



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université Abou Bakr Belkaid –Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie Moléculaire et cellulaire
Laboratoire
« Antibiotiques Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique »

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de
Master en Biologie
Option : Biochimie Appliquée

Présenté par : **Taha Moanis Islam KHECHAB**

Thème

*Étude in silico de la protéolyse
des pannexines par les caspases*

Encadré par Amal BRIKCI NIGASSA Maître de conférences Université de Tlemcen

Évalué par :

Examineur 1 Amine BEDRANE Maître assistant Université de Tlemcen

Examineur 2 Meriem BENMANSOUR Maître de conférences Université de Tlemcen

Année universitaire : 2020-2021

Dédicaces

À ma chère mère, Mesmoudi Ghoutia pour tous ses sacrifices, son amour, sa gentillesse, son support, et ses prières tout au long de ma vie. Pour ses encouragements, son engagement dans mon éducation et son soutien afin d'accomplir mes rêves.

À la belle famille Brikci Nigassa, qui est ma deuxième famille.
À mes enseignantes et maitres Amal Brikci Nigassa et Meriem Benmansour qui m'ont soutenu et m'ont encouragé à travailler.

À mon meilleur ami et frère en tout sauf en sang, Hamdi Riadh et sa famille, avec qui je trouve le courage d'affronter et de relever les défis du monde et à mes chers amis, Reda, Wanis, Salim, Hichem, Rached, votre aide signifie le monde pour moi.

Que ce travail soit l'accomplissement et la quintessence de votre support et le fruit de vos prières.

Remerciements

En préambule à ce mémoire je remercie Allah, le Tout-Puissant, le Tout-Miséricordieux qui m'a aidé, m'a donné la patience et le courage durant toute ma vie et mes longues années d'études.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi que la réussite de cette année universitaire.

Ces remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté des sciences de la vie et de la terre de Tlemcen, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Je tiens à remercier sincèrement Dr Amal BRIKCI NIGASSA née SAÏDI, en tant que Directrice de mémoire, qui est toujours à l'écoute, toujours présente et disponible tout au long de notre formation en Master et la réalisation de ce mémoire. Ainsi que pour l'inspiration, le courage et l'aide qu'elle a bien voulu consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Je tiens à remercier profondément Dr Meriem BENMANSOUR et Mr Amine BEDRANE, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

Résumé

Les pannexines (Panx) sont des protéines membranaires à traversées multiples qui font partie d'une famille multigénique de trois membres chez l'homme (*hPanx1*, *hPanx2*, *hPanx3*). Elles sont capables de former des hémicanaux qui transportent les ions et les molécules telles que l'ATP dans le milieu extracellulaire et interviennent dans plusieurs phénomènes physiologiques tels que l'apoptose, qui est la mort programmée de la cellule et au cours de laquelle une famille de protéase à cystéine appelées caspases (Cas) intervient et clive des régions cruciales à l'activité des pannexines afin d'accentuer le phénomène d'apoptose.

Dans ce travail, nous avons fait une analyse structurale et fonctionnelle des pannexines humaines à l'aide d'outils informatique. À cet égard, nous avons utilisés les séquences des pannexines humaines (*hPanx*) afin de prédire et caractériser les différents domaines des trois isoformes (*hPanx1*, *hPanx2*, *hPanx3*) et les sites de clivage par les caspases.

L'étude de la topologie a été réalisée à l'aide d'un programme appelé ProtScale qui a montré que les pannexines humaines sont des protéines membranaires à quatre domaines transmembranaires : deux boucles extracellulaires, une boucle intracellulaire et les domaines N- et C-terminaux qui se trouvent du côté cytosolique.

La prédiction des sites de clivage au moyen des deux programmes Procleave et CasCleave a révélé la présence de plusieurs sites ciblés par les différentes caspases exécutrices (Cas-3, Cas-6, Cas-7) au niveau de certains résidus d'acide aspartique (D379, D167 et D81 pour la *hPanx1*, D266, D415 et D639 pour la *hPanx2* et D81, D94 pour la *hPanx3*) et la présence de plusieurs motifs de reconnaissance qui sont DXXD et XXXD. Ces sites de clivage se trouvent généralement dans la longue queue C-terminale caractéristique de la *hPanx1* et la *hPanx2* alors que pour la *hPanx3*, les sites de clivage se trouvent au sein de la boucle extracellulaire.

Mots clés : pannexines humaines, caspases, prédiction des sites de clivage, topologie membranaire

Abstract

Pannexins (Panx) are membrane proteins with multiple transmembrane passages, they are part of a multigene family of three members in humans (*hPanx1*, *hPanx2*, *hPanx3*). They are capable of forming hemichannels that transport ions and molecules such as ATP in the extracellular environment and are involved in numerous physiological processes such as apoptosis, the programmed death of the cell, during which a family of cysteine proteases called caspases (Cas) intervenes and cleaves regions crucial to the pannexin activity to accentuate the phenomenon of apoptosis.

In this work, we made a structural and a functional analysis of human pannexins using *in silico* tools. In this regard, we used the sequences of human pannexins (*hPanx*) in order to predict and characterize the different domains of the three isoforms (*hPanx1*, *hPanx2*, *hPanx3*) and the caspase cleavage sites.

The study of the topology was done through the use of a program called ProtScale which showed that the human pannexins are membrane proteins with four transmembrane domains, two extracellular loops, an intracellular loop and the N- and C-termini domains which are found in the cytosolic side.

The prediction of cleavage sites by the means of two software programs, Procleave and CasCleave, revealed the presence of numerous sites targeted by different executioner caspases (Cas-3, -6 and -7) at the level of certain aspartic acid residues (D379, D167 and D81 for *hPanx1*, D266, D415 and D639 for *hPanx2* and D81, D94 for *hPanx3*) and the presence of several recognition motifs which are DXXD and XXXD. These cleavage sites are generally found in the characteristically long C-terminal domain for *hPanx1* and *hPanx2*, while the cleavage sites for the *hPanx3* are found on within the extracellular loop.

Keywords: human pannexins, caspase, cleavage site prediction, membrane topology

ملخص

البانكسينات عبارة عن بروتينات غشائية ذات ممرات متعددة من خلال الغشاء الهولي تتكون من ثلاثة أعضاء موجودة في البشر (بانكسين1، بانكسين2، بانكسين3). إن هذه البروتينات قادرة على تكوين قنوات نصفية تسمح بتنقل الأيونات و الجزيئات خارج الخلية مثل (الأدينوزين ثلاثي الفوسفات) و تشارك كذلك في العديد من العمليات الفيزيولوجية مثل الإستماتة. أثناء عملية الإستماتة، وهو الموت المبرمج للخلية، تتدخل عائلة من البروتينات ذات السيستين تسمى كاسباس و تشق مناطق مهمة لنشاط البانكسينات لإبراز عملية الإستماتة.

في المرحلة الأولى من هذا العمل، قمنا بإجراء تحليل هيكلي و وظيفي للبانكسينات البشرية باستخدام أدوات البيو معلوماتية و في هذا الصدد، إستخدمنا متتاليات البانكسينات البشرية من أجل التنبؤ و تحديد المقاطع المختلفة لهاته البانكسينات البشرية الثلاثة و مواقع الإنشقاق بالكاسباس.

تمت دراسة الطوبولوجيا من خلال إستعمال برنامج خاص و الذي أظهر أن البانكسينات البشرية عبارة عن بروتينات غشائية ذات أربعة ممرات عبر الغشاء، حلقتان خارج الخلية، حلقة داخل السيتوبلازم مع النهايات الأمينية و الكربوكسيلية من الجانب الداخلي للسيتوبلازم.

التنبؤ بمواقع الإنشقاق عن طريق إستعمال برنامجين سمح بالكشف عن وجود عدة مواقع إنشقاق بالكاسباس المختلفة التي تستهدف الحمض الأميني حمض الأسبرتيك في D379، D167 و D81 للبانكسينات 1 البشرية و D266، D415، D639 للبانكسينات 2 البشرية و D81، D94 للبانكسينات 3 البشرية. ووجود كذلك عدة مواقع التعرف الخاصة بالكاسباس DXXD و XXXD. توجد مواقع الإنشقاق بشكل عام في النهاية الكربوكسيلية الطويلة مميّزاً عند البانكسين 1 البشرية و البانكسين 2 البشرية، بينما توجد مواقع الإنشقاق للبانكسين 3 البشرية داخل الحلقة الأولى خارج الخلية.

كلمات مفتاحية: البانكسينات البشرية، الكاسباس، التنبؤ بمواقع الإنشقاق، طوبولوجيا غشائية

Liste des figures

Figure 1.1 : Structure des caspases	6
Figure 2.1 : Structure des hémicanaux de connexines, innexines et pannexines	11
Figure 3.1 : Requête pour la base de données NCBI.	15
Figure 3.2 : La séquence de la pannexine 1 humaine (<i>hPax1</i>) selon le format « fasta ».	16
Figure 3.3 : Interface du programme ProtScale.	17
Figure 3.4 : Interface utilisateur de l'outil Procleave.	19
Figure 3.5 : Interface utilisateur de CasCleave.	20
Figure 4.1 : Profil d'hydropathie de la pannexine 1 humaine (<i>hPax1</i>).	22
Figure 4.2 : Profil d'hydropathie de la pannexine 2 humaine (<i>hPax2</i>).	23
Figure 4.3 : Profil d'hydropathie de la pannexine 3 humaine (<i>hPax3</i>).	24
Figure 4.4 : Visualisation de la topologie et des sites de clivage de la pannexine 1 humaine.	32
Figure 4.5 : Visualisation de la topologie et des sites de clivage de la pannexine 2 humaine	33
Figure 4.6 : Visualisation de la topologie et des sites de clivage de la pannexine 3 humaine.	34

Liste des tableaux

Tableau 3.1 : Nomenclature des pannexines humaines selon NCBI.	16
Tableau 3.2 : Valeurs de l'échelle des acides aminés selon Kyte et Doolittle	18
Tableau 4.1 : Prédiction des différents sites de clivage de la <i>hPanx1</i> par Procleave	25
Tableau 4.2 : Prédiction des différents sites de clivage de la <i>hPanx2</i> par Procleave.	26
Tableau 4.3 : Prédiction des différents sites de clivage de la <i>hPanx3</i> par Procleave.	27
Tableau 4.4 : Prédiction des différents sites de clivage par CasCleave	29
Tableau 4.5 : Tableau comparatif des deux programmes utilisés.	30

Table des matières

Introduction	1
Partie 1 : Synthèse bibliographique	4
Chapitre I : Généralités sur les caspases	5
1 Structure et fonction des caspases.....	6
Chapitre II : Famille des pannexines	8
1 Introduction	9
2 Expression et localisation des pannexines humaines dans différents tissus	9
3 Structure des pannexines	10
4 Fonction et régulation des canaux de pannexines	11
Partie 2 : Travaux expérimentaux et résultats	13
Chapitre III : Matériels & Méthodes	14
1 Choix des pannexines.....	15
2 Étude de la topologie des pannexines humaines	16
2.1 Hydrophathie et ProtScale	17
3 Prédiction des sites de clivage	18
3.1 Procleave.....	18
3.2 CasCleave	19
Chapitre IV : Résultats & Discussion	21
1 Analyse de la topologie des pannexines par ProtScale.....	22
2 Prédiction des sites de clivage des pannexines humains par les caspases	24
2.1 Analyse par Procleave	24
2.1.1 Pannexine 1.....	24
2.1.2 Pannexine 2.....	26
2.1.3 Pannexine 3.....	27
2.2 Analyse par CasCleave	28
3 Une comparaison entre Procleave et CasCleave.....	29
3.1 Pannexine 1	29
3.2 Pannexine 2.....	30
3.3 Pannexine 3.....	30
4. Topologie prédite montrant les sites de clivage par les caspases	31
Conclusion	36
Références bibliographiques	38

Liste des abréviations

Apaf1 : Facteur d'activation des peptidases de l'apoptose 1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*)

ATP : Adénosine Triphosphate

CARD : Domaine de recrutement de caspase (*caspase activation and recruitment domain*)

Cas : Caspase

Cx : Connexine

D : Acide Aspartique (Asp)

DED : Domaine de la mort (*Death effector domain*)

EL : Boucle Extracytoplasmique (*Extracellular Loop*)

FADD : Protéine adaptatrice (*Fas-Associated protein with Death Domain*)

hPanx : Pannexine humaine

IL : Boucle Intracytoplasmique (*Intracellular Loop*)

Inx : Innexine

kDa : kilodalton

M : Domaine membranaire

Panx : Pannexine

UTP : Uridine Triphosphate

Introduction

Initialement, la recherche sur les protéines des jonctions communicantes a permis de les classer en deux familles principales : les *connexines* (Cx) et les *innexines* (Inx). Cependant, une recherche relativement récente a permis l'identification d'une troisième famille appelée *pannexines* (Panx), un nom proposé par Panchin et son équipe à partir du fait que leur répartition dans le règne animal est importante (**Panchin et al., 2000**).

