

Université de Montréal

Couplage entre les régions IIS4S5 et IIIS6 lors de l'activation du canal calcique $Ca_v3.2$

par

Pierre-Olivier Demers Giroux

Département de physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences
en physiologie
option physiologie et biophysique moléculaires

août 2013

© Pierre-Olivier Demers Giroux, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
Couplage entre les régions IIS4S5 et IIS6 lors de l'activation du canal
calcique $Ca_v3.2$

Présenté par :
Pierre-Olivier Demers Giroux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Réjean Couture, président-rapporteur

Lucie Parent, directrice de recherche

Nazzareno D'Avanzo, membre du jury

Résumé

Le canal calcique dépendant du voltage de type-T $Ca_v3.2$ joue un rôle important dans l'excitabilité neuronale et dans la perception de la douleur. Le canal $Ca_v3.2$ partage une grande homologie structurale et fonctionnelle avec les canaux Na_v . Ces deux types de canaux sont activés par de faibles dépolarisations membranaires et possèdent des cinétiques de temps d'activation et d'inactivation plus rapides que les canaux Ca_v de type-L. Les structures cristallines à haute résolution des canaux bactériens Na_vAb (Payandeh et al. 2011; Payandeh et al. 2012) et Na_vRh (Zhang et al. 2012) suggèrent que l'hélice amphiphile S4S5 du domaine II peut être couplée avec les résidus de l'hélice S6 dans le domaine II ainsi qu'avec des résidus de l'hélice homologue dans le domaine adjacent, soit le domaine III, et ce, durant l'activation du canal. Pour déterminer les résidus fonctionnellement couplés, durant l'activation du canal $Ca_v3.2$, une analyse cyclique de doubles mutants a été effectuée par substitution en glycine et alanine des résidus clés entre l'hélice S4S5 du domaine II et le segment S6 des domaines II et III. Les propriétés biophysiques ont été mesurées à l'aide de la technique de « cut-open » sur les ovocytes. Les énergies d'activation ont été mesurées pour 47 mutations ponctuelles et pour 14 paires de mutants. De grandes énergies de couplage ($\Delta\Delta G_{interact} > 2 \text{ kcal mol}^{-1}$) ont été observées pour 3 paires de mutants introduites dans les IIS4S5/IIS6 et IIS4S5/IIIS6. Aucun couplage significatif n'a été observé entre le IIS4S5 et le IVS6. Nos résultats semblent démontrer que les hélices S4S5 et S6 provenant de deux domaines voisins sont couplées durant l'activation du canal calcique de type-T $Ca_v3.2$.

Mots-clés: activation, calcium, canal ionique, « Double Mutant Cycle Analysis », électrophysiologie, « gating »

Abstract

Voltage-activated T-type calcium channel $\text{Ca}_v3.2$ plays an important role in neuronal excitability and in pain perception. $\text{Ca}_v3.2$ channel bears a strong structural and functional homology with voltage-dependent Na_v channels. In particular, these channels are activated by relatively small depolarization and display faster activation and inactivation kinetics than the L-type Ca_v channel. High-resolution crystal structures of bacterial Na_vAb (Payandeh *et al.* 2011; Payandeh *et al.* 2012) and Na_vRh (Zhang *et al.* 2012) suggest that the amphiphilic helix S4S5 in Domain II may be coupled with S6 residues both in Domain II and in the adjacent Domain III during channel activation. To determine whether residues in the S4S5 helix of Domain II are functionally coupled with residues in the S6 helix in Domain II and Domain III during the voltage-dependent activation of $\text{Ca}_v3.2$, a double mutant cycle analysis was performed by introducing pairs of glycine and alanine residues in the S4S5 helix of Domain II and the S6 region of Domains II and III. Biophysical properties were measured with the cut-open oocyte technique. Activation gating was measured for 47 single mutants and 14 pairs of mutants. Strong coupling energies ($\Delta\Delta G_{\text{interact}} > 2 \text{ kcal mol}^{-1}$) were reported for 3 pairs of mutants introduced in IIS4S5/IIS6 and IIS4S5/IIIS6. No significant coupling was observed between IIS4S5 and IVS6. Altogether, our results demonstrate that the S4S5 and S6 helices from neighboring domains are energetically coupled during the activation of the low voltage-gated T-type $\text{Ca}_v3.2$ channel.

Keywords : activation, calcium, double mutant cycle analysis, ionic channel, electrophysiology, gating

Liste des abréviations

- A -

A : Alanine (Ala)

Achr : Récepteur à l'acétylcholine

AID : « Alpha Interaction Domain »

ATP: Adénosine triphosphate

- B -

BID : « Beta Interaction Domain »

BTZ : Benzothiazepine

- C -

C : Cystéine (Cys)

Ca_v : Canal Calcique Dépendant du Voltage

CFU : « Colony Forming Unit »

- D -

D : Aspartate (Asp)

ΔG_{act} : Énergie libre de Gibbs d'activation

ΔG_{inact} : Énergie libre de Gibbs d'inactivation

DHP : Dihydropyridine

- E -

E : Glutamate (Glu)

$E_{0.5,act}$: Potentiel de mi-activation

$E_{0.5,inact}$: Potentiel de mi-inactivation

EGTA : Acide glycol-bis(2-aminoéthylether)-*N,N,N',N'*-tétraacétique

- G -

G : Glycine (Gly)

GK : Guanylate Kinase

- H -

HVA : « High Voltage Activated »

- I -

I : Isoleucine (Ile)

- K -

K_V : Canal Potassique Dépendant du Voltage

- L -

L : Leucine (Leu)

LVA : « Low Voltage Activated »

- M -

MES : Acide méthanesulfonique

- N -

N : Asparagine (Asn)

Na_v : Canal Sodique Dépendant du Voltage

- P -

P : Proline (Pro)

PAA : Phénylalkylamine

PCR : « Polymerase Chain Reaction »

- R -

R : Arginine (Arg)

R50 : Courant résiduel à 50 ms

RE : Réticulum Endoplasmique

ROC : « Receptor Operated Channel »

RS : Réticulum Sarcoplasmique

- S -

S.E.M. : Écart standard à la moyenne

SH3 : « Src Homology-3 »

- T -

TEA : Tétréthylammonium

TRP : « Transient Receptor Potential »

τ_{deact} : Constante de temps de désactivation

τ_{inact} : Constante de temps d'inactivation

- V -

V : Valine (Val)

$V_{0.5, \text{act}}$: Potentiel de mi-activation

- X -

X : Acide aminé quelconque

Table des matières

1. INTRODUCTION	1
1.1. Rôles physiologiques des ions Ca^{2+}	1
1.1.1. Transport membranaire de l'ion Ca^{2+}	2
1.2. Les canaux calciques dépendants du voltage	3
1.2.1. Classification des canaux Ca_V	4
1.2.2. Sous-unités des canaux Ca_V	6
1.2.2.1. La sous-unité $\text{Ca}_V\alpha 1$	7
1.2.2.2. La sous-unité $\text{Ca}_V\beta$	11
1.2.2.3. La sous-unité $\text{Ca}_V\alpha 2\delta$	13
1.2.2.4. La sous-unité $\text{Ca}_V\gamma$	13
1.2.3. Canaux calciques LVA	14
1.2.3.1. Rôles physiologiques	16
1.2.3.1.1. Fonctions neuronales.....	16
1.2.3.1.2. Fonctions cardiaques.....	17
1.2.3.1.3. Pathologies associées	18
1.2.4. Propriétés biophysiques	20
1.2.4.1. Perméabilité	22
1.2.4.2. Activation	23
1.2.4.3. Inactivation.....	24
1.2.4.4. Déactivation	25
1.3. Activation des canaux potassiques.....	25
1.3.1 Le senseur au voltage S4	26
1.3.2. La porte d'activation	28
1.3.3. La boucle S4S5.....	30
1.4. Activation des canaux calciques.....	31
1.4.1. Le senseur au voltage S4	32
1.4.2. La porte d'activation	32

1.4.3. La boucle S4-S5.....	35
1.5. Hypothèses et objectifs de recherche.....	37
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	39
2.1. Techniques de biologie moléculaire	39
2.2. Expression fonctionnelle des canaux	40
2.3. Enregistrements électrophysiologiques	41
2.4. Analyse des données	44
2.5. Analyse cyclique de doubles mutations.....	47
2.6. Modélisation par homologie.....	51
3. RÉSULTATS (PAR ARTICLE)	52
4. DISCUSSION	79
4.1. Limites du projet	79
4.1.1. Limites des modèles	79
4.1.2. Appareillage de COVC.....	80
4.1.2.1. Avantages du COVC.....	80
4.1.2.2. Limites et contraintes du COVC.....	81
4.1.3. Limites de l'analyse cyclique de doubles mutants.....	83
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	85
6. BIBLIOGRAPHIE	87

Liste des tableaux

Tableau I. Correspondance entre les nomenclatures des canaux Ca_v , leurs localisations tissulaires et leurs inhibiteurs.....	6
---	---

Liste des tableaux dans l'article

Tableau I. Biophysical properties of S6 mutants in $Ca_v3.2$	74
Tableau II. Biophysical properties of IIS4S5 mutants in $Ca_v3.2$	76
Tableau III. Biophysical properties of double mutants in $Ca_v3.2$	78

Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénétique des canaux Ca_V	8
Figure 2. Suggestion de la topologie de la sous-unité $Ca_V\alpha_1$ à la membrane plasmique	9
Figure 3. Alignement de la région « gating brake » des canaux LVA	10
Figure 4. Structure du complexe $Ca_V\beta_2a / Ca_V1.2$ -AID	12
Figure 5. La sous-unité $Ca_V\alpha_1$ des canaux LVA.....	15
Figure 6. Localisation des mutations retrouvées dans le gène CACNA1H chez des patients souffrants d'épilepsie avec absence.....	19
Figure 7. Schéma des cinétiques du canal $Ca_V3.1$	22
Figure 8. Hélice S4 de $K_V1.2$	27
Figure 9. Modèles de déplacement du S4	28
Figure 10. Porte d'activation des canaux MthK, KvAP et $K_V1.2$	29
Figure 11. Couplage entre la boucle S4-S5 et la porte d'activation dans $K_V1.2$	31
Figure 12. Alignement des S4 des canaux Ca_V	32
Figure 13. Mutations dans les hélices S6 de $Ca_V2.3$	34
Figure 14. Couplage mécanique entre les résidus L596 du IIS4S5 et I701 du IIS6 du canal $Ca_V2.3$	36

Liste des figures de l'article

Figure 1. Modeling of domains II and III based upon the atomic coordinates of Na _v Ab and Na _v Rh	64
Figure 2. Biophysical properties of Ca _v 3.2	65
Figure 3. Alignement of the primary sequences of the S6 in Ca _v 3.2, Na _v Ab, Na _v Rh, K _v 1.2 and the domain II of Ca _v 2.3	66
Figure 4. Biophysical properties of glycine mutants in IIS6 of Ca _v 3.2	67
Figure 5. Bar graph of the activation and inactivation energies for the glycine mutants in IIS6 of Ca _v 3.2.....	68
Figure 6. Alignement of the primary sequences and bar graph of the activation energies for the glycine mutants in S4S5 of Ca _v 3.2	68
Figure 7. Mecanical coupling between T911 in the IIS4S5 and I1013 in the IIS6 in Ca _v 3.2.....	69
Figure 8. Mecanical coupling between V907 in the IIS4S5 and I1013 in the IIS6 in Ca _v 3.2.....	70
Figure 9. Computer-based molecular models of domains II and III for Ca _v 3.2	71
Figure 10. Mecanical coupling between V907 in the IIS4S5 and N1548 in the IIS6 in Ca _v 3.2	72
Figure 11. Bar graph of the coupling energies for the double glycine mutants of Ca _v 3.2	73

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Lucie Parent de m'avoir accueilli dans son laboratoire durant les trois dernières années. Sa persévérance et son dévouement sont pour moi un modèle à suivre pour ma future vie professionnelle. Le Dr Parent m'a permis de me surpasser pour la réalisation de ce projet. J'aimerais aussi souligner le temps que le Dr Parent a consacré à la réalisation de mon article premier auteur et pour l'aide apportée pour la rédaction de mon mémoire de maîtrise.

Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire, soient Dr Benoîte Bourdin et madame Yolaine Dodier pour leur support et leurs conseils, Sébastien Wall-Lacelle pour m'avoir initié à l'électrophysiologie et à la biologie moléculaire, Catherine Brousseau pour son aide en fluorométrie en voltage imposé et Behzad Shakeri d'avoir été un ami précieux et pour son aide apportée dans la correction de ce mémoire. J'aimerais remercier Julie Verner pour son aide et son dévouement pour l'isolation d'ovocytes et Georges Haddad d'avoir pris le temps de m'enseigner la technique de « cut-open ».

J'aimerais remercier le groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM) de m'avoir accordé une bourse de prestige et la faculté de médecine de l'Université de Montréal de m'avoir accordé une bourse de dépannage.

Finalement, je souhaite remercier de tout mon cœur, les membres de ma famille, Suzanne, Serge, Serge-Alexandre, Bruno et mes amies Élodie et Raphaëlle pour leur support et leurs encouragements qui m'ont permis de réaliser ce projet.

1. INTRODUCTION

Le calcium (Ca^{2+}) est un cation divalent indispensable pour le bon fonctionnement de l'organisme. Dans le corps humain, il y a environ 1% du Ca^{2+} sous forme ion libre, le reste du Ca^{2+} (99%) joue un rôle structural au niveau des os et des dents; une partie du Ca^{2+} est aussi chélatée à d'autres ions. L'ion Ca^{2+} est distribué inégalement de part et d'autre de la membrane cellulaire, soit une concentration de 1 à 2 mM dans le milieu extracellulaire et une concentration de 0,1 μM au niveau du cytoplasme cellulaire si on ne considère pas le Ca^{2+} à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Ce gradient favorise le flux d'ions vers l'intérieur de la cellule. Le Ca^{2+} possède le gradient électrochimique le plus important de tous les ions chez les mammifères (Dong *et al.* 2006).

1.1. Rôles physiologiques des ions Ca^{2+}

L'ion Ca^{2+} est un messenger second assumant des rôles très diversifiés au sein de la cellule (Carafoli *et al.* 2001). Un messenger second est généralement une molécule ou un ion, comme dans le cas du Ca^{2+} , qui permet de façon indirecte la transduction d'un signal extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. L'ion Ca^{2+} intervient dans plusieurs mécanismes, entre autres: dans la contraction musculaire, la sécrétion, la régulation de l'expression des gènes, le métabolisme, la prolifération, l'apprentissage, la mémoire et plusieurs autres (Berridge *et al.* 1999). Cette diversité est due à la capacité de la cellule à interpréter les variations de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} selon la vitesse et son amplitude (Berridge *et al.* 2000). Les variations de concentration intracellulaire peuvent être induites par une entrée de Ca^{2+} provenant du milieu extracellulaire ou d'un relargage de Ca^{2+} des réticulum endoplasmique (RE) et sarcoplasmique (RS) ou encore par une combinaison des deux mécanismes. De plus, l'entrée de

Ca^{2+} dans la cellule a aussi pour effet de contribuer à la dépolarisation de la membrane cellulaire ce qui peut activer plusieurs types de protéines-canaux à la membrane.

1.1.1. Transport membranaire de l'ion Ca^{2+}

La membrane plasmique cellulaire est une bicouche de phospholipides et de protéines diverses formant une mosaïque fluide. Les phospholipides sont composés d'une tête phosphorylée polaire à laquelle est attachée une ou deux chaînes d'acide gras aliphatiques. Les phospholipides de la membrane cellulaire sont disposés en bicouche de sorte que les têtes polaires soient en périphérie et que les chaînes aliphatiques soient vers l'intérieur de la membrane. Cette dernière forme ainsi une grande barrière énergétique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, empêchant la diffusion simple de l'ion Ca^{2+} à travers de la membrane. L'ion Ca^{2+} nécessite donc l'aide d'une protéine membranaire, tel un canal, pour former un environnement propice au transport du calcium de part et d'autre de la membrane cellulaire.

Il existe quatre types de canaux calciques qui permettent l'entrée d'ions selon le gradient de concentration. Ces protéines permettent donc un transport qu'on dit passif, car il n'y a aucune dépense énergétique engendrée par l'entrée des ions Ca^{2+} .

- ✧ Les canaux calciques activés par le voltage (Ca_v) sont exprimés dans les cellules excitables, où ils sont activés par la dépolarisation de la membrane cellulaire qui se produit au cours du potentiel d'action.
- ✧ Les canaux calciques activés par un récepteur sont activés par la liaison d'un ligand extracellulaire. Ils sont surtout exprimés dans les cellules sécrétrices ainsi que dans les terminaisons nerveuses. Parmi ceux-ci on retrouve le récepteur ionotrope dont le ligand se lie directement au canal tel que le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (Achr) et le récepteur métabotrope qui nécessite la

liaison d'un ligand pour pouvoir activer à son tour le canal (Berridge, Bootman et al. 2003).

- ✧ Les canaux calciques mécaniquement activés sont exprimés dans plusieurs types cellulaires comme les cellules épithéliales de la trachée (Boitano et al. 1992) et les cellules cardiaques (Dostal et Baker 1998) pour en nommer quelques-unes. Ces canaux sont activés par la déformation cellulaire.
- ✧ SOC signifie « *Store-operated calcium channels* ». Ces canaux sont activés en réponse à une déplétion des réserves calciques intracellulaires.

Il y a aussi d'autres types de protéines qui permettent le rétablissement du gradient de concentration suite à une entrée cellulaire du calcium. Ces protéines permettent un transport qu'on dit actif, car les ions Ca^{2+} doivent voyager contre leur gradient de concentration. Dans le cas du transport actif primaire les protéines nécessitent d'hydrolyser de l'adénosine-triphosphate (ATP) pour permettre le transport d'ion Ca^{2+} . Tandis que le transport actif secondaire utilise l'énergie fournie par le gradient de concentration d'un autre ion pour permettre aux ions Ca^{2+} de traverser la membrane contre son gradient.

1.2. Les canaux calciques dépendants du voltage

Les travaux effectués par Hodgkin et Huxley sur l'axone de calmar géant démontrent qu'en réponse à une stimulation il se produit une entrée d'ions Na^+ , ce qui a pour effet de dépolariiser la membrane cellulaire. Le potentiel membranaire est par la suite rétabli par une sortie d'ions K^+ provoquée par la dépolariisation initiale (Hodgkin et Huxley 1952). Le groupe de Fatt identifie pour la première fois un potentiel d'action qui se propage en absence d'ions Na^+ dans le milieu extracellulaire. Ces observations, qui ont été faites sur des

fibres musculaires de pattes de crabes, seront par la suite expliquées par l'entrée de Ca^{2+} durant la phase ascendante du potentiel d'action (Fatt et Ginsborg 1958a; Fatt et Ginsborg 1958b). Peu de temps après, le groupe de Hagiwara et Naka observe des modifications engendrées par des agents chélateurs d'ions Ca^{2+} sur ces mêmes potentiels d'actions calciques, ce qui confirme la théorie émise par Fatt en 1958 (Hagiwara et Naka 1964).

1.2.1. Classification des canaux Ca_v

La première classification des canaux Ca_v était basée sur leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques. Les premières études électrophysiologiques sur les canaux Ca_v ont été accomplies dans des œufs d'étoiles de mer, *Mediaster aequalis*, où il y a été observé deux types de courants entrants. Un premier s'activant à un voltage membranaire dans les alentours de -50 mV et un deuxième à -6mV (Hagiwara et al. 1975). Une deuxième série d'études électrophysiologiques effectuée sur des neurones du corps olivaire inférieur du cochon d'Inde *Cavia porcellus* (Llinas et Yarom 1981; Mitra et Morad 1986) a confirmé la présence de deux familles de canaux calciques, soient les canaux calciques activés par une faible dépolarisation (Low-Voltage-Activated, LVA) et les canaux calciques activés par une forte dépolarisation (High-Voltage-Activated, HVA). Les canaux LVA s'activent à un potentiel membranaire d'environ -70 mV, un potentiel similaire à celui nécessaire pour activer les canaux sodiques dépendants du voltage (Na_v). Dû à leur petite conductance unitaire et à leur cinétique d'inactivation rapide, ces canaux sont aussi appelés canaux de type-T pour « tiny » et « transient ». Le seuil d'activation des canaux HVA se situe autour -20 mV. Ceux-ci sont également appelés canaux de type-L pour « large » et « long-lasting » car ces derniers ont une grande conductance unitaire en présence de Ba^{2+} . Également, en présence de Ba^{2+} , leur cinétique d'inactivation est plus lente que celle des canaux de type-T. Dans les années 1980, des expériences effectuées sur des neurones ont révélé un nouveau canal

calcique insensible aux composés organiques de la famille des dihydropyridines (DHP). Ce dernier possédait une conductance unitaire intermédiaire se situant entre celles des canaux de type-T et de type-L. Initialement, il a été nommé canal de type-N, pour neuronal. Par la suite, les canaux Ca_v de type-N ont été divisés en trois types en fonction de leur sensibilité à diverses toxines. Ceux étant sensibles à la toxine ω -conotoxin GVIA ont gardé la nomination de type-N. Ceux sensibles à la toxine ω -Aga IVA ont été classés de type-P/Q alors que les canaux résistants aux deux toxines ont été classés de type-R (Lacinova 2005).

