléique (C18:1$^{\Delta 9Z}$; n = 11), acide linoléique (C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$; n = 21) et acide α-linolénique (C18:3$^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$; n = 12).

L'acide gras saturé C18:0 n'active pas le canal TREK-1 : I_0 = 18,70 ± 6,15 pA/pF *vs* I_{max} =18,42 ± 5,55 pA/pF (p-value > 0,9999). L'addition d'une ou de deux insaturations sur cet acide gras saturés confère à ces deux nouveaux acides gras (C18:1$^{\Delta 9Z}$ et C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$) la capacité d'activer le canal TREK-1 (**Figure 75**). Ainsi, la présence d'insaturation(s) semble nécessaire pour activer le canal TREK-1.
Cependant, le nombre croissant d'insaturations ne semble pas être un critère d'activation du canal TREK-1 puisque le C18:3$^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$ n'active pas le canal TREK-1 (**Figure 75.A**) et qu'il n'y a pas de corrélation entre l'activation du canal TREK-1 et le nombre d'insaturations des acides gras à 18 atomes de carbones (**Figure 75.B** et **Figure 75.C**).

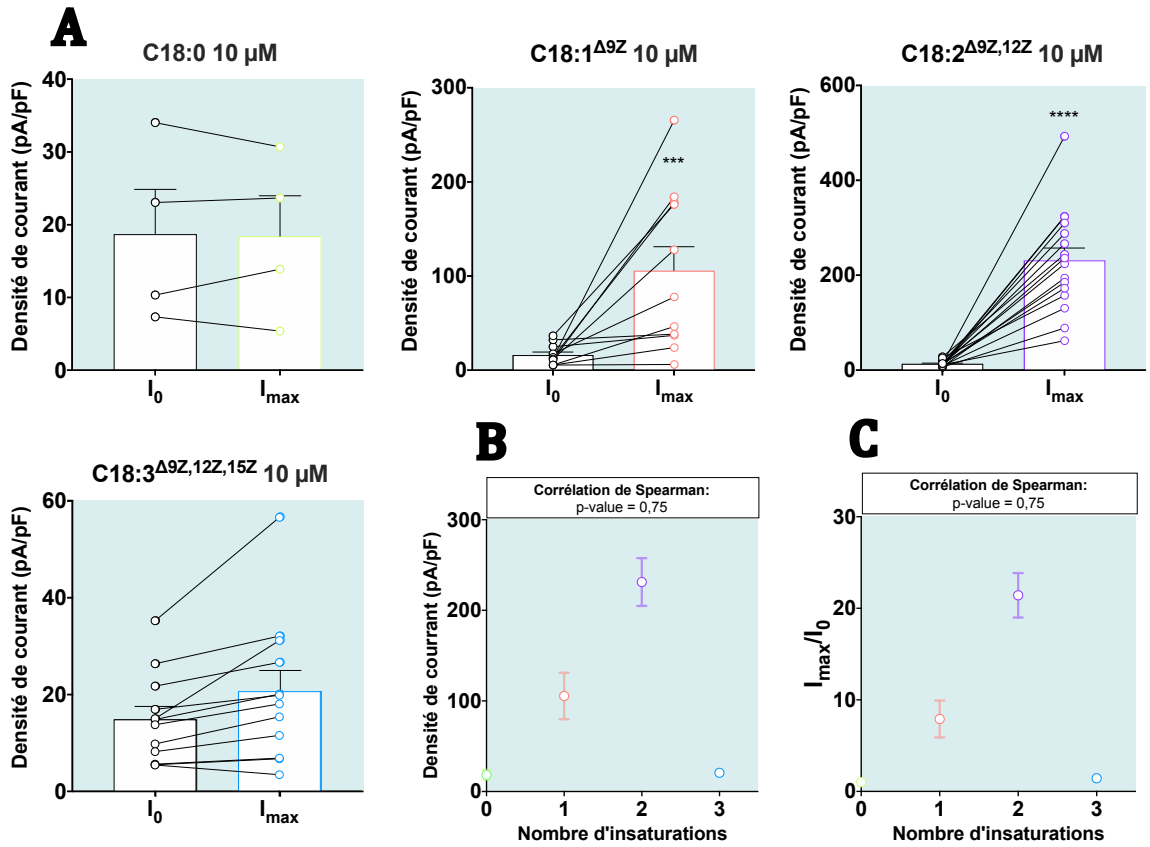

Figure 75

Comparaison des effets des acides gras à 18 atomes de carbones sur le canal TREK-1

A. *Densités de courant initiales (I_0) et maximalse (I_{max}) activées par les : C18:0 (I_0 = 18,70 ± 6,15 pA/pF vs I_{max} =18,42 ± 5,55 pA/pF ; p-value > 0,9999), C18:1$^{\Delta 9Z}$ (I_0 = 16,11 ± 3,24 pA/pF vs I_{max} = 105,50 ± 25,67 pA/pF ; p-value = 0,0010), C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$ (I_0 = 13,42 ± 1,53 pA/pF vs I_{max} = 231,20 ± 26,45 pA/pF ; p-value < 0,0001) et C18:3$^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$ (I_0 = 14,88 ± 2,66 pA/pF vs I_{max} = 20,72 ± 4,24 pA/pF ; p-value = 0,094) à 10 µM et 10 mV. Les groupes sont comparés avec un test apparié de Wilcoxon.* ***B-C****. Il n'y a pas de corrélation entre le nombre d'insaturations des acide gras à 18 atomes de carbones et* ***B.*** *la densité de courant maximale activé par les acides gras (I_{max}) (test de corrélation de Spearman : p-value = 0,75) ou* ***C.*** *l'amplitude d'activation du canal (I_{max}/I_0) TREK-1 (p-value = 0,75).*

b. La configuration spatiale des acides gras

Le nombre et la position des insaturations sur les acides gras sont responsables de leurs configurations spatiales (**Figure 4**). Aussi, la présence d'insaturations est nécessaire pour activer le canal TREK-1, mais l'exception du C18:3$^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$ soulève la question de l'importance de la position des insaturations et donc de la géométrie de l'acide gras dans l'activation du canal TREK-1.

b.1. La position des insaturations

En reprenant les résultats de la partie « **L'activation de TREK-1 n'est pas corrélée à la longueur de la chaîne carbonée des acides gras poly-insaturés** » qui compare les effets des différents acides gras poly-insaturés, nous allons regarder l'importance de la position des insaturations sur la chaîne aliphatique des acides gras pour l'activation du canal TREK-1. Les enregistrements ont été réalisés en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp dans un modèle de surexpression stable du canal TREK-1.

Les acides gras poly-insaturés sont divisés en trois groupes : C18, C20 et C22. Nous avons déjà vu que les différents acide gras poly-insaturés activent le canal TREK-1 (exception du C18:3$^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$) et que l'amplitude de cette activation varie en fonction de l'acide gras considéré. Nous avons également vu que les acides gras agissent *via* une modification de la N.Po pour augmenter le courant macroscopique et que ce mécanisme complexifie la distinction statistique de l'effet des différents acides gras. Grâce à l'analyse en régression linéaire simple de la relation $Log_{10}(I_{max}/I_0) = f(Log_{10}(I_0))$, nous avons pu affiner la discrimination des effets des acides gras, aboutissant à trois groupes distincts d'amplitudes d'effets :

- **Activateur fort** : Y-intercept > 2 : C18:2$^{\Delta 9,12}$, C22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$ et C22 :6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$
- **Activateur intermédiaire** : 1,7 < Y-intercept < 2 : C20:4$^{\Delta 5,8,11,14}$ et C20:5$^{\Delta 5,8,11,14,17}$
- **Activateur faible** : Y-intercept < 1,7 : C20:2$^{\Delta 11,14}$ et C20:4$^{\Delta 8,11,14,17}$

La **Figure 76** illustre le rôle des insaturations en fonction de leur position sur la chaîne aliphatique des acides gras, en partant de l'extrémité carboxyle (COO^-). Ainsi, au sein du groupe C18, l'insaturation en position 9 semble être nécessaire pour activer le canal TREK-1 : sans elle, le C18:0 n'est pas capable d'activer TREK-1 tandis que le C18:$1^{\Delta 9Z}$ et C18:$2^{\Delta 9Z,12Z}$ sont des activateurs du canal (**Figure 76** ; $I_{max}/I_{0\text{-}(C18:1)} = 7{,}91 \pm 2{,}01$ et $I_{max}/I_{0\text{-}(C18:2)} = 21{,}42 \pm 2{,}42$, respectivement). Cependant, l'insaturation en position 15 du C18:$2^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$ empêche l'acide gras d'exercer son effet activateur du canal TREK-1 (**Figure 76**).
Au sein du groupe C20, les C20:$2^{\Delta 11Z,14Z}$ et C20:$4^{\Delta 8Z,11Z,14Z,17Z}$ produisent des « effets faibles » tandis que les C20:$4^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z}$ et C20:$5^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z}$ produisent des « effets intermédiaires ». L'insaturation responsable de cette différence d'effet semble être l'insaturation en position 5 tandis que la présence ou non de l'insaturation en position 17 ne semble pas avoir d'impact sur la capacité des acides gras à activer TREK-1 (**Figure 76**).
Au sein du groupe C22, c'est l'insaturation en position 4 qui semble être déterminante pour avoir un effet fort des acides gras, tandis que l'insaturation en position 19 ne semble pas avoir d'impact sur la capacité des acides gras à activer TREK-1 (**Figure 76**).

Au regard de l'analyse de ces trois groupes, C18, C20 et C22, la première insaturation en partant de l'extrémité carboxyle semble être déterminante dans l'activation du canal TREK-1. Cette première insaturation potentialise les effets des acides gras (**Figure 76**). La dernière insaturation en partant de l'extrémité carboxylique ne semble quant à elle pas avoir d'impact (ni positif, ni négatif) sur l'effet des acides gras C20 (position 17) et C22 (position 19) (**Figure 76**). Cependant, pour les C18, la dernière insaturation en position 15 prévient l'activation du canal TREK-1.

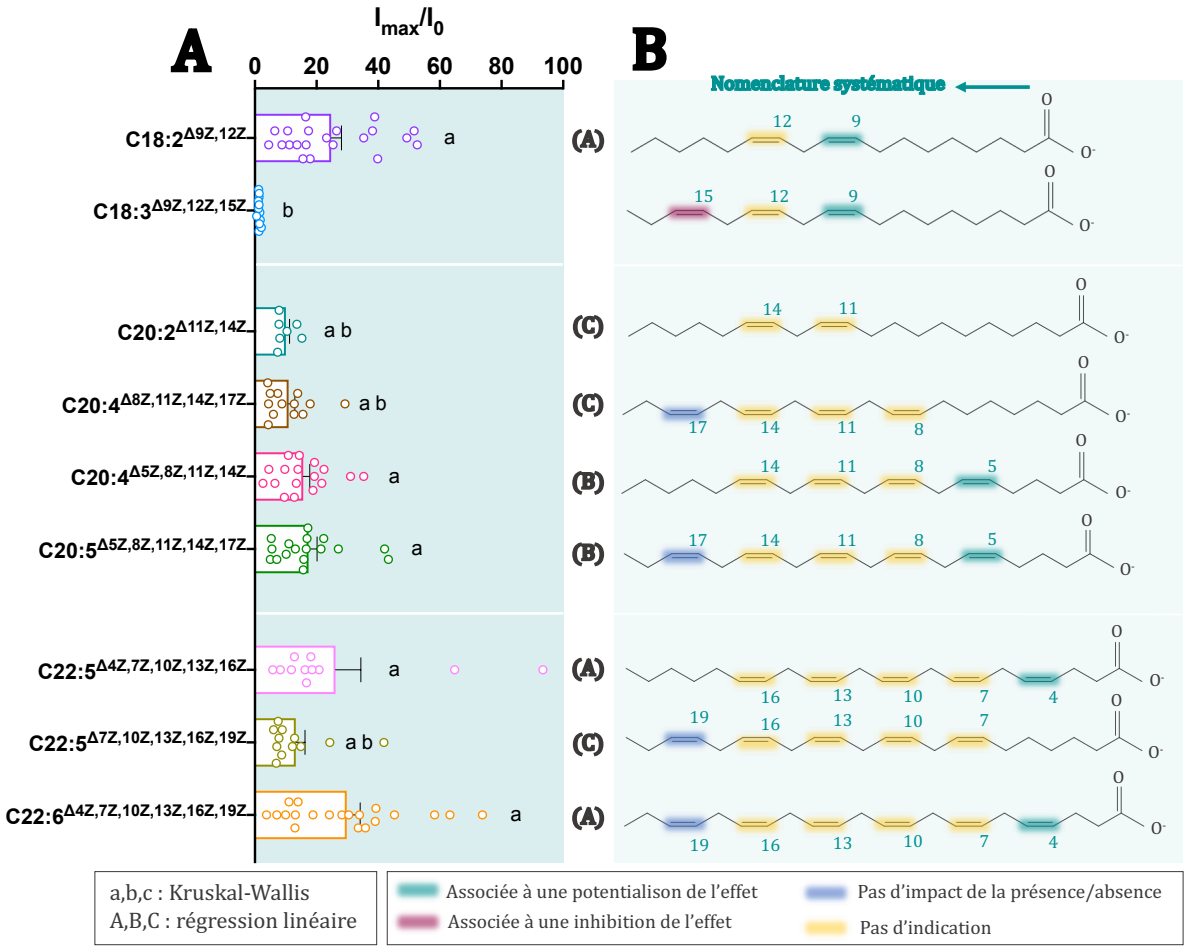

Figure 76

Rôle de la position des insaturations dans l'effet des acides gras poly-insaturés sur l'activation du canal TREK-1

A. *Amplitude d'activation (I_{max}/I_0) du canal TREK-1 à 0 mV par les différents acides gras poly-insaturés testés à 10 µM. Les groupes sont comparés avec un test apparié de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn: les groupes qui ne portent pas la même lettre minuscule (a, b) sont statistiquement différents. Les lettres capitales A,B et C identifient 3 grands groupes d'acides gras ayant le même effet sur le canal TREK-1 d'après l'analyse de régression linaire : (A) C22:6$^{\Delta 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z}$ (code couleur : orange), C22:5$^{\Delta 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z}$ (rose clair), C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$ (violet) > (B) C20:5$^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z}$ (vert), C20:4$^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z}$ (magenta) > (C) C22:5$^{\Delta 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z}$ (kaki), C20:4$^{\Delta 8Z,11Z,14Z,17Z}$ (marron), C20:2$^{\Delta 11Z,14Z}$ (vert bouteille) . Les données sont représentées comme la moyenne + SEM.* ***B.*** *Structures chimiques linéaires des acides gras correspondants. Le code couleur des insaturations illustre le rôle de l'insaturation dans l'activation du canal TREK-1.*

b.2. La configuration des insaturations

Pour approfondir cette étude de l'impact de la géométrie des acides gras sur l'activation du canal TREK-1, nous avons utilisé des acides gras conjugués de l'acide linoléique (C18:$2^{\Delta 9Z,12Z}$). Les acides gras conjugués sont des acides gras dont au moins une insaturation passe d'une configuration Cis à une configuration Trans (**Figure 3**). Les structures chimiques linéaires du C18:$2^{\Delta 9Z,12Z}$ et de ses trois acides gras conjugués (CLA$^{\Delta 9E,11E}$, CLA$^{\Delta 9Z,11E}$ et CLA$^{\Delta 10E,12Z}$) sont illustrées dans la **Figure 77**. Les différences géométriques linéaire et spatiale sont représentées dans la **Figure 78**. Le logiciel MolView utilise 5 « *open data bases* : *PubChem, RCSB Protein Data Bank, NIST Chemistry WebBook, Crystallography Open Database, NCI/CADD Chemical Identifier Resolver* ». Ainsi, le repliement des acides gras poly-insaturés varie en fonction de la configuration des insaturations et n'est donc pas la même pour tous les acides gras (**Figure 78**).

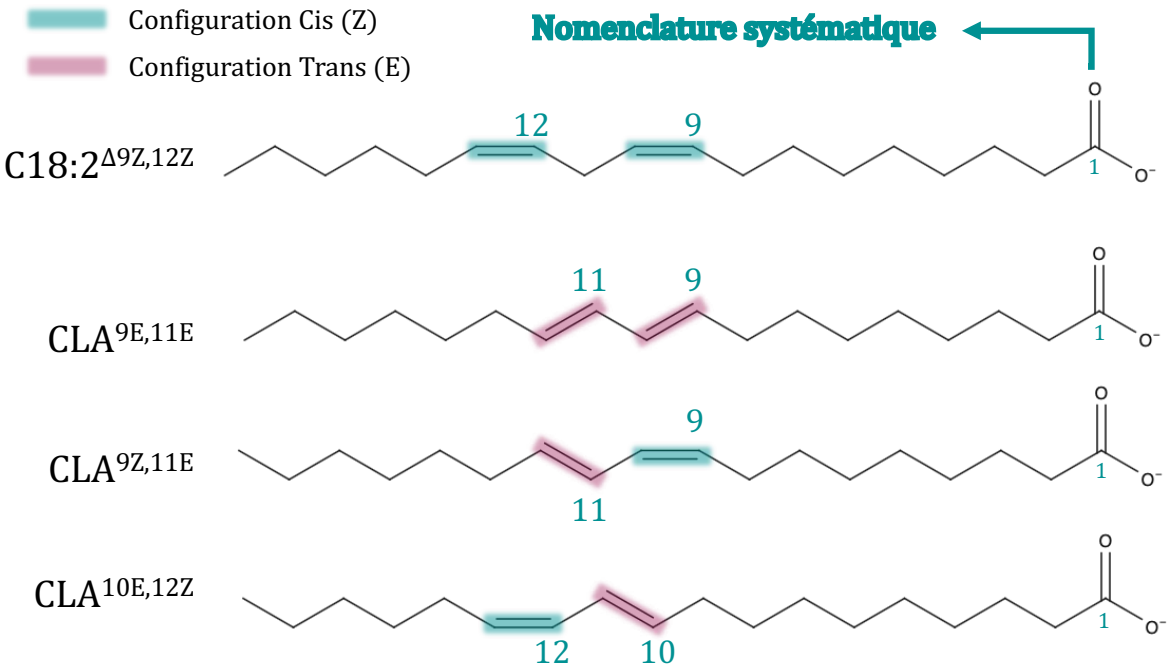

Figure 77

Structures chimiques linéaires des acides gras conjugués de l'acide linoléique C18:$2^{\Delta 9Z,12Z}$

L'acide linoléique (LA, C18:$2^{\Delta 9Z,12Z}$) a ses deux insaturations en position 9 et 12 en configurations Cis. Les acides gras conjugués du LA sont des isomères du LA qui ont au moins une insaturation en configuration Trans, ils sont nommés CLA (« conjugated linoleic acid ») et la position ainsi que la configuration Cis et Trans sont indiquées en indice (Z pour Cis et E pour Trans).

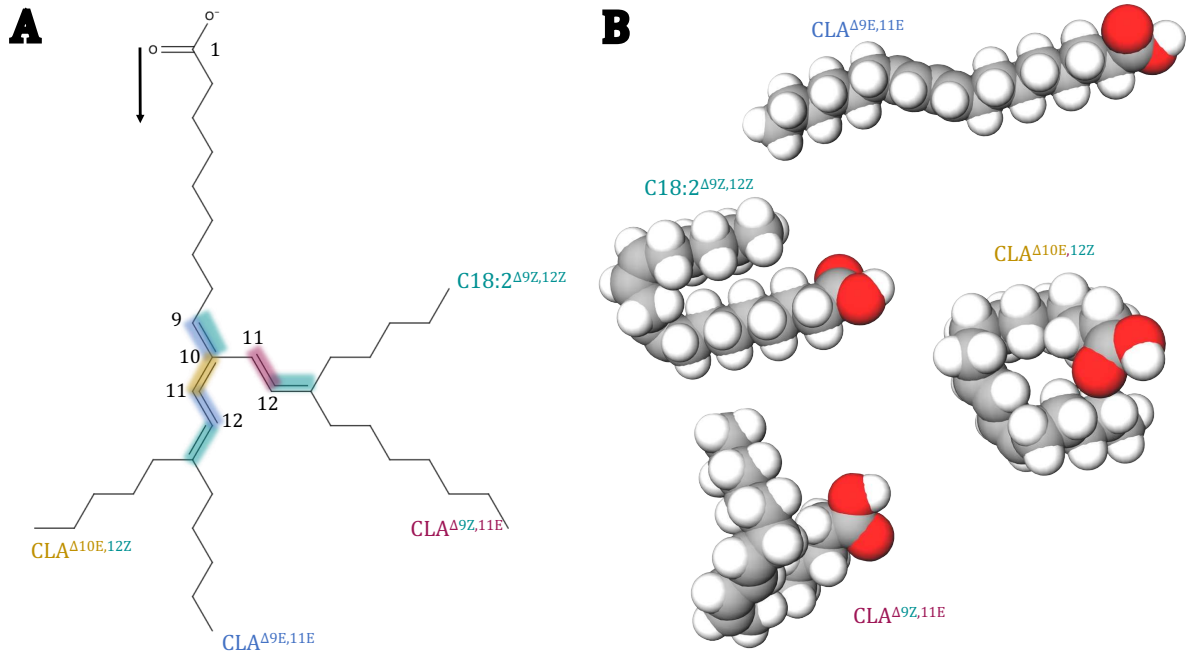

Figure 78

Différences géométrique et spatiale des acides gras conjugués de l'acide linoléique

__A.__ Différences géométriques 2D des acides gras conjugués du LA. __B.__ Repliements spatiaux des CLA illustrés par la représentation des sphères de Van der Waals (logiciel MolView). Pour voir les structures 3D en détails, cliquez sur les liens : C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$, CLA$^{\Delta 9E,11E}$, CLA$^{\Delta 9Z,11E}$ et CLA$^{\Delta 10E,12Z}$.

La **Figure 79** montre que le CLA$^{\Delta 9E,11E}$ n'est plus capable d'activer le canal TREK-1 (I_0 = 7,91 ± 1,30 pA/pF *vs* I_{max} = 8,68 ± 1,68 pA/pF ; p-value = 0,31). Pour cet acide gras conjugué, les deux insaturations sont passées en configuration Trans (E). Il semblerait que l'insaturation en position 9 que nous avions déterminée comme importante dans l'activation du canal TREK-1 par les acides gras à 18 atomes de carbones (**Figure 76**) doit obligatoirement être en configuration Cis (Z) sur la chaîne aliphatique des acides gras pour induire l'activation du canal. Cette hypothèse est confirmée par l'activation effective de TREK-1 par le CLA$^{\Delta 9Z,11E}$, où seule l'insaturation en position 9 est restaurée en configuration Cis (Z) : I_0 = 9,92 ± 1,91 pA/pF *vs* I_{max} = 167,30 ± 21,92 pA/pF (p-value = 0,0005) (**Figure 79**). L'amplitude d'activation de TREK-1 par le CLA$^{\Delta 9Z,11E}$ (I_{max}/I_0 = 19,77 ± 2,71) est comparable à celle du C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$ (I_{max}/I_0 = 19,25 ± 2,79) (**Figure 79**). Pour confirmer une moindre implication de l'insaturation en position 12 du C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$ par rapport à celle en position 9, nous avons

comparé son effet au $CLA^{\Delta 10E,12Z}$; pour ce CLA, l'insaturation 12 en configuration Cis est conservé et seule l'insaturation 9 est passée en configuration Trans. Ce $CLA^{\Delta 10E,12Z}$ conserve une faible capacité à activer le canal TREK-1 (I_0 = 11,67 ± 2,17 pA/pF *vs* I_{max} = 27,71 ± 7,64 pA/pF ; p-value = 0,0039), mais l'amplitude d'activation due au $CLA^{\Delta 10E,12Z}$ (I_{max}/I_0 = 2,05 ± 0,24) est bien moins importante que pour le $C18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ (I_{max}/I_0 = 19,25 ± 2,79) et le $CLA^{\Delta 9Z,11E}$ (I_{max}/I_0 = 19,77 ± 2,71) (**Figure 79**).