Cette famille joue un rôle très important dans plusieurs phénomènes physiologiques grâce à leur capacité à former des canaux non jonctionnels ou hémicanaux qui permettent le passage des ions et de petites molécules contrairement aux canaux jonctionnels formés par les connexines et les innexines (**Iglesias et al., 2009**). Ces phénomènes comportent la régulation de la pression artérielle, l'inflammation, le bon fonctionnement cellulaire, le transport membranaire, la communication cellulaire et la mort programmée de la cellule (**Chekeni et al., 2010 ; Billaud et al., 2011**). Les pannexines subissent différentes formes de régulation qui peut être mécanique, par le Calcium (Ca^{2+}), par le Potassium (K^+) et notamment par la protéolyse par les caspases qui sont impliquées dans les deux phénomènes d'inflammation et d'apoptose.

Les caspases sont parmi les protéases les plus spécifiques. En dépendant des résidus de cystéine au niveau du site actif et uniquement au niveau de certains résidus d'acide aspartique, les caspases hydrolysent les liaisons peptidiques inactivant par la suite et dans le cas général le substrat.

L'étude *in silico* de ces protéines membranaires présente une opportunité très intéressante vu la rareté des travaux de littérature sur la structure tridimensionnelle des pannexines. Les outils très accessibles et disponibles à partir des sites web spécialisés, nous ont particulièrement intéressés pour réaliser ce travail qui consiste à effectuer des prédictions de la topologie et les sites de clivage par les caspases à partir des séquences peptidiques des pannexines humaines dans la perspective d'utiliser les résultats obtenus au cours de cette recherche dans des expériences ultérieures afin de développer différentes approches pour mieux comprendre le fonctionnement des pannexines.

Notre premier but dans ce travail est la prédiction de la topologie des pannexines humaines. La prédiction des domaines transmembranaires en utilisant un programme pertinent qui est ProtScale (**Gasteiger et al., 2005**). Le deuxième objectif concerne la prédiction des sites de clivage par les caspases des trois isoformes des pannexines en utilisant deux programmes qui sont le

programme ProCleave qui est très récent (**Li *et al.*, 2020**) et le programme CasCleave qui est spécifique au caspases (**Wang *et al.*, 2014**).

Ce mémoire commence par une introduction générale, exposant ainsi la problématique du sujet, suivie de deux parties :

La première partie est une synthèse bibliographique qui comporte deux chapitres :

Le chapitre I présente des généralités sur les caspases et comporte quelques informations concernant leur structure ainsi que leur rôle dans les processus d'inflammation et d'apoptose.

Le Chapitre II présente la famille des pannexines. Nous y abordons le sujet de la découverte des pannexines, leur structure, leur expression ainsi que leur régulation.

La deuxième partie est la phase expérimentale et comporte deux chapitres :

Le Chapitre III explique les méthodes et outils utilisés dans ce travail.

Le Chapitre IV présente les résultats obtenus par les différentes méthodes employées lors de ce travail et leur interprétation.

Enfin, ce mémoire se termine par une conclusion.

Partie 1 :
Synthèse bibliographique

Chapitre I : **Généralités sur les caspases**

1 Structure et fonction des caspases

Les caspases constituent une famille de protéases à cystéine (*cysteine-aspartic proteases*) qui joue un rôle important dans les phénomènes de l'inflammation ainsi que de la mort programmée de la cellule (**Hardwick, 2002**).

Les caspases sont composées de trois domaines structuraux : un prodomaine N-terminale (*Pro*), un grand domaine (*Large/Lg*) et un autre petit domaine (*Small/Sm*). La majorité des caspases ont un prodomaine assez long, notamment les caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10 et les caspases-12 à l'exception des caspases-7, -3 et -6 qui ont un prodomaine court (Figure 1.1A) (**Hardwick, 2002**).

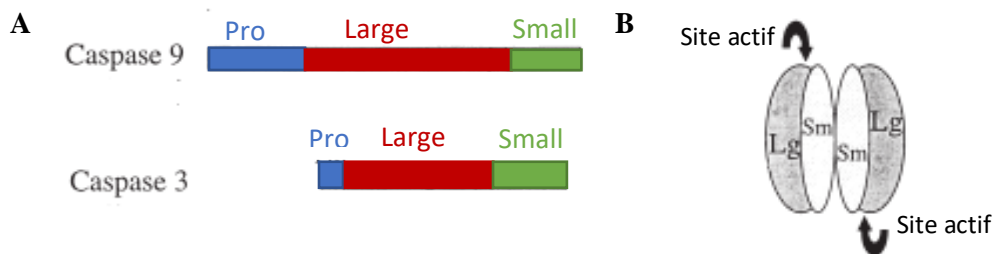


Figure 1.1 : Structure des caspases (**Hardwick, 2002**).

A : représentation des trois domaines des caspases ; Pro pour Prodomaine, Large pour le grand domaine et Small pour le petit domaine.

B : La position des deux sites de fixation des caspases ; Lg représente le grand domaine et Sm le petit domaine

Les caspases sont des enzymes qui sont synthétisées sous forme de proenzymes inactifs qui nécessitent usuellement un clivage ou une dimérisation pour leur activation. La majorité des caspases possèdent différents domaines d'interaction protéine-protéine qui facilitent la formation de complexes protéiques comme le domaine CARD (domaine de recrutement de caspase) chez les caspases-1, -2, -4, -5 et -9 et le domaine DED (domaine de la mort ou *death effector domain*) chez les caspases-8 et -10 (**Taylor et al., 2008**).

Ces protéases à cystéine possèdent un site actif qui contient de la cystéine voisinée d'une histidine et un troisième résidu qui est différent pour chaque type de caspase et deux sites de fixation dans deux extrémités opposées (Figure 1.1B). Impliquées dans le phénomène d'apoptose, qui est la mort programmée de la cellule, les caspases démontent les composants intracellulaires tout en évitant de causer des dégâts aux cellules voisines (**Teng et al., 2015**).

Il existe deux types de caspases : les caspases initiatrices et les caspases exécutrices, qui sont dépendantes les unes des autres. Les initiatrices activent les exécutrices et ces dernières vont réaliser la protéolyse de protéines intracellulaires et jouent le rôle d'activateur pour d'autres caspases exécutrices ce qui conduit à une boucle de rétroaction d'activation de caspases (**McIlwain et al., 2013**).

Il existe aussi deux principales voies de l'apoptose : la voie intrinsèque, appelée aussi la voie mitochondriale, et la voie extrinsèque. La voie extrinsèque dépend d'un signal venant de l'extérieur de la cellule sous forme de ligand qui se lie à un récepteur de surface. L'interaction ligand-récepteur entraîne la fixation des protéines adaptatrices (FADD) qui recrute à leur tour les caspases-8 ou -10 afin de les activer sous forme de dimères. Ces derniers vont donc initier la mort programmée de la cellule en passant par le clivage et l'activation des caspases exécutrices.

La voie intrinsèque est généralement activée à cause du stress cellulaire qui provoque la perturbation de la mitochondrie et par conséquent la libération du cytochrome c dans le cytoplasme qui à son tour va se lier au facteur protéique appelé Apaf1 (facteur d'activation des protéases de l'apoptose 1). Le complexe cytochrome c-Apaf-1 s'agrège et forme un apoptosome formé de sept monomères. L'apoptosome ainsi formé va donc recruter et activer des procaspases-9 à travers leur domaine CARD. Étant activés, les caspases-9 vont cliver et activer les caspases effectrices comme les caspases-3 et -7 ce qui active ainsi la cascade de protéolyse conduisant à l'apoptose. (**Alberts et al., 2017**).

Chapitre II :

Famille des pannexines

1 Introduction

Lors de l'analyse des *innexines*, qui sont des protéines capables de former des jonctions communicantes chez les invertébrés, l'équipe de **Panchin et al.** découvre des protéines qui ont une homologie curieusement similaire aux *innexines* et qu'ils ont appelées *pannexines*¹.

Les pannexines constituent une famille structuralement et fonctionnellement analogue aux deux autres principales familles de protéines capables de former des jonctions communicantes qui sont les *connexines* (chez les vertébrés) et les *innexines* (chez les invertébrés) malgré des différences importantes au niveau des séquences. Appartenant à la superfamille des *tetraspans*, ces trois familles de protéines membranaires partagent la même topologie grâce à la présence de quatre domaines transmembranaires. L'oligomérisation des pannexines forme des canaux appelés *pannexons* (**Sosinsky et al. 2011**) suivant l'appellation des canaux formés par les connexines et les innexines, *connexons* et *innexons* respectivement (**Bruzzo et al., 2003**). Contrairement au connexon qui désigne un hémicanal et dont l'amarrage de deux hémicanaux forme un canal entre deux cellules voisines, le terme *pannexon* indique un canal à membrane unique capable de faire passer les ions et les molécules de petite taille comme par exemple l'ATP ou l'UTP qui sont exportés au milieu extracellulaire (**Narahari et al., 2021 ; Navis et al., 2020**).

2 Expression et localisation des pannexines humaines dans différents tissus

Dans le génome humain, les pannexines constituent une famille importante de protéines membranaires comportant trois isoformes : les pannexine-1 (*hPanx1* ; h pour *human*), pannexine-2 (*hPanx2*) et pannexine-3 (*hPanx3*) (**Penuela et al. 2013**).

Le gène qui code pour la *hPanx1* se trouve au niveau du chromosome 11. Cette protéine qui se compose de 422 résidus d'acides aminés ayant une taille d'environ 47 kDa, se trouve d'une manière ubiquitaire dans les différents tissus humains tels que le cerveau, le cœur, le muscle squelettique, la peau, le foie, les poumons et plus spécialement dans le système nerveux central où la *hPanx1* a été détectée au niveau du cervelet, du cortex, de la rétine, de l'amygdale, des neurones et des cellules gliales (**Baranova et al., 2004**).

¹ *Pannexine* du Latin : *pan* = tout, partout et *nexus* = connexion, liaison, lien.

La *hPanx2* qui est codée par un gène qui se situe sur le chromosome 22 contient 633 résidus d'acides aminés et possède une taille d'environ 69 kDa. La distribution est assez limitée par rapport à celle de la *hPanx1* et qui se limite au système nerveux (**Bruzzone *et al.* 2003**).

Similairement à la *hPanx1*, la *hPanx3* est codée par un gène localisé au niveau du chromosome 11. Composée de 392 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 44 kDa, cette pannexine a été détectée au niveau de l'hippocampe ainsi qu'au niveau des tissus épithéliaux et osseux (**Baranova *et al.*, 2004**).

La comparaison entre la *hPanx1* et *hPanx3* a montré une homologie d'environ 30% de séquence ainsi que des poids moléculaires assez proches (47 kDa pour *hPanx1* et 44 kDa pour *hPanx3*). Par contre la *hPanx2* présente un poids moléculaire nettement supérieur à ceux de la *hPanx1* et *hPanx3* (69kDa), ceci s'explique par la longueur apparente du domaine C-terminal.