En 1986, à l'aide des techniques de purification et de chromatographie, le groupe de Catterall découvre que les canaux Ca_v sont des protéines multimériques composées de trois à quatre sous-unités (Curtis et Catterall 1986). La sous-unité principale, $Ca_v\alpha_1$ est la sous-unité qui forme le pore du canal et qui détermine ses propriétés biophysiques et pharmacologiques. Les autres sous-unités sont dites auxiliaires ($Ca_v\beta$, $Ca_v\alpha_2\delta$ et $Ca_v\gamma$) et modulent l'activité de la sous-unité principale. Une nouvelle classification est alors établie. Cette classification est basée selon la séquence de l'ADN complémentaire de chaque clone de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$. Le premier isoforme $Ca_v\alpha_1$ à être purifié et cloné provient des cellules musculaires squelettiques et il est nommé α_1S (Curtis et Catterall 1984). Le canal α_1C se retrouve dans les cellules du muscle cardiaque (Biel et al. 1990). Les autres isoformes sont identifiés en ordre alphabétique selon la date de leur découverte, soient les canaux α_1A à α_1I . (Voir tableau I).

À ce jour, les canaux Ca_v sont encodés par 10 gènes différents. Ces gènes peuvent être séparés en trois familles distinctes selon leurs séquences primaires. Cela a permis, en 2000, d'établir une nouvelle nomenclature de type $Ca_vx.y$ où « x » désigne le chiffre de la famille à laquelle appartient le canal tandis qu'« y » distingue les membres d'une même famille selon une nomenclature déjà utilisée pour les canaux potassiques. Ainsi dans la première famille, Ca_v1 , il y a les canaux $Ca_v1.1$ à $Ca_v1.4$. Dans la deuxième

famille, Ca_v2 , il y a les canaux $Ca_v2.1$ à $Ca_v2.3$ et dans la troisième famille, Ca_v3 , il y a les canaux $Ca_v3.1$ à $Ca_v3.3$ (tableau I).

Classification fonctionnelle	Type	Canal	α_1	Localisation tissulaire	Inhibiteurs
HVA	L	$Ca_v1.1$	α_{1S}	Muscles squelettiques et cardiaques neurones, rétine	Dihydropyridines Phénylalkylamines Benzothiazépines
		$Ca_v1.2$	α_{1C}		
		$Ca_v1.3$	α_{1D}		
		$Ca_v1.4$	α_{1F}		
	P/Q	$Ca_v2.1$	α_{1A}	Neurones	ω -aga-IVA
	N	$Ca_v2.2$	α_{1B}		ω -CTX-GVIA
	R	$Ca_v2.3$	α_{1E}		SNX-482
LVA	T	$Ca_v3.1$	α_{1G}	Neurones et cœur	Mibéfradil (± spécifique) Kurtoxine
	T	$Ca_v3.2$	α_{1H}		
	T	$Ca_v3.3$	α_{1I}		

Tableau I : Correspondance entre les nomenclatures des canaux Ca_v , leurs localisations tissulaires et leurs inhibiteurs. (Randall et Benham 1999; Ertel et al. 2000; Catterall et al. 2003)

1.2.2. Sous-unités des canaux Ca_v

Les canaux de types HVA sont des complexes hétéroooligomériques. Ils sont constitués de la sous-unité principale $Ca_v\alpha_1$ qui forme un pore ayant la

capacité de laisser circuler les ions Ca^{2+} à travers la membrane cellulaire. Les trois sous-unités auxiliaires $\text{Ca}_V\beta$, $\text{Ca}_V\alpha_2\delta$ et $\text{Ca}_V\gamma$ modulent l'activité de la sous-unité principale. Ces sous-unités ont généralement un rapport stœchiométrique de 1:1:1:1 (Striessnig et al. 1986). Il reste à préciser qu'elles ne sont pas nécessairement toujours associées à la sous-unité $\text{Ca}_V\alpha_1$. La régulation par la protéine $\text{Ca}_V\gamma$ n'est prouvée que pour le canal $\text{Ca}_V1.1$. Cependant, les études suggèrent que toutes les sous-unités $\text{Ca}_V\alpha_1$ des canaux HVA sont associées aux sous-unités auxiliaires $\text{Ca}_V\beta$ et $\text{Ca}_V\alpha_2\delta$ (Hofmann et al. 1999). L'interaction des canaux LVA avec des sous-unités auxiliaires n'est pas aussi bien étudiée et les observations semblent diverger sur ce sujet (Lacinova et al. 2000). Les canaux LVA peuvent s'exprimer à la membrane en absence des sous-unités auxiliaires $\text{Ca}_V\beta$ et $\text{Ca}_V\alpha_2\delta$. Certains groupes prétendent que $\text{Ca}_V\alpha_2\delta$ augmente la densité de courant, mais ces observations n'ont pas été répétées (Gao et al. 2000 ; Hobom et al. 2000 ; Lacinova et Klugbauer 2004).

1.2.2.1. La sous-unité $\text{Ca}_V\alpha_1$

La sous-unité $\text{Ca}_V\alpha_1$ est la sous-unité principale qui forme le pore du canal. Cette sous-unité définit les différents canaux et lui confère ses propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques. À ce jour, il existe 10 sous-unités $\text{Ca}_V\alpha_1$ subdivisées en 3 familles, soient les deux familles Ca_V1 et Ca_V2 appartenant aux canaux HVA et la famille Ca_V3 qui est le seul membre des canaux LVA. Au sein d'une même famille, l'homologie de la séquence primaire se situe entre 80 et 90% alors que les canaux HVA et LVA ne présentent qu'environ 25% d'homologie, tel qu'indiqué dans la figure 1 (Lacinova 2005). Les différentes sous-unités $\text{Ca}_V\alpha_1$ possèdent entre 1870 et 2420 acides aminés leur conférant ainsi des poids moléculaires variant entre 212 et 273 kDa. Des analyses d'hydrophobicités prédisent une topologie transmembranaire avec quatre domaines (I à IV) dont chacun des domaines est composé de six hélices transmembranaires (S1 à S6) avec une

terminaison amine et carboxyle du côté cytosolique (voir figure 2). Leur structure rappelle fortement celle retrouvée dans les canaux potassiques dépendants du voltage (K_V) et sodiques dépendants du voltage (Na_V). Chaque segment transmembranaire est composé d'environ 20 acides aminés. Contrairement aux canaux K_V , qui sont symétriques, les canaux Ca_V , tout comme les canaux Na_V de mammifères, possèdent quatre domaines différents, ayant pour résultat un pore asymétrique tant au niveau structural que fonctionnel (Parent et Gopalakrishnan 1995; Swartz 2004).

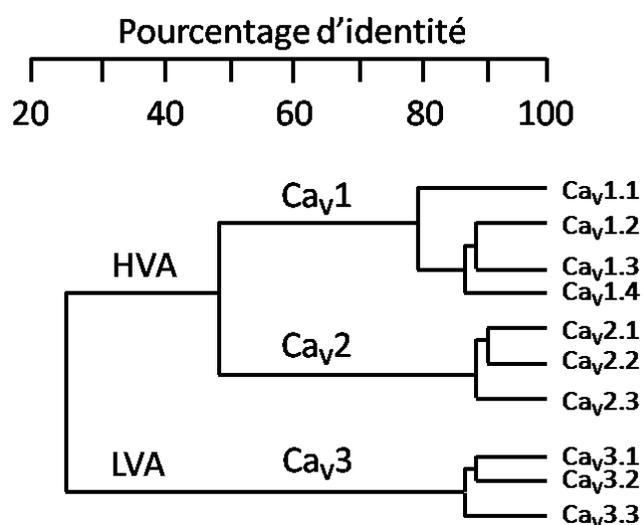


Figure 1 : Arbre phylogénétique des canaux Ca_V . Les canaux LVA et HVA partagent une homologie de séquence de 25%, alors que les canaux d'une même famille partagent une homologie de l'ordre de 80%. Modifié de (Lacinova 2005)

Les segments S4 possèdent cinq à six résidus chargés positivement à pH neutre principalement des arginines (Arg, R) donnant une charge nette positive à ce segment (voir figure 2). Dans les canaux K_V , le mouvement du S4 durant l'activation a été prouvé (Logothetis et al. 1992; Glauner et al. 1999) et ce déplacement aurait pour effet un changement de conformation menant à l'ouverture du canal (Bezaniilla 2002). En se basant sur l'homologie structurale pour tous les canaux dépendants du voltage, on peut présumer que les S4 jouent un rôle similaire dans les canaux Ca_V .

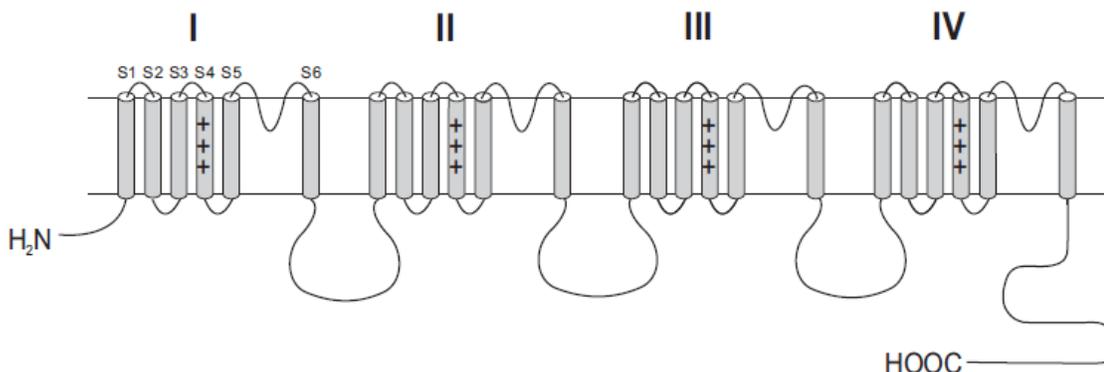


Figure 2 : Structure secondaire prédite de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ à la membrane. La sous-unité est composée de 4 domaines homologues I-IV, chaque domaine est composé de six hélices transmembranaires S1 à S6. Les hélices- α sont représentées sous forme de cylindre. Les quatre hélices S4 possèdent une charge positive nette.

Le filtre de sélectivité pour les canaux Ca_v se trouve dans la boucle semi-transmembranaire reliant le S5 au S6 pour chaque domaine. Cette région présente une affinité aux ions calcium de l'ordre de $K_d \cong 1\mu\text{M}$. Cette affinité serait due aux résidus glutamates (Glu, E) chargés négativement situés dans chacun des domaines dans la boucle S5S6 (Parent et Gopalakrishnan 1995; Favre et al. 1996). Pour les canaux LVA, le Glu dans le domaine III et IV est remplacé par un aspartate (Asp, D) (Cribbs et al. 2000).

Le pore du canal serait formé des quatre hélices S6. Cette hypothèse fut grandement appuyée, grâce au changement d'affinité pour les DHP, phenylalkylamines (PAA) et benzothiazepines (BTZ) suite à des mutations ponctuelles sur les hélices IIIS5, IIIS6 et IVS6 (Hockerman et al. 1997; Peterson et al. 1997).

Dans la boucle intracellulaire qui relie le domaine I au domaine II, il y a une région conservée de 18 acides aminés dans tous les canaux HVA nommé « Alpha Interaction Domain » (AID). Cette région constitue le site de liaison à haute affinité avec la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ (Walker et De Waard 1998).

Les canaux LVA ne possèdent pas de région équivalente au AID dans leur structure (Hofmann et al. 1999). Par contre, les canaux LVA possèdent une région appelée « gating brake » dans la boucle intracellulaire qui relie le domaine I au domaine II. Cette région serait composée de deux hélices- α d'environ une vingtaine d'acides aminés qui seraient reliées entre elles par une boucle cytoplasmique composée d'environ 15 résidus, telles que présentées sur la figure 3 (Baumgart et al. 2008). L'analyse des gènes de personnes atteintes d'épilepsie a montré une forte concentration de mutations dans cette région pour les canaux $Ca_v3.2$ (Chen et al. 2003b) et $Ca_v3.1$ (Singh et al. 2007). Les chercheurs ont donc tenté d'identifier l'effet de ces mutations à partir de techniques d'électrophysiologie. La mutation et la délétion de certains acides aminés dans le « gating brake » ont pour effet d'augmenter l'amplitude de courants Ca^{2+} entrants. Suite à une étude de quantification de canaux à la membrane, à l'aide de la technique ELISA, il semblerait que l'augmentation de courant serait causée par un nombre plus élevé de canaux à la membrane (Vitko et al. 2007). De plus, les mutations dans le « gating brake » ont aussi pour effets de déplacer la courbe d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Arias-Olguin et al. 2008; Karmazinova et al. 2011).

```

*****  **  ***  *  **  **  **  ***  *****  *  *  **  **  *
Cav3.1    FSETKQRESQLMREQRVFLSNASTLASFSEPGSCYEELLKYLVIILRKAARRLAQVSRRAIGVRA
Cav3.2    FSETKQRESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRW
Cav3.3    FSETKQREHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKAKRRALGLYQALQSRR
3.2 SOEMA hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcttcheeccccttchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhtcee
           helix 1                loop                helix 2

```

Figure 3 : Alignement de la région « gating brake » des trois canaux Ca_v3 . Les *Astérisques* désignent les résidus conservés. La prédiction de la structure secondaire est affichée où *h* prédit un hélice- α , *c* une boucle, *e* un feuillet- β et *t* un tournant. Modifié de (Baumgart et al. 2008).

1.2.2.2. La sous-unité $\text{Ca}_v\beta$

La sous-unité intracellulaire $\text{Ca}_v\beta$ est co-exprimée avec les sous-unités $\text{Ca}_v\alpha 1$ de tous les canaux HVA. La co-expression avec les sous-unités $\text{Ca}_v\alpha 1$ des canaux LVA n'a pas été démontrée (Lacinova et al. 2000). La sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ fait partie de la famille des guanylates kinases associées à la membrane (MAGUK). Il en existe quatre isoformes différentes ($\text{Ca}_v\beta 1$ à $\text{Ca}_v\beta 4$) dont les poids moléculaires varient entre 52 et 78 kDa (Walker et De Waard 1998).

La sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ joue surtout un rôle dans l'adressage membranaire des canaux HVA (Brice et al. 1997; Bichet et al. 2000) et peut aussi moduler certaines propriétés biophysiques des canaux en fonction des isoformes co-exprimés. Par contre, les mécanismes d'adressage membranaire restent encore nébuleux, la sous-unité pourrait soit stabiliser la protéine à la membrane soit permettre un recyclage membranaire plus efficace. Suite à la co-cristallisation du domaine AID de $\text{Ca}_v 1.2$ avec la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 2$ (Van Petegem et al. 2004), deux régions hautement conservées ont été identifiées : le domaine SH3 (« Src Homology-3 ») et le domaine GK (« Guanylate Kinase »). La structure du complexe $\text{Ca}_v\beta 2\text{a}/\text{Ca}_v 1.2\text{-AID}$ est présentée à la figure 4. C'est le domaine GK qui interagit avec le AID et augmente la densité de canaux HVA à la membrane (Bourdin et al. 2010). Suite à des études électrophysiologiques et biochimiques sur le canal $\text{Ca}_v 2.3$ co-exprimé avec la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$, il a été identifié quatre résidus leucines (Leu, L) (L200, L303, L337 et L342), dans le domaine GK, essentiel à l'adressage membranaire de $\text{Ca}_v 2.3$. En fait, ces résidus L formeraient une poche hydrophobe qui permettrait l'interaction avec l'AID du canal $\text{Ca}_v 2.3$ (Shakeri et al. 2012).

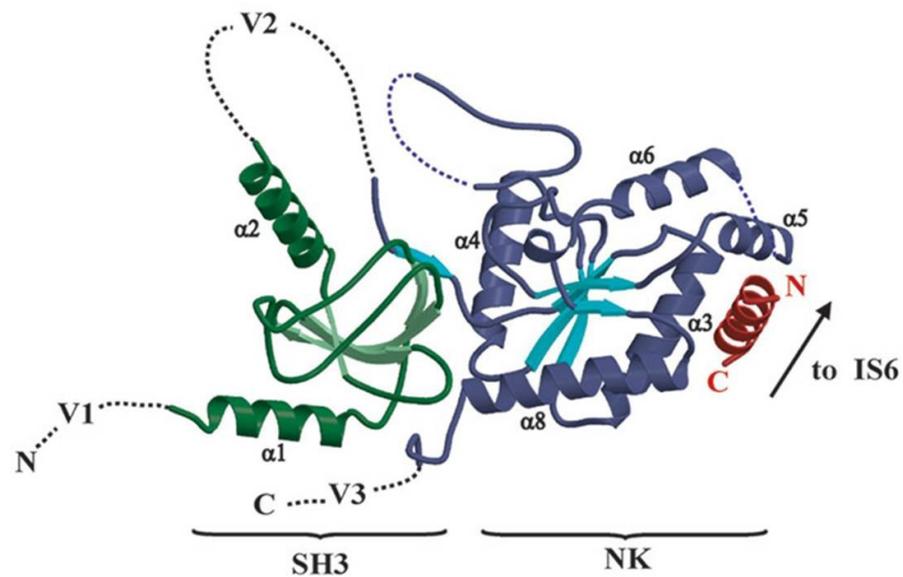


Figure 4 : Structure du complexe $\text{Ca}_v\beta 2a / \text{Ca}_v1.2\text{-AID}$: La sous-unité $\text{Ca}_v\beta 2a$ a été co-cristallisée avec le domaine AID de $\text{Ca}_v1.2$ avec une résolution de 1.97 Å. Le domaine SH3 (vert) contient cinq feuillets β antiparallèles ainsi que deux hélices α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$). Le domaine GK contient cinq feuillets β parallèles (bleu) entourés de six hélices α ($\alpha 3$ à $\alpha 8$, mauve). Le domaine AID de $\text{Ca}_v1.2$ est représenté en rouge. Les boucles VI, V2 et V3 n'ont pu être cristallisées en raison de leur forte variabilité. (Van Petegem et al. 2004)

Les sous-unités $\text{Ca}_v\beta$ ne semblent pas interagir avec les canaux LVA. Premièrement, les canaux LVA ne possèdent pas de région équivalente au AID (Hofmann et al. 1999). Plusieurs études électrophysiologiques vont aussi dans ce sens. Lorsqu'on élimine l'expression des quatre isoformes de $\text{Ca}_v\beta$ à l'aide de transfections d'oligonucléotides anti-sens dans les neurones du « nodus ganglion » (Lambert et al. 1997) ou dans les neurones de mammifères NG108-15 (Leuranguer et al. 1998), il n'y a pas d'effet sur l'amplitude ou sur la dépendance au voltage des courants natifs de type-T. Lorsqu'il y a surexpression de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 2a$ dans les cellules NG108-15, encore une fois, il n'y a aucune altération des courants natifs de type-T (Wyatt et al. 1998).