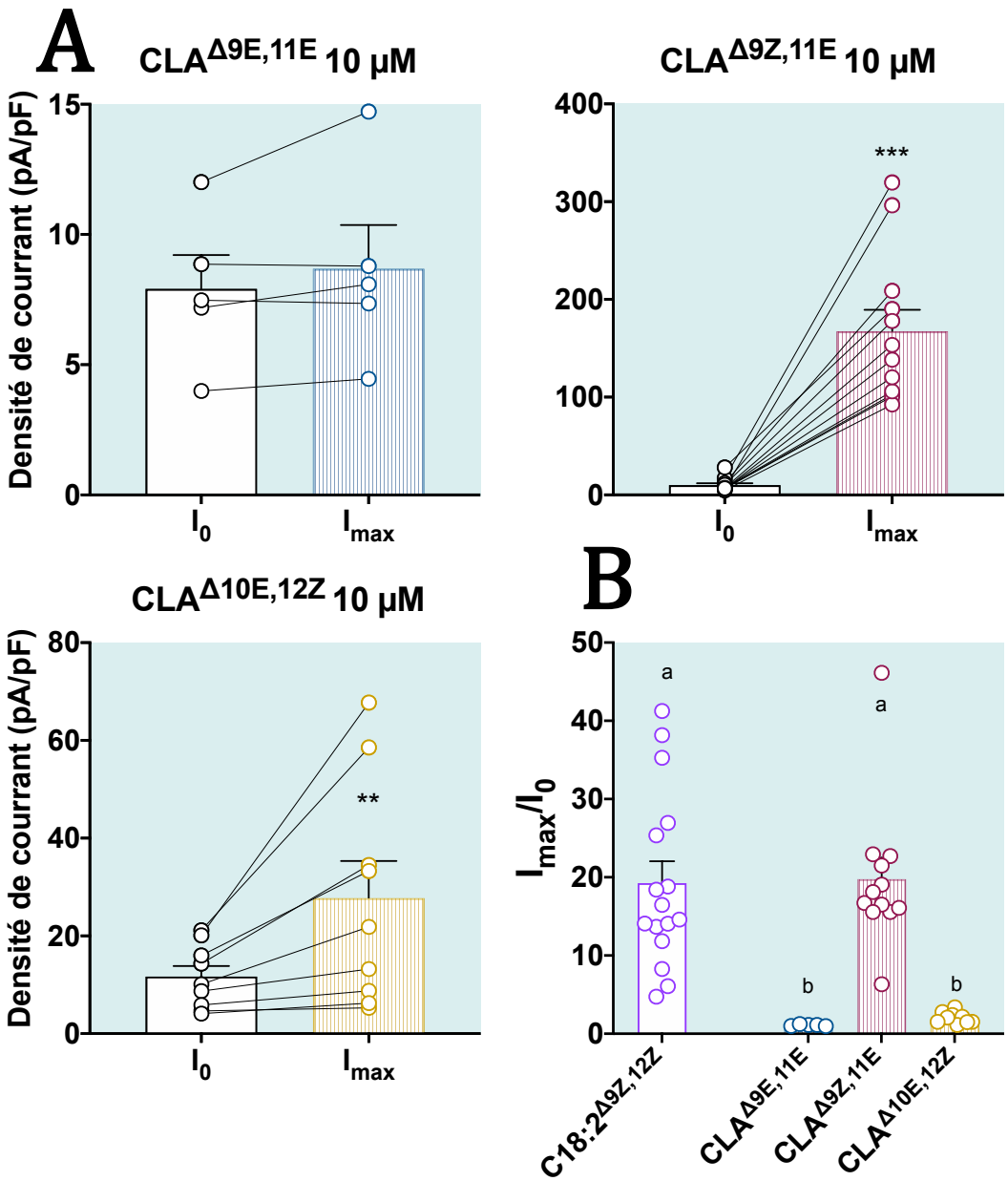

Figure 79

Effets des acides gras conjugués de l'acide linoléique sur le canal TREK-1

A. *Densités de courant initiales (I_0) et maximales (I_{max}) activées par 10 µM des acides gras conjugués de l'acide linoléique (CLA) : $CLA^{\Delta 9E,11E}$ (I_0 = 7,91 ± 1,30 pA/pF vs I_{max} = 8,68 ± 1,68 pA/pF ; p-value = 0,3125, n = 5), $CLA^{\Delta 9Z,11E}$ (I_0 = 9,92 ± 1,91 pA/pF vs I_{max} = 167,30 ± 21,92 pA/pF ; p-value = 0,0005, n = 12) et $CLA^{\Delta 10E,12Z}$ (I_0 = 11,67 ± 2,17 pA/pF vs I_{max} = 27,71 ± 7,64 pA/pF ; p-value = 0,0039, n = 9) à 0 mV. Les groupes sont comparés avec un test apparié de Wilcoxon.* ***B.*** *Comparaison de l'amplitude d'activation I_{max}/I_0 de l'acide linoléique ($C18:2^{\Delta 9Z,12Z}$: I_{max}/I_0 = 19,25 ± 2,79) et de ses trois acides conjugués, $CLA^{\Delta 9E,11E}$ (I_{max}/I_0 = 1,09 ± 0,05), $CLA^{\Delta 9Z,11E}$ (I_{max}/I_0 = 19,77 ± 2,71) et $CLA^{\Delta 10E,12Z}$ (I_{max}/I_0 = 2,05 ± 0,24). Les groupes sont comparés avec un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn : les groupes qui ne portent pas la même lettre sont statistiquement différents.*

3. DISCUSSION ET CONCLUSION PARTIELLE

Nos travaux suggèrent que l'extrémité carboxylique des acides gras est indispensable dans l'activation du TREK-1, puisque l'estérification de cette extrémité prévient l'activation. Les travaux de Fink et al., en 1998 avaient également montré que l'estérification de l'acide docosahexaénoïque (DHA-OMe) et de l'acide arachidonique (AA-OMe) ne permettait pas l'activation du canal TRAAK (Fink et al., 1998).

Dans nos conditions, à pH 7,4, c'est la forme basique de l'extrémité carboxylique (carboxylate, COO^-) qui est prédominante (**Figure 80**). Ainsi, la formation d'une liaison hydrogène ou ionique (interaction électrostatique) entre l'acide gras, via l'oxygène électronégatif, et la protéine TREK-1 pourrait être impliquée dans le processus d'interaction de TREK-1 avec les acides gras poly-insaturés (**Figure 81**). Les phospholipides de la membrane interagissent via des interactions électrostatiques entre leurs têtes polaires et les résidus chargés positivement du domaine C-terminal du canal TREK-1.

Un tel processus d'interaction a déjà été proposé pour l'interaction des acides gras avec d'autres canaux ioniques. L'activation du canal « *K_v1-type Shaker H4*» est potentialisée par l'augmentation du pH tandis que le DHA-OMe perd sa capacité à décaler la voltage-dépendance du canal vers des potentiels plus négatifs (Börjesson et al., 2008). Ces résultats suggèrent que le groupement carboxylate (COO^-) est nécessaire pour permettre l'interaction du DHA avec le canal.

D'autres travaux se sont penchés sur l'interaction des acides gras avec le canal potassique voltage-dépendant $K_v7.1$ (Larsson et al., 2018 ; Liin et al., 2016 ; Liin et al., 2015). Le DHA ($C22:6^{\Delta\ 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z}$) s'insère dans la membrane au contact du segment transmembranaire S4 de $K_v7.1$ (Liin et al ., 2015) et *via* un mécanisme électrostatique, promeut l'ouverture du canal, se traduisant par un décalage de la voltage-dépendance vers des potentiels plus négatifs (Larsson et al ., 2018 ; Liin et al., 2015). De manière intéressante, la co-expression de $K_v7.1$ (*KCNQ1*) et de *KCNE1* abolit l'effet activateur du DHA à pH physiologique. En fait, la présence de KCNE1 permet le réarrangement de certains résidus acides (principalement E290) de $K_v7.1$. Le réarrangement de ces résidus diminue localement le pH, proche du site de liaison du DHA, favorisant sa protonation (Larsson et al., 2018). Finalement, le DHA protoné, non chargé, devient inefficace, probablement privé de sa possibilité d'interagir avec le canal $K_v7.1$.

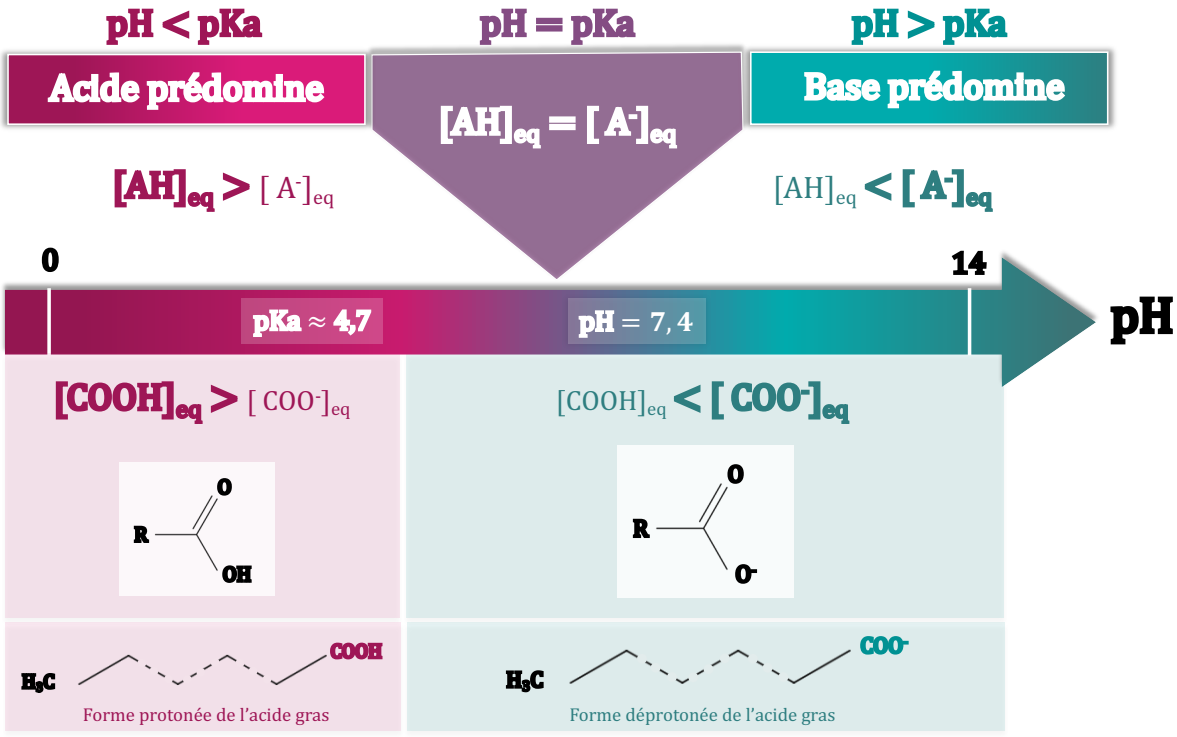

Figure 80

Diagramme de prédominance acide-base des acides gras

Le diagramme de prédominance représente la répartition de la forme acide AH ou basique A^- d'une molécule. La nature de la forme prédominance dépend du pH du milieu et de la pKa de

la molécule. La relation qui lie le pH et la pKa est : pH = pKa + $log(\frac{[A^-]_{eq}}{[AH]_{eq}})$. Ainsi, lorsque pH < pKa on a : $log(\frac{[A^-]_{eq}}{[AH]_{eq}}) < 0$, soit $\frac{[A^-]_{eq}}{[AH]_{eq}} < 1$ et donc $[A^-]_{eq} < [AH]_{eq}$. Pour pH = pKa on a : $log(\frac{[A^-]_{eq}}{[AH]_{eq}}) = 0$, soit $\frac{[A^-]_{eq}}{[AH]_{eq}} = 1$ et donc $[A^-]_{eq} = [AH]_{eq}$. Et pour pH > pKa on a : $log(\frac{[A^-]_{eq}}{[AH]_{eq}}) > 0$, soit $\frac{[A^-]_{eq}}{[AH]_{eq}} > 1$ et donc $[A^-]_{eq} > [AH]_{eq}$. Dans le cas des acide gras, l'extrémité carboxyle a une valeur de pKa ≈ 4,7. Ainsi, l'extrémité carboxyle est retrouvée sous forme basique, déprotonée (R-COO$^-$) à pH physiologique 7,4.

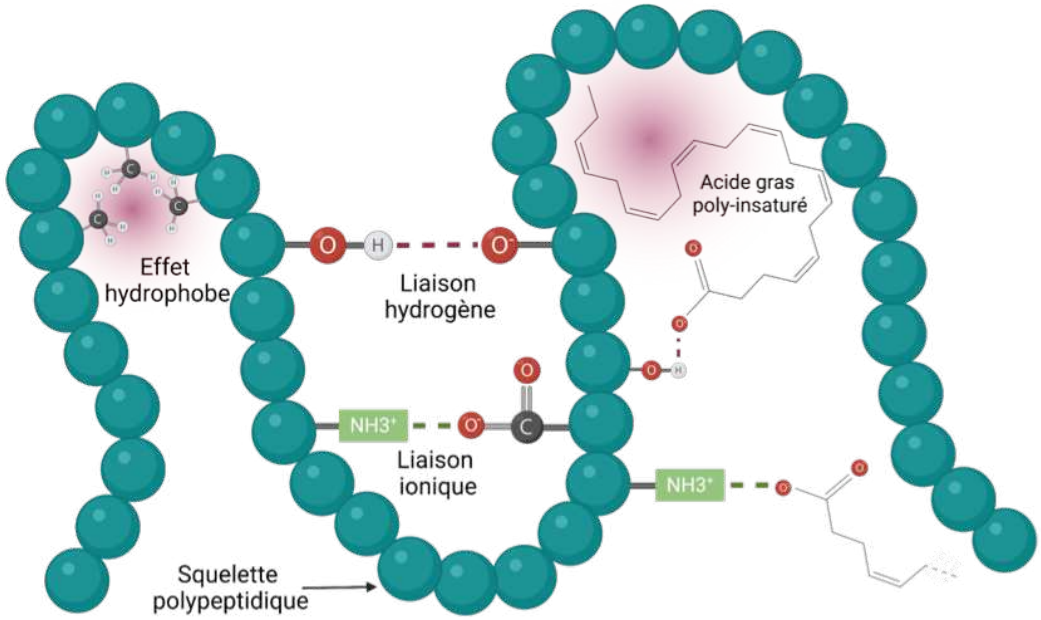

Figure 81

Hypothèse d'interaction de l'extrémité carboxyle des acides gras avec le canal TREK-1

La configuration tridimensionnelle d'une protéine est déterminée par différents types d'interactions protéine-protéine. Parmi ces interactions, on retrouve les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques ou électrostatique ainsi que les interactions hydrophobes. La liaison hydrogène est une interaction non covalente qui implique le transfert d'un électron d'un atome électronégatif comme l'oxygène (O) vers un atome d'hydrogène (H) accepteur d'électrons. La liaison ionique ou électrostatique, se forme à partir de la chaîne latérale (R-NH3$^+$) de certains

acides aminés ionisables comme l'aspartate, la lysine, l'arginine et le glutamate. Des interactions hydrophobes se forment (liaisons de Van der Waals) entre des acides aminés non polaires, isolant de ce fait la partie de la protéine du milieu aqueux. Dans un premier temps, les acides gras pourraient s'insérer au voisinage de la protéine TREK-1, dans une poche hydrophobe de la protéine. Ensuite, la tête carboxyle des acides gras, carboxylate à pH physiologique (COO^-), pourrait former des liaisons hydrogènes ou des interactions électrostatiques avec les acides aminés du canal TREK-1.

Par ailleurs, il semblerait que les insaturations 9Z et 12Z concourent toutes les deux à l'effet du C18:$2^{\Delta 9Z,12Z}$ sur le canal TREK-1 mais que la majorité de cet effet est médié par l'insaturation en position 9. De plus, l'intégrité de la configuration Cis de cette insaturation en position 9 doit être garantie pour que l'acide gras puisse interagir avec le canal TREK-1 et l'activer (**Figure 81**).
Comme les configurations des insaturations affectent la géométrie et la configuration spatiale des acides gras, nous pouvons penser qu'il existe un repliement 3D optimal déterminant d'un volume optimal d'occupation (**Figure 82**) par les acides gras leur permettant d'interagir avec le canal TREK-1 et de permettre son activation.

Ainsi, nous émetons aujourd'hui l'hypothèse que l'interaction des acides gras avec le canal TREK-1 est permise lorsque plusieurs conditions sont réunies : **(1)** L'extrémité carboxylique de l'acide gras doit être libre afin de pouvoir interagir de manière non covalente avec la protéine. Cette « liberté » de la tête carboxylique sous-entend qu'il ne faut pas d'estérification et que l'encombrement stérique autour de cette extrémité ne doit pas entraver l'interaction. **(2)** Afin d'arriver au(x) site(s) de liaison(s) des acides gras, grâce à sa chaîne carbonée, l'acide gras s'insère dans la membrane pour atteindre une poche hydrophobe de la protéine (**Figure 81**). Ceci expliquerait dans un premier temps pourquoi la tête carboxylique est nécessaire mais pas suffisante pour activer le canal TREK-1 et expliquerait d'autre part que tous les acides gras ne produisent pas la même intensité d'activation du canal TREK-1. Cette interaction hydrophobe avec la protéine nécessiterait aussi un repliement spatial optimal de la chaîne aliphatique. Si les acides gras n'ont pas cette configuration spatiale optimale (**Figure 82**), ils ne sont alors pas capables ou moins à même de recruter les canaux TREK-1, expliquant leurs différences d'effets.

Ainsi, les acides gras interagiraient en deux sites avec la protéine TREK-1: **(1)** un site hydrophobe, lieu d'interaction de la chaîne carbonée et **(2)** un site de liaison, lieux d'interaction de l'extrémité carboxylique.

Grâce à la technique de « *molecular dynamics simulation* », un tel mécanisme d'interaction a déjà était montré pour l'interaction des acides gras poly-insaturés avec le canal « *shaker* » voltage-dépendant (Yazdi et al., 2016 ; Ottosson et al., 2014 ; Börjesson et al., 2008) et l'interaction de l'acide linoléique (LA, C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$) avec le canal voltage-dépendant K_v7.1 (*KCNQ1*) (Yazdi et al., 2021). En ce qui concerne le canal K_v7.1, l'extrémité carboxylique de charge négative à pH physiologique (COO^-), interagit principalement avec des résidus chargés positivement. L'extrémité carboxylique forme des interactions électrostatiques, avec le résidu K316 présent dans le domaine pore de K_v7.1, proche de l'interface eau-membrane, ainsi qu'avec le résidu R218, situé dans le voltage-senseur. Elle forme aussi une liaison hydrogène avec le résidu Y268, du voltage-senseur. Plus en profondeur de la membrane, la chaîne carbonée est impliquée dans des interactions hydrophobes avec un réseau de résidus hydrophobes des segments transmembranaires S5 et S6 et de l'hélice du pore (Yazdi et al., 2021). De manière intéressante, en raison de la rigidité de sa chaîne carbonée, l'acide stéarique (C18:0) ne parvient pas à interagir avec les résidus hydrophobes qui forment une cavité restreinte et ne peut pas former de liaison hydrogène avec le résidu Y268 du voltage-senseur. La différence d'effet entre le C18:2$^{\Delta 9Z,12Z}$ et le C18:0 s'explique donc par une faible mobilité du C18:0, le privant de l'accès aux sites d'interactions. Dans le cas de K_v7.1, c'est la liaison de la tête carboxylique aux résidus positifs du voltage-senseur (Yazdi et al., 2021) qui expliquerait le shift de sa voltage-dépendance vers des potentiels plus négatifs en présence d'acide gras poly-insaturés (Larsson et al., 2018 ; Liin et al., 2015).

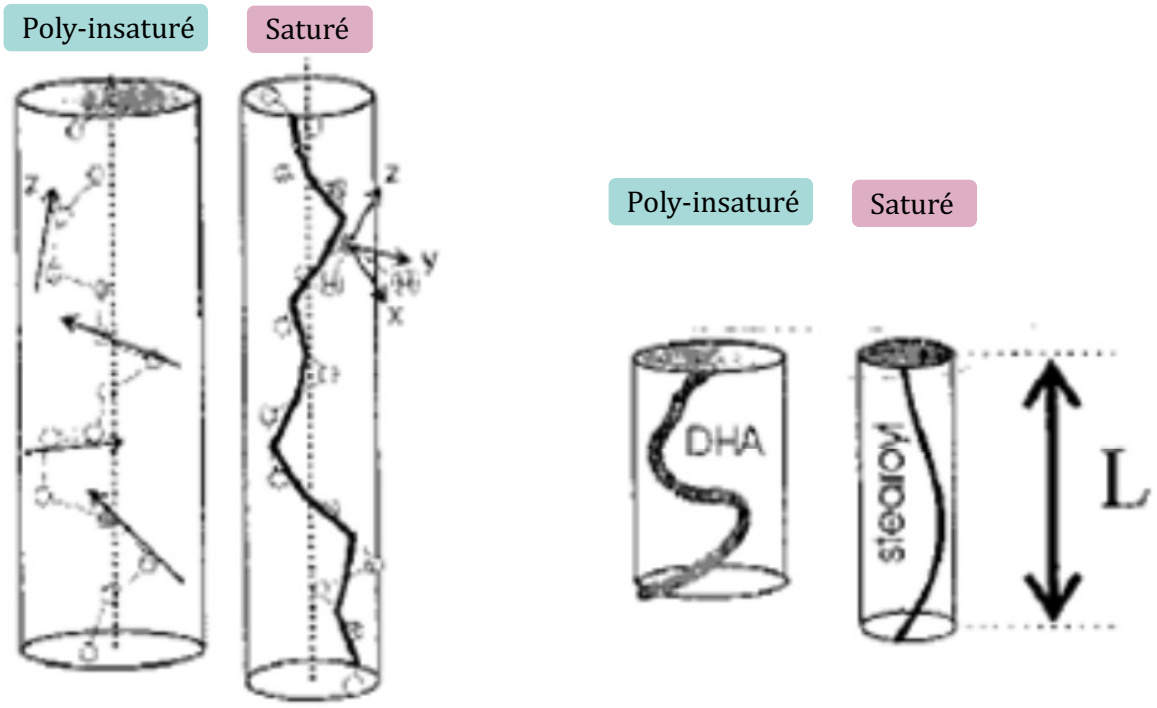

Figure 82

Différence du volume occupé par les chaînes aliphatiques poly-insaturés et saturés

Les chaînes aliphatiques poly-insaturés et saturés sont plus ou moins désorganisées sur les axes tridimensionnels X, Y et Z. Cette désorganisation dépend du nombre de carbones et d'insaturations sur la chaîne aliphatique. Le volume occupé par les acides gras, représenté par des cylindres variant selon leur section A_{ch}, et leur longueur (L), résulte du nombre de carbones et du nombre d'insaturations. Figure adaptée de Binder et Gawrisch., 2001.

E. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En recoupant nos résultats avec la littérature, nous concluons que l'activation de TREK-1 par les acides gras poly-insaturés ne fait pas intervenir une voie mécano-sensible, mais résulte plus probablement d'une interaction directe des acides gras avec le canal.
Comme cela a déjà été montré pour les canaux potassiques voltage-dépendant $K_v7.1$, « *shaker H4* » et le canal BK, l'interaction des acides gras insaturés avec TREK-1 met probablement en jeu des interactions spécifiques électrostatiques et/ou des liaisons hydrogènes entre l'extrémité carboxylate des acides gras insaturés et les résidus polaires (chargés) du canal. Dans ce processus d'interaction, la chaîne aliphatique joue également un rôle, en permettant à l'acide gras d'interagir de manière plus ou moins spécifique avec des résidus hydrophobes de la protéine.
L'interaction des acides gras avec TREK-1 met en jeu leur configuration spatiale et le volume occupé par les acides gras insaturés, modulés par le nombre d'atomes de carbones, le nombre d'insaturations et la configuration Cis/Trans des insaturations. La haute flexibilité des acides gras poly-insaturés augmente leur probabilité d'interactions avec les sites de liaisons tandis que la rigidité des acides gras saturés et des acides gras en configuration Trans les rend inefficaces. Ces données devront cependant être validées par « *Molecular Dynamics simulation* ».

L'étude de la variabilité de l'activité initiale de TREK-1 en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp a révélé qu'il existe en condition physiologique, en absence de modulation, deux fractions de canaux TREK-1 : une fraction voltage-dépendante et une fraction « *leak* ». L'interconversion de ces deux fractions est permise par certains modulateurs. Si les phosphorylations des résidus sérine du domaine C-terminal font basculer TREK-1 dans un mode voltage-dépendant, les acides gras poly-insaturé permettent de le faire basculer dans un mode « *leak* ». Au niveau du courant macroscopique, le basculement du mode voltage-dépendant au mode « *leak* » est associé à une perte de la rectification sortante, prédite par l'équation de GHK. Cette perte de la rectification sortante entre -100 mV et +30 mV s'accompagne de la perte de la temps-dépendance observée lors de la dépolarisation en *step* et donc de la composante voltage-dépendante du courant porté par TREK-1. Par ailleurs, l'interaction des acides gras poly-insaturés avec les canaux TREK-1 permet d'augmenter la fraction de canaux fonctionnant en mode « *leak* ». Toutefois, il reste encore à définir le ou les sites d'interactions des acides gras poly-insaturés avec le canal TREK-1 grâce aux techniques de *molecular dynamics simulation* couplé à de la mutagenèse dirigée. Les sites privilégiés des

interactions à favoriser sont les sites chargés positivement à pH physiologique accessible depuis les deux faces de la membrane.

En physiologie, il reste à confirmer sur cellules primaires la présence des deux fractions de canaux TREK-1 actifs et « silencieux » et l'origine de cette dichotomie. *Si un tel phénomène se confirme, quel est le rôle de cette fraction « silencieuse », rapidement mobilisable par l'environnement ? Existe-t-il des types cellulaires distincts possédant une plus ou moins grande fraction de canaux actifs ou cette variabilité de canaux actifs existe aussi au sein d'un même type cellulaire ?* Une des hypothèses pouvant expliquer la différence intercellulaire de la fraction active est que les cellules ne sont pas au même moment de leur cycle cellulaire. En effet, les canaux potassiques sont des effecteurs des *checkpoints* du cycle cellulaire et leurs densité et activité varient en fonction de la phase du cycle (Urrego et al., 2014). *Quelle serait alors la différence de la fraction de canaux actifs entre des cellules à des moments différents de leur cycle cellulaire et la différence entre des cellules qui ont un cycle cellulaire et celles qui sont stoppées dans leur cycle, comme les neurones ou les cardiomyocytes ?*

Sur des cellules primaires excitables, comme les neurones ou les cardiomyocytes, il serait également intéressant d'étudier l'impact physiopathologique de l'interconversion des modes de fonctionnement de TREK-1, partiellement voltage-dépendant et « *leak* ». La compréhension du mécanisme qui sous-tend cette interconversion pourrait permettre le développement d'activateurs de TREK-1 qui soit conserveraient la composante voltage-dépendante, soit favoriserait le mode « *leak* ». Favoriser un mode par rapport à l'autre grâce à des activateurs, pourrait être bénéfique dans la prise en charge des physiopathologies des cellules excitables dans lesquelles TREK-1 a un rôle, comme l'épilepsie ou les arythmies cardiaques. Dans un potentiel d'action, les canaux potassiques voltage-dépendants sont impliqués dans la phase de repolarisation tandis que les canaux de fuite sont impliqués dans l'hyperpolarisation du potentiel de repos. Un activateur de TREK-1 qui conserverait sa composante voltage-dépendante pourrait être utilisé pour les pathologies qui nécessitent un raccourcissement du potentiel d'action. D'un autre côté, pour les pathologies qui nécessitent une diminution l'excitabilité cellulaire, les activateurs de TREK-1 qui permettent sa conversion en mode « *leak* », comme les acides gras poly-insaturés, pourraient être davantage bénéfiques.

BIBLIOGRAPHIE

Alvarez O & Latorre R (2017) The enduring legacy of the 'constant-field equation' in membrane ion transport. J Gen Physiol 149: 911–920

Andharia N, Joseph A, Hayashi M, Okada M & Matsuda H (2017) Involvement of intracellular transport in TREK-1c current run-up in 293T cells. Channels (Austin) 11: 224–235

Armstrong CM (2003) The Na/K pump, Cl ion, and osmotic stabilization of cells. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 6257–6262

Bang H, Kim Y & Kim D (2000) TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K+ channel family. J Biol Chem 275: 17412–17419

Bang HO, Dyerberg J & Hjørne N (2009) The Composition of Food Consumed by Greenland Eskimos. Acta Medica Scandinavica 200: 69–73

Bechard E, Bride J, Le Guennec J-Y, Brette F & Demion M (2022) TREK-1 in the heart: Potential physiological and pathophysiological roles. Front Physiol 13: 1095102

Benoist D, Stones R, Benson AP, Fowler ED, Drinkhill MJ, Hardy MEL, Saint DA, Cazorla O, Bernus O & White E (2014) Systems approach to the study of stretch and arrhythmias in right ventricular failure induced in rats by monocrotaline. Progress in Biophysics and Molecular Biology 115: 162–172

Ben Soussia I, El Mouridi S, Kang D, Leclercq-Blondel A, Khoubza L, Tardy P, Zariohi N, Gendrel M, Lesage F, Kim E-J, et al (2019) Mutation of a single residue promotes gating of vertebrate and invertebrate two-pore domain potassium channels. Nat Commun 1

Berdeaux O, Scruel O, Durand T & Cracowski J-L (2005) [Isoprostanes, biomarkers of lipid peroxidation in humans. Part 2: Quantification methods]. Pathol Biol (Paris) 53: 356–363

Bernardino de la Serna J, Schütz GJ, Eggeling C & Cebecauer M (2016) There Is No Simple Model of the Plasma Membrane Organization. Front Cell Dev Biol 4: 106

Berrier C, Pozza A, de Lacroix de Lavalette A, Chardonnet S, Mesneau A, Jaxel C, le Maire M & Ghazi A (2013) The purified mechanosensitive channel TREK-1 is directly sensitive to membrane tension. J Biol Chem 288: 27307–27314

Bevers EM & Williamson PL (2010) Phospholipid scramblase: an update. FEBS Lett 584: 2724–2730

Bhatt DL, Miller M, Brinton EA, Jacobson TA, Steg PG, Ketchum SB, Doyle RT, Juliano RA, Jiao L, Granowitz C, et al (2020) REDUCE-IT USA: Results From the 3146 Patients Randomized in the United States. Circulation 141: 367–375

Billman GE, Hallaq H & Leaf A (1994) Prevention of ischemia-induced ventricular fibrillation by omega 3 fatty acids. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 4427–4430

Binder B et Gawrisch K: Effect of unsaturated lipid chains on dimensions, molecular order and hydration of membranes. J. Phys. Chem. B. 2001. 105, 12378- 12390

Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M & Heurteaux C (2002) Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. Neuroscience 109: 231–241

Bockenhauer D, Zilberberg N & Goldstein SA (2001) KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. Nat Neurosci 4: 486–491

Boekell KL, Brown BJ, Talbot BE & Schlondorff JS (2022) Trpc6 gain-of-function disease mutation enhances phosphatidylserine exposure in murine platelets. PLoS ONE 17

Bohannon BM, Perez ME, Liin SI & Larsson HP (2019) ω-6 and ω-9 polyunsaturated fatty acids with double bonds near the carboxyl head have the highest affinity and largest effects on the cardiac IKs potassium channel. Acta Physiol (Oxf) 225: e13186

Boland LM & Drzewiecki MM (2008) Polyunsaturated fatty acid modulation of voltage-gated ion channels. Cell Biochem Biophys 52: 59–84

Börjesson SI & Elinder F (2011) An electrostatic potassium channel opener targeting the final voltage sensor transition. J Gen Physiol 137: 563–577

Börjesson SI, Hammarström S & Elinder F (2008) Lipoelectric modification of ion channel voltage gating by polyunsaturated fatty acids. Biophys J 95: 2242–2253

Börjesson SI, Parkkari T, Hammarström S & Elinder F (2010) Electrostatic tuning of cellular excitability. Biophys J 98: 396–403

Bouzat CB & Barrantes FJ (1993) Effects of long-chain fatty acids on the channel activity of the nicotinic acetylcholine receptor. Recept Channels 1: 251–258

Bretscher ,M.S.(1972)J.Mol.Biol.71,523-528.

Bruno MJ, Koeppe RE & Andersen OS (2007) Docosahexaenoic acid alters bilayer elastic properties. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 9638–9643

Bryan RM, You J, Phillips SC, Andresen JJ, Lloyd EE, Rogers PA, Dryer SE & Marrelli SP (2006) Evidence for two-pore domain potassium channels in rat cerebral arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol 291: H770-780

Burdge GC (2006) Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 75: 161–168

Burdge GC, Finnegan YE, Minihane AM, Williams CM & Wootton SA (2003) Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [13C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men. *Br J Nutr* 90: 311–321

Cain SM, Meadows HJ, Dunlop J & Bushell TJ (2008) mGlu4 potentiation of K(2P)2.1 is dependant on C-terminal dephosphorylation. Mol Cell Neurosci 37: 32–39

Calder PC (2018) Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future. Proc Nutr Soc 77: 52–72

Chatelain FC, Bichet D, Feliciangeli S, Larroque M-M, Braud VM, Douguet D & Lesage F (2013) Silencing of the tandem pore domain halothane-inhibited K+ channel 2 (THIK2) relies on combined

intracellular retention and low intrinsic activity at the plasma membrane. J Biol Chem 288: 35081–35092

Chemin J, Girard C, Duprat F, Lesage F, Romey G & Lazdunski M (2003) Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K+ channels. EMBO J 22: 5403–5411

Chemin J, Patel AJ, Duprat F, Lauritzen I, Lazdunski M & Honoré E (2005) A phospholipid sensor controls mechanogating of the K+ channel TREK-1. EMBO J 24: 44–53

Chen C, Wang L, Rong X, Wang W & Wang X (2015) Effects of fluoxetine on protein expression of potassium ion channels in the brain of chronic mild stress rats. Acta Pharm Sin B 5: 55–61

Choi BH, Choi JS, Yoon SH, Rhie DJ, Min DS, Jo YH, Kim MS & Hahn SJ (2001) Effects of norfluoxetine, the major metabolite of fluoxetine, on the cloned neuronal potassium channel Kv3.1. Neuropharmacology 41: 443–453

Clifton PM & Keogh JB (2017) A systematic review of the effect of dietary saturated and polyunsaturated fat on heart disease. Nutr Metab Cardiovasc Dis 27: 1060–1080

Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, et al (1999) Molecular diversity of K+ channels. Ann N Y Acad Sci 868: 233–285

Cohen A, Ben-Abu Y, Hen S & Zilberberg N (2008) A novel mechanism for human K2P2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues. J Biol Chem 283: 19448–19455

Cuello LG, Jogini V, Cortes DM & Perozo E (2010) Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels. Nature 466: 203–208

Czirják G, Tóth ZE & Enyedi P (2004) The two-pore domain K+ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. J Biol Chem 279: 18550–18558

Decher N, Maier M, Dittrich W, Gassenhuber J, Brüggemann A, Busch AE & Steinmeyer K (2001) Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. FEBS Lett 492: 84–89

Del Mármol J, Rietmeijer RA & Brohawn SG (2018) Studying Mechanosensitivity of Two-Pore Domain K+ Channels in Cellular and Reconstituted Proteoliposome Membranes. Methods Mol Biol 1684: 129–150

Di A, Xiong S, Ye Z, Malireddi RKS, Kometani S, Zhong M, Mittal M, Hong Z, Kanneganti T-D, Rehman J, et al (2018) The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. Immunity 49: 56-65.e4

Djillani A, Pietri M, Mazella J, Heurteaux C & Borsotto M (2019) Fighting against depression with TREK-1 blockers: Past and future. A focus on spadin. Pharmacol Ther 194: 185–198

Djillani A, Pietri M, Moreno S, Heurteaux C, Mazella J & Borsotto M (2017) Shortened Spadin Analogs Display Better TREK-1 Inhibition, In Vivo Stability and Antidepressant Activity. Front Pharmacol 8: 643

Dobrev D, Carlsson L & Nattel S (2012) Novel molecular targets for atrial fibrillation therapy. Nat Rev Drug Discov 11: 275–291

Dong YY, Pike ACW, Mackenzie A, McClenaghan C, Aryal P, Dong L, Quigley A, Grieben M, Goubin S, Mukhopadhyay S, et al (2015) K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. Science 347: 1256–1259

Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT & MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity. Science 280: 69–77

Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C & Lazdunski M (1997) TASK, a human background K+ channel to sense external pH variations near physiological pH. EMBO J 16: 5464–5471

Duprat F, Lesage F, Patel AJ, Fink M, Romey G & Lazdunski M (2000) The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. Mol Pharmacol 57: 906–912

Durand T, Bultel-Poncé V, Guy A, El Fangour S, Rossi J-C & Galano J-M (2011) Isoprostanes and phytoprostanes: Bioactive lipids. Biochimie 93: 52–60

Durand T, Bultel-Poncé V, Guy A, Berger S, Mueller MJ & Galano J-M (2009) New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathways: the phytoprostanes. Lipids 44: 875–888

Enyedi P & Czirják G (2010) Molecular background of leak K+ currents: two-pore domain potassium channels. Physiol Rev 90: 559–605

Feliciangeli S, Tardy MP, Sandoz G, Chatelain FC, Warth R, Barhanin J, Bendahhou S & Lesage F (2010) Potassium channel silencing by constitutive endocytosis and intracellular sequestration. J Biol Chem 285: 4798–4805

Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C & Lazdunski M (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K+ channel. EMBO J 15: 6854–6862

Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M & Lazdunski M (1998) A neuronal two P domain K+ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. EMBO J 17: 3297–3308

Franks NP & Honoré E (2004) The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. Trends in Pharmacological Sciences 25: 601–608

Girard C, Duprat F, Terrenoire C, Tinel N, Fosset M, Romey G, Lazdunski M & Lesage F (2001) Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels. Biochem Biophys Res Commun 282: 249–256

Girard C & Lesage F (2004) [Neuronal background two-P-domain potassium channels: molecular and functional aspects]. Med Sci (Paris) 20: 544–549

Goñi FM (2014) The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. Biochim Biophys Acta 1838: 1467–1476

González W, Valdebenito B, Caballero J, Riadi G, Riedelsberger J, Martínez G, Ramírez D, Zúñiga L, Sepúlveda FV, Dreyer I, et al (2015) K_2p channels in plants and animals. Pflugers Arch 467: 1091–1104

Gordon JA & Hen R (2006) TREKing toward new antidepressants. Nat Neurosci 9: 1081–1083

Gorter E & Grendel F (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. J Exp Med 41: 439–443

Gruss M, Bushell T, Bright D, Lieb W, Mathie A & Franks N (2004) Two-pore-domain K+ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. Molecular pharmacology 65

Guizy M, Arias C, David M, González T & Valenzuela C (2005) {Omega}-3 and {omega}-6 polyunsaturated fatty acids block HERG channels. Am J Physiol Cell Physiol 289: C1251-1260

Hac-Wydro K & Wydro P (2007) The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes. Chem Phys Lipids 150: 66–81

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch 391: 85–100

Heginbotham L, Lu Z, Abramson T & MacKinnon R (1994) Mutations in the K+ channel signature sequence. Biophys J 66: 1061–1067

Henis YI, Rimon G & Felder S (1982) Lateral mobility of phospholipids in turkey erythrocytes. Implications for adenylate cyclase activation. Journal of Biological Chemistry 257: 1407–1411

Hervieu GJ, Cluderay JE, Gray CW, Green PJ, Ranson JL, Randall AD & Meadows HJ (2001) Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. Neuroscience 103: 899–919

Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G, et al (2004) TREK-1, a K+ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. EMBO J 23: 2684–2695

Heurteaux C, Lucas G, Guy N, El Yacoubi M, Thümmler S, Peng X-D, Noble F, Blondeau N, Widmann C, Borsotto M, et al (2006) Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. Nat Neurosci 9: 1134–1141

Heyn MP (1979) Determination of lipid order parameters and rotational correlation times from fluorescence depolarization experiments. FEBS Lett 108: 359–364

Hille B (2001) Ion channels of excitable membranes, 3rd edition edn.

Hivelin C, Béraud-Dufour S, Devader C, Abderrahmani A, Moreno S, Moha Ou Maati H, Djillani A, Heurteaux C, Borsotto M, Mazella J, et al (2016) Potentiation of Calcium Influx and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cell by the Specific TREK-1 Blocker Spadin. J Diabetes Res 2016: 3142175

Honoré E (2007) The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. Nat Rev Neurosci 8: 251–261

Honoré E, Maingret F, Lazdunski M & Patel AJ (2002) An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K(+) channel TREK-1. EMBO J 21: 2968–2976

Honoré E, Patel AJ, Chemin J, Suchyna T & Sachs F (2006) Desensitization of mechano-gated K2P channels. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 6859–6864

Huang B, Qin D & El-Sherif N (2001) Spatial alterations of Kv channels expression and K+ currents in post-MI remodeled rat heart. Cardiovascular Research 52: 246–254

Huang CL, Feng S & Hilgemann DW (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. Nature 391: 803–806

Ibarguren M, López DJ & Escribá PV (2014) The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1838: 1518–1528

James MJ, Ursin VM & Cleland LG (2003) Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n−3 fatty acids12. The American Journal of Clinical Nutrition 77: 1140–1145

Kamatham S, Waters CM, Schwingshackl A & Mancarella S (2019) TREK-1 protects the heart against ischemia-reperfusion-induced injury and from adverse remodeling after myocardial infarction. Pflugers Arch 471: 1263–1272

Kang D & Kim D (2004) Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K+ channels of the TALK family. Biochem Biophys Res Commun 315: 836–844

Kang JX & Leaf A (1994) Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat cardiac myocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 9886–9890

Kang JX & Leaf A (1996) Protective effects of free polyunsaturated fatty acids on arrhythmias induced by lysophosphatidylcholine or palmitoylcarnitine in neonatal rat cardiac myocytes. Eur J Pharmacol 297: 97–106

Kang JX, Xiao YF & Leaf A (1995) Free, long-chain, polyunsaturated fatty acids reduce membrane electrical excitability in neonatal rat cardiac myocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 3997–4001

Kekenes-Huskey PM, Burgess DE, Sun B, Bartos DC, Rozmus ER, Anderson CL, January CT, Eckhardt LL & Delisle BP (2022) Mutation-Specific Differences in Kv7.1 (KCNQ1) and Kv11.1 (KCNH2) Channel Dysfunction and Long QT Syndrome Phenotypes. Int J Mol Sci 23: 7389

Kelly D, Mackenzie L, Hunter P, Smaill B & Saint DA (2006) Gene expression of stretch-activated channels and mechanoelectric feedback in the heart. Clin Exp Pharmacol Physiol 33: 642–648

Kennard LE, Chumbley JR, Ranatunga KM, Armstrong SJ, Veale EL & Mathie A (2005) Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. Br J Pharmacol 144: 821–829

Kim D & Gnatenco C (2001) TASK-5, a new member of the tandem-pore K(+) channel family. Biochem Biophys Res Commun 284: 923–930

Kim Y, Bang H, Gnatenco C & Kim D (2001) Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K+ channels by pressure, free fatty acids and alkali. Pflugers Arch 442: 64–72

Klausner RD, Kleinfeld AM, Hoover RL & Karnovsky MJ (1980) Lipid domains in membranes. Evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis. J Biol Chem 255: 1286–1295

Knothe G & Dunn R (2009) A Comprehensive Evaluation of the Melting Points of Fatty Acids and Esters Determined by Differential Scanning Calorimetry. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society 86

Langer A, Bartoschik T, Cehlar O, Duhr S, Baaske P & Streicher W (2022) A New Spectral Shift-Based Method to Characterize Molecular Interactions. Assay Drug Dev Technol 20: 83–94

Larsson JE, Larsson HP & Liin SI (2018) KCNE1 tunes the sensitivity of KV7.1 to polyunsaturated fatty acids by moving turret residues close to the binding site. Elife 7: e37257

Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G & Lazdunski M (2000) Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. EMBO J 19: 1784–1793

Lauritzen L, Hansen HS, Jørgensen MH & Michaelsen KF (2001) The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. Prog Lipid Res 40: 1–94

Le Guennec JV & Noble D (1994) Effects of rapid changes of external Na+ concentration at different moments during the action potential in guinea-pig myocytes. J Physiol 478 Pt 3: 493–504

Leaf A, Kang JX, Xiao YF, Billman GE & Voskuyl RA (1999) The antiarrhythmic and anticonvulsant effects of dietary N-3 fatty acids. J Membr Biol 172: 1–11

Leaf A & Xiao YF (2001) The modulation of ionic currents in excitable tissues by n-3 polyunsaturated fatty acids. J Membr Biol 184: 263–271

Leifert WR, McMurchie EJ & Saint DA (1999) Inhibition of cardiac sodium currents in adult rat myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. J Physiol 520 Pt 3: 671–679

Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G & Barhanin J (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K+ channel with a novel structure. EMBO J 15: 1004–1011

Lesage F & Lazdunski M (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. Am J Physiol Renal Physiol 279: F793-801

Lesage F, Maingret F & Lazdunski M (2000) Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K(+) channel. FEBS Lett 471: 137–140