3 Structure des pannexines

Plusieurs études ont été entreprises à la recherche de la structure et la topologie des pannexines, plus précisément *in silico* à l'aide d'outils d'informatiques qui permettent la prédiction de la structure des protéines membranaires de quatre domaines hydrophobes et représentant les domaines transmembranaires (**Claros et Heijne, 1994 ; Douradou *et al.*, 2004 ; Spagnol *et al.*, 2004 ; Penuela *et al.*, 2009**) et *in vitro* par différents essais biochimiques tels que la mutagénèse des cystéines, l'immunomarquage et la cryo-microscopie électronique qui ont permis de compléter les résultats des travaux *in silico* en proposant un modèle topologique (**Wang & Dahl, 2010 ; Penuela *et al.*, 2009 ; Michalski *et al.*, 2020**).

Le modèle topologique acquis montre que les pannexines sont très similaires aux connexines et innexines. Ces travaux ont montré la présence de quatre domaines transmembranaires (M), deux boucles extracellulaires (EL), une boucle intracellulaire (IL) et des extrémités N- et C-terminales cytosoliques. Les trois isoformes des pannexines varient surtout par la longueur du domaine C-terminal, alors qu'ils se distinguent des innexines et des connexines par leurs séquences et le nombre de résidus cystéine au niveau des boucles extracellulaires (**Baranova *et al.*, 2004 ; Scemes *et al.*, 2007**).

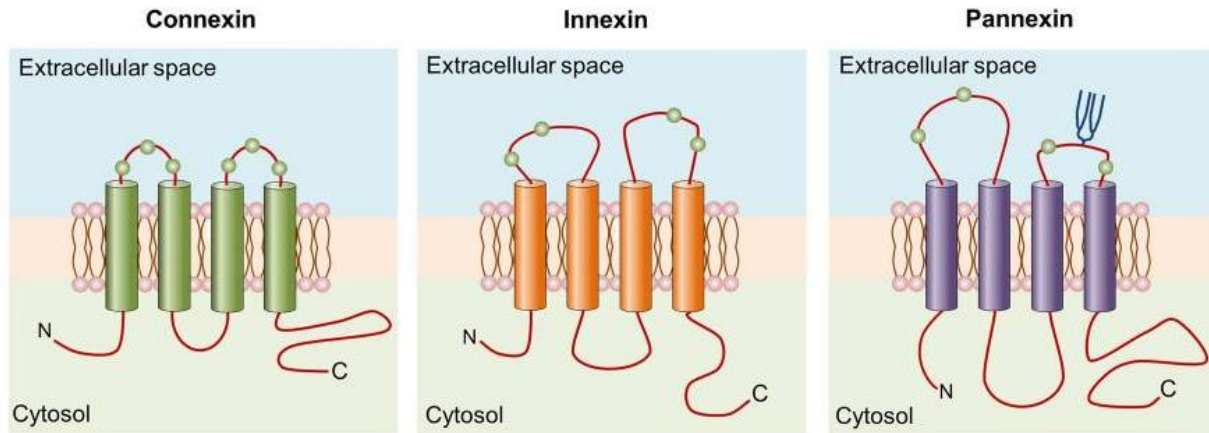


Figure 2.1 : Structure des hémicanaux de connexines, innexines et pannexines

Les pannexines sont des sous-unités dont l'oligomérisation forme un canal. Les Panx1 sont capables de former des hexamères (Ambrosi *et al.*, 2010 ; Chiu *et al.*, 2014) tandis que les Panx2 ont tendance à former des octamères (Ambrosi *et al.*, 2010). Dans le cas des Panx3, de nombreux travaux supposent que le nombre de sous-unités nécessaires afin de former un canal est similaire à celui des Panx1 (Sosinsky *et al.*, 2011 ; Ishikawa *et al.*, 2017).

4 Fonction et régulation des canaux de pannexines

Parmi les trois isoformes, l'étude de la Panx1 qui est la plus ubiquitaire a permis de comprendre les mécanismes impliqués dans le fonctionnement des pannexines ainsi que leur régulation.

De nombreux travaux indiquent que les pannexines jouent un rôle très important dans la communication cellulaire et le transport des ions et des petites molécules. La présence de charges positives qui tapissent les ouvertures extra- et intracellulaire du canal permet d'avoir une grande aptitude à transporter les molécules anioniques telles que l'ATP (Ruan *et al.* 2020.).

Les pannexines sont impliquées dans la propagation des vagues de calcium par le biais de la libération d'ATP à l'extérieur de la cellule qui va ensuite activer les récepteurs purinergiques ionotropique (P2X) et métabotropique (P2Y) (Penuela *et al.*, 2013 ; Alves *et al.*, 2018).

Le passage de l'ATP à l'extérieur de la cellule à travers les canaux de pannexines fait l'objet de plusieurs études à cause de son implication dans des différents phénomènes physiologiques tels que la régulation artérielle, la vasoconstriction, la vasodilatation (Billaud *et*

al., 2011), la réponse immunitaire et la propagation de la réponse inflammatoire (**Pellegrin et Surprenant, 2006**). Cette libération importante d'ATP trouve aussi un rôle pertinent dans la mort programmée de la cellule (**Chekeni et al., 2010**).

En effet, l'ATP joue le rôle d'un signal appelé « find-me signal » permettant d'attirer les macrophages vers les cellules apoptotiques. L'augmentation de l'expression et de la stimulation des pannexines est en corrélation directe avec l'efflux d'ATP ce qui met en évidence l'implication des pannexines dans le phénomène d'apoptose (**Sandilos et al., 2012**).

Dans le cadre de la régulation du canal formé par les pannexines, plusieurs travaux démontrent le rôle prédominant du domaine C-terminal dans l'activité de la Panx1 selon un mécanisme de « la balle et de la chaîne » (*ball-and-chain model*) où il agit comme un bouchon. Les caspases interviennent et agissent en clivant le domaine C-terminal, ce clivage permet l'ouverture définitive et irréversible du canal permettant ainsi le passage de l'ATP et d'autres molécules de façon continue (**Navis et al. 2020**).

Partie 2 :
Travaux expérimentaux et
résultats

Chapitre III :

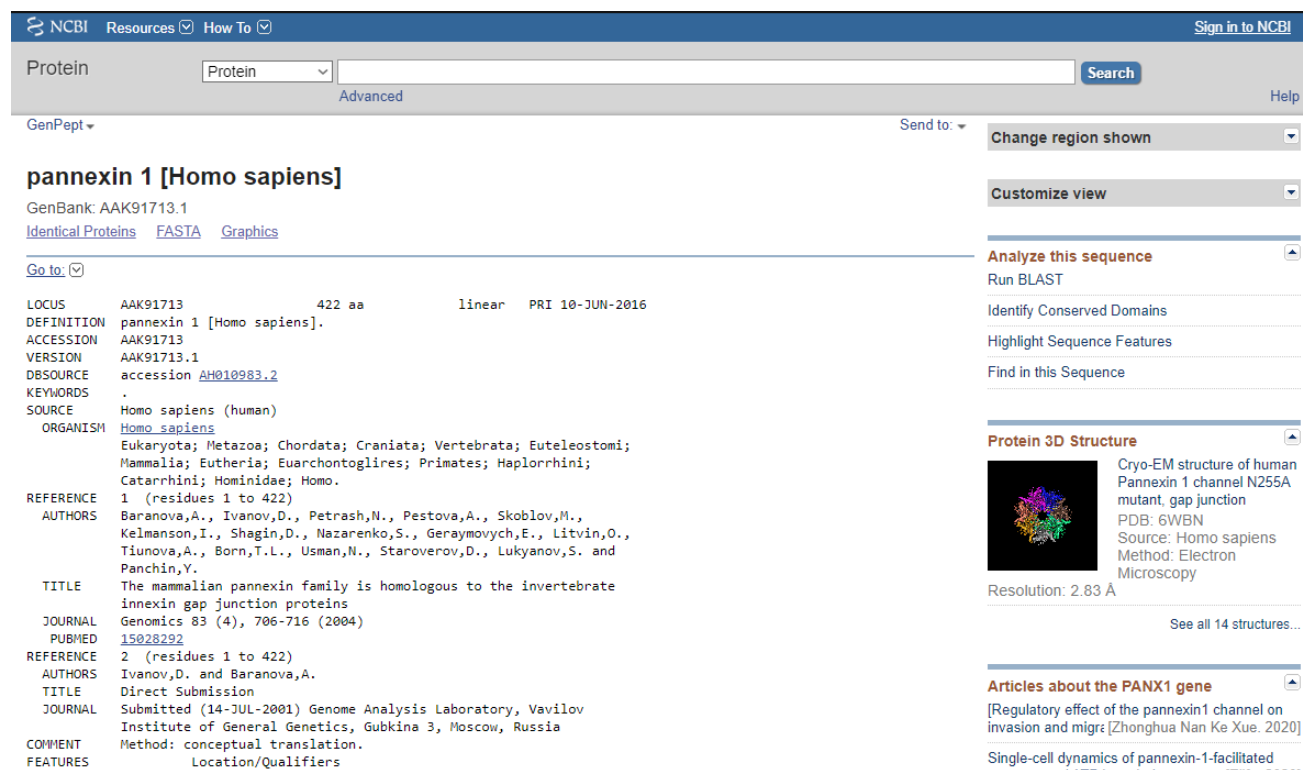
Matériel & Méthodes

1 Choix des pannexines.

Dans ce travail, nous avons opté pour l'étude des pannexines humaines (*hPanx1*, *hPanx2* et *hPanx3*) qui sont des protéines membranaires capables de former des hémicanaux constituant des pores au niveau de la membrane plasmique et/ou du réticulum endoplasmique en utilisant différents outils de bio-informatique.

La première étape de cette étude était d'analyser la topologie des trois pannexines humaines à l'aide du programme ProtScale (Gasteriger *et al.* 2005). La deuxième étape était la prédiction des sites du clivage par deux programmes qui sont Procleave (Li *et al.*, 2020) et CasCleave (Wang *et al.*, 2014).

Les séquences des pannexines humains nécessaires à ces programmes ont été extraites à partir de la base de données NCBI qui désigne National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et qui contient des séquences protéiques manuellement révisées et corrigées par les scientifiques (Figure 3.1). Ces séquences recherchées se caractérisent par l'organisme et par un numéro d'accèsion spécifique.



NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Protein Protein Search Help

GenPept Send to Change region shown

pannexin 1 [Homo sapiens]

GenBank: AAK91713.1
[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS AAK91713 422 aa linear PRI 10-JUN-2016

DEFINITION pannexin 1 [Homo sapiens].

ACCESSION AAK91713

VERSION AAK91713.1

DBSOURCE accession [AH010983.2](#)

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (residues 1 to 422)

AUTHORS Baranova,A., Ivanov,D., Petrash,N., Pestova,A., Skoblov,M., Kelmanson,I., Shagin,D., Nazarenko,S., Geraymovych,E., Litvin,O., Tiunova,A., Born,T.L., Usman,N., Staroverov,D., Lukyanov,S. and Panchin,Y.

TITLE The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins

JOURNAL Genomics 83 (4), 706-716 (2004)

PUBMED [15028292](#)

REFERENCE 2 (residues 1 to 422)

AUTHORS Ivanov,D. and Baranova,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-JUL-2001) Genome Analysis Laboratory, Vavilov Institute of General Genetics, Gubkina 3, Moscow, Russia

COMMENT Method: conceptual translation.

FEATURES Location/Qualifiers

Analyze this sequence Run BLAST Identify Conserved Domains Highlight Sequence Features Find in this Sequence

Protein 3D Structure Cryo-EM structure of human Pannexin 1 channel N255A mutant, gap junction PDB: 6WBN Source: Homo sapiens Method: Electron Microscopy Resolution: 2.83 Å See all 14 structures...

Articles about the PANX1 gene [Regulatory effect of the pannexin1 channel on invasion and migr; [Zhonghua Nan Ke Xue. 2020] Single-cell dynamics of pannexin-1-facilitated

Figure 3.1 : Requête pour la base de données NCBI.

Afin d'analyser les séquences des pannexines par ces outils de bio-informatique, les séquences sont extraites selon un format particulier nommé « fasta » pour *fast-all* (qui signifie l'utilisation de tous les alphabets) ou *fast alignment*. Ce format permet de représenter les séquences protéiques en utilisant le code à une lettre.