1.2.2.3. La sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$

La sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$ est en fait composée de deux protéines. Il y a la protéine $Ca_v\alpha_2$ extracellulaire qui est liée à la protéine transmembranaire δ par un pont disulfure. La protéine δ est en fait composée d'une seule hélice transmembranaire et la protéine $Ca_v\alpha_2$ est celle qui interagit et module l'activité de la sous-unité principale $Ca_v\alpha_1$ (Gurnett et al. 1996). Ces deux protéines sont issues de l'épissage alternatif du même gène et subissent un clivage post-traductionnel pour ensuite être reliées grâce à un pont disulfure (Randall et Benham 1999). La sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$ est une glycoprotéine possédant plusieurs sites de glycosylation. Il existe quatre isoformes de la sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$ ($Ca_v\alpha_2\delta$ -1 à $Ca_v\alpha_2\delta$ -4), possédant un niveau d'homologie variant entre 30% et 60%. De façon générale, la co-expression de $Ca_v\alpha_2\delta$ avec la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ provoque un accroissement de l'amplitude des courants ioniques ainsi que certaines modulations des cinétiques d'activation et d'inactivation (Arikkath et Campbell 2003).

Dans les canaux de type LVA, il a été proposé que la sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$ -2 pourrait moduler leurs activités. Premièrement, la sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$ -2 aurait pour effet d'augmenter le nombre de canaux à la membrane (Gao et al. 2000) et d'accélérer l'inactivation des canaux (Hobom et al. 2000). Ces observations n'ont été par ailleurs peu ou pas reproduites.

1.2.2.4. La sous-unité $Ca_v\gamma$

La sous-unité $Ca_v\gamma$ est une protéine membranaire possédant quatre hélices transmembranaires avec une terminaison amine et carboxyle intracellulaire. La protéine $Ca_v\gamma$ a été purifiée la première fois à partir de cellules de muscle squelettique de lapin. Cette protéine est composée de 222 acides aminés possédant un poids moléculaire de 25.1 kDa (Bosse et al. 1990; Jay et al. 1990). Cette isoforme fut appelée $Ca_v\gamma$ -1. Aujourd'hui, il y a huit isoformes différentes qui ont été identifiées ($Ca_v\gamma$ -1 à $Ca_v\gamma$ -8) possédant un poids

moléculaire variant entre 25 à 35 kDa. La sous-unité $Ca_v\gamma$ -1 se trouve dans le muscle squelettique couplée à la sous-unité $Ca_v1.1$ (Sharp et Campbell 1989). Les isoformes se trouvant au niveau du cerveau pourraient être couplées avec les sous-unités des $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ et $Ca_v2.3$ (Rousset et al. 2001; Sharp et al. 2001). L'isoforme $Ca_v\gamma$ -5 s'exprime en abondance dans le foie, les reins, le cœur, les poumons et dans les muscles squelettiques (Klugbauer et al. 2000). La sous-unité $Ca_v\gamma$ -5 pourrait moduler les propriétés biophysiques des canaux LVA, mais seulement en présence de la sous-unité $Ca_v\alpha2\delta$ -2 (Lacinova et Klugbauer 2004). Les isoformes $Ca_v\gamma$ -6 et $Ca_v\gamma$ -7 se trouvent au niveau du cœur et $Ca_v\gamma$ -8 se trouve au niveau du cerveau (Hansen et al. 2004).

Les modulations des propriétés biophysiques sur la sous-unité $Ca_v\alpha1$ sont moins bien définies que pour les deux autres sous-unités auxiliaires. Selon certaines études, la sous-unité $Ca_v\gamma$ augmenterait l'amplitude du courant entrant et déplacerait les courbes d'activation ou d'inactivation vers des potentiels membranaires plus négatifs. Ces effets pourraient aussi varier en fonction des autres sous-unités co-exprimées (Klugbauer et al.2000; Rousset et al.2001).

1.2.3. Canaux calciques LVA

Les canaux calciques LVA sont principalement composés des canaux de la famille Ca_v3 . Ces protéines n'ont jamais été co-purifiées avec les sous-unités auxiliaires des canaux HVA. Les gènes chez l'humain pour les canaux $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.3$ se retrouvent respectivement sur les chromosomes 17 (Perez-Reyes et al. 1998), 16 (Cribbs et al. 1998) et 22 (Mittman et al. 1999).

L'analyse d'hydrophobicité prédit une structure similaire à celle des canaux HVA et des canaux K_v et Na_v . Ces canaux seraient composés de quatre

domaines non symétriques et chaque domaine posséderait six segments transmembranaires. Tel qu'indiqué sur la figure 5, le filtre de sélectivité est composé de deux résidus Glu dans les domaines I et II et de deux Asp dans les domaines III et IV (EEDD), ce qui contraste avec les canaux HVA qui sont seulement composés de Glu dans chacun des domaines (EEEE). Les résidus positifs dans l'hélice S4 du senseur au voltage sont conservés autant dans les canaux HVA que LVA. Dans la boucle intracellulaire qui relie le domaine I au II dans les canaux LVA, il y a une région nommée « gating brake » qui aurait un rôle sur l'adressage membranaire et sur l'activation et l'inactivation (Vitko et al. 2007 ; Arias-Olguin et al. 2008 ; Baumgart et al. 2008 ; Karmazinova et al. 2011). Il y a une homologie de 57% sur la séquence totale des acides aminés entre le canal $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ et une homologie de 90% pour les segments transmembranaires (Cribbs et al. 2000). Le canal $Ca_v3.3$ partage une homologie sur la structure primaire entière de 59.3% avec $Ca_v3.1$ et de 56,9% avec $Ca_v3.2$. Pour les régions transmembranaires, l'homologie est de l'ordre de 80% autant pour le canal $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ (Lee et al. 1999).

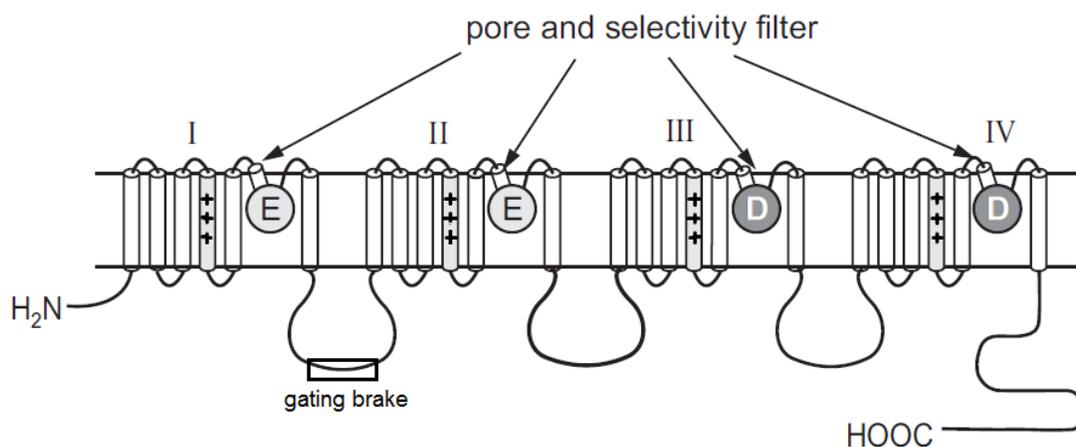


Figure 5 : La sous-unité $Ca_v\alpha1$ des canaux LVA. La structure prédite est similaire aux canaux calciques HVA, aux canaux K_v et Na_v . Le filtre de sélectivité est composé de deux glutamates dans les domaines I et II et de deux aspartates dans les domaines III et IV. La région « gating brake » se situe dans la boucle qui relie le domaine I au domaine II. Modifié de (Lacinova 2005).

1.2.3.1. Rôles physiologiques

Pour étudier la distribution des canaux de type-T dans le corps, des techniques de transfert de Northern, d'ARN « dot blots » et d'hybridation in situ ont été faites par diverses équipes de chercheurs. Le canal $Ca_v3.1$ a été identifié principalement dans le cerveau chez l'humain et dans une moindre mesure dans le cœur, les ovaires et le placenta (Peres-Reyes et al. 1998; Klugbauer et al. 1999; Monteil et al. 2000a). L'expression de $Ca_v3.2$ est plus ubiquitaire. Chez l'homme, ce canal s'exprime à un haut niveau dans les reins, le foie et le cœur et à un plus faible niveau dans le cerveau, le placenta, les poumons, les muscles squelettiques et le pancréas (Cribbs et al. 1998; Williams et al. 1999). Pour $Ca_v3.3$, le canal s'exprime exclusivement au niveau du cerveau (Lee et al. 1999).

L'expression des canaux de type-T dans divers types de cellules suggère que ces canaux jouent un rôle dans plusieurs fonctions biologiques. Ces canaux s'ouvrent suite à une faible dépolarisation membranaire, ce qui fait d'eux les meilleurs candidats pour l'entrée de Ca^{2+} lorsque la membrane est près du potentiel de repos (Carbone et Swandulla 1989; Nilius et al. 2006; Perez-Reyes 2003). Ils contribuent à la rythmogenèse, la transmission sensorielle, l'intégration dendritique, la prolifération et la différenciation cellulaire. Ils semblent aussi jouer un rôle dans l'olfaction, la vision et la perception de la douleur (Kawai et al. 2001; Pan et al. 2001; Todorovic et al. 2001).

1.2.3.1.1. Fonctions neuronales

Les courants natifs de type-T ont été isolés dans des neurones provenant de régions différentes du cerveau. Des courants de type-T, plus grands que 1 nA, ont été enregistrés dans les neurones de la partie frontale antérieure du cerveau (Allen et Brown 1993), dans les neurones de la partie ventrale

basale du thalamus (Kuo et Yang 2001) et les neurones du ganglion de la racine dorsale (White et al. 1989).

Dans les neurones, les canaux LVA jouent un rôle de stimulateur secondaire. Les neurones possèdent un potentiel de repos qui se situe entre -90 et -70 mV, un voltage membranaire qui est près du seuil d'activation des canaux LVA. Suite à un potentiel excitateur postsynaptique, les canaux LVA s'activent et génèrent des pointes de courants entrants de calcium. Ces pointes de courant entrants vont activer à leur tour les canaux Na_V et les canaux calciques HVA. Donc, les canaux LVA jouent un rôle important dans la genèse du « burst firing ». Cependant, lorsque le neurone est légèrement dépolarisé, les canaux LVA sont majoritairement dans un état inactivé, un potentiel excitateur postsynaptique activera directement les canaux Na_V . Ce qui aura pour effet de produire « rebound burst » dans le neurone dépolarisé par les canaux LVA dû à leur cinétique de recouvrement d'inactivation rapide (< 400 ms) (Perez-Reyes 2003).

1.2.3.1.2. Fonctions cardiaques

Les courants de type-T, au niveau du cœur, sont surtout détectés dans les cellules « pacemaker » mais sont beaucoup moins présents ou non existant dans les myocytes ventriculaires. Les courants de type-T sont surtout observés dans les cultures embryonnaires ou néonatales de myocytes; par contre, ils ont été très rarement observés dans les myocytes adultes, sauf chez le cochon d'Inde (Loirand et al. 1989 ; Leuranguer et al. 2000), ceci suggère que les canaux HVA participent au développement des cellules cardiaques. Toutefois, la réexpression des courants de type-T peut se produire dans certaines conditions pathologiques (Nuss et Houser 1993; Huang et al. 2000; Martinez et al. 1999).

Dû à l'emplacement des canaux de type-T au niveau du cœur et de leurs propriétés biophysiques, ces canaux pourraient contribuer à la génération d'un potentiel d'action dans le nœud sino-auriculaire, permettant de dépolariser la membrane de la cellule et de propager le potentiel d'action (Kass 1987; Hagiwara et al. 1988; Zhou et Lipsius 1994). De plus, l'entrée d'ions Ca^{2+} via les canaux de type-T aurait un rôle significatif dans le relargage d'ions Ca^{2+} des RS dans le cœur en développement. Dans l'étape embryonnaire, ces canaux auraient donc un rôle dans le couplage excitation-contraction (Kitchens et al. 2003).

1.2.3.1.3. Pathologies associées

Des altérations de l'activité des canaux de type-T ont été associées à une gamme de pathologies neuronales incluant des épilepsies idiopathiques généralisées et des pathologies associées à une mauvaise signalisation de la douleur (Khosravani et Zamponi 2006; Nelson et al. 2006; Siwek et al. 2012). Une étude de séquençage des exons 3 à 35 du canal $\text{Ca}_v3.2$, chez des enfants souffrant d'épilepsie avec absence, a permis d'identifier 12 mutations ponctuelles dans le gène codant pour la protéine $\text{Ca}_v3.2$ (figure 6) dont certaines se trouvant dans la région «gating brake» (Chen et al. 2003b). Dans le canal $\text{Ca}_v3.1$, certaines mutations ont été associées à des épilepsies idiopathiques généralisées (Singh et al. 2007).

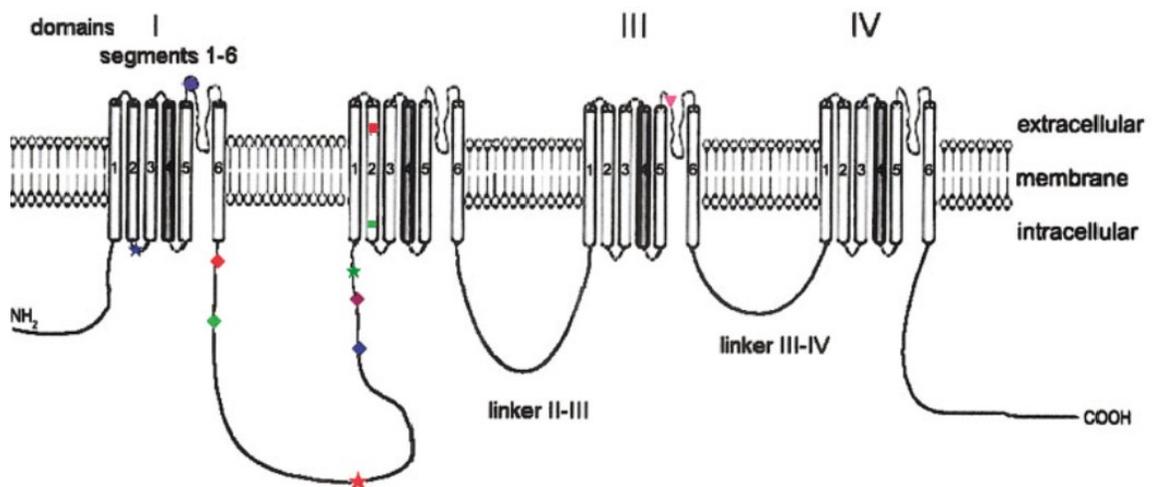


Figure 6 : **Location des mutations retrouvées dans le gène CACNA1H chez des patients souffrant d'épilepsie avec absence.** (étoile bleue) F161L; (cercle bleu) E282K; (losange rouge) C456S; (losange vert) G499S; (étoile rouge) P648L, (losange bleu) R744Q and A748V; (losange mauve) G773D; (étoile verte) G784S; (carré rouge) V831M; (carré vert) G848S; (triangle rose) D1463N. (Chen et al. 2003b)

Au niveau cardiaque, l'expression d'ARNm du canal $Ca_v3.2$ est supérieure dans les cellules du cœur d'embryon que dans le cœur adulte. On observe le phénomène inverse pour le canal $Ca_v1.2$ (Qu et Boutjdir 2001). Par contre lors de certaines conditions pathologiques, d'hypertrophie ou d'insuffisance cardiaque, il semble y avoir un retour du patron d'expression des gènes néonataux (Swynghedauw 1999) dont le canal $Ca_v3.2$ (Nuss et Houser 1993; Huang et al. 2000; Martinez et al. 1999). Cependant, il reste toujours à déterminer si c'est la pathologie qui entraîne la réexpression du gène du canal $Ca_v3.2$, ou bien c'est la réexpression de $Ca_v3.2$ qui entraîne la pathologie.

L'étude sur des souris (knockout) qui n'expriment pas le canal $Ca_v3.2$, montre que ces souris sont plus petites et possédant des déformations au cours du développement. Au niveau cardiaque, les souris présentent de façon consécutive une constriction au niveau des artères coronaires et une fibrose myocardique focale. De plus, les vaisseaux coronaires isolés montrent des contractions normales, mais une relaxation diminuée en

réponse à l'acétylcholine et au nitroprussiate. L'entrée d'ions Ca^{2+} via le canal $Ca_v3.2$ semble donc essentielle pour la relaxation des vaisseaux coronaires (Chen et al 2003a).

Du fait que les canaux de type-T semblent impliqués dans différentes pathologies, ils sont donc de bonnes cibles thérapeutiques. Certaines molécules, dont certaines déjà sur le marché, ont pour effet d'altérer les propriétés des canaux de type-T, telles que des antihypertenseurs, des antiépileptiques, des anesthésiants et des antipsychotiques (Perez-Reyes 2003)

1.2.4. Propriétés biophysiques

Le mouvement d'ions Ca^{2+} au travers les canaux Ca_v dépend de deux facteurs : le gradient chimique de concentration, déterminé par la concentration d'ions de part et d'autre de la membrane, et le gradient électrique, déterminé par le potentiel membranaire. On parle donc d'un gradient électrochimique. Le potentiel électrochimique est obtenu par la formule de Nernst :

$$E_{ion} = \frac{RT}{z_{ion} F} \ln \left(\frac{[Ca^{2+}]_{ext}}{[Ca^{2+}]_{int}} \right)$$

Dans le cas d'ions calcium, cette équation pour une température de 22 °C, la valeur $RT/F \approx 25$ mV, le z_{Ca} , qui correspond à la charge de l'ion, est égale à 2, la concentration de calcium extracellulaire, $[Ca^{2+}]_{ext}$, est de 1.5 mM et la concentration de calcium intracellulaire, $[Ca^{2+}]_{int}$, est de 10^{-4} mM. Donc, pour une température de 22 °C, le potentiel de Nernst est d'environ 120 mV. Cela signifie que pour tous les potentiels membranaires inférieurs à 120 mV, les ions Ca^{2+} vont subir une force vers l'intérieur de la cellule plutôt que vers

l'extérieur. Il est important de noter que les potentiels membranaires physiologiques ne sont jamais supérieurs à 120 mV, donc en conditions physiologiques les ions Ca^{2+} vont toujours subir une force qui les pousse vers l'intérieur de la cellule. Au-delà de ce potentiel, les ions vont subir une force vers l'extérieur de la cellule.

Les cellules excitables ont un potentiel de repos entre -90 mV et -70 mV, à ces potentiels les canaux de type LVA seront principalement dans un état fermé ou inactivé. Une fraction des canaux peut être dans un état ouvert dès que le potentiel de repos est près de -70 mV. Les canaux de type LVA qui sont dans l'état fermé vont subir un changement de conformation vers l'état ouvert et inactivé. Ces changements de conformation constituent le « gating » de la protéine.

Les canaux ioniques dépendants du voltage peuvent être retrouvés sous la forme de 3 états distincts soient fermé, ouvert et inactivé (Yellen 1998; Hille 2001). Pour chaque état, la protéine peut avoir plus d'une conformation structurale. L'état fermé correspond au moment où la structure empêche les ions de traverser la membrane au travers le pore. Cet état est retrouvé généralement au potentiel de repos donc associé à des voltages membranaires plus négatifs. L'état ouvert correspond au moment où la structure permet aux ions de traverser la membrane via le pore. Cet état n'est atteint qu'à partir de l'état fermé. Ce processus d'ouverture des canaux se nomme activation et le processus d'un canal de passer d'un état ouvert à fermé se nomme désactivation. L'état inactivé correspond au moment où un élément structural malgré une dépolarisation membranaire empêche les ions de traverser le pore du canal. L'inactivation est un état qui peut se produire soit à partir de l'état ouvert ou fermé.

En 1999, l'équipe du Dr. Jones propose un modèle de cinétiques suite aux observations des propriétés biophysiques du canal $\text{Ca}_v3.1$ exprimé de façon consécutive dans les cellules HEKT. Il propose un modèle où l'inactivation

est couplée de façon allostérique au mouvement des trois premiers senseurs au voltage S4 (figure 7). Une des conséquences aux états dépendants de l'inactivation est que les canaux $Ca_v3.1$ continuent à être inactivés suite à une repolarisation, ce qui entraîne une accumulation de canaux dans l'état inactivé suite à une série de pulses dépolarisants (Serrano et al. 1999).