Lesage F, Reyes R, Fink M, Duprat F, Guillemare E & Lazdunski M (1996) Dimerization of TWIK-1 K+ channel subunits via a disulfide bridge. EMBO J 15: 6400–6407

Lesage F, Terrenoire C, Romey G & Lazdunski M (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K+ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. J Biol Chem 275: 28398–28

Lesage F & Barhanin J (2011) Molecular physiology of pH-sensitive background K(2P) channels. Physiology (Bethesda) 26: 424–437

Li H-X, Wang R-X, Li X-R, Guo T, Wu Y, Guo S-X, Sun L-P, Yang Z-Y, Yang X-J & Jiang W-P (2011) Increasing DHA and EPA concentrations prolong action potential durations and reduce transient outward potassium currents in rat ventricular myocytes. Lipids 46: 163–170

Li X , Dyachenko V, Zuzarte M, Putzke C, Preisig-Müller R, Isenberg G & Daut J (2006) The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle. Cardiovasc Res 69: 86–97

Liin SI, Silverå Ejneby M, Barro-Soria R, Skarsfeldt MA, Larsson JE, Starck Härlin F, Parkkari T, Bentzen BH, Schmitt N, Larsson HP, et al (2015) Polyunsaturated fatty acid analogs act antiarrhythmically on the cardiac IKs channel. Proc Natl Acad Sci U S A 112: 5714–5719

Liou YA, King DJ, Zibrik D & Innis SM (2007) Decreasing linoleic acid with constant alpha-linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men. J Nutr 137: 945–952

Lipowsky R & Sackamann (1995) Structure and dynamics of membrane. 1st Edition

Lolicato M, Arrigoni C, Mori T, Sekioka Y, Bryant C, Clark KA & Minor DL (2017) K2P2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. Nature 547: 364–368

Lopes CMB, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J & Logothetis DE (2002) Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. Neuron 34: 933–944

Lugenbiel P, Wenz F, Syren P, Geschwill P, Govorov K, Seyler C, Frank D, Schweizer PA, Franke J, Weis T, et al (2017) TREK-1 (K2P2.1) K+ channels are suppressed in patients with atrial fibrillation and heart failure and provide therapeutic targets for rhythm control. Basic Res Cardiol 112: 8

Lundbæk JA, Birn P, Hansen AJ, Søgaard R, Nielsen C, Girshman J, Bruno MJ, Tape SE, Egebjerg J, Greathouse DV, et al (2004) Regulation of Sodium Channel Function by Bilayer Elasticity. J Gen Physiol 123: 599–621

Ma R & Lewis A (2020) Spadin Selectively Antagonizes Arachidonic Acid Activation of TREK-1 Channels. Front Pharmacol 11: 434

Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M & Honoré E (1999) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. J Biol Chem 274: 26691–26696

Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M & Honoré E (2000) Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. J Biol Chem 275: 10128–10133

Maingret F, Honoré E, Lazdunski M & Patel AJ (2002) Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K(+) channel. Biochem Biophys Res Commun 292: 339–346

Mally M, Peterlin P & Svetina S (2013) Partitioning of oleic acid into phosphatidylcholine membranes is amplified by strain. J Phys Chem B 117: 12086–12094

Markin VS & Martinac B (1991) Mechanosensitive ion channels as reporters of bilayer expansion. A theoretical model. Biophys J 60: 1120–1127

Martinac B, Adler J & Kung C (1990) Mechanosensitive ion channels of E. coli activated by amphipaths. Nature 348: 261–263

Mazella J, Pétrault O, Lucas G, Deval E, Béraud-Dufour S, Gandin C, El-Yacoubi M, Widmann C, Guyon A, Chevet E, et al (2010) Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. PLoS Biol 8: e1000355

McClenaghan C, Schewe M, Aryal P, Carpenter EP, Baukrowitz T & Tucker SJ (2016) Polymodal activation of the TREK-2 K2P channel produces structurally distinct open states. J Gen Physiol 147: 497–505

McLennan PL (1993) Relative effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on cardiac arrhythmias in rats. Am J Clin Nutr 57: 207–212

McLennan PL, Abeywardena MY & Charnock JS (1988) Dietary fish oil prevents ventricular fibrillation following coronary artery occlusion and reperfusion. Am Heart J 116: 709–717

McLennan PL, Bridle TM, Abeywardena MY & Charnock JS (1992) Dietary lipid modulation of ventricular fibrillation threshold in the marmoset monkey. Am Heart J 123: 1555–1561

Merendino N, Costantini L, Manzi L, Molinari R, D'Eliseo D & Velotti F (2013) Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acid DHA: a potential adjuvant in the treatment of cancer. Biomed Res Int 2013: 310186

Moha ou Maati H, Peyronnet R, Devader C, Veyssiere J, Labbal F, Gandin C, Mazella J, Heurteaux C & Borsotto M (2011) A human TREK-1/HEK cell line: a highly efficient screening tool for drug development in neurological diseases. PLoS One 6: e25602

Moruzzi G (1996) The electrophysiological work of Carlo Matteucci. 1964. Brain Res Bull 40: 69–91

Murbartián J, Lei Q, Sando JJ & Bayliss DA (2005) Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. J Biol Chem 280: 30175–30184

Nabekura J, Noguchi K, Witt MR, Nielsen M & Akaike N (1998) Functional modulation of human recombinant gamma-aminobutyric acid type A receptor by docosahexaenoic acid. J Biol Chem 273: 11056–11061

Neher E & Sakmann B (1976) Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. J Physiol 258: 705–729

Neher E, Sakmann B & Steinbach JH (1978) The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. Pflugers Arch 375: 219–228

Ottosson NE, Liin SI & Elinder F (2014) Drug-induced ion channel opening tuned by the voltage sensor charge profile. Journal of General Physiology 143: 173–182

Palmquist DL (2009) Omega-3 Fatty Acids in Metabolism, Health, and Nutrition and for Modified Animal Product Foods. The Professional Animal Scientist 25: 207–249

Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN & Jan LY (1987) Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila. Science 237: 749–753

Patel AJ & Honoré E (2001) Properties and modulation of mammalian 2P domain K+ channels. Trends Neurosci 24: 339–346

Patel AJ, Lazdunski M & Honoré E (2001) Lipid and mechano-gated 2P domain K(+) channels. Curr Opin Cell Biol 13: 422–428

Patel AJ, Honoré E, Lesage F, Fink M, Romey G & Lazdunski M (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K+ channels. Nat Neurosci 2: 422–426

Patel AJ, Honoré E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F & Lazdunski M (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K+ channel. EMBO J 17: 4283–4290

Piccolino M (2006) Luigi Galvani's path to animal electricity. C R Biol 329: 303–318

Plourde M & Cunnane SC (2007) Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. Appl Physiol Nutr Metab 32: 619–634

Ponnampalam E, Hopkins D & Jacobs J (2018) Increasing omega-3 levels in meat from ruminants under pasture-based systems. Rev Sci Tech OIE 37: 57–70

Potter BJ, Sorrentino D & Berk PD (1989) Mechanisms of cellular uptake of free fatty acids. Annu Rev Nutr 9: 253–270

Rajamani S, Eckhardt L, Valdivia Cr, Klemens C, Gillman B, et al (2006) Drug-induced long QT syndrome: hERG K+ channel block and disruption of protein trafficking by fluoxetine and norfluoxetine. British journal of pharmacology 149

Rajan S, Wischmeyer E, Xin Liu G, Preisig-Müller R, Daut J, Karschin A, derst C (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K+ channel. An extracellular histiding as pH sensor. The Journal of biological chemistry 275

Rajan S, Wischmeyer E, Karschin C, Preisig-Müller R, Grzeschik KH, Daut J, Karschin A & Derst C (2001) THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K+ channels. J Biol Chem 276: 7302–7311

Renigunta V, Schlichthörl G & Daut J (2015) Much more than a leak: structure and function of K_2p-channels. Pflugers Arch 467: 867–894

Richieri GV & Kleinfeld AM (1995) Unbound free fatty acid levels in human serum. J Lipid Res 36: 229–240

Roberts LJ, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, Dettbarn WD & Morrow JD (1998) Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. J Biol Chem 273: 13605–13612

Roberts LJ & Morrow JD (2000) Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. Free Radic Biol Med 28: 505–513`

Roberts LJ & Milne GL (2009) Isoprostanes. J Lipid Res 50 Suppl: S219-223

Roy J, Fauconnier J, Oger C, Farah C, Angebault-Prouteau C, Thireau J, Bideaux P, Scheuermann V, Bultel-Poncé V, Demion M, et al (2017) Non-enzymatic oxidized metabolite of

DHA, 4(RS)-4-F4t-neuroprostane protects the heart against reperfusion injury. Free Radic Biol Med 102: 229–239

Roy J, Oger C, Thireau J, Roussel J, Mercier-Touzet O, Faure D, Pinot E, Farah C, Taber DF, Cristol J-P, et al (2015) Nonenzymatic lipid mediators, neuroprostanes, exert the antiarrhythmic properties of docosahexaenoic acid. Free Radic Biol Med 86: 269–27

Saitta F, Motta P, Barbiroli A, Signorelli M, La Rosa C, Janaszewska A, Klajnert-Maculewicz B & Fessas D (2020) Influence of Free Fatty Acids on Lipid Membrane–Nisin Interaction. Langmuir 36: 13535–13544

Salinas M, Reyes R, Lesage F, Fosset M, Heurteaux C, Romey G & Lazdunski M (1999) Cloning of a new mouse two-P domain channel subunit and a human homologue with a unique pore structure. J Biol Chem 274: 11751–11760

Sandoz G, Douguet D, Chatelain F, Lazdunski M & Lesage F (2009) Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 14628–14633

Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Kitada C, Yokoi H, Nozawa K, Okada H, Matsushime H & Furuichi K (2003) A novel two-pore domain K+ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. J Biol Chem 278: 27406–27412

Schewe M, Nematian-Ardestani E, Sun H, Musinszki M, Cordeiro S, Bucci G, de Groot B, Tucker S, Rapedius M, Baukrowitz T (2016) A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K(+) Channels. Cell 164

Schmidt C, Kisselbach J, Schweizer PA, Katus HA & Thomas D (2011) The pathology and treatment of cardiac arrhythmias: focus on atrial fibrillation. Vasc Health Risk Manag 7: 193–202

Schmidt C, Wiedmann F, Kallenberger SM, Ratte A, Schulte JS, Scholz B, Müller FU, Voigt N, Zafeiriou M-P, Ehrlich JR, et al (2017) Stretch-activated two-pore-domain (K2P) potassium channels in the heart: Focus on atrial fibrillation and heart failure. Prog Biophys Mol Biol 130: 233–243

Schmidt C, Wiedmann F, Schweizer PA, Becker R, Katus HA & Thomas D (2013) Class I antiarrhythmic drugs inhibit human cardiac two-pore-domain K(+) (K2 2p) channels. Eur J Pharmacol 721: 237–248

Schwartz LM, McCleskey EW & Almers W (1985) Dihydropyridine receptors in muscle are voltage-dependent but most are not functional calcium channels. Nature 314: 747–751

Sethi S, Eastman AY & Eaton JW (1996) Inhibition of phagocyte-endothelium interactions by oxidized fatty acids: a natural anti-inflammatory mechanism? J Lab Clin Med 128: 27–38

Sethi S, Ziouzenkova O, Ni H, Wagner DD, Plutzky J & Mayadas TN (2002) Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leukocyte-endothelial interactions through activation of PPAR alpha. Blood 100: 1340–1346

Seyfarth E-A (2006) Julius Bernstein (1839-1917): pioneer neurobiologist and biophysicist. Biol Cybern 94: 2–8

Shealy RT, Murphy AD, Ramarathnam R, Jakobsson E & Subramaniam S (2003) Sequence-function analysis of the K+-selective family of ion channels using a comprehensive alignment and the KcsA channel structure. Biophys J 84: 2929–2942

Sheetz MP & Singer SJ (1974) Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. Proc Natl Acad Sci U S A 71: 4457–4461

Sigworth FJ (1986) The patch clamp is more useful than anyone had expected. Fed Proc 45: 2673–2677

Simopoulos AP (2001) n-3 fatty acids and human health: defining strategies for public policy. Lipids 36 Suppl: S83-89

Singer SJ & Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175: 720–731

Spector AA & Yorek MA (1985) Membrane lipid composition and cellular function. J Lipid Res 26: 1015–1035

Sprecher H (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. Biochim Biophys Acta 1486: 219–231

Stillwell W & Wassall SR (2003) Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. Chemistry and Physics of Lipids 126: 1–27

Taber DF, Morrow JD & Roberts LJ (1997) A nomenclature system for the isoprostanes. Prostaglandins 53: 63–67

Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D & Bayliss DA (2001) Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. J Neurosci 21: 7491–7505

Tan JHC, Liu W & Saint DA (2004) Differential expression of the mechanosensitive potassium channel TREK-1 in epicardial and endocardial myocytes in rat ventricle. Exp Physiol 89: 237–242

Toborek M, Malecki A, Garrido R, Mattson MP, Hennig B & Young B (1999) Arachidonic acid-induced oxidative injury to cultured spinal cord neurons. J Neurochem 73: 684–692

Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stühmer W & Pardo LA (2014) Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 369: 20130094

Van Meer G, Voelker DR & Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. Nat Rev Mol Cell Biol 9: 112–124

Vierra NC, Dadi PK, Milian SC, Dickerson MT, Jordan KL, Gilon P & Jacobson DA (2017) TALK-1 channels control β cell endoplasmic reticulum Ca2+ homeostasis. Sci Signal 10: eaan2883

Voskuyl RA, Vreugdenhil M, Kang JX & Leaf A (1998) Anticonvulsant effect of polyunsaturated fatty acids in rats, using the cortical stimulation model. Eur J Pharmacol 341: 145–152

Vreugdenhil M, Bruehl C, Voskuyl RA, Kang JX, Leaf A & Wadman WJ (1996) Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 12559–12563

Vrinten P, Wu G, Truksa M & Qiu X (2007) Production of polyunsaturated fatty acids in transgenic plants. Biotechnol Genet Eng Rev 24: 263–279

Wakili R, Voigt N, Kääb S, Dobrev D & Nattel S (2011) Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. J Clin Invest 121: 2955–2968

Wang W, Yin H, Feng N, Wang L & Wang X (2020) Inhibitory effects of antidepressant fluoxetine on cloned Kv2.1 potassium channel expressed in HEK293 cells. Eur J Pharmacol 878: 173097

Whelan J (2009) Dietary stearidonic acid is a long chain (n-3) polyunsaturated fatty acid with potential health benefits. J Nutr 139: 5–10

Wiedmann F, Rinné S, Donner B, Decher N, Katus HA & Schmidt C (2021) Mechanosensitive TREK-1 two-pore-domain potassium (K2P) channels in the cardiovascular system. Prog Biophys Mol Biol 159: 126–135

Winegar BD, Owen DF, Yost CS, Forsayeth JR & Mayeri E (1996) Volatile general anesthetics produce hyperpolarization of Aplysia neurons by activation of a discrete population of baseline potassium channels. Anesthesiology 85: 889–900

Xiao YF, Gomez AM, Morgan JP, Lederer WJ & Leaf A (1997) Suppression of voltage-gated L-type Ca2+ currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 4182–4187

Xiao YF, Gomez AM, Morgan JP, Lederer WJ & Leaf A (1997) Suppression of voltage-gated L-type Ca2+ currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 4182–4187

Xiao YF, Kang JX, Morgan JP & Leaf A (1995) Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na+ channels of neonatal rat ventricular myocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 11000–11004

Xiao YF, Wright SN, Wang GK, Morgan JP & Leaf A (1998) Fatty acids suppress voltage-gated Na+ currents in HEK293t cells transfected with the alpha-subunit of the human cardiac Na+ channel. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 2680–2685

Yang J, Jan YN & Jan LY (1995) Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier K+ channel. Neuron 14: 1047–1054

Yazdi S, Stein M, Elinder F, Andersson M & Lindahl E (2016) The Molecular Basis of Polyunsaturated Fatty Acid Interactions with the Shaker Voltage-Gated Potassium Channel. PLoS Comput Biol 12: e1004704

Zhao L, Fu L, Gao Q, Xie R & Cao J (2011) Regional differential expression of TREK-1 at left ventricle in myocardial infarction. Can J Cardiol 27: 826–833

ANNEXE

Revue publiée en 2022:

Bechard E, Bride J, Le Guennec J-Y, Brette F & Demion M (2022) TREK-1 in the heart: Potential physiological and pathophysiological roles. Front Physiol 13: 1095102

frontiers | Frontiers in Physiology

TYPE Mini Review
PUBLISHED 22 December 2022
DOI 10.3389/fphys.2022.1095102

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Jordi Heijman,
Maastricht University, Netherlands

REVIEWED BY
Felix Wiedmann,
Heidelberg University Hospital, Germany
Samuel Kamatham,
St. Jude Children's Research Hospital, United States

*CORRESPONDENCE
Fabien Brette,
fabien.brette@inserm.fr
Marie Demion,
marie.demion@umontpellier.fr

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to Cardiac Electrophysiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

RECEIVED 10 November 2022
ACCEPTED 13 December 2022
PUBLISHED 22 December 2022

CITATION
Bechard E, Bride J, Le Guennec J-Y, Brette F and Demion M (2022), TREK-1 in the heart: Potential physiological and pathophysiological roles.
Front. Physiol. 13:1095102.
doi: 10.3389/fphys.2022.1095102

COPYRIGHT
© 2022 Bechard, Bride, Le Guennec, Brette and Demion. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

TREK-1 in the heart: Potential physiological and pathophysiological roles

Emilie Bechard, Jamie Bride, Jean-Yves Le Guennec, Fabien Brette* and Marie Demion*

PhyMedExp, Université de Montpellier, Inserm U1046, UMR CNRS 9412, Montpellier, France

The TREK-1 channel belongs to the TREK subfamily of two-pore domains channels that are activated by stretch and polyunsaturated fatty acids and inactivated by Protein Kinase A phosphorylation. The activation of this potassium channel must induce a hyperpolarization of the resting membrane potential and a shortening of the action potential duration in neurons and cardiac cells, two phenomena being beneficial for these tissues in pathological situations like ischemia-reperfusion. Surprisingly, the physiological role of TREK-1 in cardiac function has never been thoroughly investigated, very likely because of the lack of a specific inhibitor. However, possible roles have been unraveled in pathological situations such as atrial fibrillation worsened by heart failure, right ventricular outflow tract tachycardia or pulmonary arterial hypertension. The inhomogeneous distribution of TREK-1 channel within the heart reinforces the idea that this stretch-activated potassium channel might play a role in cardiac areas where the mechanical constraints are important and need a particular protection afforded by TREK-1. Consequently, the main purpose of this mini review is to discuss the possible role played by TREK -1 in physiological and pathophysiological conditions and its potential role in mechano-electrical feedback. Improved understanding of the role of TREK-1 in the heart may help the development of promising treatments for challenging cardiac diseases.

KEYWORDS

TREK-1, K2P2.1, atrial fibrillation, myocardial infarction, RVOT

1 Introduction

In cardiomyocytes, excitation-contraction coupling, the process that links electrical activity to cell contraction, is well established. On the contrary, the mechano-electric feedback (MEF) mechanism that can be summarized by how mechanical stimulation can modulate action potential (AP) shape is less understood. Such a feed-back mechanism must involve mechanosensitive signals, mainly stretch, especially *via* mechano-gated ionic channels.

K2P channels are modulators of cardiac repolarization and within this family of channels, TREK-1 is the most abundant channel expressed in the human heart (Wiedmann et al., 2021). The mechano-gated TREK-1 channel is differentially

expressed in regions of the heart participating in electrical heterogeneity within specific areas (Tan et al., 2004). TREK-1 is 17 time more express at the mRNA level in the endocardium when compared to epicardium, and 3-fold at the functional (current) level (Kelly et al., 2006).

2 TREK-1 and mechano-electrical feedback

As well as TREK-1 channel expression is heterogenous in ventricle, MEF differs regionally. In 1999, it was demonstrated that, in response to stretch, canine AP was shortened at the endocardial level but not in the epicardium leading to ventricular arrhythmias (Takagi et al., 1999). Such stretch-induced arrhythmias were sensitive to gadolinium, a non-specific stretch-activated channel blocker. In 2006, Kelly and collaborators demonstrated that in Langendorff perfused rat isolated heart, increasing intraventricular pressure by inflation of a balloon, induced a shortening of the AP both in subepicardial and subendocardial zones (Kelly et al., 2006). However, AP shortening was more pronounced in the endocardium than in the epicardium at all repolarization levels. This suggests that the spatial variation of TREK-1 channel expression may influence regionally the MEF altering in turn the dispersion of AP repolarization and induces disturbances in repolarization in several models including human (Sarubbi et al., 2004). Such repolarization dispersion (*i.e.* AP at different part of the ventricle repolarizing at different times) is arrhythmogenic (Roden and Woosley, 1985) and is normally reduced under physiological conditions. The different AP durations (APD) in the myocardium finally synchronize their repolarization along the wall despite an asynchronous depolarization time (Volders et al., 2000).

However, in several cardiac pathologies, both TREK-1 channel expression and MEF are modified. In pathological conditions where mechanical properties are altered, such as fibrosis, a slowed AP propagation may induce a dispersion of repolarization and thus arrhythmias, altering both MEF and APD regulation.

For example, in rat, TREK-1 channel expression is increased by cardiac hypertrophy induced by isoproterenol and this is associated with an amplified transmural gradient (endocardium vs. epicardium) of TREK-1 channel (Wang et al., 2013). This up-regulation might be linked to reexpression of fetal genes, characteristic finding of pressure overload–induced cardiac hypertrophy, however to the best of our knowledge there is no information about a possible developmentally regulated expression of TREK-1 gene. In mammals, global deletion of TREK-1 induces an exaggerated concentric hypertrophy in response to pressure overload, but protects from the development of systolic and diastolic dysfunction. As TREK-1 is present in cardiac fibroblasts and modulates their function, its specific deletion in fibroblasts reduces fibrosis development. Thus, cardioprotective effects of TREK-1 loss of function are driven by cardiac fibroblasts (Abraham et al., 2018).

TREK-1 activity can also be changed during pathology since the activation of TREK-1 by Polyunsaturated fatty acids like arachidonic acid might occur in pathophysiological situations like ischemia when ATP cause the release of this fatty acid (Aimond et al., 2000).

However, the transmural variation of TREK-1 expression cannot explain by itself all the MEF variability. Indeed, the cellular strain and forces are locally different from the endocardial to epicardial cells when the ventricle is deformed. This was first shown at the cellular level (Cazorla et al., 2000) and more recently in living individuals cardiac layers (Pitoulis et al., 2020). For example, during end-diastolic relaxation, significant circumferential stretch, wall thinning, and in-plane and transverse shear were observed. Left ventricular mechanics during the early relaxation phase involves substantial deformation of fiber and sheet structures with significant transmural heterogeneity. A significant epicardial stretch along myofibers was observed during early relaxation when compared to endocardial fibers (Ashikaga et al., 2004).