FASTA ▾

RecName: Full=Pannexin-1

UniProtKB/Swiss-Prot: Q96RD7.4

[GenPept](#) [Identical Proteins](#) [Graphics](#)

```
>sp|Q96RD7.4|PANX1_HUMAN RecName: Full=Pannexin-1
MAIAQLATEYVFSDFLLKEPTEPKFKGLRLELAVDKMVTCTIAVGLPLLLISLAFQAQEISIGTQISCFSPS
SFSWRQAAFVDSYCNAAVQKNSLQSESGNPLWLHKFFPYILLFALLLYLPPLFWRFAAAPHICSDLK
FIMEELDKVYNRAIKAASARDLDMRDGACSVPGVTENLQSLWEVSESHFKYPIVEQYLKTKKNSNLI
IKYISCRLLTLIIILLACIYLGYYFSLSSLSDEFVCSIKSGILRNDSTVPDQFQCKLIAVGIFQLLSVIN
LVVVYLLAPVVVYTLFVPPFRQKTDVLKVEIILPTFDVLHFKSEGYNDLSLYNLFLEENISEVKSYPKLV
LENIKSSGQIDPMLLLTNLGMIKMDVVDGKTPMSAEMREEQGNQTAELQGMNIDSETKANNGEKNARQR
LLDSSC
```

Figure 3.2 : La séquence de la pannexine 1 humaine (*hPanx1*) selon le format « fasta ».

Tableau 3.1 : Nomenclature des pannexines humaines selon NCBI.

Pannexine	Nom des pannexines selon NCBI	Numéro d'accension	Protéines (Acide Aminé)
<i>hPanx1</i>	RecName: Full=Pannexin-1	Q96RD7	426
<i>hPanx2</i>	RecName: Full=Pannexin-2	Q6IMP4	677
<i>hPanx3</i>	RecName: Full=Pannexin-3	Q8CEG0	392

2 Étude de la topologie des pannexines humaines

Lors de l'étude des protéines membranaire, il est impératif d'effectuer une analyse de la topologie membranaire. Plusieurs outils capables d'effectuer la prédiction de la topologie existent

tels que ΔG Predictor (Hessa *et al.*, 2007), TOPCONS (Bernsel *et al.*, 2009) et ProtScale (Gasteriger *et al.* 2005) que nous avons utilisé pour prédire et caractériser les domaines transmembranaires des pannexines humaines.

2.1 Hydropathie et ProtScale

Cette analyse dépend de l'utilisation du programme ProtScale (Gasteriger *et al.* 2005) à travers le portail de ressources bio-informatiques Expasy mis à disposition par l'institut suisse de bio-informatique (<https://web.expasy.org/protscale/>) (Figure 3.3). ProtScale permet de calculer des indices d'hydropathie des pannexines et de les représenter sous forme d'un profil. Plusieurs échelles d'acides aminés sont disponibles pour ces calculs. Le programme attribue ainsi une valeur d'hydrophobie à chaque acide aminé. Selon une fenêtre qui a une taille de 19 résidus d'acides aminés, le programme analyse la séquence et pour chaque position, la valeur moyenne d'hydropathie des acides aminés dans cette fenêtre est calculée et puis attribuée au résidu qui se trouve au centre de la fenêtre. L'échelle la plus courante et la plus utilisée dans cette étude est celle de Kyte et Doolittle (1982) (Tableau 3.2).

Expasy ProtScale [Home](#) | [Contact](#)

ProtScale

ProtScale [Reference / Documentation] allows you to compute and represent the profile produced by any amino acid scale on a selected protein.

An **amino acid scale** is defined by a numerical value assigned to each type of amino acid. The most frequently used scales are the hydrophobicity or hydrophilicity scales and the secondary structure conformational parameters scales, but many other scales exist which are based on different chemical and physical properties of the amino acids. This program provides 57 predefined scales entered from the literature.

Enter a UniProtKB/Swiss-Prot or UniProtKB/TrEMBL accession number (AC) (e.g. **P05130**) or a sequence identifier (ID) (e.g. **KPC1_DROME**):

Or you can paste your own sequence in the box below:

Please choose an amino acid scale from the following list. To display information about a scale (author, reference, amino acid scale values) you can click on its name.

<input type="radio"/> Molecular weight	<input type="radio"/> Number of codon(s)
<input type="radio"/> Bulkiness	<input type="radio"/> Polarity / Zimmerman
<input type="radio"/> Polarity / Grantham	<input type="radio"/> Refractivity
<input type="radio"/> Recognition factors	<input type="radio"/> Hphob. / Eisenberg et al.
<input type="radio"/> Hphob. OH / Sweet et al.	<input type="radio"/> Hphob. / Hopp & Woods
<input checked="" type="radio"/> Hphob. / Kyte & Doolittle	<input type="radio"/> Hphob. / Manavalan et al.

Figure 3.3 : Interface du programme ProtScale.

Tableau 3.2 : Valeurs de l'échelle des acides aminés selon Kyte et Doolittle

Acides Aminés	
Ala (A) : +1.800	Leu (L) : +3.800
Arg (R) : -4.500	Lys (K) : -3.900
Asn (N) : -3.500	Met (M) : +1.900
Asp (D) : -3.500	Phe (F) : +2.800
Cys (C) : +2.500	Pro (P) : -1.600
Gln (Q) : -3.500	Ser (S) : -0.800
Glu (E) : -3.500	Thr (T) : -0.700
Gly (G) : -0.400	Trp (W) : -0.900
His (H) : -3.200	Tyr (Y) : -1.300
Ile (I) : +4.500	Val (V) : +4.200

Ensuite, le programme réalise un profil sous forme de représentation graphique bidimensionnelle nommé profil d'hydropathie à partir des indices calculés selon la position des acides aminés. Les valeurs négatives représentent les acides aminés à caractère hydrophile alors que les valeurs positives indiquent les acides aminés à caractère hydrophobe. Le profil d'hydropathie a été réalisé pour les trois isoformes des pannexines humaines.

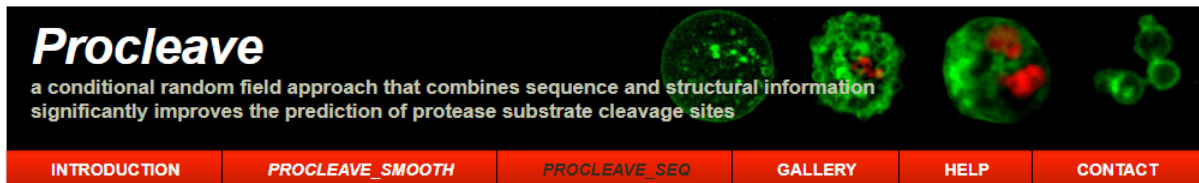
3 Prédiction des sites de clivage

De nombreux outils en bio-informatique ont été développés afin de prédire les sites de clivage par les protéases. Nous pouvons citer PeptideCutter (**Gasteiger et al., 2005**), qui utilise un ensemble de données expérimentales afin de prédire les sites de clivage, PEPS (*prediction of endopeptidase substrates*) (**Lohmüller et al., 2003**) qui implique l'utilisation d'une matrice de score des sites de clivage par les endopeptidases (CSSM), Procleave (**Li et al., 2020**) et CasCleave (**Wang et al., 2014**) que nous allons utiliser dans ce travail.

3.1 Procleave

Procleave est un outil de prédiction très récent des sites de clivage d'un substrat spécifique par une ou plusieurs protéases à la fois à partir de séquences d'acides aminés (<http://procleave.erc.monash.edu/>) (Figure 3.4). Procleave utilise les données récentes de

MEROPS, qui est une base de données spécifiques aux peptidases, et la séquence spécifique du substrat afin d'obtenir des prédictions selon un modèle de sites de clivages sous forme de P4-P4' (Li *et al.*, 2020).



Procleave_sequence webserver

Input the substrate sequence (example)

Figure 3.4 : Interface utilisateur de l'outil Procleave.

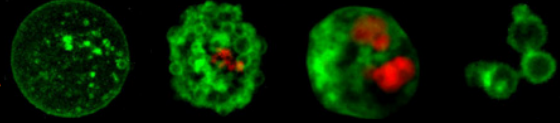
3.2 CasCleave

CasCleave 1.0 est un outil de prédiction des sites de clivage de substrat spécifiquement par les caspases introduit dans sa version initiale par **Song et équipe en 2010**, Ces enzymes clivent les substrats à des sites contenant des résidus d'acide aspartique (D) qui se trouvent, selon le modèle prédictif de CasCleave, en position P₁. Cependant, les résidus qui occupent les positions P₁' et P₂-P₄' contrôlent, selon leur nature (Hydrophobe, hydrophile) l'efficacité du clivage.

CasCleave 2.0 est un programme en ligne fourni par Melbourne Web Design. Il présente une nouvelle approche qui permet la prédiction des sites de clivage de substrat des caspases et des granzymes. Les sites de clivage potentiels sont déduits sur la base du score de probabilité obtenu pour chaque résidu de la séquence en question, en prenant compte des caractéristiques fonctionnelles de la séquence protéique, les propriétés des acides aminés ainsi que la structure qui entoure les sites de clivage et les sites non concernés par le clivage (Wang *et al.*, 2014).

CasCleave

Computational identification of caspase substrate cleavage sites



[INTRODUCTION](#)

[WEBSERVER](#)

[DATABASE](#)

[HELP](#)

[LINKS](#)

[CONTACT](#)

CasCleave webservice

POSTED ON NOVEMBER 30TH, 2009 BY JIANGNING SONG AND MELBOURNE WEB DESIGN

Input the sequence (example)

Figure 3.5 : Interface utilisateur de CasCleave.

Chapitre IV :

Résultats & Discussion

1 Analyse de la topologie des pannexines par ProtScale

ProtScale est un programme pertinent qui permet l'identification et la caractérisation des domaines hydrophobes en procurant un profil d'hydropathie qui est un diagramme où la position des acides aminés des séquences se trouve en abscisse et l'indice d'hydropathie se situe en ordonnée.

Le profil d'hydropathie de la *hPanx1* nous indique la présence de quatre domaines hydrophobes correspondant aux séquences : 37-55 ; 108-126 ; 214-232 ; 275-294 ainsi que la présence de six segments hydrophiles : 1-36 ; 56-107 ; 127-213 ; 233-274 ; 295-361 ; 378-426. Il existe aussi un cinquième domaine hydrophobe qui ne semble pas traverser la membrane mais implique une interaction avec elle en : 362-377 (Figure 4.1 A).

Ces résultats nous ont permis de représenter les domaines hydrophobes de la *hPanx1* en utilisant la dernière version du logiciel DOG 2.0 (Ren *et al.*, 2009) qui permet de les visualiser dans une structure en domaine (Figure 4.1 B).