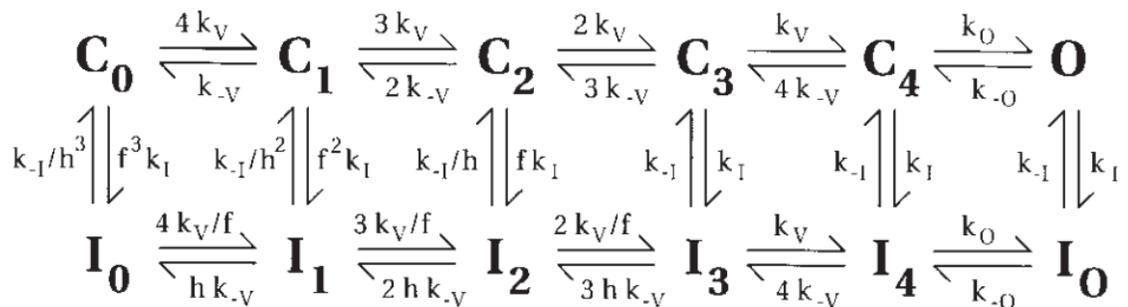


Figure 7 : Schéma des cinétiques du canal $Ca_v3.1$. On assume que le taux et le recouvrement d'inactivation sont les mêmes pour les trois états les plus à droites (C_3, C_4, O). Le modèle implique six états constants à 0 mV, pour le mouvement des senseurs aux voltages ($k_V = 2500 \text{ s}^{-1}$, $k_{-V} = 8 \text{ s}^{-1}$), ouverture/fermeture du canal ($k_O = 4000 \text{ s}^{-1}$, $k_{-O} = 25 \text{ s}^{-1}$), l'inactivation ($k_I = 70 \text{ s}^{-1}$, $k_{-I} = 1.4 \text{ s}^{-1}$). L'inactivation est couplée de façon allostérique au mouvement des trois premiers senseurs aux voltages, avec un facteur $f = 0.2$ pour le taux d'inactivation et une constante $h = 0.5$ pour le recouvrement d'inactivation. (Serrano et al. 1999)

1.2.4.1. Perméabilité

Contrairement aux canaux HVA qui possèdent des Glu dans la région du pore pour les quatre domaines, les canaux LVA possèdent des Glu dans la région du pore pour les domaines I et II et des Asp pour les domaines III et IV. Les Asp au niveau de la région du pore dans les domaines III et IV pourraient expliquer la faible conductance en canal unitaire. La conductance en canal unitaire pour le canal $Ca_v3.1$ est de 7.5 pS (Perez-Reyes et al. 1998). Pour le canal $Ca_v3.2$, il y a eu deux séries d'expériences qui ont mené une première conductance de 5.3 pS (Cribbs et al. 1998) et une deuxième légèrement plus élevée de 9.1 pS (Williams et al. 1999). Le canal $Ca_v3.3$ a la

conductance la plus élevée de 11.0 pS (Monteil et al. 2000b). Le ratio de perméabilité pour le canal $Ca_v3.1$ est pour $Ba^{2+}/Ca^{2+} \sim 0.96$ et pour $Sr^{2+}/Ca^{2+} \sim 1.35$ (Monteil et al. 2000a).

1.2.4.2. Activation

La dépendance au voltage pour les canaux LVA ne va pas varier en fonction du type d'ion utilisé, soit l'ion Ca^{2+} ou l'ion Ba^{2+} , mais elle va plutôt varier selon leur concentration extracellulaire (Klößner et al. 1999; Klugbauer et al. 1999). Pour les trois canaux, $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$, le potentiel de mi-activation ($V_{0.5act}$) est d'environ -45 mV en présence de 1.25 mM Ca^{2+} en milieu extracellulaire (Klößner et al. 1999). Les valeurs de $V_{0.5act}$ rappellent fortement celles retrouvées dans les canaux Na_v . Les cinétiques d'activation peuvent être décrites selon une seule constante de temps qui diminue lorsqu'on augmente l'amplitude du pulse dépolarisant. Pour les canaux $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ les constantes de temps varient entre 8 à 10 ms à des voltages près du potentiel de repos et les constantes vont être plus rapides de quelques millisecondes à des voltages plus positifs, ce qui est comparable aux résultats obtenus avec le canal HVA $Ca_v2.3$ co-exprimé avec la sous-unité $Ca_v\beta3$ (Perez-Reyes et al. 1998; Klößner et al. 1999; Klugbauer et al. 1999; Lee et al. 1999; Williams et al. 1999). Pour le canal $Ca_v3.3$ dans les cellules HEKT les constantes de temps d'activation débutent à 50 ms et diminuent jusqu'à 5 ms (Klößner et al. 1999; Kozlov et al. 1999; Lee et al. 1999). Pour des raisons qui restent inconnues, dans les ovocytes de *Xenopus*, les constantes de temps pour $Ca_v3.3$ sont deux fois plus lentes (Lee et al. 1999). Pour les canaux $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ les constantes de temps sont indépendantes du système d'expression utilisé.

1.2.4.3. Inactivation

Les cinétiques d'inactivation et de recouvrement d'inactivation sont beaucoup plus rapides dans les canaux LVA que dans les canaux HVA. Les cinétiques d'inactivation peuvent être décrites selon une seule constante, comme pour les cinétiques d'activation, qui diminuent lorsqu'on augmente l'amplitude du pulse dépolarisant. Suite à un pulse dépolarisant près du seuil de repos, les constantes de temps sont d'environ 50 ms. Cependant, elles diminuent rapidement lorsque qu'on augmente l'amplitude du pulse et les constantes saturent à environ à 20 ms si la solution externe contient du Ca^{2+} et d'environ à 10 ms si elle contient du Ba^{2+} autant pour le canal $\text{Ca}_v3.1$ (Perez-Reyes et al. 1998; Klugbauer et al. 1999) que pour le canal $\text{Ca}_v3.2$ (Cribbs et al. 1998; Klöckner et al. 1999). Les cinétiques d'inactivation du canal $\text{Ca}_v3.3$ sont plus lentes que pour les deux autres canaux. Elles sont d'environ 200 ms à un voltage près du potentiel de repos et lorsqu'on augmente l'amplitude du pulse dépolarisant, elles vont saturer environ à 100 ms en présence de Ca^{2+} dans les cellules HEKT (Klöckner et al. 1999; Kozlov et al. 1999.) Encore une fois, pour des raisons toujours inexplicées, les cinétiques d'inactivation sont plus lentes lorsque le canal $\text{Ca}_v3.3$ est exprimé dans les ovocytes (Lee et al. 1999).

Le recouvrement d'inactivation est le temps nécessaire au canal pour passer de l'état inactivé à l'état fermé et ainsi de permettre au canal de s'activer à nouveau. Il se traduit en une seule exponentielle en fonction du temps et varie selon la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$. Dans les cellules HEKT, pour le canal $\text{Ca}_v3.1$, la constante de temps est de 117 ms, pour le canal $\text{Ca}_v3.2$ elle est de 395 ms et pour le canal $\text{Ca}_v3.3$ elle est de 352 ms (Klöckner et al. 1999) que ce soit en présence de Ca^{2+} ou Ba^{2+} (Klugbauer et al. 1999).

1.2.4.4. Déactivation

La déactivation des canaux LVA est très lente comparativement à celle des canaux HVA. Les cinétiques de déactivation peuvent être décrites selon une seule constante de temps. À un voltage plus négatif que -100 mV, les constantes de temps pour $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ sont de 1-2 ms. Pour des voltages membranaires plus positifs, les constantes vont augmenter de façon non-linéaire (Serrano et al. 1999) et atteindre une valeur de 10-12 ms à un voltage membranaire de -40 mV (Cribbs et al. 1998; Perez-Reyes et al. 1998; Klugbauer et al. 1999). Les constantes de temps de déactivation sont indépendantes de l'ion en solution externe soit Ca^{2+} ou Ba^{2+} (Klugbauer et al. 1999). Le canal $Ca_v3.3$ possède une déactivation beaucoup plus rapide, à un voltage hyperpolarisant les cinétiques sont de 0.3-0.5 ms et de 2 ms à un voltage membranaire de -40 mV (Klößner et al. 1999; Kozlov et al. 1999; Monteil et al. 2000b).

1.3. Activation des canaux potassiques

Étant donné la ressemblance de la structure secondaire prédite des canaux K_v , ils sont de bons modèles pour l'étude des autres canaux dépendants du voltage. De plus, il y a eu beaucoup d'études sur les canaux K_v . En effet, plusieurs canaux K_v procaryotes et eucaryotes ont été cristallisés (MthK, KcsA, $Kv1.2$, $KvAP$), permettant de voir en détails les diverses régions impliquées dans le fonctionnement de ces protéines. Quatre régions critiques ont été identifiées comme jouant un rôle clé dans l'activation des canaux K_v , soit le segment S4, l'hélice amphiphile S4S5, le pore et la porte d'activation formés par le segment S6.

1.3.1 Le senseur au voltage S4

Les canaux K_v détectent les changements de voltage grâce au segment S4 qui possède quatre résidus arginines positifs à pH neutre. Ces résidus forment un motif RX3RX3RX3R, où les acides aminés X sont des résidus hydrophobes (figure 8). Lors du changement de potentiel membranaire, ces résidus vont réagir au changement du champ électrique à l'intérieur de la membrane (Bezanilla et Stefani 1998). L'hélice S4 va donc se déplacer au travers la membrane. Le déplacement des résidus Arg chargés produit un courant électrique qu'on nomme « courant de gating » d'une amplitude d'environ 100 fois plus petit que le courant ionique produit par le passage des ions au travers le canal (Bezanilla et Stefani 1998). Le « courant de gating » peut être représenté mathématiquement (Bezanilla 2000). L'intégrale sur le temps du « courant de gating » donne la charge $Q(V)$. Cette charge, lorsque tracée en fonction du voltage, donne une courbe de type Boltzmann, où les asymptotes représentent les deux états à l'équilibre du canal soit fermé et ouvert.

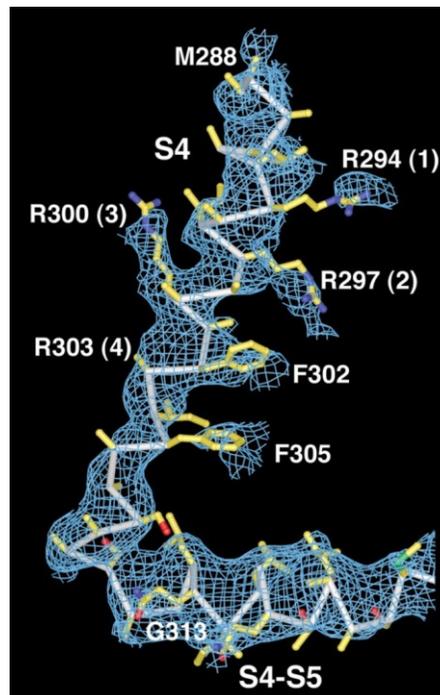


Figure 8 : Hélice S4 de Kv1.2. L'hélice S4 de Kv1.2 contient quatre arginines (R294, R297, R300 et R303) formant un motif $RX_3RX_3RX_3R$ responsable de la sensibilité au voltage (Long et al. 2005a).

Il est donc établi que l'hélice S4 est sensible aux variations de voltage membranaire, cependant le type de déplacement que subit l'hélice reste un sujet de controverse. Trois modèles ont été établis soit le modèle de la vis hélicoïdale, le modèle du transporteur et le modèle de la pagaie.

Le modèle de la vis hélicoïdale a été le premier modèle établi en 1986 (Catterall 1986; Guy et Seetharamulu 1986). Ce modèle suggère que les charges subissent une rotation accompagnée d'une translation le long de l'axe de rotation à travers le champ membranaire. L'amplitude de ce mouvement est entre 5-13 Å. Certains résidus du S4 (R1, R2 et R3) passeraient alors d'une exposition au milieu intracellulaire à une exposition au milieu extracellulaire. Le modèle du transporteur suggère un mouvement limité (2-3 Å) de l'hélice S4. Lorsque la protéine se trouve dans l'état fermé, les charges de l'hélice S4 sont situées dans une cavité en contact avec la

solution intracellulaire. Lors de l'activation, ces charges se déplacent sous l'effet du potentiel membranaire vers une deuxième cavité, cette fois en contact avec la solution extracellulaire. Le déplacement, dans ce modèle, consiste en une rotation et une inclinaison de l'hélice S4, qui ne subit pas de translation (Bezanilla et Stefani 1998). Le modèle de la pagaie propose un déplacement non seulement de l'hélice S4, mais aussi de la partie extracellulaire de S3 (S3b). Il se distingue aussi par une amplitude de mouvement nettement supérieure aux deux autres modèles, soit un déplacement net (somme du déplacement vertical et latéral) de 15-20 Å (Ruta et al. 2005). Par contre, suite aux dernières études ce modèle n'est pratiquement plus utilisé. Les trois modèles sont montrés à la figure 9.

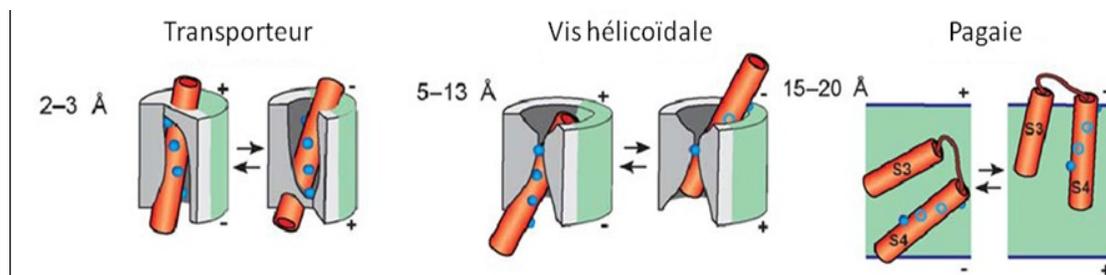


Figure 9 : Modèles de déplacement du S4. Le modèle du transporteur, le modèle de la vis hélicoïdale et le modèle de la pagaie. Modifié de (Tombola et al. 2006).

1.3.2. La porte d'activation

Au potentiel de repos, les canaux K_V ne laissent pratiquement pas passer d'ions K^+ (probabilité d'ouverture (P_O) < 0.01). Lors d'une dépolarisation membranaire, la protéine subit un changement de conformation qui augmente grandement le passage des ions. Il y a donc une partie de la protéine qui joue le rôle de porte, qui empêche le passage d'ions lorsqu'elle est fermée et laisse les ions circuler lorsqu'elle est ouverte suite à une dépolarisation membranaire. Des études avec des inhibiteurs de canaux potassiques ont permis d'identifier que cette porte est accessible du côté intracellulaire (Armstrong 1966). Par la suite, l'hélice S6 a été suggérée comme le segment qui pourrait former le pore et jouer le rôle de la porte

dans les canaux grâce à des créations de chimères et d'études électrophysiologiques en présence d'inhibiteur (Choi et al. 1993 ; Lopez et al. 1994 ; Liu et al. 1997).

Les structures à haute résolution des canaux potassiques KvAP, KcsA, MthK et Kv1.2, ont permis de confirmer que l'hélice S6 forme effectivement le pore de ces canaux. Dans les canaux d'origine eucaryote, on retrouve deux prolines (Pro, P) formant un motif PXP où X est un résidu hydrophobe. Dans la structure de Kv1.2, où le X est une valine (Val, V), obtenue par le groupe de MacKinnon, montre que dans la conformation ouverte de la protéine, l'hélice S6 est pliée au niveau du motif PVP, suggérant fortement que cette région jouerait en effet le rôle d'une porte permettant l'ouverture du pore (figure 10) (Long et al. 2005b). La structure tridimensionnelle de KcsA a permis de visualiser le pore dans la configuration fermée. Cette structure montre que les hélices TM2 (équivalentes aux S6) se croisent du côté intracellulaire et empêchent ainsi le passage des ions, formant une cavité entre la porte d'activation et le filtre de sélectivité (Doyle et al. 1998).

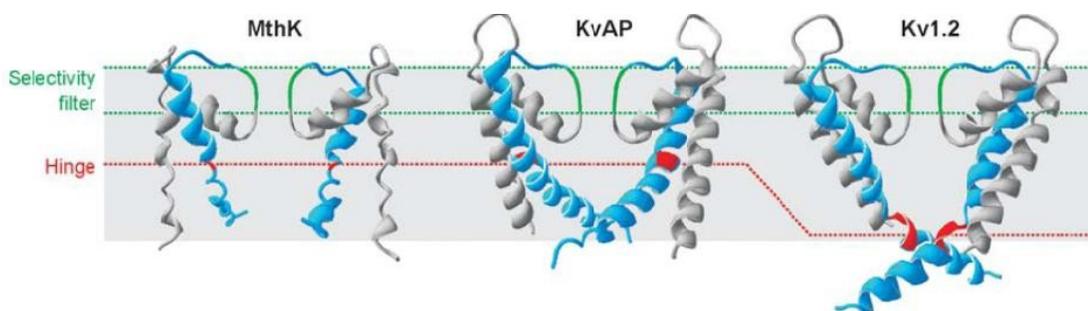


Figure 10 : Porte d'activation des canaux MthK, KvAP et Kv1.2. Les hélices montrées sont celles qui forment le pore dans chaque protéine, soit S5 (TM1) et S6 (TM2). Les hélices S6 ou TM2 (bleu) se déplacent pour ouvrir ou obstruer le filtre de sélectivité (vert). Ce mouvement est rendu possible grâce à la présence d'une région agissant à titre de charnière (rouge). Cette région est composée du motif PVP chez Kv1.2. Le fond bleu représente la membrane plasmique. (Tombola et al. 2006)

1.3.3. La boucle S4S5

Les études semblent démontrer un couplage mécanique entre la boucle S4S5 et la porte d'activation lors de l'activation des canaux K_V . En un premier lieu, les chercheurs se demandèrent comment le mouvement de l'hélice S4 est relié à l'ouverture de la porte d'activation de l'hélice S6. Il fallait donc élucider le type de couplage entre les hélices S4 et S6 durant l'activation. Deux hypothèses furent émises : un couplage allostérique ou soit un couplage mécanique (Tombola et al. 2006). Le couplage allostérique impliquerait une stabilisation dans la conformation ouverte suite au mouvement des hélices S4 sous l'effet d'une dépolarisation. Un modèle de couplage allostérique engendrerait des ouvertures spontanées du pore même à des potentiels membranaires très négatifs, donc des ouvertures qui seraient indépendantes du potentiel. La probabilité d'ouverture spontanée pour le canal K_V de type Shaker est de l'ordre de 10^{-9} , soit négligeable. Par contre, à des potentiels entre 60 et 70 mV, la probabilité est entre 0,7 et 0,9 (Islas et al. 1999). Le couplage allostérique est donc peu probable. Les résultats suggèrent plutôt un couplage mécanique qui impliquerait que le pore ne peut s'ouvrir sans le mouvement des hélices S4, signifiant un couplage obligatoire entre le potentiel membranaire et l'ouverture du pore.