3 Physiological role of TREK-1

While some changes in the expression of TREK-1 might appear in pathological circumstances, a putative physiological role of TREK-1 has never been shown. Knowing its electrophysiological properties, channel open at rest and outwardly rectifying current, led to the inference that this channel must hyperpolarize the resting membrane potential and/or shorten the APD of cardiac cells but this has never been shown (Benoist et al., 2014; Kelly et al., 2006). The reason for this is probably that there is no specific pharmacology for TREK-1 and that TREK-1 blockers are often other potassium conductance blockers (Wiedmann et al., 2021). It has to be underlined that the co-expression of $K_{IR}2.1$, the molecular identity responsible for the current responsible of the cardiac resting membrane potential I_{K1}, and TREK-1 shows that TREK-1 influences slightly the resting membrane potential (Decher et al., 2017b). Also, there are many cases of mutations in channels carrying the rapid and slow delayed-rectifier and basal inward-rectifier potassium currents (I_{Kr}, I_{Ks} and I_{K1}, respectively), involved in the reserve of repolarization, that lead to long QT syndrome (Crotti et al., 2020). To the best of our knowledge, such mutations have never been described for TREK-1. This does not mean that $I_{TREK\text{-}1}$ is not involved in ventricular repolarization, since such mutations can be lethal or induce other kind of adaptation.

Interestingly, it has been observed that TREK-1 channel is mainly expressed in the more mechanical constrained area of the heart. For example, TREK-1 is more abundant in endocardial

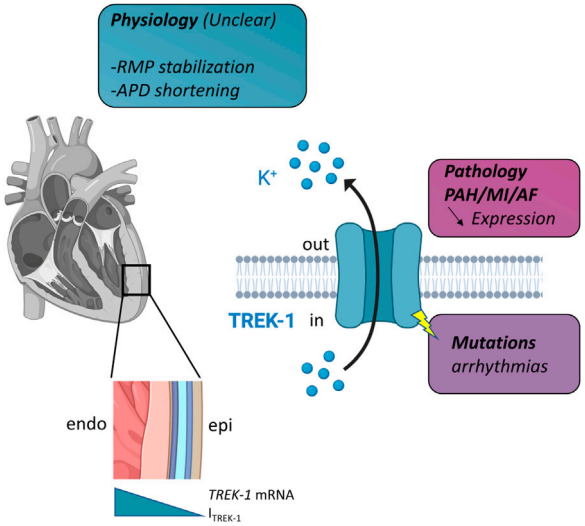

FIGURE 1
Schematic representation of TREK-1 involvement in cardiac physiology and pathology. Left, in the heart, there is a gradient of TREK-1 expression (hence current) between endocardium (endo) and epicardium (epi). Right, TREK-1 is a potassium channel and this physiological role is unclear. It may be involved in resting membrane potential (RMP) stabilization, action potential duration (APD) shortening. Decrease expression has been observed in several pathologies: pulmonary arterial hypertension (PAH), myocardial infarction (MI) and atrial fibrillation (AF). TREK-1 can be linked to arrhythmia *via* mutations. See text for details.

cells than in epicardial cells (Tan et al., 2004; Kelly et al., 2006). Hence, the effects on AP shortening of inflating a balloon in the left ventricle are more pronounced in the endocardium than in the epicardium. Besides these observations, endocardial cells are known to be more rigid than epicardial cells (Cazorla et al., 1997, 1999). In addition, Gannier et al. (1994), observed that stretching single cells can induce a large increase in diastolic calcium. This phenomenon can occur for small sarcomere lengthening that is coherent with stiff endocardial cells. This phenomenon is accompanied by a stable membrane depolarization that is at the origin of the diastolic calcium increase (White et al., 1993; Gannier et al., 1996). Thus, this phenomenon, linked to the presence of inward stretch-activated current, must be prevented by the presence of TREK-1 that would compensate the inward current, especially in cells more prone to present this phenomenon, i.e., stiffer cells, endocardial cells.

The right ventricular outflow tract (RVOT) is also a region of the heart with high physical strain. This might explain, in part at least, that the RVOT is a region of the heart where arrhythmic syndromes and the majority of idiopathic ventricular arrhythmias are found in the absence of any structural modifications and without any known etiology (Srivathsan et al., 2005). It has been noted that in rat ventricle, the RVOT APD was shorter than in the other part of the right ventricle even though there was no evidence that it was due to an overexpression or overactivity of TREK-1 (Benoist et al., 2014).

However, there are some evidences of the role of TREK-1 remodeling in the development of some arrhythmias (Benoist et al., 2014; Kamatham et al., 2019).

4 TREK-1 and pathological condition

While the physiological role of TREK-1 has not been proven formally, some cardiac diseases have been shown to be associated with changes in TREK-1 expression and the implication of TREK-1 can be inferred based on its electrophysiological properties or even proved by restoration of the initial expression (Zhao et al., 2011; Benoist et al., 2014; Lugenbiel et al., 2017; Kamatham et al., 2019; Dragasis et al., 2022).

4.1 RVOT

The RVOT is the area of the right ventricle through which blood flows in to be expulsed in the pulmonary artery. The RVOT is under a high physical strain and is known to express TREK-1. A significant proportion of ventricular extrasystoles originate from the outflow tracts, left or right (Dragasis et al., 2022).

There are at least two kinds of tachycardia that have the RVOT as the locus for arrhythmias.

4.1.1 Mutated leaky TREK-1 channel

RVOT ventricular tachycardia (RVOT-TC) is a common form of monomorphic ventricular tachycardia without any structural disease and without any explanation. 10% of ventricular tachycardia are idiopathic and interestingly 70% of these arrhythmias originate in the RVOT (Goldstein, 2017). While they are considered as benign, it has been shown that they can degenerate in ventricular fibrillation, often preceded by episodes of syncope (Noda et al., 2005). Decher et al. (2017b) identified a patient with a point mutation in TREK-1, I267T, located directly before the selectivity filter of the second pore loop. This mutation, that might be dominant-negative, makes TREK-1 permeable to sodium. Also, TREK-1 has an increased sensitivity to stretch accompanied by a reduced desensitization of the channel. Episodes of RVOT-TC are generally observed in situations where the sympathetic system is activated and thus normally TREK-1 is more or less inhibited. Decher et al. (2017b) showed that the activation of $ß_1$-receptors, co-expressed in oocytes with TREK-1^{I267T}, induces a larger depolarizing inward sodium current and thus a larger depolarization that must participate as such to the development of arrhythmias. Indeed, the increased entry of sodium leads to an increased entry of calcium through the sodium-calcium exchanger that in turn produces arrhythmias due to the

transient inward current I_{TI} (Lederer and Tsien, 1976). It has to be noted that another gene modification, an alternative translation initiation, leads to an increased sodium permeability (Thomas et al., 2008). However, the normal and pathological expression of this variant is not known as well as the physiological sodium permeability (Decher et al., 2017b; 2017a). Interestingly, the I267T mutant can recover its potassium selectivity thanks to BL-1249, a TREK-1 channel activator, opening hopes in the treatment of such a rare disease.

4.1.2 Pulmonary arterial hypertension

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a cardiac disease resulting from to a vasoconstriction and/or cell proliferation in the pulmonary circulation. The main consequences of PAH are right ventricular hypertrophy, arrhythmias and failure. A rat model of PAH has been developed by injecting monocrotaline, a plant alkaloid. Benoist et al. (2014) used that model to understand the evolution of remodeling associated with heart failure and the occurrence of arrhythmias. They found that while the APD in the RVOT is shorter than in the rest of the right ventricle in healthy animals, this APD increased more in the RVOT with PAH. The authors showed thus that remodeling is more important in the RVOT than in the other areas of the right ventricle and that such changes in APD in adjacent part of the ventricle can be responsible of arrhythmias due the dispersion of repolarization. While there was no functional analysis performed to explain such a lengthening of the AP, (Benoist et al., 2014), showed that the level of mRNA coding for TREK-1 decreased only in the right ventricle, even though there was no particular focus on the RVOT. By correlating this decrease in TREK-1 gene expression, and the associated decrease in TRPC1 and increase in TRPC6 expression (Benoist et al., 2014), to the channel conductance's, they showed that the increase in APD can be explained.

These findings are of great interest since they were counter-intuitive knowing that an acute stretch induces an increase of the TREK-1 protein (Zhao et al., 2007). A possible explanation might be that initially the acute strain induces an increase of TREK-1 to compensate and, with time, there is the installation of a chronic strain that induces a decompensation linked to, at least, a remodeling of TREK-1 expression.

4.2 Atrial fibrillation

Atrial fibrillation (AF), the most common arrhythmia, is associated with both structural and electrical remodeling that cause disturbance in repolarization and conduction and contribute to arrhythmogenesis (Schmidt et al., 2011; Wakili et al., 2011; Dobrev et al., 2012). TREK-1 expression in human atrium displays a relevant level that suggests functional and potential therapeutic roles (Schmidt et al., 2017).

Indeed, a down-regulation of *TREK-1* mRNA expression and protein level in atrium were observed in patients with AF complicated by heart failure (Schmidt et al., 2013, 2017; Lugenbiel et al., 2017). Down-regulation of TREK-1 was similarly observed in a tachypacing pig model of AF with reduced left ventricular ejection fraction. This downregulation of TREK-1 expression is consistent with a prolonged APD and effective refractory periods (ERP) but also with an increased susceptibility to experience extrasystoles. The downregulation of *TREK-1* mRNA in neonate ventricular cardiomyocytes from rat under mechanical stretch suggests that dilation of atria observed in AF patients may directly contribute to TREK-1 remodeling (Lugenbiel et al., 2017). Then, restoring TREK-1 expression in pig with AF using gene therapy was followed by a recovery of sinus rhythm and prolongation of the ERP was attenuated (Lugenbiel et al., 2017). Moreover, overexpressing TREK-1 by gene therapy enhances TREK-1 current and results in APD shortening in mouse cardiomyocytes (Lugenbiel et al., 2017). TREK-1 channel downregulation is clearly involved in the development of AF and this suggests a potential therapeutic significance of TREK-1 gene therapy to manage AF complicated by heart failure.

4.3 Myocardial infarction

Post-myocardial infarct arrhythmias are a major risk factor of sudden cardiac death. After myocardial infarction (MI), an electrical remodeling occurs, increasing the electrical instability of the post-MI heart (Huang et al., 2001). In 2002, Barrabés et al. (2002) demonstrated that MEF can be enhanced in postinfarcted myocardium when compared with normal cardiac muscle, leading to mechano-induced ventricular arrhythmias and consequently ventricular fibrillation (Barrabés et al., 2002). Zhao et al. (2011) showed that TREK-1 channel remodeling occurs after MI in both endocardium and epicardium. TREK-1 expression decreased in the infarcted region while it is increased in the infarcted border region as a compensatory mechanism. This remodeling of TREK-1 expression in infarcted border region, positively correlated with outward TREK-1 current, could be responsible of the post-MI arrhythmogenesis by inducing a dispersion of effective refractory periods in adjacent cardiac areas. A more recent study, using TREK-1 invalidated model, demonstrated that following coronary artery ligation, the infarct size was increased in TREK-1 knock-out mice, associated with higher systolic dysfunction when compared to wild-type mice (Kamatham et al., 2019). This study suggests that TREK-1 expression could be protective during ventricular remodeling by regulating membrane potential and thus calcium homeostasis.

During the process of cardiac work after an infarction, the effects of mechanical stretch on myocardium in different regions may produce an altered electrical activity, inducing disturbances

in repolarization and electrical instability that is a critical factor for arrhythmogenesis.

In conclusion, the ventricle preload and wall thickness modifications are able to alter the electrical signal induced by the MEF. This signal provides the trigger and/or the substrate to ventricular arrhythmias.

5 Future directions

To summarize our knowledge about the functional role of TREK-1 (Figure 1), it can be: 1/putative physiological roles are possible based on the electrophysiological properties of I_{TREK-1}. 2/there are some changes in the expression of TREK-1 with some chronic disease that are involved in the development of the disease but the mechanisms are not understood. Different hypothesis can be put forward to explain this situation. The first is the lack of a selective blocker for TREK-1. Spadin is given as such a selective blocker, but its practical use is limited since the channel first has to be activated by arachidonic acid to be sensitive to spadin (Hivelin et al., 2016; Djillani et al., 2017; Djillani et al., 2019; Ma and Lewis, 2020). The second aspect is the pronounced species differences in K^+ channel expression which provide an additional challenge for the elucidation of the role of TREK-1 in the heart. Finally, another aspect that has not been explored is the potential non-conducting properties of TREK-1. Indeed, in pathologies like breast cancer, such non-ionic properties of ion channels are well-known (Forzisi and Sesti, 2022). Whatever the explanation, it appears more and more obvious that TREK-1 plays a role in cardiac physiology and it represents a new target in cardiology.

Author contributions

J-YLG wrote first draft. EB, JB, FB, and MD contributed to manuscript formulation and revision. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

FB is financially supported by the French National Funding Agency for Research (ANR) (ANR-20-CE17-0010). MD, J-YL-G and EB are financially supported by the French National Funding Agency for Research (ANR) (ANR-20-CE44-001). JB is financially supported by the French CNRS labelling PRIME DO-iT and by the Region Occitanie.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

Abraham, D. M., Lee, T. E., Watson, L. J., Mao, L., Chandok, G., Wang, H.-G., et al. (2018). The two-pore domain potassium channel TREK-1 mediates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction. *J. Clin. Invest.* 128, 4843–4855. doi:10.1172/JCI95945

Aimond, F., Rauzier, J. M., Bony, C., and Vassort, G. (2000). Simultaneous activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP stimulates the K+ current ITREK in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 39110–39116. doi:10.1074/jbc.M008192200

Ashikaga, H., Criscione, J. C., Omens, J. H., Covell, J. W., and Ingels, N. B. (2004). Transmural left ventricular mechanics underlying torsional recoil during relaxation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H640–H647. doi:10.1152/ajpheart.00575.2003

Barrabés, J. A., Garcia-Dorado, D., Padilla, F., Agulló, L., Trobo, L., Carballo, J., et al. (2002). Ventricular fibrillation during acute coronary occlusion is related to the dilation of the ischemic region. *Basic Res. Cardiol.* 97, 445–451. doi:10.1007/s003950200051

Benoist, D., Stones, R., Benson, A. P., Fowler, E. D., Drinkhill, M. J., Hardy, M. E. L., et al. (2014). Systems approach to the study of stretch and arrhythmias in right ventricular failure induced in rats by monocrotaline. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 115, 162–172. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.008

Cazorla, O., Le Guennec, J. Y., and White, E. (2000). Length-tension relationships of sub-epicardial and sub-endocardial single ventricular myocytes from rat and ferret hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 735–744. doi:10.1006/jmcc.2000.1115

Cazorla, O., Pascarel, C., Brette, F., and Le Guennec, J. Y. (1999). Modulation of ions channels and membrane receptors activities by mechanical interventions in cardiomyocytes: Possible mechanisms for mechanosensitivity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71, 29–58. doi:10.1016/s0079-6107(98)00036-4

Cazorla, O., Pascarel, C., Garnier, D., and Le Guennec, J. Y. (1997). Resting tension participates in the modulation of active tension in isolated Guinea pig ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 1629–1637. doi:10.1006/jmcc.1997.0402

Crotti, L., Odening, K. E., and Sanguinetti, M. C. (2020). Heritable arrhythmias associated with abnormal function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* 116, 1542–1556. doi:10.1093/cvr/cvaa068

Decher, N., Kiper, A. K., and Rinné, S. (2017a). Stretch-activated potassium currents in the heart: Focus on TREK-1 and arrhythmias. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 130, 223–232. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2017.05.005

Decher, N., Ortiz-Bonnin, B., Friedrich, C., Schewe, M., Kiper, A. K., Rinné, S., et al. (2017b). Sodium permeable and "hypersensitive" TREK-1 channels cause ventricular tachycardia. *EMBO Mol. Med.* 9, 403–414. doi:10.15252/emmm.201606690

Djillani, A., Pietri, M., Mazella, J., Heurteaux, C., and Borsotto, M. (2019). Fighting against depression with TREK-1 blockers: Past and future. A focus on spadin. *Pharmacol. Ther.* 194, 185–198. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.10.003

Djillani, A., Pietri, M., Moreno, S., Heurteaux, C., Mazella, J., and Borsotto, M. (2017). Shortened spadin analogs display better TREK-1 inhibition, *in vivo* stability and antidepressant activity. *Front. Pharmacol.* 8, 643. doi:10.3389/fphar.2017.00643

Dobrev, D., Carlsson, L., and Nattel, S. (2012). Novel molecular targets for atrial fibrillation therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 275–291. doi:10.1038/nrd3682

Dragasis, S., Vlachos, K., Frontera, A., Mililis, P., Saplaouras, A., Zygouri, A., et al. (2022). Modern mapping and ablation of idiopathic outflow tract ventricular arrhythmias. *Rev. Cardiovasc. Med.* 23, 103. doi:10.31083/j.rcm2303103

Forzisi, E., and Sesti, F. (2022). Non-conducting functions of ion channels: The case of integrin-ion channel complexes. *Channels Austin Tex* 16, 185–197. doi:10.1080/19336950.2022.2108565

Gannier, F., White, E., Garnier, N., and Le Guennec, J. Y. (1996). A possible mechanism for large stretch-induced increase in [Ca2+]i in isolated Guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 32, 158–167. doi:10.1016/s0008-6363(95)00153-0

Gannier, F., White, E., Lacampagne, A., Garnier, D., and Le Guennec, J. Y. (1994). Streptomycin reverses a large stretch induced increases in [Ca2+]i in isolated Guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 28, 1193–1198. doi:10.1093/cvr/28.8.1193

Goldstein, S. A. (2017). Sodium leak through K2P potassium channels and cardiac arrhythmia, an emerging theme. *EMBO Mol. Med.* 9, 399–402. doi:10.15252/emmm.201607479

Hivelin, C., Béraud-Dufour, S., Devader, C., Abderrahmani, A., Moreno, S., Moha Ou Maati, H., et al. (2016). Potentiation of calcium influx and insulin secretion in pancreatic beta cell by the specific TREK-1 blocker spadin. *J. Diabetes Res.* 2016, 3142175. doi:10.1155/2016/3142175

Huang, B., Qin, D., and El-Sherif, N. (2001). Spatial alterations of Kv channels expression and K(+) currents in post-MI remodeled rat heart. *Cardiovasc. Res.* 52, 246–254. doi:10.1016/s0008-6363(01)00378-9

Kamatham, S., Waters, C. M., Schwingshackl, A., and Mancarella, S. (2019). TREK-1 protects the heart against ischemia-reperfusion-induced injury and from adverse remodeling after myocardial infarction. *Pflugers Arch.* 471 (10), 1263–1272. doi:10.1007/s00424-019-02306-y

Kelly, D., Mackenzie, L., Hunter, P., Smaill, B., and Saint, D. A. (2006). Gene expression of stretch-activated channels and mechanoelectric feedback in the heart. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 642–648. doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04392.x

Lederer, W. J., and Tsien, R. W. (1976). Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibres. *J. Physiol.* 263, 73–100. doi:10.1113/jphysiol.1976.sp011622

Lugenbiel, P., Wenz, F., Syren, P., Geschwill, P., Govorov, K., Seyler, C., et al. (2017). TREK-1 (K2P2.1) K+ channels are suppressed in patients with atrial fibrillation and heart failure and provide therapeutic targets for rhythm control. *Basic Res. Cardiol.* 112, 8. doi:10.1007/s00395-016-0597-7

Ma, R., and Lewis, A. (2020). Spadin selectively antagonizes arachidonic acid activation of TREK-1 channels. *Front. Pharmacol.* 11, 434. doi:10.3389/fphar.2020.00434

Noda, T., Shimizu, W., Taguchi, A., Aiba, T., Satomi, K., Suyama, K., et al. (2005). Malignant entity of idiopathic ventricular fibrillation and polymorphic ventricular tachycardia initiated by premature extrasystoles originating from the right ventricular outflow tract. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 1288–1294. doi:10.1016/j.jacc.2005.05.077

Pitoulis, F. G., Hasan, W., Papadaki, M., Clavere, N. G., Perbellini, F., Harding, S. E., et al. (2020). Intact myocardial preparations reveal intrinsic transmural heterogeneity in cardiac mechanics. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 141, 11–16. doi:10.1016/j.yjmcc.2020.03.007

Roden, D. M., and Woosley, R. L. (1985). QT prolongation and arrhythmia suppression. *Am. Heart J.* 109, 411–415. doi:10.1016/0002-8703(85)90627-1

Sarubbi, B., Calvanese, R., Cappelli Bigazzi, M., Santoro, G., Giovanna Russo, M., and Calabrò, R. (2004). Electrophysiological changes following balloon valvuloplasty and angioplasty for aortic stenosis and coartaction of aorta: Clinical evidence for mechano-electrical feedback in humans. *Int. J. Cardiol.* 93, 7–11. doi:10.1016/s0167-5273(03)00147-5

Schmidt, C., Kisselbach, J., Schweizer, P. A., Katus, H. A., and Thomas, D. (2011). The pathology and treatment of cardiac arrhythmias: Focus on atrial fibrillation. *Vasc. Health Risk Manag.* 7, 193–202. doi:10.2147/VHRM.S10758

Schmidt, C., Wiedmann, F., Kallenberger, S. M., Ratte, A., Schulte, J. S., Scholz, B., et al. (2017). Stretch-activated two-pore-domain (K2P) potassium channels in the heart: Focus on atrial fibrillation and heart failure. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 130, 233–243. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2017.05.004

Schmidt, C., Wiedmann, F., Schweizer, P. A., Becker, R., Katus, H. A., and Thomas, D. (2013). Class I antiarrhythmic drugs inhibit human cardiac two-pore-domain K(+) (K2 2p) channels. *Eur. J. Pharmacol.* 721, 237–248. doi:10.1016/j.ejphar.2013.09.029

Srivathsan, K., Lester, S. J., Appleton, C. P., Scott, L. R. P., and Munger, T. M. (2005). Ventricular tachycardia in the absence of structural heart disease. *Indian Pacing Electrophysiol. J.* 5, 106–121.