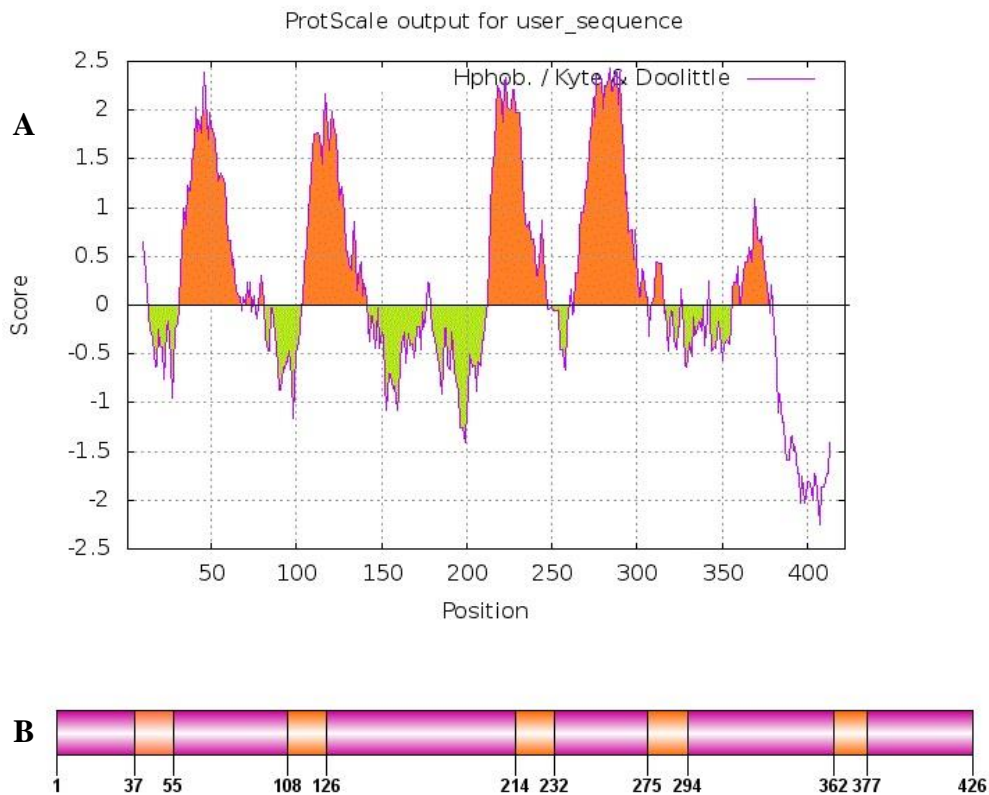


Figure 4.1 : Profil d'hydropathie de la pannexine 1 humaine (*hPanx1*).

A : Profil d'hydropathie des différents domaines en suivant l'échelle de Kyte & Doolittle.

B : Représentation de la structure en domaine des différents régions hydrophobes et hydrophiles de la *hPanx1*.

L'analyse du profil d'hydrophatie des *hPanx2* montre aussi l'existence de quatre domaines hydrophobes : 53-71 ; 123-141 ; 232-250 ; 289-308. Il montre aussi, contrairement aux *hPanx1*, la présence de cinq régions hydrophiles : 1-52 ; 71-123 ; 141-232 ; 250-289 et 308-677 qui sont présentés dans la figure 4.2 A. La représentation de ces différents domaines a été faite grâce à l'utilisation du logiciel de visualisation DOG 2.0 (Figure 4.2 B).

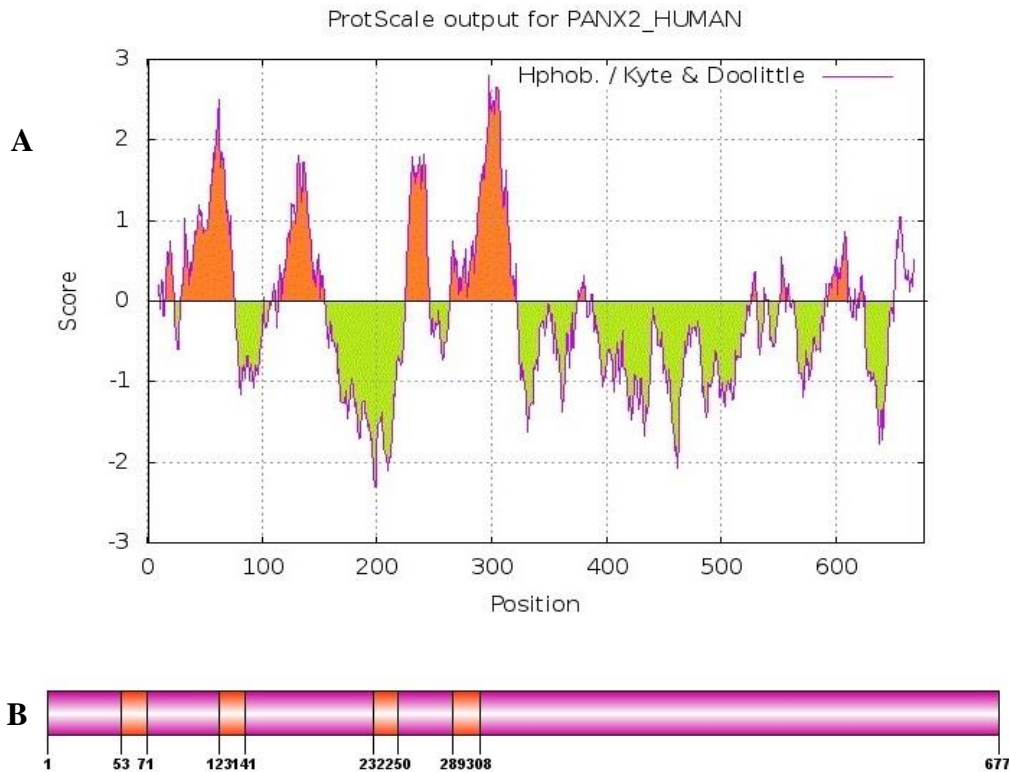


Figure 4.2 : Profil d'hydrophatie de la pannexine 2 humaine (*hPanx2*).

A : Profil d'hydrophatie des différents domaines en suivant l'échelle de Kyte & Doolittle.

B : Représentation de la structure en domaine des différents régions hydrophobes et hydrophiles de la *hPanx2*.

Le profil d'hydrophatie de *hPanx3* indique également la présence de quatre domaines hydrophobes : 35-54 ; 114-132 ; 206-224 ; 269-287. Similairement aux *hPanx1*, le diagramme montre la présence de six domaines hydrophiles : 1-34 ; 55-114 ; 132-206 ; 224-269 ; 287-327 ; 347-392.

La présence d'un cinquième domaine hydrophobe a été détecté (Figure 4.3 A), correspondant à la séquence 328-346, qui semble avoir une interaction avec la membrane sans la

traverser. L'utilisation du logiciel DOG 2.0 nous a permis de représenter les résultats concernant les régions hydrophobes et hydrophiles de la structure en domaines (Figure 4.3 B).

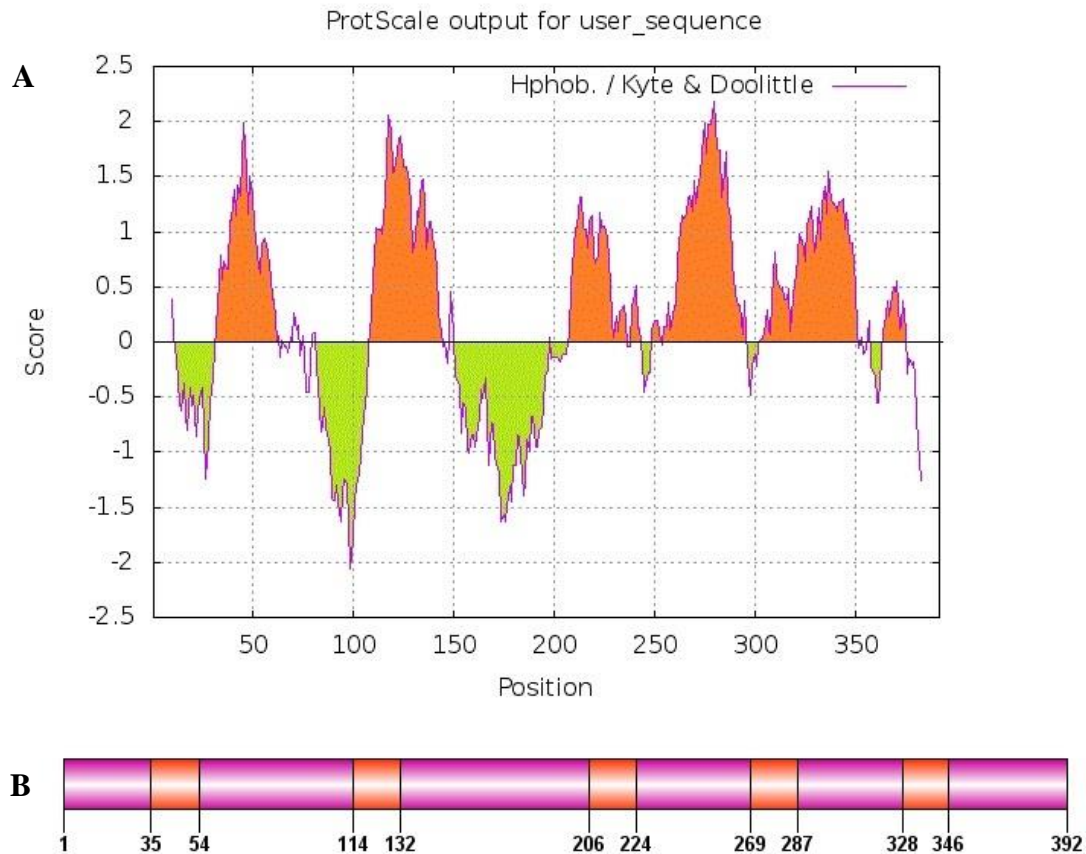


Figure 4.3 : Profil d'hydropathie de la pannexine 3 humaine (hPanx3).

A : Profil d'hydropathie des différents domaines en suivant l'échelle de Kyte & Doolittle.

B : Représentation de la structure en domaine des différentes régions hydrophobes et hydrophiles de la hPanx3.

2 Prédiction des sites de clivage des pannexines humaines par les caspases

2.1 Analyse par Procleave

2.1.1 Pannexine 1

En utilisant le programme Procleave, qui donne les résultats sous forme de scores correspondant aux probabilités pour qu'un acide aminé soit un site de clivage (Li *et al.*, 2020), nous avons obtenu les résultats donnés dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Prédiction des différents sites de clivage de la *hPax1* par Procleave

		Procleave		
		Site de clivage	Score	Position
<i>hPax1</i>	Cas-3	DVVD†GKTP	0.999	380
		DMRD†GACS	0.995	168
		AFVD†SYCW	0.773	82
	Cas-6	EELD†KVYN	0.785	148
		DVVD†GKTP	0.6	380
	Cas-7	DVVD†GKTP	0.988	380
		DMRD†GACS	0.937	168
	Cas-8	DMRD†GACS	0.735	168
		DVVD†GKTP	0.652	380

Les résultats de la prédiction des sites de clivage de la *hPax1* montrent que, pour les caspases-3 et -7 (Cas-3 et Cas-7), les sites qui ont les scores les plus élevés correspondent aux segments DVVD†GKTP et DMRD†GACS comprenant les sites de clivage D380 et D168, respectivement. Les caspases-6 et -8 (Cas-6 et Cas-8) ciblent aussi le site D380 mais avec une probabilité plus faible. De plus, la caspase-8 cible également le site D168 avec un score de 0.735 qui est inférieur aux scores obtenus pour les caspases-3 et -7.

Ces résultats présentent aussi d'autres sites, qui sont spécifiquement ciblés par la caspase-3, au niveau du D82 qui se trouve dans le segment AFVD†SYCW et par la caspase-6 au niveau du D148 qui se trouve dans le segment EELD†KVYN.

Ces résultats montrent que les caspases-3, -6, -7, -8 ciblent préférentiellement le motif DXXD† de la *hPanx1*. Dans ce motif, D est le code à une lettre de l'acide aspartique, X représente n'importe quel acide aminé et † désigne le site du clivage.

Par ailleurs, ces résultats montrent aussi que les caspases-3 et -6 reconnaissent aussi le motif XXXD†.

2.1.2 Pannexine 2

Tableau 4.2 : Prédiction des différents sites de clivage de la *hPanx2* par Procleave.

		Procleave		
		Site de clivage	Score	Position
<i>hPanx2</i>	Cas-3	AEPD†GAAE	0.982	416
		ASPD†GAAG	0.938	267
		EEED†GGPR	0.75	640
		TVRD†SGVQ	0.694	400
	Cas-6	EEED†GGPR	0.963	640
		QEID†NCYH	0.784	163
		NESD†LMYD	0.766	373
	Cas-7	AEPD†GAAE	0.951	416
		ASPD†GAAG	0.842	267
		EEED†GGPR	0.771	640
	Cas-8	EEED†GGPR	0.869	640
		AEPD†GAAE	0.826	416

Les résultats obtenus pour les *hPanx2* du tableau 4.2 montrent trois principaux sites de clivage par les caspases-3, -6, -7, -8 qui ont les scores les plus importants. Ces sites se trouvent dans les segments AEPD†GAAE, ASPD†GAAG et EEED†GGPR contenant les sites de clivage D416, D267 et D640, respectivement.