En 1991, le groupe de Jan identifie cinq résidus conservés dans la boucle S4S5 du canal de type Shaker. Ces résidus, lorsqu'ils sont mutés, affectent la conductance et l'inactivation du canal (McCormack et al. 1991). Par la suite, en 1999, Sanguinetti et Xu montrent que des mutations sur des résidus du S4S5 et de la région distale du S6, dans le canal de type Shaker, déplacent la courbe de la conductance sur le voltage vers des potentiels plus négatifs. En 2005, suite à l'obtention de la structure à haute résolution du canal $K_V1.2$, a permis de constater que la boucle S4S5 est à proximité atomique (4 à 5 Å) de la partie distale de l'hélice S6 (Long et al. 2005a). Ces résultats suggèrent tous un couplage mécanique entre la boucle S4S5 et la porte d'activation de l'hélice S6. (Voir figure 11)

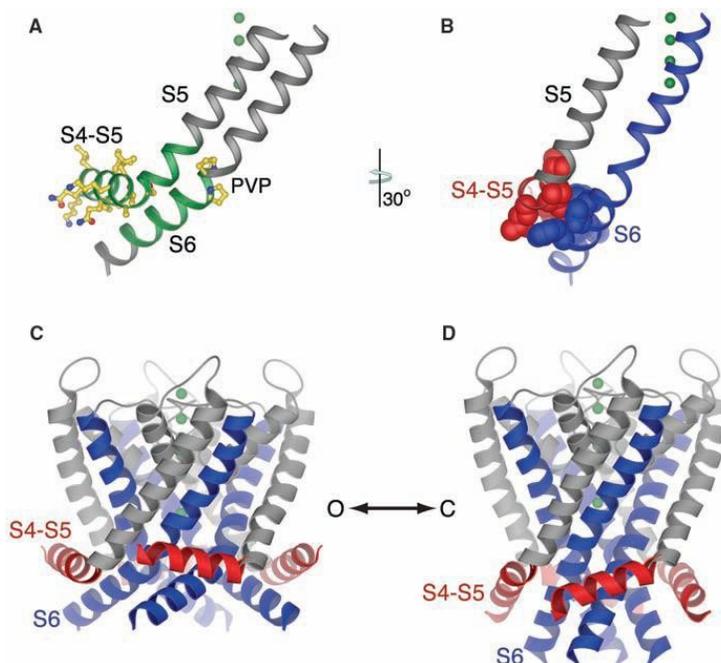


Figure 11 : Couplage entre la boucle S4S5 et la porte d'activation dans $K_v1.2$. **A.** Les résidus 388 à 421 de l'hélice S6 sont montrés en gris et vert, les chaînes latérales du motif PVP en jaune. Les chaînes latérales de la boucle S4S5 sont colorées en jaune pour les éléments, en rouge pour l'oxygène et en bleu pour l'azote. Les régions en vert doivent nécessairement provenir de la même protéine pour obtenir une sensibilité au voltage (Lu et al. 2001; Lu et al. 2002). **B.** Les résidus qui relient la boucle S4S5 et l'hélice S6 sont montrés sous forme de sphères rouges et bleus, respectivement. Boucle S4S5 : Rouge, hélice S5 : gris, hélice S6 : bleu. **C.** Vue tétramérique de la protéine en rubans. Boucle S4S5 : Rouge, hélice S5 : gris, hélice S6 : bleu. **D.** Modèle hypothétique de $K_v1.2$ en conformation fermée. Modélisation faite à partir de la structure de KcsA (PDB 1K4C) dans sa conformation fermée en positionnant les boucles S4S5 de manière à maintenir une porte d'activation fermée. Ce qui suppose un mouvement des régions S4S5. (Long et al. 2005b)

1.4. Activation des canaux calciques

Les mécanismes d'activation des canaux Ca_v ont été moins étudiés que ceux des canaux K_v et Na_v . On assume que les mécanismes moléculaires qui régissent l'activation des canaux Ca_v doivent être semblables à ceux retrouvés dans les canaux K_v . Par contre, les mécanismes semblent présenter quelques différences et sont plus complexes, car les canaux Ca_v

se composent d'une seule sous-unité formée de quatre domaines ayant des séquences primaires différentes, à l'inverse des canaux K_V qui se composent généralement d'une même sous-unité répétée quatre fois.

1.4.1. Le senseur au voltage S4

Dans les canaux Ca_V , l'hélice S4 contient quatre à cinq résidus chargés positivement (voir figure 12), suggérant que cette hélice sert de senseur de voltage tout comme pour les canaux K_V . Par contre, contrairement aux canaux K_V , nécessitant que tous les S4 aient bougé avant de laisser passer les ions (Zagotta et al. 1990), certains canaux Ca_V peuvent produire un courant ionique avant le mouvement de tous les S4 (Marks et al. 1992; Lacinova et al 2002). Étant donné que les canaux Ca_V sont formés de quatre hélices S4 différentes, on peut présumer que les changements de conformations seront inégaux suite à une dépolarisation membranaire.

	IS4	IIS4	IIIS4	IVS4
Ca 1.1	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLR C IRLLR L FKITKYW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	SAFFRLFRVMRLIKLLSRAE
Ca 1.2	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLR C VRLLR I FKITRYW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	ITFFRLFRVMRLIKLLSRGE
Ca 1.3	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLR C VRLLR I FKVTRHW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	ITFFRLFRVMRLIKLLSKGE
Ca 1.4	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISV F RCVRLLR I FKVTRHW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	ITFFRLFRVMRLIKLLSRGE
Ca 2.1	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLRALRLLR I FKVTKYW	IKSLRVLRVLRPLKTIKRL	LSFLRLFRAARLIKLLRQGY
Ca 2.2	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLRALRLLR I FKVTKYW	IKSLRVLRVLRPLKTIKRL	LSFLRLFRAARLIKLLRQGY
Ca 2.3	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLRALRLLR I FKITKYW	IKSLRVLRVLRPLKTIKRL	MSFLKLFRAARLIKLLRQGY
Ca 3.1	FSAVRTVRVLRPLRAINRV	LSVLR T FRLLR V LKLVRF	LRVLRLLR T LRPLR V ISRA	IRIMRVLR I ARV L KLLK M AV
Ca 3.2	LSAIRTVRVLRPLRAINRV	LSVLR T FRLLR V LKLVRF	LRVLRLLR T LRPLR V ISRA	IRIMRVLR I ARV L KLLK M AT
Ca 3.3	LSAIRTVRVLRPLKAINRV	LSVLR T FRLLR V LKLVRF	LRVLRLLR T LRPLR V ISRA	IRIMRVLR I ARV L KLLK M AT

Figure 12 : Alignement des S4 des canaux Ca_V . Les résidus chargés sont surlignés en gris. (Lacinova 2005)

1.4.2. La porte d'activation

La comparaison entre des résidus dans des hélices S6 des canaux Ca_V et ceux des canaux K_V laissent prédire que ces segments pourraient former le pore des canaux Ca_V . Plusieurs études par mutations ont démontré que l'hélice S6 est en effet impliquée dans l'activation et l'inactivation (Raybaud

et al. 2006). En 2005, il est observé que la mutation du domaine II au niveau du S6 I745T sur l'allèle CACNA1F, codant pour le canal $Ca_v1.4$, cause d'importantes déficiences visuelles (Hemara-Wahanui et al. 2005). Par la suite, des mutations correspondantes à I745T de $Ca_v1.4$ furent testées dans d'autres canaux Ca_v . Les mutations correspondantes I781T dans $Ca_v1.2$ (Hohaus et al 2005) et I701G dans $Ca_v2.3$ (Raybaud et al. 2007) sembleraient permettre l'ouverture du canal à des potentiels membranaires plus négatifs. De plus, les mutations ponctuelles en Pro des résidus adjacents à l'isoleucine (Ile, I) 701 soit (LAIA) du canal $Ca_v2.3$, ont toutes induit un déplacement vers des potentiels plus négatifs de la courbe d'activation, un ralentissement des cinétiques d'activation et de désactivation et d'importantes variations dans la dépendance au voltage d'inactivation (Raybaud et al. 2007). Ces mutations semblent donc stabiliser l'état ouvert des canaux.

Une étude de mutagenèse sur la séquence VAVIM dans le S6 du domaine IV du canal $Ca_v2.3$ montre des changements de propriétés sur l'inactivation et l'activation. Cependant, ces changements sont moins spectaculaires que ceux retrouvés lors des mutations dans le S6 du domaine II. Il y a un déplacement d'environ -20 mV de la courbe d'activation, pour la mutation I701G du domaine II le déplacement est d'environ -40 mV, et un déplacement d'environ -10 mV pour la courbe d'inactivation. Des mutations sur les S6 des domaines I et III ont montré des effets semblables sur l'activation et l'inactivation, mais avec un déplacement des courbes beaucoup plus petit. Les mutations des régions qui diminuent l'hydrophobicité dans la partie distale des S6 semblent donc stabiliser l'état ouvert. De plus, les effets sont différents pour chaque domaine, ceci appuie l'hypothèse que la contribution de l'ouverture du pore par les senseurs au voltage est différente pour chacun des domaines dans les canaux Ca_v (voir figure 13).

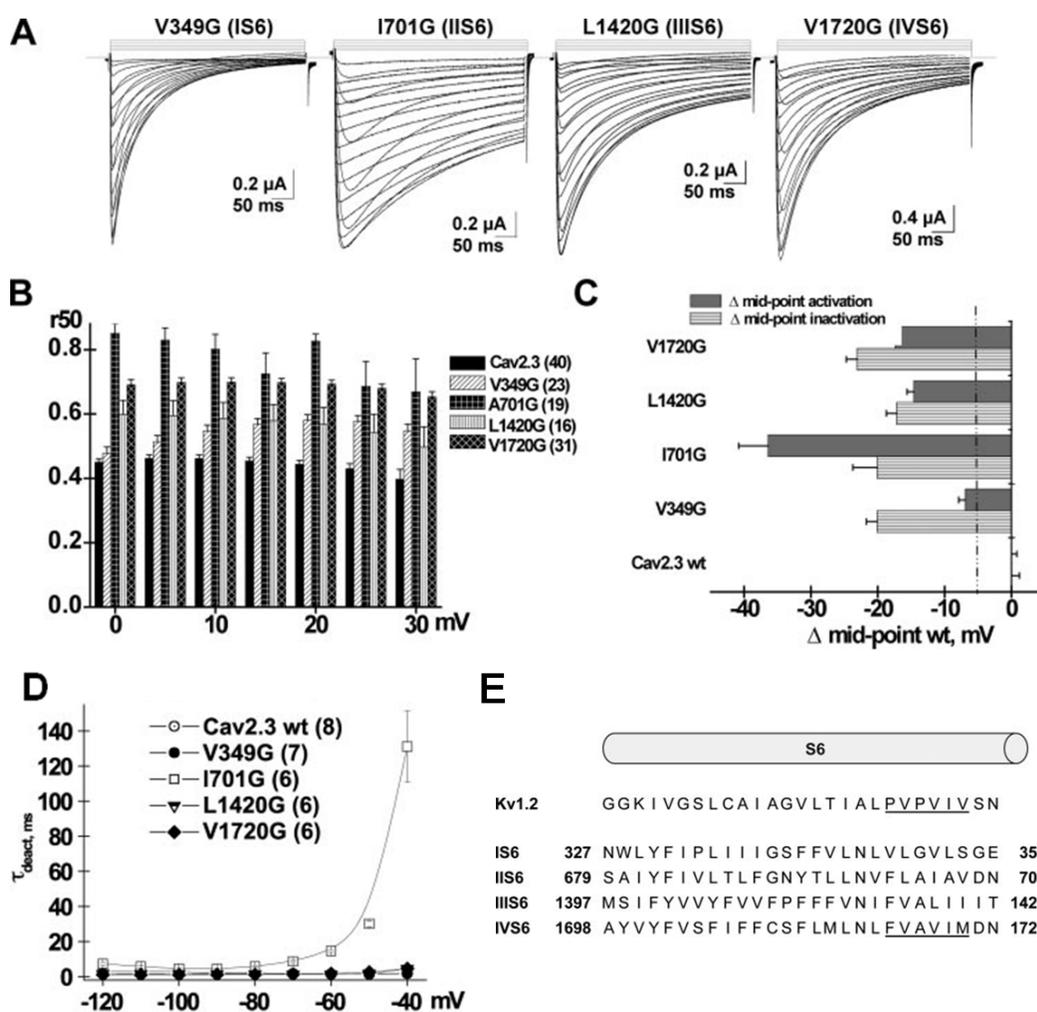


Figure 13: **Mutations dans les hélices S6 de $Ca_v2.3$.** **A.** Courants ioniques, obtenus après expression recombinante dans les œufs de *Xenopus*, des mutations de $Ca_v2.3$ en présence des sous-unités $Ca_v\alpha2\delta$ et $Ca_v\beta3$ dans une solution de 10mM Ba^{2+} . **B.** Courant résiduel à 50 ms (R50) des mutations dans les hélices S6 de $Ca_v2.3$. Le R50 représente la fraction de courant résiduel après 50 ms à un voltage donné. **C.** Différence entre les potentiels de mi-activation et mi-inactivation des mutations $Ca_v2.3$ V349G, I701G, L1420G et V1720G par rapport aux valeurs du canal de type sauvage ($Ca_v2.3$ wt). **D.** Constantes de temps d'inactivation des mutations $Ca_v2.3$ V349G, I701G, L1420G et V1720G. Ces mesures sont obtenues à partir d'un lissage mono-exponentiel des courbes de désactivation. **E.** Alignement des quatre hélices S6 de $Ca_v2.3$ avec l'hélice S6 du canal potassique Kv1.2. Modifié de (Raybaud et al. 2007).

Dans le canal $Ca_v2.3$ les résidus du S6 du motif LAIA du domaine II et ceux du motif VAVIM du domaine IV semblent critiques à la fois dû au degré d'hydrophobicité des résidus dans le S6 distal (Raybaud et al. 2007). Lorsqu'on effectue des mutations sur ces résidus, il existe une corrélation entre l'indice d'hydrophobicité du résidu utilisé et le changement dans le potentiel de mi-activation du canal. On peut donc émettre deux hypothèses; soit que les chaînes latérales de ces résidus sont dans un milieu hydrophobe à l'état fermé ou qu'elles sont dans un milieu aqueux dans l'état ouvert. Ceci expliquerait la stabilisation de l'état ouvert lorsqu'on mute ces résidus par des résidus hydrophiles.

1.4.3. La boucle S4-S5

En 2011, l'équipe du Dr Parent a démontré un mécanisme de couplage mécanique, similaire à celui retrouvé dans les canaux K_v , entre la boucle S4S5 et le segment S6 pour le canal $Ca_v2.3$. En effet, certaines mutations en Gly des résidus du S4S5 dans le domaine II semblent stabiliser l'état ouvert du canal. La mutation L596G est celle qui a l'effet le plus significatif. Le déplacement de la courbe d'activation est d'environ -40 mV. De plus, plusieurs doubles mutants (mutation à la fois d'un résidu du S4S5 et du S6) à l'aide de la méthode d'analyse cyclique de doubles mutants (Horovitz 1996), semblent indiquer une différence d'énergie libre d'interaction supérieure à $|2|$ kcal mol⁻¹ durant l'activation du canal. Ces résultats semblent indiquer la présence de couplage mécanique entre les deux résidus où il y a eu les mutations. Les deux résidus qui ont la différence d'énergie la plus significative sont le résidu L596 de la boucle S4S6 et le I701 du segment S6 avec une valeur d'environ 6 kcal mol⁻¹ (voir figure 14) (Wall-Lacelle et al. 2011).

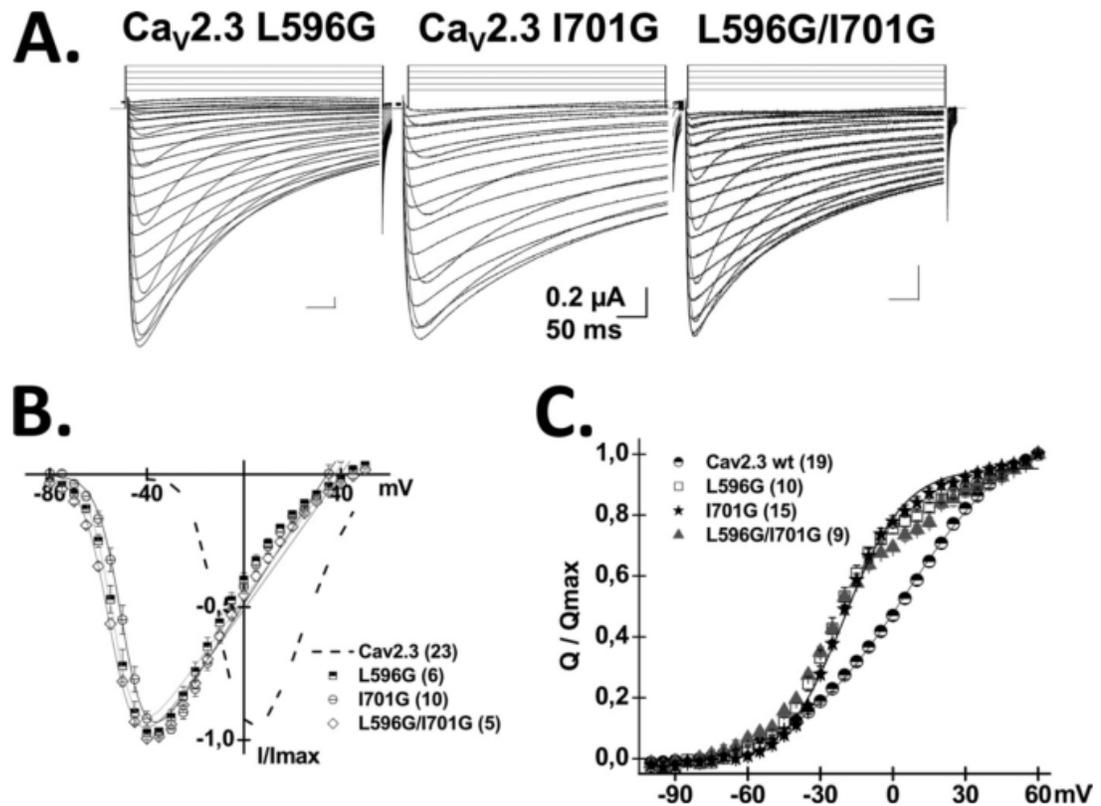


Figure 14 : Couplage mécanique entre les résidus L596 du IIS4S5 et I701 du IIS6 du canal $\text{Ca}_v2.3$ **A.** Courants ioniques des mutations de $\text{Ca}_v2.3$ en présence des sous-unités $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ et $\text{Ca}_v\beta3$ dans une solution de 10mM Ba^{2+} . **B.** Les courbes courants-voltages des mutations de $\text{Ca}_v2.3$ L506G, I701G et L596G/I701G. **C.** Les courbes du mouvement des charges sur le voltage des mutations de $\text{Ca}_v2.3$ L506G, I701G et L596G/I701G. (Wall-Lacelle et al. 2011)

1.5. Hypothèses et objectifs de recherche

Les mécanismes qui contrôlent l'activation des canaux calciques de type-T restent largement inconnus. Dans les canaux HVA, $Ca_v1.2$, $Ca_v2.1$ et $Ca_v2.3$, plusieurs mutations ponctuelles sur des résidus hydrophobes des hélices transmembranaires S6 ont montré une altération significative de l'état ouvert du canal (Raybaud et al. 2007; Hering et al. 2008). Dans le modèle électromécanique de l'activation du canal, l'état fermé est stabilisé par des interactions hydrophobes dans la région distale du S6 et les mouvements vers le haut du senseur au voltage, S4, changent la conformation du canal en tirant sur l'hélice S4S5 loin de l'hélice S6. L'équipe du Dr. Parent a démontré que le résidu conservé Ile à la position 701 dans la portion distale de l'hélice S6 est fonctionnellement couplé à la Leu 596 dans le segment S4S5 durant l'activation du canal $Ca_v2.3$ (Wall-Lacelle et al. 2011). Étant donné que les canaux LVA requièrent beaucoup moins d'énergie pour s'activer, nous suggérons pour le canal $Ca_v3.2$ que l'hélice S4S5 est moins fortement couplée aux résidus distaux du S6 durant l'activation du canal.

De plus, nous avons cherché à étudier l'interaction entre les différents domaines dans le canal $Ca_v3.2$ qui sont structurellement asymétriques. Pour étudier la structure du canal, nous avons produit des modèles 3D à partir de structures à haute résolution des canaux bactériens Na_vRh (Zhang et al. 2012) et Na_vAb (Payandeh et al. 2011). Les canaux Na_v partagent beaucoup de similitudes structurales et biophysiques avec les canaux Ca_v de type T. Ces modèles prédisent des interactions physiques entre l'hélice S4S5 d'un domaine et le S6 du domaine adjacent. Nous suggérons donc pour le canal $Ca_v3.2$ que les résidus de l'hélice S4S5 du domaine II seraient couplés de façon mécanique aux résidus de l'hélice S6 du domaine III durant l'activation du canal.

Une étude par mutagenèse dirigée couplée à l'analyse cyclique de doubles mutants permettra de tester ces hypothèses. Cette technique d'analyse

permet, en comparant l'énergie d'activation, ΔG_{act} , de deux mutations ponctuelles en glycines à celle obtenue par la mutation double associée, de caractériser le couplage entre les deux résidus. Si les résidus mutés agissent sur la protéine de manière indépendante l'un de l'autre, la différence de la somme des ΔG_{act} de la protéine sauvage et de la mutation double devrait être égale à la somme des ΔG_{act} des deux mutations simples. Cependant, si les deux résidus sont couplés, cette différence ne sera pas nulle. Cette propriété de l'énergie d'activation permet d'introduire un coefficient de couplage, Ω , qui permet de déterminer si deux régions sont couplées lors d'un mécanisme. Cette technique a déjà été utilisée pour étudier le lien entre deux résidus dans les canaux K_v (Ranganathan et al. 1996), Ca_v (Kudrnac et al. 2009; Wall-Lacelle et al. 2011) et CNG (Kusch et al. 2010). Cette technique sera donc utilisée pour déterminer la présence de couplage entre les résidus du IIS4S5 aux résidus du IIS6 et du IIIS6.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Techniques de biologie moléculaire

L'ADNc codant pour la protéine humaine de type sauvage Ca_v3.2 (GenBank AF051946) dans le vecteur pGEM-HEA a gracieusement été donné par le Dr. Edward Perez-Reyes (Université de Virginie) et Dr. Leanne L. Cribbs (Université de Loyola).