Takagi, S., Miyazaki, T., Moritani, K., Miyoshi, S., Furukawa, Y., Ito, S., et al. (1999). Gadolinium suppresses stretch-induced increases in the differences in epicardial and endocardial monophasic action potential durations and ventricular arrhythmias in dogs. *Jpn. Circ. J.* 63, 296–302. doi:10.1253/jcj.63.296

Tan, J. H. C., Liu, W., and Saint, D. A. (2004). Differential expression of the mechanosensitive potassium channel TREK-1 in epicardial and endocardial myocytes in rat ventricle. *Exp. Physiol.* 89, 237–242. doi:10.1113/expphysiol.2003.027052

Thomas, D., Plant, L. D., Wilkens, C. M., McCrossan, Z. A., and Goldstein, S. A. N. (2008). Alternative translation initiation in rat brain yields K2P2.1 potassium channels permeable to sodium. *Neuron* 58, 859–870. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.016

Volders, P. G., Vos, M. A., Szabo, B., Sipido, K. R., de Groot, S. H., Gorgels, A. P., et al. (2000). Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: Time to revise current concepts. *Cardiovasc. Res.* 46, 376–392. doi:10.1016/s0008-6363(00)00022-5

Wakili, R., Voigt, N., Kääb, S., Dobrev, D., and Nattel, S. (2011). Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J. Clin. Invest.* 121, 2955–2968. doi:10.1172/JCI46315

Wang, W., Zhang, M., Li, P., Yuan, H., Feng, N., Peng, Y., et al. (2013). An increased TREK-1-like potassium current in ventricular myocytes during rat cardiac hypertrophy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 61, 302–310. doi:10.1097/FJC.0b013e318280c5a9

White, E., Le Guennec, J. Y., Nigretto, J. M., Gannier, F., Argibay, J. A., and Garnier, D. (1993). The effects of increasing cell length on auxotonic contractions; membrane potential and intracellular calcium transients in single Guinea-pig ventricular myocytes. *Exp. Physiol.* 78, 65–78. doi:10.1113/expphysiol.1993.sp003671

Wiedmann, F., Rinné, S., Donner, B., Decher, N., Katus, H. A., and Schmidt, C. (2021). Mechanosensitive TREK-1 two-pore-domain potassium (K2P) channels in the cardiovascular system. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 159, 126–135. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2020.05.007

Zhao, F., Dong, L., Cheng, L., Zeng, Q., and Su, F. (2007). Effects of acute mechanical stretch on the expression of mechanosensitive potassium channel TREK-1 in rat left ventricle. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 27, 385–387. doi:10.1007/s11596-007-0409-2

Zhao, L., Fu, L., Gao, Q., Xie, R., and Cao, J. (2011). Regional differential expression of TREK-1 at left ventricle in myocardial infarction. *Can. J. Cardiol.* 27, 826–833. doi:10.1016/j.cjca.2011.01.013

Manuscrit en cours de révision (sur BioR*x*iv) :

<u>Emilie bechard</u>, Elodie Arel, Jamie Bride, Julien Louradour, Xavier Bussy, Anis Elloumi, Claire Vigor, Pierre Soule, Camille Oger, Jean-Marie Galano, Thierry Durand, Jean-Yves Le Guennec, Hamid Moha-ou-maati, Marie Demion (bior*x*iv) Activation of htrek-1 by polyunsaturated fatty acids does not only involve membrane tension. https://doi.org/10.1101/2022.08.01.502268

Activation of hTREK-1 by polyunsaturated fatty acids does not only involve membrane tension

Emilie BECHARD[1], Elodie AREL[1], Jamie BRIDE[1], Julien LOURADOUR[1], Xavier BUSSY[1], Anis ELLOUMI[2], Claire VIGOR[2], Pierre SOULE[4], Camille OGER[2], Jean-Marie GALANO*[2], Thierry DURAND*[2], Jean-Yves LE GUENNEC*[1], Hamid MOHA-OU-MAATI*[3], Marie DEMION*[$,1].

[1]: PhyMedExp, Université de Montpellier, Inserm U1046, UMR CNRS 9412, Montpellier (France)
[2]: IBMM, Université de Montpellier, UMR CNRS 5247, ENSCM, Montpellier (France)
[3]: IGF, Université de Montpellier, Inserm 1191, UMR CNRS 5203, Montpellier (France) Present adress INM, Inserm U1298, Montpellier (France)
[4] : NanoTemper Technologies GmbH, Munich (Germany)
* : last co-authors

corresponding author
Marie DEMION
PhyMedExp, Inserm U1046, CNRS UMR9214
CHU Arnaud de Villeneuve
Bâtiment Craste de Paulet
370 avenue du Doyen Gaston Giraud
34290 MONTPELLIER Cedex 05
France

Running title : hTREK-1 is directly activated by PUFAs

Data Availability Statement : Data available on request from the authors

Bulleted point Summary

"What is already known ?"

- TREK-1 is a mechanosensitive channel and is activated by poly-unsaturated fatty acids such as arachidonic acid.
- The hypothesis in PUFAs-mediated TREK-1 activation is that PUFAs change membrane tension following their insertion into the membrane.

"What this study adds ?"

- We showed that the activation does not involve changes in membrane tension.
- The PUFAs-mediated TREK-1 activation is not correlated with the acyl chain length and occurs in 1 min while membrane is not yet fludized.
- The PUFAs effects are immediately and fully reversible in few minutes without BSA.
- Activation occurs even if PUFAs are subperfused from the inner leaflt of the membrane, independently of the involved membrane curvature.

"Clinical significance ?"

- Activation of TREK-1 is known to be cardioprotective and neuroprotective and a better characterization of the mechanism of action of its activation can bring new perspective.

ABSTRACT

BACKGROUND AND PURPOSE

TREK-1 is a mechanosensitive channel also activated by polyunsaturated fatty acids (PUFAs). TREK-1 activation by PUFAs is supposed to be linked to changes in membrane tension following PUFAs insertion. Their ability to insert into the membrane increase with their hydrophobicity and thus the length of the carbon chain.

EXPERIMENTAL APPROACH

In this study, we compared the effect of multiple fatty acids and ML402 in both whole-cell and inside-out configurations of the patch-clamp technique.

KEY RESULTS

First, we showed a variable TREK-1 activation by PUFAs related to the variable constitutive activity of TREK-1. Then, we observed no correlation between TREK-1 activation and acyl chain length or number of double bonds suggesting that the bilayer-couple hypothesis cannot explain by itself the activation of TREK-1 by PUFAs. The membrane fluidity measurement is not modified by PUFAs at 10 μM. The spectral shift analysis in TREK-1-enriched microsomes indicates a $K_{D,TREK1}$ at 44 μM of C22:6 n-3. PUFAs display the same activation and reversible kinetics than the direct activator ML402 and activate TREK-1 in both whole-cell and inside-out configurations of patch-clamp suggesting that the binding site of PUFAs is accessible from both sides of the membrane, as for ML402.

CONCLUSION AND IMPLICATIONS

Finally, we proposed a two steps mechanism for TREK-1 activation by PUFAs: first, insertion into the membrane, with no fluidity or curvature modifications at 10 μM, and then interaction with TREK-1 channel to open it.

INTRODUCTION

Potassium channels have a crucial role in the electrical activity of excitable cells such as neurons and cardiomyocytes. Some of these potassium channels are common drug targets modulating the action potential shape and consecutively organs functions. Among the K^+ channels, members of the two-pore domains K^+ channels family (K2P) are involved in the repolarization phase of action potential and in the resting membrane potential (Kelly *et al*, 2006). K2P family includes 15 members classified in 6 functional subfamilies: TWIK (Tandem of pore domains in a Weak Inward rectifying K channel), TREK (TWIK-Related K channel), TASK (TWIK-related Acid Sensitive K channel), TALK (TWIK-related Alkaline pH-activated K channel), THIK (Tandem pore domain Halothane-Inhibited K channel), TRESK (TWIK-Related Spinal Cord K Channel). K2P channels share common structural features, each subunit containing two-pore domains (P1, P2) and four putative transmembrane segments (M1-M4) (Honoré, 2007). The dimerization of K2P channels allows the formation of the canonical K^+ selective pore domain. TREK-1 channel, one of the three members of the TREK subfamily with TREK-2 and TRAAK, has been discovered in 1996 by Fink *et al*. The gating of TREK-1 channel is poly-modulated by a wide range of physical and chemical stimuli including mechanical stretch, temperature, voltage, pH changes, pharmacological agents and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). This channel is widely studied since its activation is involved in neuroprotection (Lamas & Fernández-Fernández, 2019), cardioprotection (Kamatham *et al*, 2019), analgesia (Li & Toyoda, 2015) and reduced epilepsy crisis (Heurteaux *et al*, 2004). In the majority of these diseases, the protection afforded by TREK-1 activation is due to the hyperpolarization of the membrane potential (Djillani *et al*, 2019)

Among the wide diversity of TREK-1 modulators, PUFAs have been shown to behave as strong activators (Patel *et al*, 1998; Danthi *et al*, 2003). PUFAs are amphipathic molecules with a hydrophilic carboxyl head and a long hydrophobic chain of carbons and multiple double bonds.

The two main classes of PUFAs are n-3-PUFAs and n-6-PUFAs based on the position of the first double bond from the carbon ω starting at the methyl extremity. Numerous studies suggest that n-3-PUFAs, such as docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), exert antiarrhythmic properties through the modulation of ionic channels and consequent membrane hyperpolarization (Kang & Leaf, 1994, 1996). Such hyperpolarization could be consecutive to TREK-1 activation as it is largely expressed in the myocarde(Wiedmann *et al*, 2021; Bechard *et al*, 2022). Since TREK channels are mechano-sensitives, the comparison of the effects of different PUFAs on TRAAK (Fink *et al*, 1996) suggests that PUFAs can insert inside the membrane inducing an increase in membrane fluidity (Leifert *et al*, 1999) that in turn modifies membrane curvature and tension (Sheetz and Singer., 1974). In fact, TRAAK is very likely to be activated by PUFAs through this mechanosensitive pathway since the activation is related to the acyl chain length and to the number of double bonds (Fink et al., 1998; Maingret *et al*, 1999; Patel et al., 2001; Honoré, 2007). However, while it is known that PUFAs also activate TREK-1 channel, no study has compared the effects of different PUFAs on TREK-1 to determine a potential mechanism of action. In this study, we performed a thorough comparison of the effects of 9 PUFAs (from 18 to 22 carbons with 2 to 6 double bonds) and 2 other C18 FA (mono-unsaturated and saturated) on the TREK-1 current (I_{TREK-1}). We report that there is no correlation between the acyl chain length and TREK-1 activation, as for the PUFAs-induced membrane fluidity. Then, the comparison of the effects of PUFAs and ML402, a direct activator of TREK-1 binding within a cryptic pocket behind the selectivity filter (Lolicato *et al*, 2017), suggests that there is a at least one binding site for PUFAs on TREK-1 channel. This hypothesis is reinforced by the affinity protein-PUFA test performed in TREK-1 enriched-microsomes using the nanotemper technology, but the precise binding site remains to be determined in further studies.

RESULTS

TREK-1 channel activation by PUFAs does not depend of acyl chain length

As previously described,TREK-1 channel is activated by PUFAs, such as arachidonic acid (AA, C20:4 n-6) (Patel *et al*, 1998), LA (Danthi *et al*, 2003) or DHA (Ma & Lewis, 2020). In our hands, the average membrane potential (Em) of HEK hTREK-1 cells was -69.2 ± 0.7 mV (mean ± SEM) (**Fig 1D**, n=130), with a variable initial current density of 15.3 ± 1.2 pA/pF (n=130) at 0 mV. During PUFA superfusion, the current density elicited by voltage ramp from -100 mV to +30 mV progressively increased until a steady-state was reached (**Fig 1A and 1B**). When TREK-1 is activated, Em hyperpolarized to -81.7 ± 0.3 mV (**Fig 1D**, n=130), close to the theorical equilibrium potential of K^+ ions (E_K = -86.5 mV). In order to determine wether the variability of the initial current density (I_0) was related to a variability of TREK-1 channel activity in initial condition, we superfused an inhibitor of TREK-1 channel, Norfluoxetine (NrFlx) at 10 µM. As the initial current was significantly decrease from 8.8 ± 2.2 pA/pF to 3.7 ± 0.9 pA/pF (p-value=0.02; n=5) when Norfluoxetine was applied and as the characteristic outward rectification of I_{TREK-1} was lost, we concluded that I_0 was carried out mostly by TREK-1 channel (**Fig 1C**).

To investigate the importance of the acyl chain length and double bounds, we compared the response of 9 PUFAs with various chain lengths, from 18 to 22 carbons with different number of double bounds, from 2 to 6 unsaturations and one mono-unsaturated fatty acids (C18:1 n-9) (**Table 1**). We plotted the relationship between current density at 0 mV in the presence of unsaturated fatty acids (I_{PUFA}) normalized to the initial current density (I_0) (this normalized parameter corresponds to the current fold-increase (I_{PUFA}/I_0)) and the number of carbons on the acyl chain. As shown in **Fig 1E**, there is no statistical correlation between unsaturated fatty acid activation I_{PUFA}/I_0 and the acyl chain length (Spearman correlation test : p-value = 0.10), as for the current density of TREK-1 channel after PUFA perfusion (Spearman correlation test : p-

value = 0.33) (**Fig 1G**). We then plotted the relationship between I_{PUFA}/I_0 at 0 mV or current density in response of PUFA perfusion and the number of double bounds in the acyl chains and observed a positive correlation between the number of double bounds and the I_{PUFA}/I_0 (**Fig 1F,** Spearman correlation test : p-value = 0.04, r = 0.67**).** However, this potential relationship was not confirmed by the simple linear regression test (p-value = 0,12). Moreover, no correlation was observed between the number of double bounds in the acyl chains and I_{PUFA} (**Fig 1H**; Spearman correlation tests: p-value = 0.25). These statistical analysis reveal that there is at least no relationship between the effect of unsaturated fatty acids on TREK-1 and the acyl chain length and that a potential relationship existing with the number of double bonds requires further investigationsAccordingly, the most potent activators were both one of the shortest one, C18:2 n-6 (I_{PUFA}/I_0 = 24.8 ± 3.3; current density = 353.7 ± 22.4 pA/pF), and one of the longest one, C22:6 n-3 (I_{PUFA}/I_0 = 29.8 ± 4.4; current density = 276.8 ± 24.5 pA/pF). Conversely, C18:2 n-6 is one of the most potent activator but C18:3 n-3 failed to activate TREK-1 channel (I_{PUFA}/I_0 = 1.4 ± 0.1; Current density = 20.7 ± 4.2 pA/pF). Like C18:3 n-3, the saturated stearic acid (C18:0) had no effect on TREK-1 while the mono-unsaturated C18:1 n-9 produced a 7.4 ± 1.9-fold increase of I_{TREK-1} (n=12, **Table 1**). However, statistical analysis failed to discriminate the PUFA's effects (I_{PUFA}/I_0 parameters compared with a nonparametric kruskall-wallis test) probably due to the important variability of the effects.

The variability in PUFA responses is related to the variable initial current density

Despite an important number of cells studied, we observed a large variability of the TREK-1 current activation by PUFAs illustrated in **Fig 2A**. The severity of the inclusion criteria (see Material and Methods section) suggests that the variability observed in PUFAs responses is inherent to TREK-1 channel.

Fig 2A illustrates the large variability of PUFA effects based on the fold-increase analysis (I_{PUFA}/I_0).We demonstrated that the variability of the I_{PUFA}/I_0 parameter resulted from the variability of the initial current I_0 but not from the current density at steady-state after the application of the PUFAs (I_{PUFA}) (**Fig 2B**). Indeed, the calculation of the coefficient of variation ($CV = \frac{SD}{Mean}$) confirmed that the dispersion of the I_{PUFA}/I_0 calculation is higher than the dispersion of the I_{PUFA} at steady-state of the activation (**Fig 2C**). Thus, CV modification is in accordance with the hypothesis that the variability of I_0 is responsible of the variability of the I_{PUFA}/I_0 parameter.

To better characterize the relationship between I_0 and I_{PUFA}/I_0, we plotted the fold-increase of TREK-1 current (I_{PUFA}/I_0, Y axis) as a function of the initial current (I_0, X axis). As shown in **Fig 3A,** there is a non-linear relationship between I_{PUFA}/I_0 and I_0. This relationship can be linearized by log-transforming the data (Log10) (**Fig 3B**). Thus, the effects of all PUFAs but C22:5 n-3 depends on I_0, independently of the absolute amplitude of I_{PUFA}. Therefore, there is a negative relationship between Log10(I_{PUFA}/I_0) and Log10(I_0): C18:2 n-6 (R^2=0.82, p-value=0.0001), C20:2 n-6 (R^2=0.66, p-value=0.0271), C20:4 n-3 (R^2=0.80, p-value=0.0001), C20:4 n-6 (R^2=0.50, p-value=0.0023), C20:5 n-3 (R^2=0.53, 0.0008), C22:5 n-6 (R^2=0.84, p-value=0.0001) and C22:6 n-3 (R^2=0.68, p-value=0.0001) (**Fig 3B, Table 2**). To determine if the observed variability is due to the cellular model that we use, or not, we also used two other models: another stable model of TREK-1 overexpression (Andharia *et al*, 2017) and transiently transfected HEK 293T cells with TREK-1 (pIRES2 *KCNK2* WT) (**Figure 3C**). The I_{PUFA}/I_0 variability observed can be explained by the variety of constitutively active TREK-1 channels at resting condition.

Thanks to the linear regression analysis, we obtained the Y-intercept which reflects the fold-activation of TREK-1 current for an unitary current (Log(1)=0). The Y-intercept of DPA n-3 cannot be calculated since there was no correlation between I_{PUFA}/I_0 and I_0. For the 7 others

PUFAs, the Y-intercept values allow their separation into 3 groupes with the following activation sequence : C22:6 n-3, C22:5 n-6, C18:2 n-6 > C20:5 n-3, C20:4 n-6 > C20:4 n-3, C20:2 n-6 (**Table 2**). Then, plotting the relationship between Y-intercept (Y axis) and the number of carbons (X axis) reveled once again that there is no correlation between the fold-activation of TREK-1 and the acyl chain length of PUFAs (**Fig 3D**). There is also no correlation with the number of double bounds (**Fig 3E**). In conclusion, TREK-1 activation by PUFAs is definitively not dependent of the acyl chain length and the number of double bond (**Fig 1D-G** and **Fig 3D-E**).

Variable activation rate suggests different binding affinities of PUFAs for TREK-1 channel

To explore a new way of action of PUFAs on TREK-1 channel, we analyzed and compared the kinetics of activation of TREK-1 perfusing PUFAs or ML402, a binding activator of TREK-1. **Fig 4A to C** represent the mean ± SEM of the normalized current densities ($\frac{I-I_0}{I_{PUFA}-I_0}$) over the time in response to PUFA n-6, PUFA n-3 and ML402, respectively. Representative traces of current densities activation are presented on the right panels. The steady-state of activation was reached after 3 successive stable traces. The half-activation of TREK-1 by each PUFA and ML402 are presented in the **Table 3**. We were able to distinguish at least two types of activation rate, a fast one with an half-activation less than 3 min (C18:2 n-6, C22:6 n-3 and ML402) and a slower one above 3 min (C20:2 n-6, C20:4 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-6 and C22:5 n-3). The **Fig 4D** shows that there is no statistical correlation between the acyl chain lengh, and thus their ability to incorporate into the membrane, and the half-activation (Spearman correlation test : p-value > 0.99). As reported in **Table 3**, the averaged half-activation of TREK-1 channel was lower for C18:2 n-6 and C22:6 n-3, both having comparable kinetics to those observed for ML402. Although there were no significant differences between these three

compounds and C22:5 n-6 and C20:5 n-3, the kinetics of the latters appeared slightly slower (**Fig 4A, B and D, Table 3**). In contrast, C20:4 n-3, C20:4 n-6 and C22:5 n-3 had slower kinetics with an averaged half-activation close to 4 min (**Table 3**). Since C18:2 n-6 and C22:6 n-3 have the same fast activation and C22:5 n-3 has the slowest one, we assumed that the activation rate of the TREK-1 by PUFAs does not depend on the acyl chain length (**Fig 4D**). However, among the PUFAs, there is a negative correlation between the half-activation (min) and the fold-increase of TREK-1 current (I_{PUFA}/I_0) (Spearman correlation test : p-value = 0.002 and r = -0.93; **Fig 4E**). As the stronger activators are the faster activators of TREK-1, we proposed that some PUFAs, as C18:2 n-6 and C22:6 n-3 have a higher binding affinity for TREK-1 which would allow them to activate it faster and stronger.

Activation of TREK-1 channel by PUFAs is fully reversible.

To see if the activation of TREK-1 channel by PUFA is due to an insertion and thus a modification of membrane tension, we looked at the reversibility kinetic with extracellular medium free of Bovin Serum Albumin (BSA). We focused on C18:2 n-6, C20:5 n-3 and C22:6 n-3, the most potent activators of C18, C20 and C22 PUFAs, respectively (**Table 1**). ML402 activation reversed immediately and 50% of effective reversibility occurred in less than 1 min (**Fig 5A and 5B**). C20:5 n-3, had a kinetic of washing (washout time 50%: 0.9 ± 0.1 min) comparable to ML402 (**Fig 5A and 5B**). Even though the washout of C18:2 n-6 and C22:6 n-3 was slower than ML402 (washout time 50%: 2.4 ± 0.2 min, 3.7 ± 0.3 min and 0.4 ± 0.04 min, respectively) , PUFAs effect were also fully reversed under washing. Once again, there is no correlation between the acyl chain length (**Fig 5C**, Spearman correlation tes: p-value > 0.99) or the number of double bounds (**Fig 5D**, Spearman correlation test: p-value > 0.99) and the time to have 50% of effective reversibility of the TREK-1 activation. C18:2 n-6 and C22:6 n-3, that activated TREK-1 at least twice more than ML402 (I/I_0: 24.8 ± 3.3, 29.8 ± 4.4 and 9.6 ± 0.9,

265 respectively), had a total reversibility in few minutes. At this point, we cannot exclude a
266 membrane insertion of PUFAs, but we assume that the main effects of PUFAs on TREK-1
267 activation could be a direct and reversible interaction of PUFAs with the channel as it is known
268 for KCNQ1 (Liin *et al*, 2015) and for the Shaker H4 Kv channel (Börjesson *et al*, 2008)
269
270 **Alteration of membrane curvature or fluidity did not explain activation of TREK-1**
271 **channel by PUFAs.**
272 In order to evaluate the membrane curvature and tension effects on the PUFAs-induced TREK-
273 1 activation, we performed experiments in the inside-out configuration of the patch-clamp
274 technique (+30 mV, symmetrical condition: 145 mM KCl). In this configuration, we were able
275 to superfuse molecules at the inner face of the membrane and PUFAs must induce a curvature
276 of the membrane opposite to the one obtained in the whole-cell configuration. As shown in
277 **Figure 6A**, ML402 superfusion at the inner face of the membrane induced a reversible increase
278 of TREK-1 current (**Table 4**). Kinetics of activation and reversibility were comparable to those
279 obtained in the whole-cell configuration (**Fig 4** and **Fig 5**) suggesting that the ML402-binding
280 site is accessible from the outer and the inner leaflet of the membrane. Interestingly, a
281 comparable reversible activation of TREK-1 channel was obtained for C18:2 n-6 and C22:6 n-
282 3 5 μM, suggesting that the membrane curvature is not involved in the activation of TREK-1
283 channel by PUFAs (**Fig 6B** and **6C, Table 4**).
284 Then, we assessed the membrane fluidity changes during PUFAs application with a
285 pyrenedecanoic acid probe (PDA), analog to lipids. By measuring the ratio of PDA monomer to
286 excimer fluorescence (405nm/470nm ratio), a quantitative assesment of the membrane fluidity
287 can be obtained at different time points by following the ratio modification over time (F/F_0-1).
288 We focus our experiments on C18:2 n-6 and C22:6 n-3 which are the stronger activators of
289 TREK-1 and C18:3 n-3 that failed to activate TREK-1. These 3 PUFAs at 10 μM did not

modify the membrane fluidity even after 50 minutes of application, while at 100 µM they induced a decrease of F/F_0-1 from T_0 compared to the control condition (basic extracellular medium). These results indicate that membrane fluidity is not modified by PUFAs at 10 µM (**Fig 7A-C**), at least within 50 minutes of application. In addition, given that TREK-1 activation starts at 1 minute of perfusion of C18:2 n-6 and C22:6 n-3 10 µM (**Fig 4**) it is unlikely that PUFA effects on TREK-1 activation are due to an increase in membrane fluidity. Altogether, these data suggest that at least both C18:2 n-6 and C22:6 n-3 PUFAs activate TREK-1 channel by direct interaction with TREK-1 protein and not by a modification of the membrane fluidity.