Par ailleurs, d'autres sites de clivage ont été prédits avec des probabilités plus faibles et qui sont le site D400 du segment TVRD†SGVQ, le site D163 du segment QEID†NCYH et le site D373 du segment NESD†LMYD.

Ces résultats (Tableau 4.2) montrent que les caspases-3, -6, -7 et -8 ciblent le motif XXXD† pour les *hPanx2*. Nous pouvons remarquer que les sites de clivage sont complètement différents de ceux de la *hPanx1* et ceci pour les différentes caspases.

2.1.3 Pannexine 3

Tableau 4.3 : Prédiction des différents sites de clivage de la *hPanx3* par Procleave.

		Procleave		
		Site de clivage	Score	Position
<i>hPanx3</i>	Cas-3	AYVD†SSCW	0.693	82
		TVVD†FMTL	0.595	368
		HKQD†GPGQ	0.579	95
	Cas-6	SELD†KSYN	0.664	149
	Cas-7	HKQD†GPGQ	0.618	95
	Cas-8	HKQD†GPGQ	0.6	95
AYVD†SSCW		0.597	82	

Les résultats de la prédiction des sites de clivage obtenus pour les *hPanx3* montrent que toutes les probabilités des sites de clivage par les caspases-3, -7 et -8 sont faibles et semblent partager un même site de clivage D95 au niveau du segment HKQD†GPGQ. Alors que, les Cas-3 et -8 ciblent spécifiquement un autre site D82 au niveau du segment AYVD†SSCW.

Par ailleurs, d'autres sites de clivage ont été prédits pour les caspases-3 et -6 qui sont le site D368 au niveau du segment TVVD†FMTL et D149 qui se trouve dans le segment SELD†KSYN.

Les résultats du tableau 4.3 montrent que les caspases-3, -6, -7 et -8 ciblent le même motif XXXD† retrouvé pour les *hPanx2*.

Les résultats obtenus par Procleave pour les trois isoformes indiquent qu'il existe deux motifs, XXXD† et DXXD† spécifiques ciblés par les caspases.

2.2 Analyse par CasCleave

CasCleave est un programme spécifique aux caspases et au lieu de calculer la probabilité des sites de clivage selon chaque caspase individuellement comme Procleave, le programme génère les résultats en passant par toutes les caspases à la fois (**Wang *et al.*, 2014**). Ces résultats sont donnés sous forme d'un tableau qui présente le site de clivage, le score et la position (Tableau 4.4).

Pour les *hPanx1*, les sites DVVD*GKTP et DMRD*GACS présentant les scores les plus élevés comprennent les sites de clivage D379 et D167, respectivement. Deux autres sites ont été prédits, le site D401 et le site D81 qui se trouvent dans les segments ELQD*SETK et AFVD*SYCW, respectivement.

Les *hPanx2* se trouvent ciblés par les caspases dans six différents sites. Les quatre ayant les scores les plus élevés sont AEPD*GAAG, DVGD*LIAI, EEED*GGPR et ASPD*GAAG comprenant les sites de clivage D415, D650, D639 et D266 respectivement.

Avec seulement deux sites de clivage, les *hPanx3* se trouvent ciblés dans le segment HKQD†GPGQ qui comprend le site D94 et dans AYVD*SSCW qui comprend le site D81.

Les caspases ciblent le même motif DXXD* et/ou XXXD* retrouvé précédemment avec Procleave.

Tableau 4.4 : Prédiction des différents sites de clivage par CasCleave

CasCleave			
	Site de clivage	Score	Position
hPanx1	DVVD*GKTP	1.288	379
	DMRD*GACS	1.093	167
	ELQD*SETK	0.729	401
	AFVD*SYCW	0.695	81
hPanx2	AEPD*GAAE	0.928	415
	DVGD*LIAI	0.912	650
	EEED*GGPR	0.812	639
	ASPD*GAAG	0.803	266
	TVRD*SGVQ	0.621	399
hPanx3	HKQD*GPGQ	0.655	94
	AYVD*SSCW	0.557	81

3 Une comparaison entre Procleave et CasCleave

Nous avons opté à prendre les scores les plus élevés (≥ 0.6) des deux programmes Procleave et CasCleave qui sont similaires en principe et différents en application, ils nous ont fourni des résultats presque identiques (Tableau 4.5).

3.1 Pannexine 1

Le programme Procleave indique que les caspases-3, -6 et -7 (exécutrices) semblent agir sur les *hPanx1* au niveau des segments ³⁷⁶DVVD†GKTP³⁸³ et ¹⁶⁴DMRD†GACS¹⁷¹ qui comprennent les sites de clivage D379 et D167, respectivement. CasCleave confirme ces résultats produits par Procleave et ciblent les sites de clivage D379 et D167. Cela permet d'identifier un site spécifique de clivage DXXD†.

Les deux programmes ont permis également la prédiction d'un autre site D81 au niveau du segment ⁷⁸AFVD†SYCW⁸⁵. De plus, le site D147 du segment ¹⁴⁴EELD†KVYN¹⁵¹ a été prédit spécifiquement par Procleave alors que le site D401 qui se trouve dans le segment ³⁹⁸ELQD†SETK⁴⁰⁵ a été prédit spécifiquement par CasCleave.

3.2 Pannexine 2

Les résultats obtenus pour les *hPanx2* montrent que les sites de clivage D415, D266 et D639 correspondant aux segments $^{412}\text{AEPD}\dagger\text{GAAE}^{419}$, $^{263}\text{ASPD}\dagger\text{GAAG}^{270}$ et $^{636}\text{EEED}\dagger\text{GGPR}^{643}$, respectivement sont prédits par les deux programmes.

Cependant le site de clivage D650 du segment $^{647}\text{DVGD}\dagger\text{LIAI}^{654}$ a été prédit uniquement par CasCleave.

3.3 Pannexine 3

Pour les *hPanx3*, les deux logiciels ont prédits deux sites de clivage, D81 et D94 qui se trouvent dans les segments $^{78}\text{AYVD}\dagger\text{SSCW}^{85}$ et $^{91}\text{HKQD}\dagger\text{GPGQ}^{98}$, respectivement.

Tableau 4.5 : Tableau comparatif des deux programmes utilisés.

			Procleave	CasCleave
	Site de clivage	Position	Score	Score
<i>hPanx1</i>	DVVD†GKTP	379	0.999	1.288
	DMRD†GACS	167	0.995	1.093
	AFVD†SYCW	81	0.773	0.695
	EELD†KVYN	147	0.785	-
	ELQD*SETK	401	-	0.729
<i>hPanx2</i>	AEPD†GAAE	415	0.859	0.928
	ASPD†GAAG	266	0.798	0.803
	EEED†GGPR	639	0.651	0.812
	DVGD*LIAI	650	-	0.912
<i>hPanx3</i>	AYVD†SSCW	81	0.665	0.655
	HKQD†GPGQ	94	0.6	0.557

Ces sites de clivage par les caspases comprennent les motifs XXXD† et DXXD†.

4. Topologie prédite montrant les sites de clivage par les caspases

Protter est un outil web spécialisé dans la visualisation des protéines ainsi que leurs caractéristiques prédites (Omasits *et al.*, 2014) (<https://wlab.ethz.ch/protter/#>). Les figures sont obtenues à partir des différentes études analytiques de la structure et de la topologie des pannexines humaines

L'analyse de la topologie des pannexines montre la présence de quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires, une boucle intracellulaire et les deux extrémités N- et C-terminales qui sont du côté cytosolique.

Les programmes ont permis la prédiction et l'identification de deux sites de clivage principaux chez la *hPannx1*. Le premier site correspondant au résidu d'acide aspartique D379 qui se trouve dans la séquence ³⁷⁶DVVD†G³⁸⁰ dans le domaine C-terminal. Le deuxième site correspondant au résidu d'acide aspartique D167 qui se trouve au niveau de la séquence ¹⁶⁴DMRD†G¹⁶⁸ au sein de la boucle intracellulaire et un troisième site qui se trouve au niveau du résidu d'acide aspartique D81 dans la séquence ⁷⁸AFVD†S⁸² au sein de la première boucle extracellulaire (Figure 4.4).

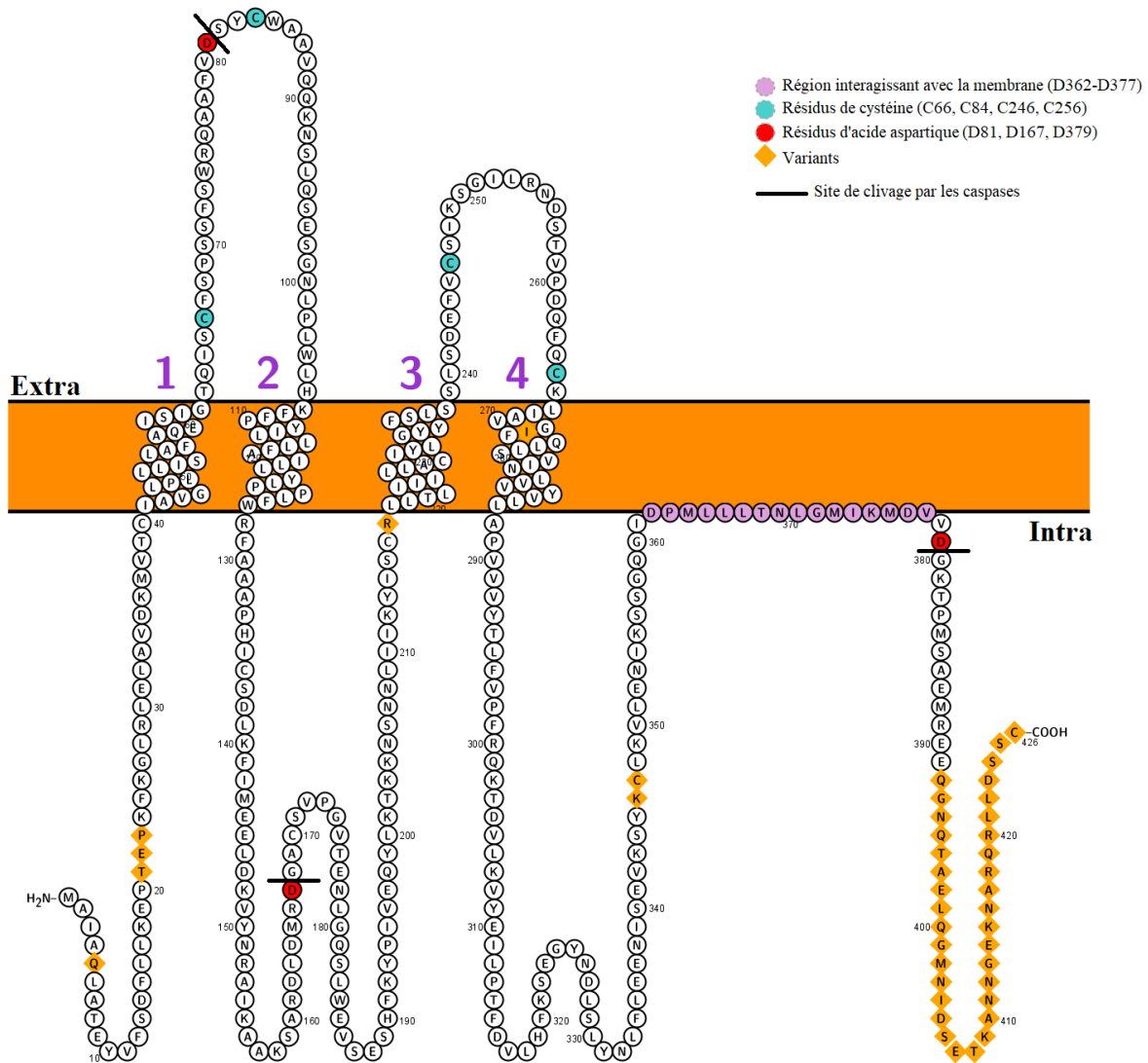


Figure 4.4 : Visualisation de la topologie et des sites de clivage de la pannexine 1 humaine.