Toutes les mutations ont été introduites dans Ca_v3.2 par technique de mutagenèse dirigée par « Polymerase Chain Reaction » (PCR) à l'aide de la trousse *QuickChange™ XL* (Stratagene, La Jolla, CA). Les amorces sens et anti-sens utilisées (Invitrogen, Carlsbad, CA) étaient constitués de 33 nucléotides, contenant la mutation désirée au milieu du fragment. Le produit de PCR obtenu est alors digéré pendant deux heures à 37°C par l'enzyme *DpnI* fourni dans la trousse *QuickChange™ XL* afin de dégrader l'ADN parental méthylé et hémiméthylé. L'intégrité et le poids moléculaire du produit de PCR ont alors été vérifiés sur gel d'agarose à 1% (m/v) dissous en Tris acétate EDTA (TAE : 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA).

Le produit de PCR a ensuite été amplifié par bactéries compétentes X-10 Gold fournies avec la trousse *QuickChange™ XL*. Ces bactéries ont une efficacité de 5 x 10⁹ cfu/μg d'ADN pUC. (cfu signifie « Colony Forming Unit »). Les bactéries sont initialement incubées pendant 10 minutes sur glace avec β-mercaptoéthanol pour augmenter l'efficacité de la transformation. Le produit de PCR est alors ajouté et le mélange incubé pendant 30 minutes sur glace. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique de 30 secondes à 42°. Le milieu de culture NZY+ Broth (125 mM MgCl₂, 12.5 mM MgSO₄, 20 mM glucose dans milieu LB Broth (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)) est alors ajouté et le mélange est incubé sous agitation pendant une heure à 37°C. Le produit final est alors étendu sur une boîte de LB Agar (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) contenant l'antibiotique ampicilline qui est incubée entre 16 et 18 heures à 37°C.

Quatre colonies sont alors repiquées séparément dans du milieu LB avec 400 µg/mL d'ampicilline chacune et incubées sous agitation pendant 16 à 18 heures à 37°C. L'ADN ainsi amplifié est alors extrait à l'aide de la trousse *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Mississauga, Ont). Les clones obtenus sont séquencés à l'aide de l'appareil *DNA analyser ABI 3730* (IRIC, Université de Montréal). Le clone positif sélectionné est alors amplifié par bactéries ultra-compétentes DH5α. L'ADN sélectionné est ajouté aux bactéries et le mélange est incubé pendant 30 minutes sur glace, après quoi un choc thermique de 30 secondes à 42°C est effectué. Du milieu de culture LB Broth est alors ajouté et le mélange est incubé sous agitation pendant une heure à 37°C. Le produit final est alors étendu sur une boîte de LB Agar contenant de l'ampicilline qui est incubée à 37°C entre 16 et 18 heures.

Une colonie est alors repiquée dans du milieu LB avec 400 µg/mL d'ampicilline et incubée sous agitation pendant 16 à 18 heures à 37°C. L'ADN ainsi amplifié est alors extrait à l'aide de la trousse *QIAprep® Spin Midiprep Kit* (Qiagen, Mississauga, Ont) et séquencé de nouveau pour vérifier la présence de la mutation. L'ADN circulaire ainsi obtenu est linéarisé par une incubation de deux heures à 37°C avec l'enzyme de restriction AFLII. L'ADN linéaire issu de cette incubation est alors vérifié sur gel d'agarose 1% dans le but de vérifier son poids moléculaire ainsi que son intégrité.

Les ARN messagers (ARNm) sont ensuite obtenus à l'aide de la trousse *mMessage T7 mMachine®* (Ambion, Austin, TX). Le poids moléculaire et l'intégrité sont à nouveau vérifiés sur gel d'agarose 1%. L'ARNm est ensuite stocké à -20°C.

2.2. Expression fonctionnelle des canaux

Le canal Ca_v3.2 est exprimé dans les ovocytes de grenouille de type *Xenopus Laevis* (Nasco, Fort Atkinson, WI). Les ovocytes choisis sont de stade V et VI. Les sacs ovariens sont retirés de la grenouille par une incision au niveau de la

partie ventrale postérieure de l'abdomen. Ils sont manuellement séparés des sacs ovariens avant d'être incubés dans une solution de Barth sans calcium (en mM : 90 NaCl; 3 KCl; 0.82 MgSO₄; 5 HEPES; pH 7,6) contenant 2mg/ml de collagénase (Gibco, Burlington, Ont). Cette incubation permet de détacher la membrane folliculaire qui entoure les ovocytes. Ceux-ci sont alors incubés pendant une heure dans une solution de Barth (en mM : 90 NaCl; 3 KCl; 0,82 MgSO₄; 0,41 (CaCl₂ + 2 H₂O); 0,33 (Ca(NO₃)₂ + 4 H₂O; 5 HEPES; pH 7,6) contenant 1 g/L d'albumine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) afin d'arrêter la réaction de la collagénase. Les ovocytes sont ensuite triés et stockés dans une solution de Barth sérum (en mM : 90 NaCl; 3 KCl; 0,82 MgSO₄; 0,41 (CaCl₂ + 2 H₂O); 0,33 (Ca(NO₃)₂ + 4 H₂O; 5 HEPES; 2,5 Na pyruvate; 100 unités/mL de Pen-Strep; 10mg/100mL de kanamycine; 5% de Horse serum; pH 7,6) à 18°C. On injecte 46 nL d'ARNm à une concentration variant entre 1µg/µl à 1,5µg/µl dans le cytoplasme des ovocytes. Ceux-ci sont, pendant l'injection, dans une solution de Barth antibiotique (en mM : 90 NaCl; 3 KCl; 0,82 MgSO₄; 0,41 (CaCl₂ + 2 H₂O); 0,33 (Ca(NO₃)₂ + 4 H₂O; 5 HEPES; 2,5 Na pyruvate; 100 unités/mL de Pen-Strep; 10mg/100mL de kanamycine; pH 7,6) et sont ensuite retournés à 18°C dans la solution de Barth sérum pendant un à cinq jours.

2.3. Enregistrements électrophysiologiques

Les enregistrements électrophysiologiques en Ba²⁺ sont effectués en voltage imposé grâce à un appareillage de « cut-open » (COVC) à l'aide de l'amplificateur CA-1. Les électrodes en verres sont étirées par l'étireur PP-830 (Narishide, Japan). Elles sont remplies d'une solution de (en mM) 3 KCl.

La technique du COVC permet l'étude de deux types de courant : le courant ionique macroscopique et le courant dû aux mouvements de charge des hélices S4 qu'on nomme « gating currents ». Le courant ionique macroscopique se mesure en présence d'une solution externe 10 mM Ba²⁺ (10 mM BaOH, 110 mM NaOH, 1 mM KOH et 20 mM Hepes, pH 7.0 ajusté

avec de l'acide méthanesulfonique (MES)) et d'une solution interne composée de 120 mM N-Methyl-D-Glucamine, 10 mM EGTA et 10 mM Hepes, pH 7.0 ajusté avec du MES. Ce courant correspond à l'entrée de Ba^{2+} , suite à l'activation des canaux de l'ovocyte dans la partie supérieure de l'appareillage de COVC. Le « gating current » se mesure en présence de la solution externe 2 mM Co^{2+} (2 mM $CoCl_2$, 110 mM NaOH et 10 mM Hepes, pH 7.0 ajusté avec du MES) et d'une solution intracellulaire composée de 110 mM glutamate de potassium et 10 mM Hepes, pH 7.0 ajusté avec du KOH. Les ions Co^{2+} étant trop volumineux pour traverser les canaux calciques, ces solutions vont donc permettre de calculer le courant qui correspond au déplacement de charges des hélices S4 des canaux dans de l'ovocyte dans la partie supérieure de l'appareillage de COVC suite à leur activation.

L'acquisition des données lors des expériences est effectuée avec le logiciel Clampex 10 de la suite pClamp 10 (Molecular Devices, Axon instruments, Foster City, CA). Les données sont enregistrées à une fréquence de 5 kHz et filtrées à 1 kHz grâce au filtre intégré à l'amplificateur.

Les ovocytes qui expriment la protéine dont l'ARN a été injecté sont soumis à trois protocoles de pulses pour l'étude du courant macroscopique. Le premier protocole mesure la dépendance en voltage de l'activation ainsi que les cinétiques d'inactivation. Dans ce protocole (protocole A), l'ovocyte est tout d'abord maintenu à un potentiel de repos de -100 mV ou -120 mV selon la mutation étudiée où les canaux se trouvent majoritairement dans l'état fermé. Des pulses de 150 ms sont ensuite appliqués à des voltages variant de -80 mV à +40 mV, par intervalle de 2 mV. La plage de voltage balayée est choisie de manière à pouvoir observer au complet l'activation du canal. Le canal est ensuite soumis de nouveau à un potentiel de repos pour permettre aux canaux de retourner à l'état fermé.

Le deuxième protocole (protocole B) permet de mesurer la dépendance en voltage de la déactivation (passage de l'état ouvert à l'état fermé). À partir d'un potentiel de repos de -100 mV ou -120 mV, l'ovocyte est amené par un

court pulse de 20 ms au potentiel où le courant ionique mesuré à l'aide du premier protocole est maximal (le potentiel en question dépend de la mutation étudiée). Une série de pulses de 400 ms est alors appliquée de -120 mV à -20 mV par intervalle de 10 mV afin de mesurer la dépendance en voltage de la constante de temps de désactivation. Le canal est ensuite soumis de nouveau à un potentiel de repos pour permettre aux canaux de retourner à l'état fermé.

Le troisième protocole (protocole C) permet de mesurer la dépendance en voltage de l'inactivation. À partir d'un potentiel de repos de -100 mV ou -120 mV, l'ovocyte est exposé à une série de pulses dépolarisants allant de -110 mV à 0 mV par intervalle de 10 mV pendant deux secondes. Immédiatement après ce pulse, l'ovocyte est exposé à un pulse test de 50 ms à un voltage où tous les canaux sont ouverts, pour ensuite retourner au potentiel de repos. Durant le pulse test, les seuls canaux qui peuvent passer à l'état activé et donc laisser passer un courant ionique sont ceux qui ne se sont pas activés pendant le pulse de 2s. Le rapport du courant résiduel mesuré pendant le pulse test sur le courant total mesuré pendant le pulse test lors du premier pulse dépolarisant à un potentiel de -110 mV nous donne une mesure de la fraction des canaux qui sont inactivés.

Pour l'étude du « gating current » il y a seulement un protocole de pulse. Ce protocole (protocole D) mesure le mouvement de charge de l'hélice S4 durant l'activation et durant la désactivation. L'ovocyte est tout d'abord maintenu à un potentiel de repos de -100 mV ou -120 mV. Des pulses de 25 ms sont ensuite appliqués à des voltages variant de -120 mV à +40 mV, par intervalle 2 mV. Le canal est ensuite soumis de nouveau à un potentiel de repos pour permettre aux canaux de retourner à l'état fermé. Pour ce protocole, la fuite est directement soustraite par le logiciel Clampex 10.

2.4. Analyse des données

Pour les protocoles qui mesurent le courant ionique macroscopique, les données brutes obtenues en électrophysiologie à partir des protocoles décrits à la section précédente sont importées dans le logiciel Clampfit 10 de la suite pClamp 10 (Molecular Devices, Axon instruments, Foster City, CA). Ce logiciel permet d'effectuer une soustraction de fuite (option « Leak Substraction ») afin de ramener le courant initial à une valeur nulle.

Pour le protocole qui mesure la dépendance en voltage de l'activation ainsi que les cinétiques, la valeur du courant maximal observé durant le pulse de 150 ms du protocole d'activation est extraite et reportée sur une feuille de calcul dans le logiciel Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA). Le courant maximal observé sur chaque pulse est normalisé. La courbe d'activation sera tracée en effectuant un lissage des séries de courants normalisés en fonction du potentiel en utilisant une courbe de Boltzmann d'équation

$$\frac{I}{I_{\max}} = G_{rel} \frac{(V_m - V_{inv})}{1 + \exp\left[-\frac{zF(V_m - E_{0.5,act})}{RT}\right]} \quad (1)$$

Avec : $E_{0.5,act}$ = potentiel de mi-activation, G_{rel} = conductance normalisée,

z = paramètre de pente, V_m = potentiel imposé, V_{rev} = potentiel d'inversion, $RT/F \cong 25$ mV à 22°C

La valeur $E_{0.5,act}$ et le paramètre de pente z extraits de chaque enregistrement sont utilisés pour calculer l'énergie associée au changement de conformation observé lors du passage de l'état fermé à l'état ouvert. L'énergie de Gibbs d'activation, ΔG_{act} , est obtenu à partir des valeurs $E_{0.5,act}$ et z à l'aide de l'équation

$$\Delta G_{act} = z \cdot F \cdot E_{0.5,act} \quad (2)$$

La fonction de lissage de Clampfit 10 est utilisée à partir des données importées du protocole A afin d'obtenir les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal. Le lissage du courant observé de chaque pulse dépolarisant est fait en fonction du temps à l'aide d'une fonction exponentielle d'équation

Les données obtenues à partir du protocole B sont importées dans le logiciel Clampfit 10 et sont soumises à une réduction de fuite afin de ramener le courant initial à une valeur nulle. La fonction de lissage de Clampfit 10 est alors utilisée pour lisser le courant observé durant les 50 premières ms de chaque pulse dépolarisant en fonction du temps à l'aide d'une fonction exponentielle d'équation

$$I(t) = A \exp\left[\frac{-t}{\tau_{deact}}\right] + \quad (3)$$

Avec : A = amplitude, t = temps (ms), τ_{deact} = constante de temps de désactivation, C = constante

Les données obtenues par le protocole C sont importées dans Clampfit 10 et sont soumises à une réduction de fuite afin de ramener le courant initial à une valeur nulle. Pour chaque potentiel, la valeur du courant maximal durant chaque pulse test de 50 ms est extraite et reportée dans une feuille de calcul du logiciel Origin 7.0. La valeur du courant maximal du pulse final est divisée par celle du pulse initial et est reportée fonction du voltage imposé. Ces valeurs sont ensuite lissées à l'aide d'une courbe de Boltzmann d'équation

$$\frac{I}{I_{\max}} = 1 - \frac{(1 - Y_0)}{1 + \exp\left[-\frac{zF(V_m - E_{0.5,inact})}{RT}\right]} \quad (4)$$

Avec : $E_{0.5,inact}$ = Potentiel de mi-inactivation, z = paramètre de pente,

Y_0 = fraction du courant non-inactivé, V_m = potentiel imposé,

$RT/F \cong 25 \text{ mV}$ à 22°C

La valeur $E_{0.5, \text{inact}}$ et le paramètre de pente z extraits de chaque enregistrement sont utilisés pour calculer l'énergie associée au changement de conformation observé lors du passage de l'état ouvert à l'état inactivé. L'énergie de Gibbs d'inactivation, ΔG_{inact} , est obtenue à partir des valeurs $E_{0.5, \text{inact}}$ et z à l'aide de l'équation

$$\Delta G_{\text{inact}} = z \cdot F \cdot E_{0.5, \text{inact}} \quad (5)$$

Les différentes analyses effectuées sur les courbes obtenues pendant les expériences d'électrophysiologie permettent d'extraire plusieurs paramètres biophysiques qui nous informent sur l'effet des mutations étudiées :

1. Le potentiel de mi-activation, $E_{0.5, \text{act}}$, et le potentiel de mi-inactivation, $E_{0.5, \text{inact}}$, sont issus du lissage individuel de la courbe d'activation ou d'inactivation de chaque enregistrement et nous informe sur la sensibilité au voltage de l'activation/inactivation du canal étudié. Ils correspondent aux potentiels auxquels on observe 50% du courant maximal ou de l'inactivation maximale. Le potentiel de mi-inactivation est souvent couplé au potentiel d'activation. Or, dans $\text{Ca}_v3.2$, l'inactivation se produit aussi directement à partir de l'état fermé et n'est donc pas complètement couplée à l'activation.
2. L'énergie d'activation ou d'inactivation, ΔG_{act} ou ΔG_{inact} respectivement, représente l'énergie associée au changement de conformation observé (état fermé à état ouvert pour ΔG_{act} , état ouvert à état inactivé pour ΔG_{inact}). Elle est calculée à partir des potentiels de mi-activation/inactivation et du paramètre de pente calculé pour chaque enregistrement.

Finalement, les constantes de temps d'activation, τ_{act} , d'inactivation, τ_{inact} , et de désactivation, τ_{deact} , mesurent la stabilité de l'état ouvert.

Pour le protocole qui mesure le « gating current » les données brutes obtenues en électrophysiologie à partir du protocole décrit à la section précédente sont importées dans le logiciel Clampfit 10. L'aire sous la courbe

observé durant le pulse du protocole d'activation est extrait et reporté sur une feuille de calcul dans le logiciel. L'air sous la courbe maximal observé sur chaque pulse est normalisé. La courbe du mouvement de charge sera tracée en effectuant un lissage des séries de courants normalisés en fonction du potentiel en utilisant une courbe de Boltzmann d'équation.

$$Q/Q_{\max} = \frac{1}{1 + \exp\left[-ze(V - E_{0.5,Q})/kT\right]} \quad (6)$$

Avec : $E_{0.5,Q}$ = potentiel milieu du déplacement de charges, e = charge électrique élémentaire, z = paramètre de pente, k = constant de Boltzmann

Dans tous les cas, les analyses des données d'activation sont effectuées en fonction des données normalisées par rapport au courant maximal. Les valeurs obtenues expérimentalement à partir des courbes d'activation individuelles ont été moyennées. L'incertitude sur ces valeurs correspond à l'écart standard à la moyenne (S.E.M.) calculée par Origin 7.0. La comparaison entre les canaux mutés et les canaux de type sauvage a été évaluée statistiquement à l'aide de la fonction *One-way ANOVA* d'Origin 7.0. À moins d'une mention contraire, deux populations seront considérées statistiquement différentes si l'analyse *One-way ANOVA* présente un facteur $p < 0.01$.