DHA interacts directly with TREK-1 channel protein in TREK-1 enriched microsomes

In order to assess a potential direct PUFA-TREK-1 interaction, we purified microsomes from hTREK-1/ HEK and native HEK 293T cells and labeled lysine residues of the total proteins to perform affinity measurements using Spectral Shift (SpS). A serial dilution of C22:6 n-3 was performed over 16 points (from 1 mM to 1.5 nM) and mixed with labeled microsomes from "hTREK-1/ HEK" or "native HEK 293T" cells. In individual serial dilution, each of the 16 points was mixed with labeled microsomes derived from the same batche of microsomes. Data of the affinity curve are expressed as mean ± SEM of 5 to 9 experiments from different batches of microsomes of "hTREK-1/ HEK" and "native HEK 293T" cells. TREK-1 protein quantity is constant within the 16 samples from microsomes from hTREK-1/ HEK. At first glance, we observed similar affinity from C22:6 n-3 in these two type of microsomes : $K_{d,TREK-1}$ ~ 50 µM and $K_{d,HEK}$ ~ 100 µM highlighting a similar mode of association of C22:6 n-3 within the microsomes. However, the SpS signal displayed subtle differences according to whether or not microsomes were enriched in TREK-1 protein. Knowing SpS signal rises from fluorescence recorded by two individual channel, and having a strong reproducibility from each condition, we can derive the following assumption:

(1) $I_\lambda(\mathrm{TREK1, HEK}) = I_\lambda(\mathrm{TREK1}) + I_\lambda(\mathrm{HEK})$

Where for each individual wavelength ($\lambda_{670\ nm}$ and $\lambda_{650\ nm}$), the fluorescence recorded for the TREK-1-enriched microscomes (I_λ(TREK1, HEK)) correspond to both the fluorescence from the labelled empty microsomes (I_λ(HEK)) and from the labelled TREK-1 (I_λ(TREK1)).

Being able to isolate the specific fluorescence associated to TREK-1 ($I_\lambda(\mathrm{TREK1})$) within the TREK-1-enriched microsomes ($I_\lambda(\mathrm{TREK1, HEK})$), we can use individual channel for further calculation using **equation 2**, isolating the SpS signal associated only to TREK-1 by normalizing out the background signal coming for the free microsomes.

(2) $R(\mathrm{TREK1}) = \frac{I_{670}(\mathrm{TREK1,HEK}) - I_{670}(\mathrm{HEK})}{I_{650}(\mathrm{TREK1,HEK}) - I_{650}(\mathrm{HEK})}$

When performing so, the specific TREK-1 dose-response gives a K_d = 44 µM for C22:6 n-3 (**Fig 8**). Despite displaying similar affinities, the TREK-1-enriched microsomes shows a statistically better affinity than the microsomes themselves. However, it is worth noticing only a 2-fold increase of affinity, which may highlight a similar binding mode for both interactions. Altogether, this suggests an interaction mediated by the lipid bilayer, such as a membrane insertion followed by interaction with TREK-1 channel.

DISCUSSION

TREK-1 channel activation by PUFAs does not involve mechano-sensitivity but a direct interaction

In this study, we reported that TREK-1 channel is reversibly activated by polyunsaturated fatty acids (PUFAs), as already shown in different studies, each being focused mainly on one PUFA

343 : AA (Patel *et al*, 1998); LA (Danthi *et al*, 2003); DHA (Ma & Lewis, 2020). Our study is the
344 first to compare the effects of different PUFAs having between 18 to 22 carbon atoms and 2 to
345 6 double bonds on TREK-1 channel. We demonstrate that C22:6 n-3 and C18:2 n-6 are the
346 most potent activators of TREK-1 with an activation as fast as the one of the direct activator
347 ML402 and a fully reversibility. This finding shows that TREK-1 behaves differently of
348 TRAAK that is weakly activated by C18:2 n-6 (Finke et al, 1998).
349 TREK subfamily of K2P channels that includes TREK-1, TREK-2 and TRAAK, is
350 characterized by a mechano-sensitivity and therefore, channels could feel changes in the
351 membrane curvature induced by PUFAs insertion as for CPZ (Patel et al., 1998). As PUFAs
352 are anionic amphipath compounds, with a hydrophilic carboxyl group and a lipophilic tail, they
353 preferentially insert into the outer leaflet of the membrane which is positively charged
354 (Martinac *et al*, 1990; Sheetz & Singer, 1974). Thus, the longer the lipophilic carbon chain is,
355 the more the PUFAs will be inserted into the membrane, modifying the local membrane
356 biophysic properties (curvature and fluidity) (Leifert *et al*, 1999). Also, for a given carbon chain
357 length, the fluidity increases with the number of double bonds. According to the bilayer-couple
358 hypothesis, PUFA effects on TREK subfamily channels were supposed to be due to a
359 modification of biophysic properties of the membrane leading to an increase of the tension
360 transmitted to the channels (Patel *et al*, 1998). The study of the TRAAK channel activation by
361 PUFAs (C18:2 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:6 n-3) in the excised patch configuration shows
362 that TRAAK activation is positively correlated with the carbon chain length of PUFAs and the
363 number of double bonds (Fink *et al*, 1998; Patel *et al*, 2001). However, in the present study, we
364 found no statistical correlation between the acyl chain length and the potentiation of I_{TREK-1}. In
365 the opposite, C18:2 n-6 and C22:6 n-3, respectively the shortest and the longest PUFA tested,
366 are the most potent activators of TREK-1 channel. It is worth to note that C18:3 n-3, which
367 differs only by one double bond from C18:2 n-6, failed to activate TREK-1 channel. Also,

C22:6 n-3 having the same number of carbons than C22:5 n-3 is more than twice as effective in activating TREK-1. PUFAs having intermediate acyl chain length produce intermediate activation of TREK-1, in the same range as the direct activator ML402, independently of the double bonds number. In that respect, the bilayer-couple hypothesis suggesting an activation of TREK-1 by PUFAs-induced mechanosensitive pathway is not appropriate. Similar results were obtained in the literature on TREK-2 channel study, C20:4 n-6 being less efficient than C22:6 n-3 and C18:2 n-6 (Lesage *et al*, 2000).

To better characterize the mechanism of action of C22:6 n-3 and C18:2 n-6 on TREK-1, we compared their kinetics of activation and reversibility with those of ML402. ML402 is a direct activator of TREK-1, binding within a cryptic pocket behind the selectivity filter that directly stabilize the C-type gate (Lolicato *et al*, 2017). The activation kinetic of TREK-1 by C22:6 n-3, C18:2 n-6 and ML402 are comparable and faster than the other PUFAs. This suggests a possible interaction of C22:6 n-3 and C18:2 n-6 with the channel like the activator ML402 (Lolicato *et al*, 2017) and the inhibitor norfluoxetine (Dong *et al*, 2015). This hypothesis is reinforced by the inside-out experiments where C22:6 n-3, C18:2 n-6 and ML402 were applied on the inner leaflet of the membrane. Although the PUFA insertion must induce opposite curvartures while they insert from the inner (inside-out configuration) or the outer leaflet (whole-cell configuration), they still activate TREK-1 channel. We finally propose that at least C22:6 n-3 and C18:2 n-6, like ML402, interact with the channel on an accessible site from both the inner and the outer leaflet of the cell, and suggesting a binding site accessible through the lipid bilayer. Studies have already hypothesized that arachidonic acid (C20:4 n-6) could act directly by interacting with the channel (Maingret *et al*, 1999, 2000) and others have already shown that free PUFAs can directly interact with ionic channels. Indeed, C22:6 n-3 and C18:3 n-6 interact with $K_v7.1$ (*KCNKQ1*)(Liin *et al*, 2015; Yazdi *et al*, 2021). PUFAs also interact with Shaker H4 Kv channel closed to the voltage-sensor domaine through the negatively

charged carboxyl group (Börjesson *et al*, 2010; Börjesson & Elinder, 2011; Börjesson *et al*, 2008). As TREK-1 lacks a canonical voltage-sensor domain, we can hypothesize that there is another lipophilic binding site in TREK-1 interacting with the carboxyl head of PUFAs. This hypothetical PUFA binding site on TREK-1 does not correspond to the binding site of ML402 since its mutation does not prevent activation by C20:4 n-6 (Lolicato et al., 2017). Moreover, since the steady-state of TREK-1 activation by PUFA and ML402 was reached in a range of the minutes, we suggest that the PUFAs binding-sites have a limited access (Maingret *et al*, 2000). It has to be noted that bovine serum albumin (BSA) is not required to get a full reversibility during the washout as it is supposed to be when the effects are due to membrane insertion of the PUFAs (Kang & Leaf, 1994; Leifert *et al*, 1999).

Finally, in both whole-cell and inside-out configurations, the reversibility kinetics of PUFAs were immediate and the initial current recovered in few minutes. Despite a total reversibility of the TREK-1 activation under washout, we cannot definitively exclude a membrane insertion of PUFAs owing to their lipophilic properties. Nevertheless, if PUFAs insert into the membrane, they do not modify measurably the biophysic properties of the membrane (fluidity or curvature) at 10 µM over a 50 min periode whereas TREK-1 is fully activated by PUFAs in few minutes. Affinity measurements between PUFAs and TREK-1-enriched microsomes effectively indicates a potential binding with the lipid bilayer as observed for the empty microsomes. However, once the signal due to PUFA interaction with the bilayer is subtracted from the total signal, a direct binding of PUFAs to TREK-1 is measurable. This specific interaction displays a stronger affinity ($K_{D,TREK-1} \sim 44$ µM) than the simple signal involving PUFA binding with the bilayer of the microsomes. Therefore, we propose two mechanisms acting together to increase I_{TREK-1}: (1) PUFA insertion into the membrane, with no modification of its biophysic properties over few minutes at 10 µM concentration or less, is probably recquired to reach (2)

a lipophilic binding site on TREK-1 channel accessible through the lipid bilayer as for the Shaker channel (Börjesson & Elinder, 2011)

Initial TREK-1 variability influences PUFAs response

An unexpected result of this study is the observation that the PUFA effects depend on the TREK-1 initial current. This variability in initial I_{TREK-1} might have many origins such as different levels of post-translationnal modifications, different channels recruitment into the membrane or even the presence of 2 different conductances of TREK-1 channel at the single channel level (Xian Tao Li *et al*, 2006; Andharia *et al*, 2017). A comparable variability in the current-fold increase induced by PUFAs was already observed for TREK-1 activation by AA (Maingret *et al*, 2000), TRAAK (Fink *et al*, 1998; Patel *et al*, 2001) and TREK-2 (Bang *et al*, 2000; Lesage *et al*, 2000) but never explained.

It is important to note that all these studies were performed on COS-7 cells or HEK-293 cells where mammalian post-translational modifications exist. In the study of Ma and Lewis in 2020, whole-cell recording of TREK-1 and TREK-2 by arachidonic acid were performed in oocytes (*Xenopus Laevis*) and no such variability in the current fold-increase was observed. It is known that in this heterologous expression model, post-translational modification are different (Mantegazza *et al*, 2010). Therefore, the possibility that constitutive TREK-1 current varies according to the phosphorylation level (or other modifications) and influence the effects of PUFAs should be taken in consideration. It is known that TREK-1 channel is modulated by intracellular signalling pathways, related to PKA, PKC and PKG signalizations (Koh *et al*, 2001; Murbartián *et al*, 2005; Honoré, 2007), but to the best of our knowledge, no study between PUFA activation of TREK-1 and phosphorylation levels has been performed so far. As a consequence of this variability, to study the effect of an activator of I_{TREK-1}, we need a sufficient number of cells to apply the Y-intercept of the regression line, probably the best

indicator of the degree of activation of TREK-1. The existence of such variability should be taken into consideration in pathophysiological studies associated with variability of expression or response, potentially demultiplying the heterogeneity of TREK-1 response to activators.

Surprisingly, one of the most efficient activator of TREK-1 channel is C18:2 n-6. As TREK-1 is expressed in cardiomyocytes (Li & Toyoda, 2015; Kelly *et al*, 2006; Decher *et al*, 2017) C18:2 n-6 should modulate action potential shape and resting membrane potential.This suggests that C18:2 n-6 could display potent cardio as well as neuroprotective effects. If anti-arrhythmic properties of omega-3 PUFAs have been thoroughly studied (Kang & Leaf, 1994, 1996; Siscovick *et al*, 2017), the potential anti-arrhythmic effect of omega-6 PUFAs such as C18:2 n-6 has never been considered. C18:2 n-6 can be found in vegetarian and Mediterranean diets, both diets having cardioprotective vertues (de Lorgeril *et al*, 1994; Barnard *et al*, 2019). In both cases the beneficial effects are attributed to the presence of anti-oxidant molecules and C18:3 n-3 but a possible beneficial effect of C18:2 n-6 has never been explored.

CONCLUSION

To conclude, there is no relationship between the carbon number of the acyl chain, the number of double bonds and the activation of TREK-1 channel. Its most potent activators are C18:2 n-6 (linoleic acid) and C22:6 n-3 (docosahexaenoic acid) and kinetics analysis suggest a direct interaction of PUFAs on TREK-1 through a lipophilic binding site. This direct activation of PUFAs in TREK-1 could require the membrane insertion of PUFAs to facilitate the access to the binding site in the channel.

MATERIEL AND METHODS

Cell culture

We used a HEK-293T cell line for spectral shift mesurement and two HEK/hTREK-1 cell lines that stably overexpress the human TREK-1 channel subunit (Moha ou Maati *et al*, 2011; Andharia *et al*, 2017) for electrophysiological experiments and spectral shift mesurement. Cells were grown in an atmosphere of 95% air/5% CO2 in Dulbecco's modified Eagle's medium and Glutamax (Invitrogen, Cergy- Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum and 0.5 mg/mL G418 to maintain a selection pressure in the HEK/hTREK-1 cell line.

The transient expression of TREK-1 was performed in the HEK 293T cell line. The pIRES2 plasmid in which the coding sequence of TREK-1 (pIRES2 *KCNK2* WT) was inserted, was transfected in HEK 293T cells using the jetPEI® kit (Ozyme) and following the manufacturer protocol. Briefly, 48h before electrophysiological experiments, cells were transfected with a mix of the water-soluble polymer jetPEI® with DNA at 6 ng/mL and then seeded in 35x10 mm dishes (Falcon) in presence of 0.5 mg/mL of G418

Electrophysiology

Currents were recorded from hTREK-1/HEK-cells using the patch-clamp technique in whole-cell recording (WCR) configuration and in inside-out (IO) configuration. Patch pipette having 2.5-4 MΩ resistances (WCR) and 5-7 MΩ resistances (IO) were obtained from borosilicate glass capillaries by using a two-stage vertical puller (PC- 10, Narishige, London, UK). Current acquisition was performed with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instrument, Sunnyvale, CA, USA) and low-pass filtered at 5 kHz (WCR) and 2 kHz (IO). Data were digitalized with a digidata 1550B (Axon Instrument, Sunnyvale, CA, USA) at 10 kHz. The pClamp10.7 (Axon Instrument) software was used to impose stimulations protocols and record TREK-1 current. In WCR, cells were kept for experiments if the series resistance were lower than 8 MΩ, the membrane capacitance between 20 and 35 pF.

The experiments were performed at room temperature (~22 °C). Cells were continuously superfused with a extracellular medium and modulatory compounds at a rate of 1-1.5 mL/min. The dishes volume was kept constant at 2.5-3 mL using a vacuum system, connected to a peristaltic pump (ISMATEC). Using different extracellular potassium concentrations (5 mM KCl or 15 mM KCl), changes in membrane potential were measured in current-clamp allowing to determine the time to change completely the medium around the patched-cells (Le Guennec & Noble, 1994). A complete change of the extracellular medium around the patched-cell occurred in less than 15 seconds.

Whole-cell recording : the extracellular medium consisted of (in mM): 150 NaCl, 5 KCl, 3 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$ and 10 HEPES pH adjusted to 7.4 with NaOH. The pipette solution consisted of (in mM): 155 KCl, 3 $MgCl_2$, 5 EGTA and 10 HEPES, pH adjusted to 7.2 with KOH. Cells were clamped at a holding potential of -80 mV and superfused with the extracellular medium for over 1 min before the initial current (I_0) recording. Cells were hyperpolarized to -100 mV for 50 ms and then the macroscopic outward TREK-1 current was elicited with an 800 ms voltage ramp protocol from -100 mV to +30 mV every ten seconds (see the ramp protocole in **Fig 1A**). Thus, the evolution of the current amplitude changes during compound superfusion was followed in real time (**Fig 1B**). A minimum of 3 min superfusion was applied even when the tested compound showed no effect and the superfusion condition was switched once a steady-state was reached. In the case where the tested compound had no effect, a positive control of the TREK-1 activation was performed with 10 µM docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3).

Data analysis (WCR): Once at steady-state, the current amplitude at 0 mV during the voltage ramp was measured from the average of the last 3 sweeps over a delta of 1 mV (-0,5 mV to 0,5 mV) to get out of the noise. Current amplitudes are expressed in current densities (pA/pF) to

reduce the variability due to cell size. Activation an washout kinetics were followed at 0 mV. The activation kinetics from each cell of each compound (PUFAs and ML402) was fitted with a sigmoidal equation (**Fig 5**):

$$\textbf{(3)}\ I_t = I_0 + \frac{(I_{PUFA} - I_0)}{1 + e^{\frac{t_{50} - t}{slope}}}$$

where I_0 is the initial current and I_{PUFA} is the current caused by PUFA or ML402 at 10 µM concentration. The activation rate (min^{-1}) was then calculated as : activation rate = $\frac{1}{Slope}$.

Inside-out configuration: bath medium contained (in mM) : 140 NaCl, 4.8 KCl, 1.2 $MgCl_2$, 10 glucose, 10 HEPES, pH adjusted to 7.4 with NaOH. After excising the membrane patch, the bath medium was replaced by the a medium identical to the pipette medium consisted of (mM): 145 KCl, 1.2 $MgCl_2$, 10 glucose, 10 HEPES, pH adjusted to 7.2 with KOH. Cells were clamped at a holding potential of 0 mV, the theorical equilibrium potential for K^+ ions in this condition. Then, the amplitude current was followed at +30 mV in real time during the perfusion of compounds and the washout.

Membrane fluidity experiments

Membrane fluidity was assessed using the pyrenedecanoic acid probe (PDA), a probe analog to lipids that incorporates into the cell membrane. The probes in the membrane form monomers and excimers, with a rate of excimer proportional to the membrane fluidity. Under PUFAs (C18:2 n-6, C18:3 n-3, C22:6 n-3) application at 10 µM and 100 µM, we measured the emission spectrum of the PDA: 470 nm for the excimers and 400 nm for the the monomers. The monitoring of the fluorescent ratio 470/400 nm shift over time with PUFAs allowed a quantitative monitoring of the membrane fluidity changes due to PUFAs insertion into the membrane. Briefly, HEK/hTREK-1 cells were grown in culture in glass bottom culture dishes (MatTek, Ashland, U.S.A). Before fluorescent experiment, adherent HEK/hTREK-1 cells were

incubated 1h at room temperature in the dark with 5 µM of the fluorescent lipid reagent probe in buffer provided in the membrane fluidity kit (Abcam). After incubation, the unicorporated probes were removed by washing cells twice with the same extracellular medium that used for WCR experiments. Epifluorescence microscopic experiments were performed on a 40X lens using excitation light filter with a 370-mm dichroic filter (Zeiss). Emitted light were taken at 480±15 nm and 405±10 nm and the 480/405 nm ratio was calculated at intial time before PUFA application (T_0) and T_2 (2 min), T_4, T_6, T_8, T_{10}, T_{20}, T_{30}, T_{40}, T_{50} and T_{60}. The 470/400 nm ratio was calculated as the average ratio overs 5 s. Then, the 470/400 nm ratio was normalized as (F/F_0)-1 and represented over time (**Fig 7**) with F the ratio of fluorescence corresponding to a time T_t and F_0 the ratio corresponding to the T_0.

Microsomes preparation

Microsomes were obtained from the HEK/hTREK-1 cell line and from the HEK 293T cell line as control. Briefly, cells were cultured in T75 flasks until confluence.Then, cells were washed with PBS twice and centrifugated 5 min at 15,000 RPM. The pellet was lysed in a 20 mM PIPES buffer (300 mM Sucrose, 20 mM PIPES, pH 7 with NaOH). Membranes were then mechanically braked up using insulin syringe. Samples were centrifuged 20 min at 10,000 g at 4°C. Lysis protocol was repeated twice. The pellet was discarded and the supernatant containing plasma membrane and thus transmembrane proteins was ultracentifugated 1h at 32,000 RPM at 4°C (Optima^{TM}L-90K Ultracentrifuge, Beckamn Coulter; Rotor SW60Ti). The pellet containing microsomes was resuspended in 5 mM PIPES (300 mM Sucrose, 5 mM PIPES, pH 7.4 with NaOH) at a protein concentration adjusted to 25 mg/mL and conserved at -20°C 2 days before the spectral shift measurment.

Spectral shift measurement

Microsomes of HEK 293T cell lin and HEK/hTREK-1 cell line were used to evaluate the TREK-1-PUFAs interaction with HEK 293T microsomes as control. Briefly, the proteins contained in the microsomes were labeled on the lysine residues with a fluorescent dye (MO_L011 RED-NHS 2nd generation, NanoTemper Tehnologies GmbH) following the manufacturer protocol. The 20 µL at 600 µM of dye were used to labelled 200 µL of microsomes, thus leading to a final incubation volume of 200 + 20 µL. After 20 min of incubation, the 220 µL of labeled microsomes were applied to a gravity size exclusion B-column supplied in the kit, following the manufacturer protocol until etution. Labeled microsomes were eluted with 5 x 200 µL of the 5mM PIPES buffer. 5 fractions of 200 µL were collected in a clean Eppendorf. The first elution fraction contains the labeled microsomes while the last fractions contain more free dye. The fluorescence intensity of fraction 1, 2 and 3 were verified and fractions with a fluorescence count between 400 and 2,000, using 100% excitation power, were used for the experiment after a 10 min centrifugation at 16,000 g to avoid homogeneity problem. A serial dilution of C22:6 n-3 over 16 points following 1:1 pattern was set up and subsequently mixed with labeled microsomes and loaded into standard capillaries (NanoTemper Technologies GmbH). The total proteins concentration in microsomes was kept around 2,5 µg/mL whereas C22:6 n-3 was titrated from 1 mM to 30,5 nM. The read out was performed on a Monolith X instrument from NanoTemper Technologies GmbH. The samples were subjected to SpS and MST measurments and only SpS was analyzed due to the normalization requirments. The changes in the maxima emission wavelength following a ratiometric measurement upon protein-C22:6 n-3 complex formation was used to generate a binding curve as a function of C22:6 n-3 concentrations (Langer *et al*, 2022). The data were pulled from 9 and 5 individual repeat for the TREK-enriched microsomes and from HEK 293T microsomes respectively. Data processing and analysis were carried out using the MO.Control 3 software from NanoTemper Technologies followed by normalization as described in the

591 results section. All the data points presenting signs of irregularity were automatically discarded
592 upon merging the data, as documented in the software.