Représentation de la topologie membranaire de la *hPanx1* et les sites de clivage ainsi que les résidus d'acides aminés impliqués qui sont corroborés par les différents programmes utilisés lors de ce travail. La *hPanx1* comporte quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires où se trouvent quatre résidus cystéine conservés ainsi qu'un site de clivage par les caspases (D81), une boucle intracellulaire contenant le deuxième site de clivage par les caspases (D167), une région à 15 résidus (D362-D377) qui interagit avec la membrane et une longue queue C-terminale où se trouve un autre site de clivage par les caspases (D379).

Pour la *hPanx2*, les programmes utilisés ont permis également d'identifier trois sites de clivage. Deux se situant au niveau de la partie C-terminale, le premier site correspond à l'acide aspartique D415 qui se trouve dans la séquence $^{412}\text{AEPD}\dagger\text{G}^{416}$ et le deuxième correspondant à l'acide aspartique D639 de la séquence $^{637}\text{EEED}\dagger\text{G}^{640}$. Finalement, le troisième site réside dans la

deuxième boucle extracellulaire et qui correspond au résidu d'acide aspartique D266 de la séquence $^{263}\text{ASPD}\dagger\text{G}^{267}$ (Figure 4.5).

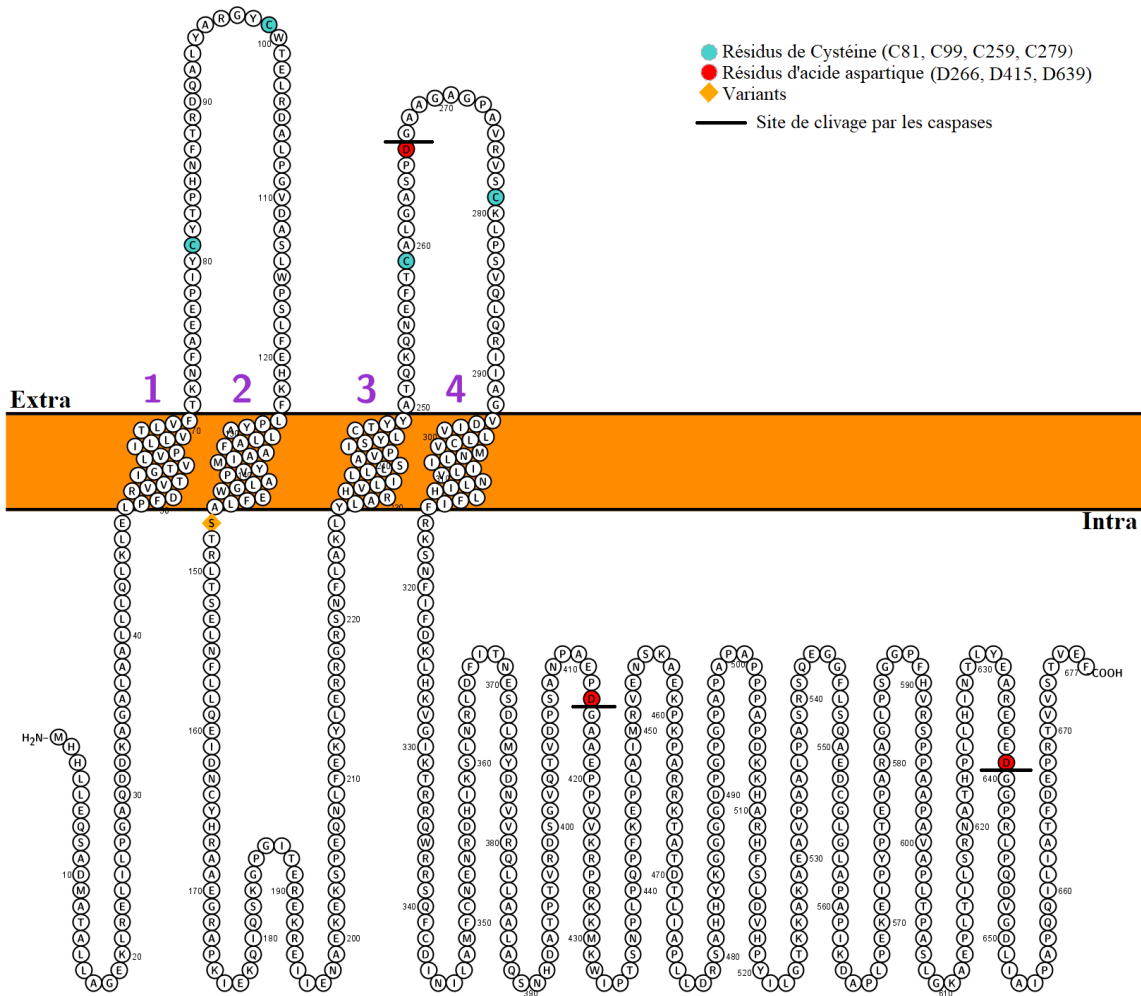


Figure 4.5 : Visualisation de la topologie et des sites de clivage de la pannexine 2 humaine

Représentation de la topologie membranaire de la hPanx2, les sites de clivage et les résidus d'acides aminés impliqués qui sont corroborés par les différents programmes utilisés lors de ce travail. La hPanx2 comporte quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires contenant quatre résidus de cystéine conservés et un site de clivage D266, une boucle intracellulaire et une longue queue C-terminale où deux sites de clivage par les caspases ont été prédits (D415, D639).

Procleave et CasCleave ont permis aussi de prédire deux sites de clivage pour la *hPanx3* qui sont le site D81 qui se trouve dans le segment $^{78}\text{AYVD}\dagger\text{S}^{82}$ et le site D94 de la séquence $^{91}\text{HKQD}\dagger\text{G}^{95}$ (Figure 4.6). Ces deux sites se trouvent dans la première boucle extracellulaire.

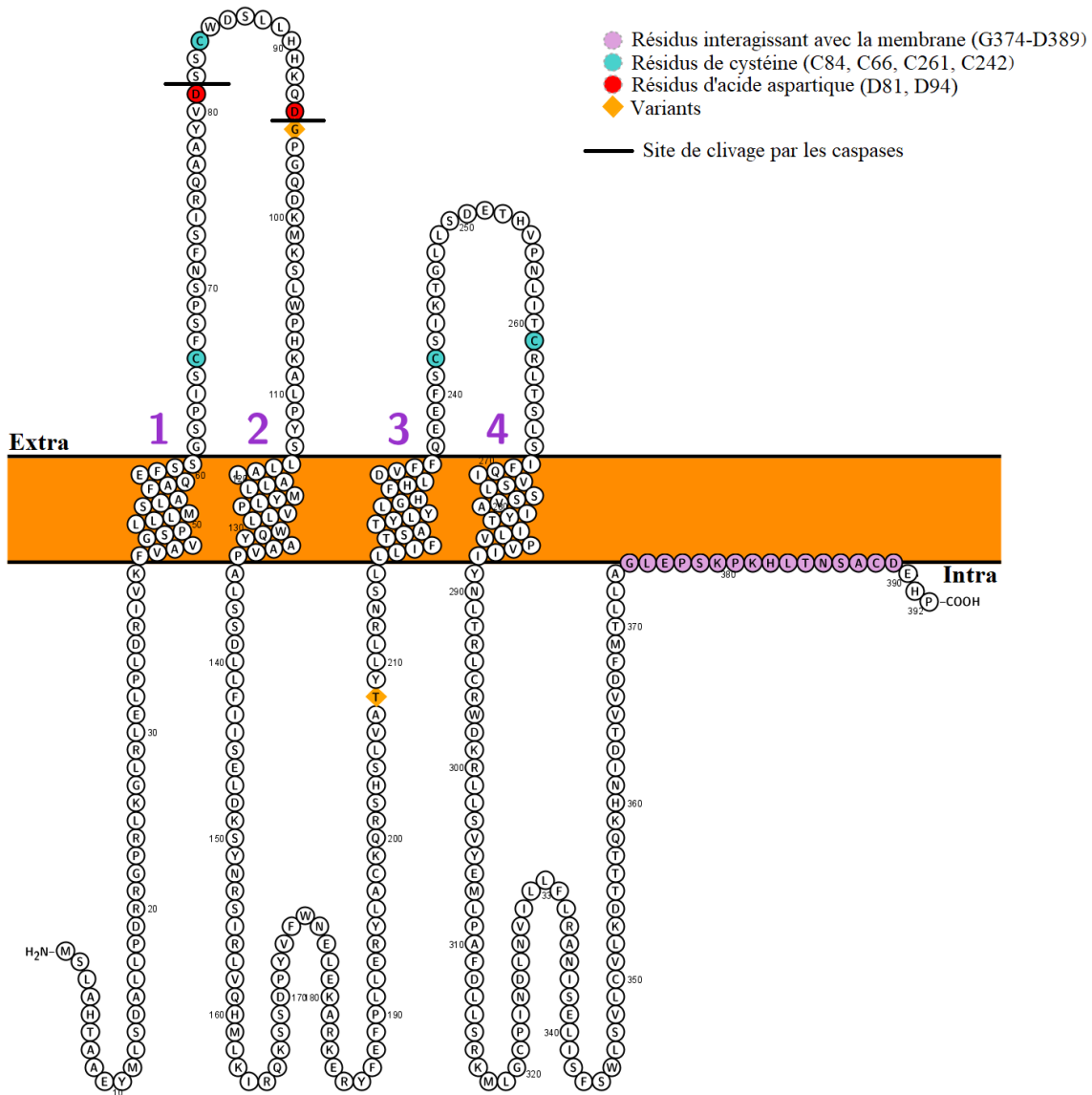


Figure 4.6 : Visualisation de la topologie et des sites de clivage de la pannexine 3 humaine.

Représentation de la topologie membranaire de la *hPanx3* et les sites de clivage ainsi que les résidus d'acides aminés impliqués et qui sont corroborés par les différents programmes utilisés lors de ce travail. La *hPanx3* comporte quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires qui contiennent quatre résidus de cystéine ainsi que deux sites de clivage par les caspases (D81, D94) et une région à 15 résidus qui interagit avec la membrane (G374-D389).

Les résultats obtenus par les trois programmes sont en concordance avec les travaux réalisés sur les pannexines et plus spécifiquement la Panx1 qui est très étudiée. D'après des travaux faits sur l'activité des caspases (**Timmer et Salvesen, 2007**), le site de reconnaissance DXXD† n'est pas suffisant pour aboutir à un clivage, la nature du résidu qui occupe la position P₁ aussi nommé P+1 du motif DXXD†P₁ joue un rôle majeur dans la réaction enzymatique. Si la position P₁ est occupée par des résidus de Gly, Thr, Ala, Asn ou Ser, le clivage est favorisé et devient plus probable. Alors que dans le cas où des résidus de Glu, Lys, Asp, Arg ou Trp occupe la position P₁, le clivage devient moins probable (**Lavrik et al., 2005**).

D'un autre côté, Sandilos et son équipe ont utilisé la pannexine 1 humaine tronquée au niveau du résidu d'acide aminé 371 (*hPanxΔ371*), ce qui a permis d'observer une activation constitutive du canal. Alors qu'en utilisant d'autres mutants de la *hPanx1* tronqué (*hPanxΔ401*, *Δ413* et *Δ391*) aucune activation ne s'est produite et le canal reste inactif. La longueur du domaine C-terminal de la *hPanx1* (378-426) semble avoir un rôle important et notamment la région qui se trouve en aval du résidu d'acide aminé 371, dans l'activation du canal (**Sandilos et al., 2012**).