2.5. Analyse cyclique de doubles mutations

L'analyse cyclique de doubles mutations (« Double Mutant Cycle Analysis ») permet de quantifier l'interaction entre deux résidus à l'intérieur d'une protéine (Horovitz 1996). Soient deux résidus, X et Y, dont on cherche à étudier l'interaction lors d'un changement de conformation. La méthode d'analyse cyclique de doubles mutations permet de quantifier l'interaction potentielle entre deux résidus Y et X à l'aide d'expériences faites sur la protéine de type sauvage, P-XY, la mutation unique de chacun des deux résidus, P-X et P-Y,

ainsi que la double mutation correspondante, P. La variation d'énergie libre due à la mutation du résidu X sera alors $\Delta G_{P-XY \rightarrow P-Y}$ et sera obtenue expérimentalement à partir de la différence entre l'énergie libre de la protéine de type sauvage et celle de la protéine contenant la mutation du résidu X.

$$\Delta G_{P-XY \rightarrow P-Y} = \Delta G_{P-XY} - \Delta G_{P-Y} \quad (7)$$

Si les deux résidus mutés agissent de manière indépendante lors du mécanisme étudié, la somme des variations d'énergie libre des mutations simples devrait être équivalente à celle de la mutation double. Cependant, si les deux résidus sont couplés lors de ce mécanisme, leurs effets sur la variation d'énergie libre ne seront pas additifs. On peut donc poser une condition sur l'additivité des variations d'énergie libre en fonction du couplage entre les résidus étudiés. Si les effets des mutations ne sont pas indépendants l'un de l'autre, ce qui laisse entendre que les résidus sont couplés, les variations d'énergies libres observées devraient respecter la condition :

$$(\Delta G_{P-XY} + \Delta G_P) - (\Delta G_{P-Y} + \Delta G_{P-X}) \neq 0 \quad (8)$$

L'interaction entre deux résidus peut être caractérisée par un coefficient de couplage faisant intervenir les constantes d'équilibre de la réaction associée au changement conformationnel étudié:

$$\Omega = \frac{k_{P-XY} \cdot k_P}{k_{P-X} \cdot k_{P-Y}} \quad (9)$$

où la constante d'équilibre k est calculée selon l'équation

$$k = \exp(\Delta G / RT) \quad (10)$$

Par cette définition, le coefficient de couplage Ω peut être exprimé exclusivement en fonction des énergies d'activation :

$$\Omega = \frac{\exp(\Delta G_{P-XY}/RT) \cdot \exp(\Delta G_P/RT)}{\exp(\Delta G_{P-X}/RT) \cdot \exp(\Delta G_{P-Y}/RT)} \quad (11)$$

Il est à noter que la condition 8 peut être retrouvée en prenant le logarithme naturel du coefficient de couplage :

$$RT \cdot \ln(\Omega) = (\Delta G_{P-XY} + \Delta G_P) - (\Delta G_{P-Y} + \Delta G_{P-X}) \quad (12)$$

La combinaison des équations (8) et (12) permet une interprétation aisée des valeurs du coefficient Ω , tel une valeur du coefficient Ω est près de 1 implique une forte additivité entre les énergies libres d'activation et donc un couplage nul entre les résidus étudiés. À l'opposé, une valeur éloignée de 1 implique que les énergies libres d'activation ne sont pas additives et par conséquent que les résidus peuvent être couplés. Il est important de noter que l'information contenue dans le facteur Ω ne réside pas tant dans sa valeur numérique absolue que dans le rapport observé entre le numérateur et le dénominateur du rapport de l'équation (12). Par exemple, une valeur Ω de 0,1 a exactement la même signification qu'une valeur de 10 en ce qui concerne la force du couplage entre les deux résidus. Pour cette raison, et pour permettre de plus facilement comparer les coefficients Ω entre eux, les valeurs présentées seront en fonction de la valeur absolue du logarithme naturel de Ω , $|\ln(\Omega)|$.

Puisque le coefficient de couplage Ω fait intervenir quatre valeurs expérimentales, il est important de bien définir l'erreur associée à celui-ci. L'erreur expérimentale sur une valeur qui est fonction de plusieurs données peut être calculée par l'expression

$$\delta F(x_1, x_2, \dots, x_n) = \sum_{i=1}^n \left| \frac{\partial F}{\partial x_i} \right| \cdot \delta x_i \quad (13)$$

L'erreur expérimentale sur le coefficient de couplage peut donc être obtenue par l'expression :

$$\delta\Omega = \left| \frac{\partial\Omega}{\partial\Delta G_{XY}} \right| \delta\Delta G_{XY} + \left| \frac{\partial\Omega}{\partial\Delta G_{WT}} \right| \delta\Delta G_{WT} + \left| \frac{\partial\Omega}{\partial\Delta G_X} \right| \delta\Delta G_X + \left| \frac{\partial\Omega}{\partial\Delta G_Y} \right| \delta\Delta G_Y$$

Les dérivées peuvent être effectuées ainsi :

$$\left| \frac{\partial\Omega}{\partial\Delta G_{XY}} \right| = \frac{1}{RT} \frac{\exp\left(\frac{\Delta G_{XY}}{RT}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta G_{WT}}{RT}\right)}{\exp\left(\frac{\Delta G_X}{RT}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta G_Y}{RT}\right)} = \frac{\Omega}{RT} = \left| \frac{\partial\Omega}{\partial\Delta G_{WT}} \right|$$

$$\left| \frac{\partial\Omega}{\partial\Delta G_X} \right| = \left| \frac{-1}{RT} \frac{\exp\left(\frac{\Delta G_{XY}}{RT}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta G_{WT}}{RT}\right)}{\exp\left(\frac{\Delta G_X}{RT}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta G_Y}{RT}\right)} \right| = \frac{\Omega}{RT} = \left| \frac{\partial\Omega}{\partial\Delta G_Y} \right|$$

Ces expressions permettent de calculer l'erreur sur Ω :

$$\delta\Omega = \frac{\Omega}{RT} (\delta\Delta G_{XY} + \delta\Delta G_{WT} + \delta\Delta G_X + \delta\Delta G_Y) \quad (14)$$

Finalement, l'erreur expérimentale sur la valeur présentée dans les graphiques, $\ln(\Omega)$, est calculée par la même méthode:

$$\delta \ln \Omega = \left| \frac{\partial \ln \Omega}{\partial \Omega} \right| \delta \Omega = \frac{1}{\Omega} \cdot \frac{\Omega}{RT} \left(\sum_i \delta \Delta G_i \right)$$

$$\delta \ln \Omega = \frac{1}{RT} \sum_i \delta \Delta G_i \quad (15)$$

où les ΔG_i sont les différents ΔG présents dans l'équation (11).

2.6. Modélisation par homologie

L'alignement de séquence primaire entre Ca_v3.2 (Genbank AF051946.3) et Na_vAb et Ca_v3.2 et Na_vRh fut obtenu via l'outil d'alignement T-coffee [<http://www.tcoffee.org>]. La région alignée s'étend du début de l'hélice S1 à la fin de l'hélice S6 pour chaque domaine.

La première modélisation par homologie fut effectuée à l'aide de la structure cristalline du canal sodique bactérien Na_vAb qui possède une résolution de 2,7 Å (3RVY.pdb). Étant donné que deux domaines adjacents ont été cristallisés, nous avons pu modéliser le domaine II et le domaine III de Ca_v3.2 dans le même modèle. La deuxième modélisation par homologie fut effectuée à l'aide de la structure cristalline du canal sodique bactérien Na_vRh qui possède une résolution de 3,05 Å (4DXW.pdb). La protéine Na_vRh a été cristallisée sous forme de tétramère, nous avons donc pu modéliser les quatre domaines de Ca_v3.2. Les modèles ont été produits par le logiciel Modeler 9v2 (Sali et Blundell 1993; Fiser et Sali 2000; Marti-Renom et al. 2000; Eswar et al. 2007). Pour chaque région modélisée, 50 modèles furent produits. Les modèles retenus sont ceux qui présentaient la moindre énergie après minimisation. Les images furent produites à l'aide du logiciel PyMOL1.1 (DeLano Scientific).

3. RÉSULTATS (par article)

La section des résultats est présentée dans l'article intitulé « *Cooperative activation of the T-type CaV3.2 channel: interaction between Domains II and III* ». Ce dernier est publié dans la revue scientifique *The Journal of Biological Chemistry*.

Toutes les expériences d'électrophysiologie, les analyses de données subséquentes, les expériences de biologie moléculaire et les modélisations ont été effectuées par Pierre-Olivier Demers Giroux.

La conception du projet, la rédaction de l'article ainsi que la composition des figures sont effectuées par Dr Lucie Parent.

Le Dr Benoîte Bourdin a apporté son aide dans la rédaction de l'article et la correction.

Le Dr Rémy Sauvé a apporté son aide et son appui dans la modélisation des structures.

Cooperative activation of the T-type $\text{Ca}_v3.2$ channel: interaction between Domains II and III*

Pierre-Olivier Demers-Giroux, Benoîte Bourdin, Rémy Sauvé, and Lucie Parent

Département de Physiologie, Membrane Protein Research Group,
Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada

*Running title: Functional coupling between adjacent domains

Keywords: Calcium channels, gating, homology modeling, electrophysiology, electromechanical coupling

Background: The low activation threshold of T-type $\text{Ca}_v3.2$ channels is central to neuronal rhythmogenesis.

Results: The S4S5 linker of Domain II is functionally coupled with Domains II and III during channel activation.

Conclusion: Activation of $\text{Ca}_v3.2$ requires a specific interaction between adjacent domains.

Significance: Disrupting this protein interface could be a pharmacological strategy to decrease Ca^{2+} influx in neuronal pathologies.

SUMMARY

T-type Ca_v3 channels are important mediators of Ca^{2+} entry near the resting membrane potential. Little is known about the molecular mechanisms responsible for channel activation. Homology models based upon the high-resolution structure of bacterial Na_v channels predict interaction between the S4S5 helix of Domain II (IIS4S5) and the distal S6 pore region of Domain II (IIS6) and Domain III (IIS6). Functional intra- and inter-domain interactions were investigated with a double mutant cycle analysis. Activation gating and channel kinetics were measured for 47 single mutants and 20 pairs of mutants. Significant coupling energies ($\Delta\Delta G_{\text{interact}} \geq 1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$) were

measured for 4 specific pairs of mutants introduced between IIS4S5 and IIS6 and between IIS4S5 and IIS6. In agreement with the computer based models, T911 in IIS4S5 was functionally coupled with I1013 in IIS6 during channel activation. The interaction energy was however found to be stronger between V907 in IIS4S5 and I1013 in IIS6. In addition V907 was significantly coupled with N1548 in IIS6 but not with N1853 in IVS6. Altogether, our results demonstrate that the S4S5 and S6 helices from adjacent domains are energetically coupled during the activation of a low voltage-gated T-type Ca_v3 channel.

Voltage-dependent Ca^{2+} channels (Ca_v) are membrane proteins that play a key role in promoting Ca^{2+} influx in response to membrane depolarization in excitable cells. Voltage-gated Ca^{2+} channels form oligomeric complexes that are classified according to the structural properties of the pore-forming $\text{Ca}_v\alpha1$ subunit. The $\text{Ca}_v\alpha1$ subunit bears high topological homology with the α subunit of Na_v channels with 24 transmembrane segments clustered in 4 homologous domains, each of which is analogous to a single subunit of K_v channels. The primary structures for 10 distinct $\text{Ca}_v\alpha1$ subunits (Snutch and Reiner 1992; Zhang et al. 1993; Birnbaumer et al. 1994; Cribbs et al. 1998; Perez-Reyes et al. 1998; Randall et al. 1999; Catterall 2000)

are classified into three main subfamilies according to their high-voltage activated gating (HVA Ca_v1 and HVA Ca_v2) or low-voltage activated gating (LVA Ca_v3). In HVA Ca_v1 and Ca_v2 channels, auxiliary subunits include a cytoplasmic $\text{Ca}_v\beta$ subunit, a mostly extracellular $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ subunit, and calmodulin constitutively bound to the C-terminus of $\text{Ca}_v\alpha1$ (Carl et al. 1995; Gao et al. 1997; Peterson et al. 1999; Catterall 2000; Dai et al. 2009) (for review see (Dolphin 2009)). LVA T-type Ca_v3 channels are currently believed to achieve voltage-dependent activation and plasma membrane targeting without a significant contribution from $\text{Ca}_v\beta$ and $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ auxiliary subunits.

LVA T-type Ca_v3 channels open in response to a small membrane depolarization, making these channels the key mediators of Ca^{2+} entry near the resting membrane potential (Carbone and Lux 1984; Perez-Reyes 2003; Carbone et al. 2006; Nilius et al. 2006). They contribute to rhythmogenesis, sensory transmission, dendritic integration, cell proliferation and differentiation. Alterations in T-type channel activity have been associated with pain signaling and a wide range of neuronal pathologies including idiopathic generalized epilepsies (Nelson et al. 2000; Khosravani and Zamponi 2006; Siwek et al. 2006; Singh et al. 2007). Hence the T-type Ca_v3 channel has arisen as an important pharmacological target for the treatment of neurological and psychiatric disorder such as schizophrenia, mania, dementia and epilepsy.

The molecular mechanisms controlling the voltage-dependent activation of T-type Ca_v3 channel remain however largely unknown. Many regions appear to participate in the channel gating. The loop between Domain I and Domain II (I-II loop) appears to play a major role in this process (Vitko et al. 2007; Arias-Olguin et al. 2008; Baumgart et al. 2008; Karmazinova et al. 2011) but molecular determinants are distributed in the IIS6 pore domain (Marksteiner et al. 2001; Talavera and Nilius 2006), on the C-

terminus (Staes et al. 2001) and the pore helix (Karmazinova et al. 2010), and on S4 segments (Kurejova et al. 2007). Nonetheless the series of events linking channel depolarization and pore opening have been only scarcely addressed.

The current model of activation postulates that the electrically driven outward movement and rotation of the S4 segment will lead to pore opening through a cascade of events that include pulling on the S4S5 linker and bending the S6 segments to open the bundle crossing at their intracellular ends (Catterall 2010). In HVA $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v2.1$, and $\text{Ca}_v2.3$ channels, a cluster of hydrophobic residues in the distal S6 pore region were shown to stabilize the channel closed state (Kraus et al. 1998; Hans et al. 1999; Tottene et al. 2002; Cao et al. 2005; Hohaus et al. 2005; Raybaud et al. 2006; Raybaud et al. 2007; Wall-Lacelle et al. 2011). In particular, we have shown that the conserved Isoleucine residue in distal S6 was functionally coupled with a Leucine residue at position 596 in the S4S5 helix during the activation of HVA $\text{Ca}_v2.3$ (Wall-Lacelle et al. 2011). Whether each of the four domains moves independently or in a concerted fashion remains to be established. By comparison, the opening of the Shaker K_v channel involves multiple activation steps as the S4 segments move from the resting state towards the activated state, which is followed by a concerted opening transition of the four identical S6 gates (Ledwell and Aldrich 1999). This transition has been shown to occur through atomic interaction between adjacent subunits/ domains (Laine et al. 2003).

In this current work, we have investigated the role of domain/domain interaction within the pore-forming $\text{Ca}_v\alpha1$ subunit during the activation of $\text{Ca}_v3.2$, a LVA Ca_v channel. Unlike HVA channels, the $\text{Ca}_v\alpha1$ subunit of $\text{Ca}_v3.2$ can be functionally expressed in the absence of $\text{Ca}_v\beta$ and $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ auxiliary subunits thus minimizing their effects on activation gating. To get structural clues regarding interaction interfaces, we produced 3D

models of the T-type $Ca_v3.2$ channel by homology with the recently published high-resolution 3D structures of the bacterial Na_vRh (Zhang et al. 2012) and Na_vAb channels in the closed and partially inactivated states (Payendeh et al. 2011; Payendeh et al. 2012) (Fig 1). The two homology models of $Ca_v3.2$ predict multiple points of interaction between adjacent domains. A total of 20 double mutants were herein functionally characterized using a double mutant cycle analysis. Strong interaction energies were measured for 4 pairs of mutants between the IIS4S5 helix and the distal S6 helices of Domain II and III. Altogether our results confirm that the proximal IIS4S5 helix is functionally coupled with the IIS6 region during channel activation. We also demonstrate that distal IIS4S5 helix is significantly coupled with residues in the IIS6 region during the activation gating of $Ca_v3.2$. These results support of model of activation gating whereby opening of voltage-activated Ca^{2+} channels involves protein-protein interaction between adjacent domains and results in the concerted movement of the four domains.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Recombinant DNA techniques. The human $Ca_v3.2$ (GenBank AF051946) (Cribbs et al. 1998) was a gift from Edward Perez-Reyes (University of Virginia) and Leanne L. Cribbs (Loyola University). Point mutations were produced with the Quick-Change XL-mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA 95051) using 39-mer primers as described elsewhere (Raybaud et al. 2007; Wall-Lacelle et al. 2011; Shakeri et al. 2012). Constructs were verified by automated double-stranded sequence analysis (Genomics Platform, IRIC, Université de Montréal, QC, Canada). Run-off transcripts were prepared using the T7 RNA polymerase mMessage mMachine[®] transcription kit (Ambion, Life Technologies, Austin, TX) and stored at $-20^{\circ}C$ before use.

Functional expression of $Ca_v3.2$. Oocytes were obtained from female *Xenopus laevis* clawed frogs as described previously (Berrou et al. 2005; Raybaud et al. 2007; Wall-Lacelle et al. 2011). Oocytes were injected with 46 or 4.6 nl of a solution containing $1 \mu g/\mu l$ cRNA coding for the $Ca_v3.2$ WT or mutant and incubated for 2 to 5 days after RNA injection.

Electrophysiological recordings and data acquisition. Wild-type and mutant channels were screened at room temperature for macroscopic Ba^{2+} currents and for gating currents, with the cut-open oocyte voltage-clamp technique using a CA-1B amplifier (Dagan Corp, Minneapolis, MN) (Stefani and Bezanilla 1998; Batulan et al. 2010) as described before (Wall-Lacelle et al. 2011). The membrane of the oocyte exposed to the bottom chamber was permeabilized by a brief treatment with 0.1% saponin. Data acquisition was performed with the Digidata 1322A 16-bit system (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The pCLAMP 10 software was used for on-line data acquisition and analysis.

Whole-cell currents were recorded in the presence of an external solution containing 10 mM BaOH, 110 mM NaOH, 1 mM KOH and 20 mM Hepes, titrated to pH 7.0 with methanesulfonic acid (Olces et al. 1996). The internal solution in contact with the oocyte cytoplasm was 120 mM N-Methyl-D-Glucamine, 10 mM EGTA and 10 mM Hepes, titrated to pH 7.0 with methanesulfonic acid. Functional expression of mutants was deemed significant with whole-cell Ba^{2+} currents larger than -50 nA. Current-voltage relationships were measured using a series of 150-ms voltage pulses (2 mV steps) applied at a frequency of 0.2 Hz from a holding potential of -100 mV. The holding potential was decreased to -120 mV for mutants displaying a negative shift in the voltage-dependence of inactivation. Leak currents were subtracted off-line. Steady-state inactivation was determined using a one-pulse protocol with a 2s-conditioning

pulse of varying amplitude followed by a test pulse at the voltage yielding the peak current and was applied at a frequency of 0.02 Hz. Normalized currents obtained at the test pulse (I/I_{max}) were fitted with a standard Boltzmann equation as described elsewhere (Berrou et al. 2001; Berrou et al. 2005; Raybaud et al. 2007). Recovery from inactivation was studied by using a paired-pulse protocol. Briefly, whole-cell Ba^{2+} currents were inactivated with 1-sec pulses to -20 mV and recovery was examined at a test pulse of -20 mV after a series of variable intervals at -100 mV.

Gating currents were recorded in the presence of an external solution containing 2 mM $CoCl_2$, 110 mM NaOH and 10 mM Hepes, titrated to pH 7.0 with methanesulfonic acid (Olcese et al. 1996). Hence the voltage dependence of gating charge movement and activation of macroscopic currents are measured with different divalent ion concentrations. Others have shown that this substitution left the charge movement unaltered and caused no changes in the surface potential (Olcese et al. 1996). The internal solution in contact with the oocyte cytoplasm was 110 mM potassium glutamate and 10 mM Hepes, titrated to pH 7.0 with KOH. Gating currents were filtered at 1 kHz and digitized at 10 kHz. Holding potential was -120 mV and 30-ms voltage steps were evoked from -120 to 0 mV by 2-mV increments. Gating charge versus voltage (Q-V) relations were obtained by integrating the OFF gating currents and then fitting single Boltzmann functions (equation 1) according to:

$$Q/Q_{max} = \frac{1}{1 + \exp[-ze(V - E_{0.5,Q})/kT]} \quad (1)$$

where the parameter e is the elementary electric charge; $E_{0.5,Q}$ is the mid-potential of charge displacement, k is the Boltzmann constant; z is the effective valence.