593 **Chemicals**

594 In this study we tested one direct activator of TREK-1, ML402, one saturated fatty acid, stearic
595 acid, one monounsaturated fatty acid, oleic acid, 9 different PUFAs having between 18 and 22
596 carbons and 2 to 6 double bonds (**Table 1**). All reagents are summarized in the reagents and
597 tools table. 10 mM stock solutions were prepared by dissolving PUFAs in absolute ethanol,
598 ML402 in DMSO. PUFAs and ML402 were stored at -80 °. 10 µM solutions were obtained by
599 diluting an aliquot of stock solution in the extracellular medium just before use for WCR
600 experiments. Cells for current recordings were first superfused with extracellular medium
601 containing ethanol at 1/1000 as a control.
602
603
604

Reagent/resource	**Source**	**Identifier or catalog number**
Experimental model		
HEK hTREK-1 cell line	(Moha ou Maati *et al*, 2011)	
HEK 293T/hTREK-1 cell line	(Andharia *et al*, 2017)	
HEK-293 T cell line		
Cell culture		
DMEM + Glutamax	ThermoFisher	31966-021
Fetal bovine serum	Sigma-Aldrich	F7524-500ML
jetPEI®	Ozyme	POL101000053
Trypsin-EDTA	ThermoFisher	25300-054
G418 (geneticin)	Sigma-Aldrich	4727878001
Chemicals		

Linoleic acid	Sigma-Aldrich	L1376-500MG
cis-11,14-Eicosadienoic acid	Sigma-Aldrich	E3127-25MG
Oleic acid	Sigma-Aldrich	O1008
Stearic acid	Sigma-Aldrich	S4751-1G
Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	Sigma-Aldrich	E2011-10MG
Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	Sigma-Aldrich	D2534-100MG
Alpha-linolenic acid	Sigma-Aldrich	L-039-1ML
Docosapentaenoic acid (cis-7,10,13,16,19)	Sigma-Aldrich	D-120-1ML
Cis-4,7,10,13,16-Docosapentaenoic acid	Sigma-Aldrich	18566-10MG
Arachidonic acid	Sigma-Aldrich	A36-11-100MG
Omega-3 Arachidonic acid	Santa Cruz	sc229695
ML402	MedChemExpress	HY-104027
NanoTemper experiment		
Protein labeling kit	NanoTemper	MO-L011
Capillaries	NanoTemper	MO-K022
Monolith^{TM} X instrument	NanoTemper	
Membrane fluidity experiment		
Membrane fluidity kit	Abcam	ab189819
Glass Bottom culture dishes	MatTek	P35G-0-14-C

Statistical analysis

All set of experiments were performed on at least three different batches (congelation and/or passage) of cells. All descriptive statistics are displayed from **Table 1** to **Table 4**. Statistical analysis were performed using Prism software (GraphPad Prism 9, Inc., USA). Spearman correlation test were performed and the p-value indicates the significance of the correlation and the r parameter indicates the direction of the correlation (negative or positive). For the linear regression, the p-value indicates the significance of the relationship, the R^2 indicates the goodness of the fit an the error bars represent the 90 % confidence interval. Kruskal-Wallis test followed by a *post hoc* Dunn's test was used for multiple comparison of unmatched data. A p-value of 0.05 or less was considered as statistically significant. The differences between more

615 than 2 groups are displayed by the letter code, where groups that do not share the same letter
616 are significantly different.
617
618

AUTHORS CONTRIBUTION

EB carried out the experiments (WCR and IO), set up experiments and protocols, conceived the original idea and wrote the manuscript.
EA carried out the experiments (WCR) and discussed the results.
JB carried out the experiments (WCR) and discussed the results.
JL carried out the experiments(WCR) and discussed the results.
XB carried out the experiments (IO) and discussed the results.
AE participated to the PUFAs structure discussion.
CV helped supervise the project on chemistry of PUFAs and discussed the results.
PS helped in the design and result analyses of affinity tests.
TD helped supervise the project on chemistry of PUFAs and discussed the results.
JMG helped supervise the project on chemistry of PUFAs and discussed the results.
CO helped supervise the project on chemistry of PUFAs and discussed the results.
JYL set up experiments and protocols, conceived the original idea, wrote the manuscript and supervised the project.
HMM provided HEK hTREK-1 cells
MD set up experiments and protocols, conceived the original idea, wrote the manuscript and supervised the project.

ACKNOWLEDGEMENT

This work is supported by the Agence Nationale de la Recherche : acronym TA-BOOm (ANR-20-CE44-0001), Région Occitanie Pyrénées-Méditerranée (MNE-AGPI03), Key Initiative Montpellier Université d'Excellence (KIM Biomarkers and Therapies) and the CBS2 doctoral school. We thank Pr OKADA for the kind gift TR-1 cells: a 293 T cell line that stably expresses TREK-1 channel.

CONFLICT OF INTEREST

None

REFERENCES

Andharia N, Joseph A, Hayashi M, Okada M & Matsuda H (2017) Involvement of intracellular transport in TREK-1c current run-up in 293T cells. *Channels Austin Tex* 11: 224–235

Bang H, Kim Y & Kim D (2000) TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K+ channel family. *J Biol Chem* 275: 17412–17419

Barnard ND, Goldman DM, Loomis JF, Kahleova H, Levin SM, Neabore S & Batts TC (2019) Plant-Based Diets for Cardiovascular Safety and Performance in Endurance Sports. *Nutrients* 11: E130

Bechard E, Bride J, Le Guennec J-Y, Brette F & Demion M (2022) TREK-1 in the heart: Potential physiological and pathophysiological roles. *Front Physiol* 13: 1095102

Börjesson SI & Elinder F (2011) An electrostatic potassium channel opener targeting the final voltage sensor transition. *J Gen Physiol* 137: 563–577

Börjesson SI, Hammarström S & Elinder F (2008) Lipoelectric modification of ion channel voltage gating by polyunsaturated fatty acids. *Biophys J* 95: 2242–2253

Börjesson SI, Parkkari T, Hammarström S & Elinder F (2010) Electrostatic tuning of cellular excitability. *Biophys J* 98: 396–403

Danthi S, Enyeart JA & Enyeart JJ (2003) Modulation of native TREK-1 and Kv1.4 K+ channels by polyunsaturated fatty acids and lysophospholipids. *J Membr Biol* 195: 147–164

Decher N, Ortiz-Bonnin B, Friedrich C, Schewe M, Kiper AK, Rinné S, Seemann G, Peyronnet R, Zumhagen S, Bustos D, *et al* (2017) Sodium permeable and 'hypersensitive' TREK-1 channels cause ventricular tachycardia. *EMBO Mol Med* 9: 403–414

Djillani A, Mazella J, Heurteaux C & Borsotto M (2019) Role of TREK-1 in Health and Disease, Focus on the Central Nervous System. *Front Pharmacol* 10: 379

Dong YY, Pike ACW, Mackenzie A, McClenaghan C, Aryal P, Dong L, Quigley A, Grieben M, Goubin S, Mukhopadhyay S, *et al* (2015) K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science* 347: 1256–1259

Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C & Lazdunski M (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K+ channel. *EMBO J* 15: 6854–6862

Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M & Lazdunski M (1998) A neuronal two P domain K+ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 17: 3297–3308

Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G, *et al* (2004) TREK-1, a K+ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 23: 2684–2695

Honoré E (2007) The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci* 8: 251–261

Kamatham S, Waters CM, Schwingshackl A & Mancarella S (2019) TREK-1 protects the heart against ischemia-reperfusion-induced injury and from adverse remodeling after myocardial infarction. *Pflugers Arch* 471: 1263–1272

Kang JX & Leaf A (1994) Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9886–9890

Kang JX & Leaf A (1996) Evidence that free polyunsaturated fatty acids modify Na+ channels by directly binding to the channel proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3542–3546

Kelly D, Mackenzie L, Hunter P, Smaill B & Saint DA (2006) Gene expression of stretch-activated channels and mechanoelectric feedback in the heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 642–648

Koh SD, Monaghan K, Sergeant GP, Ro S, Walker RL, Sanders KM & Horowitz B (2001) TREK-1 regulation by nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. An essential role in smooth muscle inhibitory neurotransmission. *J Biol Chem* 276: 44338–44346

Lamas JA & Fernández-Fernández D (2019) Tandem pore TWIK-related potassium channels and neuroprotection. *Neural Regen Res* 14: 1293–1308

Langer A, Lüdecke A, Bartoschik T, Cehlar O, Duhr S, Baaske P & Streicher W (2022) A New Spectral Shift-Based Method to Characterize Molecular Interactions. *ASSAY Drug Dev Technol* 20: 83–94

Le Guennec JV & Noble D (1994) Effects of rapid changes of external Na+ concentration at different moments during the action potential in guinea-pig myocytes. *J Physiol* 478 Pt 3: 493–504

Leifert WR, McMurchie EJ & Saint DA (1999) Inhibition of cardiac sodium currents in adult rat myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol* 520 Pt 3: 671–679

Lesage F, Terrenoire C, Romey G & Lazdunski M (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K+ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275: 28398–28405

Li X-Y & Toyoda H (2015) Role of leak potassium channels in pain signaling. *Brain Res Bull* 119: 73–79

Liin SI, Silverå Ejneby M, Barro-Soria R, Skarsfeldt MA, Larsson JE, Starck Härlin F, Parkkari T, Bentzen BH, Schmitt N, Larsson HP, *et al* (2015) Polyunsaturated fatty acid analogs act antiarrhythmically on the cardiac IKs channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 5714–5719

Lolicato M, Arrigoni C, Mori T, Sekioka Y, Bryant C, Clark KA & Minor DL (2017) K2P2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature* 547: 364–368

de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P & Delaye J (1994) Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet Lond Engl* 343: 1454–1459

Ma R & Lewis A (2020) Spadin Selectively Antagonizes Arachidonic Acid Activation of TREK-1 Channels. *Front Pharmacol* 11: 434

Maingret F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M & Honoré E (1999) TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K+ channel. *J Biol Chem* 274: 1381–1387

Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M & Honoré E (2000) Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 275: 10128–10133

Mantegazza M, Rusconi R, Scalmani P, Avanzini G & Franceschetti S (2010) Epileptogenic ion channel mutations: from bedside to bench and, hopefully, back again. *Epilepsy Res* 92: 1–29

Martinac B, Zhu H, Kubalski A, Zhou XL, Culbertson M, Bussey H & Kung C (1990) Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6228–6232

Moha ou Maati H, Peyronnet R, Devader C, Veyssiere J, Labbal F, Gandin C, Mazella J, Heurteaux C & Borsotto M (2011) A human TREK-1/HEK cell line: a highly efficient screening tool for drug development in neurological diseases. *PloS One* 6: e25602

Murbartián J, Lei Q, Sando JJ & Bayliss DA (2005) Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J Biol Chem* 280: 30175–30184

Patel AJ, Honoré E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F & Lazdunski M (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K+ channel. *EMBO J* 17: 4283–4290

751 Patel AJ, Lazdunski M & Honoré E (2001) Lipid and mechano-gated 2P domain K(+)
752 channels. *Curr Opin Cell Biol* 13: 422–428
753 Sheetz MP & Singer SJ (1974) Biological membranes as bilayer couples. A molecular
754 mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 4457–4461
755 Siscovick DS, Barringer TA, Fretts AM, Wu JHY, Lichtenstein AH, Costello RB, Kris-
756 Etherton PM, Jacobson TA, Engler MB, Alger HM, *et al* (2017) Omega-3 Polyunsaturated
757 Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease:
758 A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation* 135: e867–e884
759 Wiedmann F, Rinné S, Donner B, Decher N, Katus HA & Schmidt C (2021)
760 Mechanosensitive TREK-1 two-pore-domain potassium (K2P) channels in the cardiovascular
761 system. *Prog Biophys Mol Biol* 159: 126–135
762 Xian Tao Li null, Dyachenko V, Zuzarte M, Putzke C, Preisig-Müller R, Isenberg G & Daut
763 J (2006) The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle.
764 *Cardiovasc Res* 69: 86–97
765 Yazdi S, Nikesjö J, Miranda W, Corradi V, Tieleman DP, Noskov SY, Larsson HP & Liin SI
766 (2021) Identification of PUFA interaction sites on the cardiac potassium channel KCNQ1. *J*
767 *Gen Physiol* 153: e202012850
768
769
770
771
772
773 **FIGURE LEGENDS**

774 **Figure 1: Activation of TREK-1 channel by PolyUnsaturated Fatty Acids.**
775 **A.** Illustration of the voltage ramp protocol to record I_{TREK-1} between -100 mV and +30 mV. **B.**
776 A representative traces of current recordings during C22:6 n-3 (DHA) application is shown in
777 one trace *per* 10s (middle). The inset on the right shows the characteristic outward rectifying
778 initial current of TREK-1 (I_0: initial current density). **C.** Effect of 10µM of Norfluoxetine
779 (NrFlx on I_0. **D.** Bar graph showing the initial membrane potential Em_0 (mV) for HEK 293T
780 and HEK hTREK-1 cell lines and the membrane potential Em_{PUFA} of HEK hTREK-1 cells after
781 the PUFA perfusion. **E.** Lack of correlation between the acyl chain length and I/I_0. **F.** Positive
782 correlation between the number of double bounds and the current density (pA/pF), in response
783 to 10 µM PUFAs at 0 mV. **G.** Lack of correlation between the number of double bounds and
784 I/I_0 and **H.** the current density (pA/pF), in response to 10 µM PUFAs at 0 mV.
785
786 **Figure 2: Variability of TREK-1 activation by PUFAs**
787 **A.** Boxplot of the fold increase (I_{PUFA}/I_0) of TREK-1 and **B**. the current density at steady-state
788 (I_{PUFA}, pA/pF) at 0 mV for each PUFA at 10 µM. Boxplots represent the median (lines) with
789 max and min values (error bars). Groups were compared with a Kruskal-Wallis test followed
790 with the *post-hoc* Dunn's test. Two bars having the same letter are not significantly different.
791 **C.** Changes in the coefficient of variation (SD/mean) between I_{PUFA}/I_0 and I_{PUFA} at 0 mV. (▭:
792 coefficient of variation for I_{PUFA}/I_0; ▭: coefficient of variation for I_{PUFA}). Both coefficient of
793 variation are superimposed.
794
795 **Figure 3: Variability in TREK-1 activation by PUFAs depends on the initial current I_0.**
796 **A.** Scatter plot representations of I_{PUFA}/I_0 as a function of I_0. **B.** Linearization of the I_{PUFA}/I_0 *vs*
797 I_0 relationship following log-transformation for each PUFA. The simple linear regressions (—)
798 are represented with the 90% confidence interval (IC; dotted line) used to discard one of
799 the C20:4 n-3 and C20:4 n-6 data points (⊠). A point is discarded only if it is out by more than

twice the 90% IC. **C.** Relationship between Log10($I_{C22:6\ n-3}/I_0$) and Log10(I_0) at 0 mV in different cell lines: HEK hTREK-1 stable cell line #1 (orange), HEK hTREK-1 stable cell line #2 (red) and HEK 293T cells transiently transfected with TREK-1 channel (pIRES2 KCNK2 WT 6 ng/µL)(purple). **D.** Lack of correlation between the Y-intercept of the linear regressions obtained before and the acyl chain length, **E.** and the number of double bounds, for each PUFA at 10 µM.

Figure 4: Activation kinetics of TREK-1 channel by PUFAs.
A-C. Time course showing the effects of 10 µM PUFAs and ML402 on I_{TREK-1} at 0 mV. PUFAs and ML402 were superfused until the steady-state was reached. *Insets* show the representative current densities recorded in control medium and then under PUFAs or ML402 application. **D.** Lack of correlation between the half-activation and the acyl chain length of PUFAs (Spearman correlation test : p-value > 0.99). **E.** Relationship between the fold-increase of TREK-1 (I_{PUFA}/I_0) and the half-activation (min) (r = - 0.93; p-value=0.002; error barres show the SEM of the I_{PUFA}/I_0 and the half-activation).

Figure 5: Washout kinetics of LA, EPA, DHA and ML402.
A. Representative traces of the reversibility of the current density with one trace per minute (grey: initial current I_0; colors: PUFA-activated current density at steady-state; black: washout current density). **B.** Normalized current-time curve of the reversibility for each compound (mean ± SEM) with 1 point every 10s. The current was normalized as $(I-I_0)/(I_{PUFA}-I_0)$. The inset shows the time to have 50% of the effective reversibility of TREK-1 activation. **C.** Lack of correlation between the time for 50 % of effective reversibility and the acyl chain length and **D.** the number of double bounds.

Figure 6: PUFAs activate TREK-1 in inside-out configuration of patch-clamp.
A-C. Representative traces showing the activation and reversibility in inside-out configuration of patch-clamp technique for **A.** ML402 10 µM **B.** C18:2 n-6 5 µM and **C.** C22:6 n-3 5 µM superfused at the inner face of the membrane. Membrane potential was held at +30 mV. The expanded current traces where extracted at the time indicated by the arrows.

Figure 7: Membrane fluidity is not altered by PUFAs at 10 µM
A-C. Membrane fluidity is not changed over time by 10 µM of PUFA but 100 µM :**A.** C18:3 n-3 (10 µM: n=3; 100 µM n=6; CTL n=4), **B.** 18:2 n-6 (10 µM: n=6; 100 µM: n=7; CTL n=6), **C.** C22 :6 n-3 (10 µM: n=5; 100 µM: n=5; CTL n=5),

Figure 8 : **Effect C22:6 n-3 on SpS signal in TREK-1-enriched microsomes and non-enriched microsomes**
(I_λ(TREK1) represents the binding affinity of C22:6 n-3 (from 1 mM to 30.5 nM) for TREK-1-enriched microsomes from 1 mM to 30.5 nM (n=5-9 experiments).

	IUPAC Name		Tail length	Unsaturation number	ω	I_{PUFA}/I_0	I_{PUFA} (pA/pF)
C18:0	Stearic acid	18:0	18	0		1,0 ± 0,1	18.4 ± 5.5
C18:1 n-9	Oleic acid (9)	18:1 Δ 9	18	1	ω-9	7.4 ± 1.9	113,1 ± 24.6
C18:2 n-6	Linoleic acid (9,12)	18:2 Δ 9,12	18	2	ω-6	24.8 ± 3.3	353.7 ± 22.4
C18:3 n-3	α-Linolenic acid (9,12,15)	18:3 Δ 9,12,15	18	3	ω-3	1.4 ± 0.1	20.72 ± 4.2
C20:2 n-6	Eicosadienoic acid (11,14)	20:2 Δ 11,14	20	2	ω-6	10.1 ± 1.2	166.1 ± 16.2
C20:4 n-3	Eicosatetraenoic acid (8,11,14,17)	20:4 Δ 8,11,14,17	20	4	ω-3	10.9 ± 2.0	119.2 ± 15.5
C20:4 n-6	Eicosatetraenoic acid (5,8,11,14)	20:4 Δ 5,8,11,14	20	4	ω-6	15.7 ± 2.1	199.5 ± 23.1
C20:5 n-3	Eicosapentaenoic acid (5,8,11,14,17)	20:5 Δ 5,8,11,14,17	20	5	ω-3	17.4 ± 2.8	211.7 ± 21.0
C22:5 n-6	Docosapentaenoic acid (4,7,10,13,16)	22:5 Δ 4,7,10,13,16	22	5	ω-6	26.1 ± 8.3	245.3 ± 21.4
C22:5 n-3	Docosapentaenoic acid (7,10,13,16,19)	22:5 Δ 7,10,13,16,19	22	5	ω-3	13.3 ± 2.9	147.1 ± 26.6
C22:6 n-3	Docosahexaenoic acid (4,7,10,13,16,19)	22:6 Δ 4,7,10,13,16,19	22	6	ω-3	29.8 ± 4.4	276.8 ± 24.5

Table 1: Fatty acids nomenclature, characteristics and effects on the TREK-1 current in whole-cell configuration of patch-clamp. Values of I_{PUFA}/I_0 and I_{PUFA} are expressed as mean ± SEM.

	n	p-value	R^2	Equation	Y-intercept ± SD
C18:2 n-6	20	0.0001	0.82	Y = -0.9378*X + 2.343	2.3 ± 0.1
C20:2 n-6	7	0.027	0.66	Y = -0.5264*X + 1.621	1.6 ± 0.2
C20:4 n-3	12	0.0001	0.80	Y = -0.6305*X + 1.672	1.7 ± 0.1
C20:4 n-6	16	0.002	0.50	Y = -0.8315*X + 2.083	2.1 ± 0.3
C20:5 n-3	17	0.0008	0.53	Y = -0.7172*X + 1.958	1.9 ± 0.2
C22:5 n-6	11	0.0001	0.84	Y = -1.073*X + 2.462	2.5 ± 0.2
C22:5 n-3	12	0.371	0.08	Y = -0.3221*X + 1.378	1.4 ± 0.4
C22:6 n-3	20	0.0001	0.68	Y = -0.7378*X + 2.133	2.1 ± 0.1

Table 2: Parameters of the linear regression Log10 (I_{PUFA}/I_0)=f(Log10(I_0)).
TREK-1 current was recorded in whole-celle configuration of patch-clamp.The p-value indicates the significativity of the relationship, the R^2 indicates the goodness of the fit and the Y-intercept reflects the fold-activation of TREK-1 current for an unitary current as Log(1)=0.

		Half-activation (min)	Statistical differences	Steady-state (min)
	n	Mean ± SEM		Mean ± SEM
C18:2 n-6	20	1.86 ± 0.16	a	3.65 ± 0.28
C20:2 n-6	7	4.61 ± 0.30	b,c	7.40 ± 0.25
C20:4 n-3	12	4.56 ± 0.24	b,c	7.13 ± 0.23
C20:4 n-6	16	3.97 ± 0.31	b,c	6.67 ± 0.34
C20:5 n-3	17	3.18 ± 0.30	b,c	5.65 ± 0.33
C22:5 n-6	11	3.12 ± 0.30	a,c	5.31 ± 0.41
C22:5 n-3	12	4.18 ± 0.35	b,c	5.95 ± 0.37
C22:6 n-3	20	2.26 ± 0.19	a	4.34 ± 0.27
ML402	19	2.11 ± 0.16	a	3.86 ± 0.33

Table 3: Parameters of the activation kinetic of TREK-1 by PUFAs and ML402 in whole-cell configuration of patch-clamp. Values indicate the half-activation time (min) and the steady-state (min) of the activation of TREK-1. The statistical comparison of the half-activation time for each PUFAs was performed with a Kruskal-Wallis test followed with the *post-hoc* Dunn's test. Two rows having the same letter are not significantly different. Data are expressed as mean ± SEM.

			Steady-state (min)	50% of reversibility (s)
	n	Concentration (µM)	Mean ± SEM	Mean ± SEM
C18:2 n-6	4	5	4.6 ± 0.4	18.3 ± 6.3
C22:6 n-3	6	5	2.9 ± 0.3	18.3 ± 4.2
ML402	6	10	2.6 ± 0.6	15.5 ± 7.6

Table 4: **Descriptive statistics for TREK-1 activation and reversibility kinetics in inside-out configuration of patch-clamp.** Values indicate the steady-state time (min) and the time to have 50% of effective reversibility of TREK-1 activation (s).