Par ailleurs, l'étude de Chekeni et collaborateurs qui ont travaillé sur le rôle de la pannexine 1 dans l'apoptose a montré qu'il existe deux sites potentiels de clivage par les caspases. Le premier site ³⁷⁶DVVD³⁷⁹ au niveau de la queue C-terminale des pannexines et le deuxième site de clivage ¹⁶⁴DMRD¹⁶⁷ qui se trouve au niveau de la boucle intracellulaire (**Chekeni et al., 2010**). L'étude de Metalsi Tani en 2018, qui a travaillé sur les modifications post-traductionnelles et notamment la protéolyse en utilisant le logiciel PROSPEROUS, a également permis de mettre en évidence le site de clivage par les caspases D379 de la pannexine 1 ainsi que les sites D415 et D639 de la pannexine 2, ceci est en accord avec nos prédictions en utilisant les deux programmes (**Metalsi Tani, 2018**).

La *hPanx2*, qui présente un domaine C-terminal d'une longueur particulière comparée à la *hPanx1* et à la *hPanx3* semble avoir aussi des sites de clivage au niveau de ce domaine C-terminal. La présence de ces sites de clivage suggère une régulation des pannexines (*hPanx1* et *hPanx2*) par protéolyse du domaine C-terminal. Par contre, il semble que le domaine C-terminal de la *hPanx3* interagisse avec la membrane et ne peut donc pas intervenir dans la régulation de l'activité de ces pannexines car les sites de clivage de la *hPanx3* se trouvent principalement au sein de la première boucle extracellulaire et non au niveau de la queue C-terminale.

Conclusion

Les pannexines (Panx) sont des protéines membranaires à traversées multiples qui appartiennent à une superfamille de protéines appelé *tetraspans*. Faisant partie d'une famille multigénique de trois membres chez l'homme (*hPanx1*, *hPanx2*, *hPanx3*). Les pannexines sont capables de former des hémicanaux qui transportent les ions et les molécules telles que l'ATP dans le milieu extracellulaire et interviennent dans plusieurs phénomènes physiologiques tels que l'apoptose.

Lors de l'apoptose, qui est la mort programmée de la cellule, une famille de protéases à cystéine appelées caspases (Cas) intervient et clive des régions cruciales à l'activité des pannexines afin d'accentuer le phénomène d'apoptose.

Dans ce travail, nous avons fait une analyse structurale et fonctionnelle des pannexines humaines à l'aide d'outils informatiques. À cet égard, nous avons utilisé les séquences des pannexines humaines (*hPanx*) afin de prédire et caractériser les différents domaines des trois isoformes (*hPanx1*, *hPanx2*, *hPanx3*) et les sites de clivage par les caspases.

L'étude de la topologie a été réalisé à l'aide d'un programme appelé ProtScale qui a montré que les pannexines humaines sont des protéines membranaires à quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires, une boucle intracellulaire et les domaines N- et C-terminaux qui se trouve du côté cytosolique.

La prédiction des sites clivage au moyen des deux programmes Procleave et CasCleave a révélé la présence de plusieurs sites ciblés par les différentes caspases au niveau des résidus d'acide aspartique D167, D379 et D81 pour la *hPanx1*, les résidus D266, D415, D639 pour la *hPanx2* et les résidus D81 et D94 pour la *hPanx3*. Ces sites de clivage se trouvent dans des motifs de reconnaissance qui sont DXXD et XXXD. Ces sites de clivage se trouvent généralement dans la longue queue C-terminale caractéristique de la *hPanx1* et la *hPanx2* alors que pour la *hPanx3*, les sites de clivage se trouvent au sein de la boucle extracellulaire.

Rétrospectivement, les outils informatiques disponibles sont nécessaires pour mieux comprendre l'activité et la régulation de ces protéines afin de mieux guider la phase expérimentale. Ces résultats ouvrent l'horizon pour entamer d'autres études à propos des pannexines et leurs clivages par les caspases.

Références bibliographiques

A

Alves, M., Beamer, E., & Engel, T. (2018). The metabotropic purinergic P2Y receptor family as novel drug target in epilepsy. *Frontiers in pharmacology*, 9, 193.

Ambrosi, C., Gassmann, O., Pranskevich, J. N., Boassa, D., Smock, A., Wang, J., ... & Sosinsky, G. E. (2010). Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24420-24431.

B

Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., ... & Panchin, Y. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*, 83(4), 706-716.

Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., & Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(23), 13644-13649.

C

Caplan, M. J., Kamsteeg, E. J., & Duffield, A. (2007). Tetraspan proteins: regulators of renal structure and function. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 16(4), 353-358.

Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski, E. R., ... & Ravichandran, K. S. (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, 467(7317), 863-867.

Chiu, Y. H., Ravichandran, K. S., & Bayliss, D. A. (2014). Intrinsic properties and regulation of Pannexin 1 channel. *Channels*, 8(2), 103-109.

Claros, M. G., & Heijne, G. V. (1994). TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Bioinformatics*, 10(6), 685-686.

D

DOG 1.0: Illustrator of Protein Domain Structures. Jian Ren, Longping Wen, Xinjiao Gao, Changjiang Jin, Yu Xue and Xuebiao Yao. *Cell Research* (2009) 19:271–273.

Dourado, M., Wong, E., & Hackos, D. H. (2014). Pannexin-1 is blocked by its C-terminus through a delocalized non-specific interaction surface. *PLoS One*, 9(6), e99596.

G

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research*, 31(13), 3784-3788.

H

Hardwick, J. M. (2002). Caspases in Programmed Cell Death. *Encyclopedia of Cancer*, Second Edition, 2, 369–373.

Gajardo-Gómez, R., Labra, V. C., & Orellana, J. A. (2016). Connexins and pannexins: new insights into microglial functions and dysfunctions. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 86.

I

Ishikawa, M., & Yamada, Y. (2017). The role of pannexin 3 in bone biology. *Journal of dental research*, 96(4), 372-379.

Ishikawa, M., Iwamoto, T., Nakamura, T., Doyle, A., Fukumoto, S., & Yamada, Y. (2011). Pannexin 3 functions as an ER Ca²⁺ channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *Journal of Cell Biology*, 193(7), 1257-1274.

J

Jung, B. C., Kim, S. H., Lim, J., & Kim, Y. S. (2020). Activation of pannexin-1 mediates triglyceride-induced macrophage cell death. *BMB reports*, 53(11), 588.

L

Lavrik, I. N., Golks, A., & Krammer, P. H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of clinical investigation*, 115(10), 2665-2672.

Li, F., Leier, A., Liu, Q., Wang, Y., Xiang, D., Akutsu, T., ... & Song, J. (2020). Procleave: predicting protease-specific substrate cleavage sites by combining sequence and structural information. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 18(1), 52-64.

Litvin, O., Tiunova, A., Connell-Alberts, Y., Panchin, Y., & Baranova, A. (2006). What is hidden in the pannexin treasure trove: the sneak peek and the guesswork. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10(3), 613-634.

Locovei, S., Bao, L., & Dahl, G. (2006). Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(20), 7655-7659.

M

McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), a008656.

Michalski, K., Syrjanen, J. L., Henze, E., Kumpf, J., Furukawa, H., & Kawate, T. (2020). The Cryo-EM structure of pannexin 1 reveals unique motifs for ion selection and inhibition. *Elife*, 9, e54670. Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other

Mou, L., Ke, M., Song, M., Shan, Y., Xiao, Q., Liu, Q., ... & Deng, D. (2020). Structural basis for gating mechanism of Pannexin 1 channel. *Cell research*, 30(5), 452-454.

Narahari, A. K., Kreutzberger, A. J., Gaete, P. S., Chiu, Y. H., Leonhardt, S. A., Medina, C. B., Jin, X., Oleniacz, P. W., Kiessling, V., Barrett, P. Q., Ravichandran, K. S., Yeager, M., Contreras, J. E., Tamm, L. K., & Bayliss, D. A. (2021). ATP and large signaling metabolites flux through caspase-activated Pannexin 1 channels. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/elife.64787>

Metalsi Tani, O. (2018). Analyse structurale et fonctionnelle des pannexines [Mémoire de Master, Université de Tlemcen.

N

Navis, K. E., Fan, C. Y., Trang, T., Thompson, R. J., & Derksen, D. J. (2020). Pannexin 1 channels as a therapeutic target: Structure, inhibition, and outlook. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(15), 2163-2172.

Nicholson, D., & Melino, G. (2013). Caspases and Cell Death. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 388–396. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378630-2.00498-9>

P

Panchina, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., & Lukyanov, S. (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Current biology*, 10(13), R473-R474.

Pelegri, P., & Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal*, 25(21), 5071-5082.

Penuela, S., Bhalla, R., Gong, X. Q., Cowan, K. N., Celetti, S. J., Cowan, B. J., ... & Laird, D. W. (2007). Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *Journal of cell science*, 120(21), 3772-3783.

Penuela, S., Bhalla, R., Nag, K., & Laird, D. W. (2009). Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization. *Molecular biology of the cell*, 20(20), 4313-4323.

Penuela, S., Gehi, R., & Laird, D. W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(1), 15-22.

Penuela, S., Simek, J., & Thompson, R. J. (2014). Regulation of pannexin channels by post-translational modifications. *FEBS letters*, 588(8), 1411-1415.

Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press (2005). pp. 571-607

Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. *Bioinformatics*. 2014 Mar 15;30(6):884-6. doi: 10.1093/bioinformatics/btt607.

Q

Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L. L., Louie, S., Cupp, J. E., ... & Dixit, V. M. (2011). Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *The Journal of Immunology*, 186(11), 6553-6561.

R

Ruan, Z., Orozco, I. J., Du, J., & Lü, W. (2020). Structures of human pannexin 1 reveal ion pathways and mechanism of gating. *Nature*, 584(7822), 646–651. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2357-y>

S

Sandilos, J. K., Chiu, Y. H., Chekeni, F. B., Armstrong, A. J., Walk, S. F., Ravichandran, K. S., & Bayliss, D. A. (2012). Pannexin 1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11303-11311.

Scemes, E., Suadicani, S. O., Dahl, G., & Spray, D. C. (2007). Connexin and pannexin mediated cell—cell communication. *Neuron glia biology*, 3(3), 199.

Schweizer, A., Briand, C., & Grütter, M. G. (2003). Crystal structure of caspase-2, apical initiator of the intrinsic apoptotic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42441-42447.

Song, J., Li, F., Leier, A., Marquez-Lago, T. T., Akutsu, T., Haffari, G., ... & Pike, R. N. (2018). PROSPERous: high-throughput prediction of substrate cleavage sites for 90 proteases with improved accuracy. *Bioinformatics*, 34(4), 684-687.

Sosinsky, G. E., Boassa, D., Dermietzel, R., Duffy, H. S., Laird, D. W., MacVicar, B., ... & Dahl, G. (2011). Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels*, 5(3), 193-197.

Spagnol, G., Sorgen, P. L., & Spray, D. C. (2014). Structural order in Pannexin 1 cytoplasmic domains. *Channels*, 8(2), 157-166.

T

Taylor, K. A., Wright, J. R., & Mahaut-Smith, M. P. (2015). Regulation of Pannexin-1 channel activity. *Biochemical Society Transactions*, 43(3), 502-507.

Teng, X., & Hardwick, J. (2014). Caspases in Programmed Cell Death.

Timmer, J. C., & Salvesen, G. S. (2007). Caspase substrates. *Cell Death & Differentiation*, 14(1), 66-72.

Turmel, P., Dufresne, J., Hermo, L., Smith, C. E., Penuela, S., Laird, D. W., & Cyr, D. G. (2011). Characterization of pannexin1 and pannexin3 and their regulation by androgens in the male reproductive tract of the adult rat. *Molecular reproduction and development*, 78(2), 124-138.

Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(3), 231-241.

V

Vanden Abeele, F., Bidaux, G., Gordienko, D., Beck, B., Panchin, Y. V., Baranova, A. V., ... & Prevarskaya, N. (2006). Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *The Journal of cell biology*, 174(4), 535-546.

W

Wang, M., Zhao, X. M., Tan, H., Akutsu, T., Whisstock, J. C., & Song, J. (2014). Cascleave 2.0, a new approach for predicting caspase and granzyme cleavage targets. *Bioinformatics*, 30(1), 71-80.

Y

Yen, M. R., & Saier Jr, M. H. (2007). Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Progress in biophysics and molecular biology*, 94(1-2), 5-1