Data Analysis. Activation curves were obtained from normalized current-voltage (I-V) relationships. The estimation of

$E_{0.5,act}$ using non stationary measurements rests upon the assumption that the transition to the open state is much faster than the transition to the inactivated state. The voltage dependence of activation was estimated using the normalized conductance-voltage (G-V) data with

$G = I/(V_m - E_r)$ where I is the normalized peak whole-cell current, V_m is the voltage command, and E_r is the reversal potential. Normalized conductance values were fitted with a standard Boltzmann equation:

$$G = \frac{G_{max}}{1 + \exp[(E_{0.5,act} - V_m)/z]} \quad (2)$$

where $E_{0.5,act}$ is the mid-potential of activation, and z is the effective valence. Each data point was reported as the mean of individual measurements \pm S.E.M as described elsewhere (Berrou et al. 2001; Berrou et al. 2005; Raybaud et al. 2007)(Dafi et al. 2004; Berrou et al. 2005; Raybaud et al. 2006). The free energy of activation was calculated using the mid-potential of activation:

$$\Delta G_{act} = z \cdot F \cdot E_{0.5,act} \quad (3)$$

$$\Delta \Delta G_{act} = \Delta G_{act(mutant)} - \Delta G_{act(WT)} \quad (4)$$

Activation, inactivation, and deactivation time constants of whole-cell current traces were estimated with the predefined equations in Clampfit 10 that uses the Chebyshev routine and a 4-pt smoothing filter with a single exponential function. Statistical analyses were performed using the One-way Anova fitting routine for two independent populations included in OriginPro 8.0. Data were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Double mutant cycle analysis. The coupling or interaction energy $\Delta \Delta G_{act,interact}$ during channel activation was calculated as follows:

$$\Delta \Delta G_{act,interact} = (\Delta G_{act,WT} + \Delta G_{act,double}) - (\Delta G_{act,S455} + \Delta G_{act,S6}) \quad (5)$$

where $\Delta G_{\text{act,wt}}$ is the free energy of activation of the wild-type channel, $\Delta G_{\text{act,double}}$ is the free energy of activation of the double glycine mutant, $\Delta G_{\text{act,S4S5}}$ is the free energy of activation of the single glycine mutant in the S4S5 linker, and $\Delta G_{\text{act,S6}}$ is the free energy of activation of the single glycine mutant in S6. $\Delta\Delta G_{\text{act,interact}} = 0$ suggests that the activation energies are purely additive hence that the residues are not functionally coupled. A value of $\Delta\Delta G_{\text{interact}}$ more positive than +1 kcal mol⁻¹ or more negative than -1 kcal mol⁻¹ ($|\Delta\Delta G_{\text{interact}}| > 1$) was considered significantly different in similar studies (Kusch et al. 2010; Labro et al. 2011; Wall-Lacelle et al. 2011). The coupling or interaction energy $\Delta\Delta G_{\text{inact,interact}}$ during channel inactivation was calculated as follows:

$$\Delta\Delta G_{\text{inact,interact}} = (\Delta G_{\text{inact,WT}} + \Delta G_{\text{inact,double}}) - (\Delta G_{\text{inact,S4S5}} + \Delta G_{\text{inact,S6}}) \quad (6)$$

where $\Delta G_{\text{inact,wt}}$ is the free energy of inactivation of the wild-type channel, $\Delta G_{\text{inact,double}}$ is the free energy of inactivation of the double glycine mutant, $\Delta G_{\text{inact,S4S5}}$ is the free energy of inactivation of the single glycine mutant in the S4S5 linker, and $\Delta G_{\text{inact,S6}}$ is the free energy of inactivation of the single glycine mutant in S6.

Homology modeling of Ca_v3.2. The primary sequence of Ca_v3.2 was aligned with the Na_vAb and Na_vRh by using T-COFFEE. The computer-based molecular models of Ca_v3.2 were obtained with Modeller 9v4 (<http://salilab.org/modeller>) using the molecular coordinates of Na_vAb (3RVY.pdb and 4EKW.pdb) (Payendeh et al. 2011; Payendeh et al. 2012) and Na_vRh (4DXW.pdb) (Zhang et al. 2012) (Fig 1). The first Na_vAb structure that was reported (3RVY.pdb) was estimated to depict the channel into an intermediate conformation along the channel activation pathway (Amaral et al. 2012) whereas the second structure (4EKW.pdb) captured the channel in the inactivated state. The

activation gate of Na_vRh also appears to be in the closed state. While the structure of Na_vMs is reported to be captured in the open state, it lacks the S4S5 linkers (McCusker et al. 2012). Fifty models were generated and the models with the lowest molpdf scoring function (as provided in PyMol) were selected. The modeling was restricted to Domains II, III, and IV because Domain I of Ca_v3.2 displays a stretch of 100-residue in the loop preceding the pore region that could not be modeled with the current templates. In Domain II, Ca_v3.2 displays a series of 12 contiguous residues after the transmembrane domain S5. In Domain III, the stretch of residues not accounted for by either template amounts to 27 residues at the same position. The gaps in the structural model imply a certain degree of uncertainty in the final model, especially in regard to the orientation of the S4S5 linker with respect to the S6 residues. Despite these gaps, the structural homology for the S4S5 to S6 region in Domains II and III is conclusive with an average root mean square deviation of 1.6 Å for the Na_vRh-based model and 1.3 Å for the Na_vAb-based model.

RESULTS

Activation gating of Glycine mutants in IIS6 The T-type Ca_v3.2 channel was functionally expressed in *Xenopus* oocytes and its electrophysiological properties were measured with the cut-open oocyte technique in the presence of 10 mM Ba²⁺ as the charge carrier. As seen in Fig 2, its biophysical properties were comparable to the properties reported in the original cloning paper (Cribbs et al. 1998) and after recombinant expression in HEK cells (Klockner et al. 1999). Under our conditions, Ca_v3.2 activated with $E_{0.5,\text{act}} = -48 \pm 1$ mV (n=37) that is similar to $E_{0.5,\text{act}} = -45.8 \pm 0.7$ mV reported in HEK cells in the presence of 1.25 mM Ca²⁺ in the external medium (Klockner et al. 1999). This negative activation potential translated into a $\Delta G_{\text{act}} = -4.3 \pm 0.2$ kcal mol⁻¹ (n = 37). Ca_v3.2 activates at

significantly more negative voltages than HVA Ca_v2.3 with $E_{0.5,act} = -7$ mV for the latter (Wall-Lacelle et al. 2011). The channel kinetics were typical of current-dependent inactivation with activation and inactivation kinetics becoming increasingly faster after the threshold potential (Klockner et al. 1999). Other properties include a relatively slow deactivation time constant of 12 ± 1 ms ($n = 9$) at -40 mV and a time constant for recovery ($\tau_{recovery}$) from inactivation of 480 ± 1 ms ($n = 10$) which is similar to the $\tau_{recovery} = 395$ ms reported in HEK cells (Klockner et al. 1999). Channels inactivated with $E_{0.5,inact} = -65 \pm 1$ mV ($n = 10$). These activation and inactivation parameters suggest a window current between -65 and -50 mV as shown for native T-Type currents in vestibular neurons (Autret et al. 2005). The complete set of biophysical parameters is shown in Table I.

Gating currents were isolated in 2 mM external Co²⁺ (Olcese et al. 1996) and the voltage dependence of charge movement Q/Q_{max} was fitted with a single Boltzmann function. Q/Q_{max} and G/G_{max} curves of Ca_v3.2 WT displayed comparable voltage-dependence in contrast to K_v2.1 (Islas and Sigworth 1999) and HVA Ca_v2.3 (Olcese et al. 1996) where the threshold for gating current activation was shown to be more negative than the threshold for activation of ion currents. Similar observations were reported for LVA Ca_v3.1 and Ca_v3.3 channels whether gating currents were measured with 1 mM La³⁺ or 30 μ M Er³⁺ suggesting that this is an intrinsic property of LVA Ca_v3 channels and arguing against a role for a simple surface charge screening effect (Karmazinova et al. 2011). These results suggest that charge movement of Ca_v3.2 is negligible in the pre-open state and support a model with a concerted opening of the four pore domains.

In HVA Ca_v2.3 channels, hydrophobic residues in distal S6 were shown to stabilize the channel closed state whereas mutations to glycine residues promoted channel activation near the resting

potential (Raybaud et al. 2007; Wall-Lacelle et al. 2011). Given that LVA Ca_v3.2 channels open at negative membrane potentials, we investigated whether its closed state was also stabilized by hydrophobic residues in the distal S6 of Domain II (IIS6) (Fig 3). We opted to perform a glycine scan of IIS6 as a way to significantly perturb the energies of gating transitions (Ledwell and Aldrich 1999). Glycine is more hydrophilic than Leucine, Isoleucine, and Valine residues (Hessa et al. 2005). It thus appears to be suitable to study the role of hydrophobic interactions while minimizing steric hindrance. Furthermore, the high conformational flexibility of side-chain free glycine residues, appear to be compatible with the relatively loose α -helical arrangement of the distal S6 region observed in high-resolution of K⁺ channels (Long et al. 2005). Point mutations were introduced into ten residues from V1005 to E1016 and their biophysical properties were measured. Current traces obtained for four mutations between L1010G and L1014G are shown in Fig 4. As seen, the kinetics of L1010G, A1012G, and L1014G were not significantly different from Ca_v3.2 WT. In contrast, the activation, deactivation, and inactivation kinetics of V1011G and I1013G were significantly slower. Only I1013G activated at more negative potentials than Ca_v3.2 WT with a $E_{0.5,act} = -54 \pm 1$ mV ($n = 10$). Introducing a glycine residue at other positions in the distal IIS6 either right-shifted the activation and inactivation potentials or else were without significant impact ($p > 0.1$) (Fig 5A-B). Similar results were reported when residues in IIS6 were mutated to alanine (Table I). The slower kinetics of I1013G, its left-shift of the activation potential, and its lack of significant impact on the inactivation potential are qualitatively reminiscent of the IIS6 I701G mutant in Ca_v2.3 (Raybaud et al. 2007; Wall-Lacelle et al. 2011). Multiple primary sequence alignments of S6 segments and homology models suggest that I1013 is structurally equivalent to I701 in Ca_v2.3 (Wall-Lacelle et al. 2011) and I217 in Na_vAb (Payendeh

et al. 2012), that were shown to play a role in activation gating. Although $\text{Ca}_v3.2$ I1013G activated at more negative potentials than $\text{Ca}_v3.2$ WT, the -10 mV negative shift was more modest than the \approx -35 mV shift in the voltage-dependence of activation observed with $\text{Ca}_v2.3$ I701G (Raybaud et al. 2007; Wall-Lacelle et al. 2011). In addition, glycine substitutions were the only ones to successfully left-shift the activation potential since I1013A, I1013V and I1013L either right-shifted the activation curve or were without effect. Finally, none of the glycine mutations significantly affected the mid-potential of steady-state inactivation (Table I).

Functional coupling within Domain II

The crystal structures of K_v and Na_v channels have shown that residues in the S6 activation gate are positioned within atomic distance of the S4S5 α -helix. Mutational studies as well as statistical coupling analysis (Lee et al. 2009) have shown that the S4S5 linker plays a major role in the activation gating of voltage-dependent ion channels and that compatibility across the S4S5 linker-to-pore interface is required to couple voltage-sensor action to pore gating (Lu et al. 2002; Lee et al. 2009). Previous studies have shown that I701 in $\text{Ca}_v2.3$ (Wall-Lacelle et al. 2011) and I217 in Na_vAb (Payendeh et al. 2012) are functionally coupled with a conserved Leucine residue located in the S4S5 linker of the same Domain. This position is equivalent to L908 in $\text{Ca}_v3.2$ (Fig 6A). Both Na_vAb and Na_vRh homology models of $\text{Ca}_v3.2$ however predict that T911 in S4S5 would be the closest residue to I1013 in IIS6. $\text{Ca}_v3.2$ L908 is predicted to lie further away with predicted distances ≥ 10 Å between their C- α atoms and/or C- β atoms. To investigate functional interaction between these residues, we performed a double-mutant cycle analysis. The double-mutant cycle analysis (Horovitz 1996; Ranganathan et al. 1996) provides a way for isolating the energetics of specific pairwise interactions as shown in $\text{Na}_v1.7$

channels (Blunck and Batulan 2012) and in our previous study $\text{Ca}_v2.3$ (Wall-Lacelle et al. 2011). The initial glycine scan of IIS4S5 was carried out in 11 individual positions from L901 to D913. Of all the residues tested, only V907G strongly shifted the ΔG_{act} toward negative voltages with $\Delta\Delta G_{\text{act}} = -3.3 \pm 0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($n = 11$) (Fig 6B). The Q/Qmax curve was shifted to the same extent and overlapped with the G/Gmax curve as it was also shown for the WT channel. This tight coupling between the conductance and the charge means that electromechanical coupling was not altered, and suggests that V907G stabilized the pore in its open state (Bourdin et al. 2010). Remarkably, introduction of glycine residues at positions 902, 903, 904, 906, 908, 909, 911, 912, and 913 did not significantly alter ΔG_{act} ($p > 0.01$). T911G activated within the same voltage range as the WT channel although its activation and inactivation kinetics were significantly slower (Table II).

The properties of the double mutant T911G/I1013G are reported in Fig 7. Inactivation kinetics of T911G/I1013G were slower than the WT and T911G but remained faster than I1013G (Fig 7). More interestingly T911G/I1013G activated at slightly more depolarized voltages, whereas both single mutants activated at voltages more negative than the WT channel. Altogether, this yielded a $\Delta\Delta G_{\text{act, interact}} = 1.8 \pm 0.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($n = 6$) a value that is significantly different than 0. With a $\Delta\Delta G_{\text{interact}} \geq 1 \text{ kcal mol}^{-1}$, this result suggests that T911 is functionally coupled with I1013 during channel activation. There seems to be a functional coupling during inactivation although the larger experimental error associated with this measure ($\Delta\Delta G_{\text{inact, interact}} = 2.9 \pm 2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$, $n = 6$) precludes its statistical significance. The $\Delta\Delta G_{\text{act, interact}}$ for the double mutant T911A/I1013A was $-1.6 \pm 1.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($n = 6$) again suggestive albeit not conclusively of a possible interaction between these two residues during channel activation. Of note, T911

and I1013 in $Ca_v3.2$ are respectively equivalent to S241 in IS4S5 and V400 in IS6 (V400) that were shown to be functionally coupled during activation of $Na_v1.7$ channels (Blunck and Batulan 2012).

To assess for the specificity of interaction, biophysical properties were characterized for 8 double glycine mutants pairing IIS4S5 residues (from V906 to M912) to I1013G or the neighboring L1014G residue. All these double glycine mutants activated in a voltage-dependent manner albeit with significantly lower peak currents. Most double mutants inactivated with slower kinetics than the WT channel evoking the parent I1013G channel (Table III). Interaction energies for activation and inactivation of the V906G/I1013G, V909G/I1013G, K910G/I1013G, and T911G/L1014G pairs were not significantly different from 0. Robust interaction energies were however measured between V907 or L908 in IIS4S5 and I1013 in IIS6 during channel activation. With a value for $\Delta\Delta G_{act,interact} = 4.6 \pm 1.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($n = 6$), the interaction energy for V907G/I1013G was in fact stronger than for any other pair of mutants tested in Domain II. As seen, the activation curve (G/G_{max}) of the double mutant V907G/I1013G was superimposed with those of single mutants V907G and I1013G and significantly left-shifted as compared with the WT channel (Fig 8). The significant alteration in the electromechanical coupling is supported by the observation that the Q/Q_{max} and the G/G_{max} curves of the double V907G/I1013G mutant are shifted in similar directions.

Finally, a few other pairs of residues predicted by the 3D structure of Na_vAb to be in close proximity were tested using the same approach. N211 residue in S6 of Na_vAb is predicted to lie within atomic distance of L123 in S4S5 (44). These residues are aligned with N1008 (IIS6) and L908 (IIS4S5) in $Ca_v3.2$ (Figs 3 and 6A). Double mutants L908G/ N1008G, N914G/ E1016G, and V915G/ L1010G yielded

voltage-activated currents with $\Delta\Delta G_{act,interact}$ values that were not significantly different from 0 although these residues might be coupled during inactivation (Table III).

Interdomain coupling during activation

Homology models of $Ca_v3.2$ also predict numerous points of contact between the S4S5 and S6 between adjacent domains (Fig 9). In particular, V907 and L908 in IIS4S5 shown to be functionally coupled with I1013 in IIS6, are predicted to face N1548 in IIS6 in both homology models. L908 in IIS4S5 is predicted to be closer to N1548 in IIS6 than I1013 in IIS6. To note, N1548 is strictly conserved in the primary sequence of IIS6 in all HVA and LVA Ca_v channels (Marksteiner et al. 2001). Despite this predicted proximity ($\leq 8 \text{ \AA}$ between the closest atoms in the lateral chains), the $\Delta\Delta G_{act,interact} = 1.2 \pm 1.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($n = 6$) was not significantly different from 0 (Table III).

The neighboring residue V907 is predicted to protrude slightly further away from N1548 with predicted distances ranging from 7 to 10 \AA (Fig 10). The double mutant V907G/N1548G activated in a voltage-dependent manner with $\Delta G_{act} = -3.7 \pm 0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Table III). Both single mutants activated either at either significantly more depolarized (N1548G) or significantly hyperpolarized (V907G) voltages than the WT channel yielding a large $\Delta\Delta G_{act,interact} = 3.5 \pm 1.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($n = 6$) (Tables I, II, and III). This interaction energy suggests significant coupling between Domains II and III during channel activation. We could not however estimate the change in Q/Q_{max} . Poor functional expression of V907G/N1548G, with peak currents in average 10-times lower than recorded for the WT channel (even when measured 7 days after injection) precluded the measure of gating currents. Qualitatively similar results were obtained for the V907A/N1548A double alanine mutant although the $\Delta\Delta G_{act,interact}$ value was

smaller. This reduced interaction energy might be explained by the fact that Alanine residues are more hydrophobic than Glycine. The V907G/N1548G channel's kinetics were unremarkable but for slower inactivation kinetics and faster deactivation kinetics. The coupling energy between V907 and N1548 was stronger than for double mutants T911G / N1548G, T911A / N1548A, L908G / N1548G, L908A / N1548A, and L908G / N1853G, the latter being in IVS6 (Fig 11 and Table III). Nonetheless interaction between these residues cannot be ruled out as the values of $\Delta\Delta G_{\text{act,interact}}$ we have measured remain on the verge of statistical significance.

DISCUSSION

In this study we have analyzed the molecular mechanisms responsible for the voltage-dependent activation of the T-type $\text{Ca}_v3.2$ channel, and more specifically the role of domain/domain interaction in this process. The asymmetrical nature of $\text{Ca}_v3.2$ is perfectly suited to study the nature of inter-domain (or *intersubunit* in K_v channels) interaction during channel activation. Furthermore, the T-type $\text{Ca}_v3.2$ channel can be functionally expressed in the absence of auxiliary subunits unlike HVA $\text{Ca}_v1.2$ (Yang et al. 2012) and $\text{Ca}_v2.3$ (Wall-Lacelle et al. 2011; Shakeri et al. 2012), thus minimizing indirect effects caused by modulation of gating by $\text{Ca}_v\beta$ and $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ subunits. Biophysical properties were characterized for 47 single mutants and 20 pairs of glycine mutants. Our data identified 4 unique sets of interaction suggesting that residues in the S4S5 linker of Domain II are functionally coupled with key residues located on the S6 segments of Domain II and Domain III during the activation of LVA Ca_v3 channels. Mutations of nearby residues in IIS4S5 displayed milder if any coupling with other residues in IIS6, IIS6, or IVS6. This is the first report of residues in the S4S5 linker being coupled at once with S6 residues from 2 adjacent pore regions (Domain II and Domain III). Interdomain

(*intersubunit*) interaction between the voltage sensor S4 and pore residues in S6 has been inferred from the formation of disulfide bonds in Shaker K_v (Laine et al. 2003) and from double mutant cycle analysis in $\text{Ca}_v1.2$ (Beyl et al. 2012) respectively.

These zones of interaction were in general agreement with predictions from bacterial Na_v crystal structures. Although the latter structures turned out to be superior templates for T-type Ca_v channels than $\text{K}_v1.2$ (Long et al. 2005), the presence of large gaps in the region following S5 in Domains II and III of $\text{Ca}_v3.2$ in both computer-based 3D models limits our predictions regarding the relative orientation of the residues between the S4S5 linker and the S6 pore region. This constraint does not exclude possible physical interaction between residues in S4S5 and distal S6 but precludes a conclusive statement. Nonetheless, the strong interaction energy measured with the V907G/I1013G mutant suggests that van der Waals interactions between V907 in II S4S5 and I1013 in IIS6 are compromised in the presence of a pair of Glycine residues. Interactions at play during activation might not be identical to the ones determining inactivation. Pairs of residues showing functional coupling during channel activation (V907/I1013, L908/I1013, V907/N1548, T911 /I1013) did not show significant interaction energy during channel inactivation. These observations suggest either that activation and inactivation are structurally distinct processes or that inactivation engages a larger number of contact points between the pore region and the connecting linkers.

Limitations of our study

The ΔG_{act} and $\Delta\Delta G_{\text{act,interact}}$ reported herein for $\text{Ca}_v3.2$ with glycine mutants were significantly lower than the one estimated between L596G in IIS4S5 and I701G in IIS6 in $\text{Ca}_v2.3$ (Wall-Lacelle et al. 2011). By comparison, introducing glycine residues in the IIS4S5 linker or in IIS6 of $\text{Ca}_v2.3$ significantly decreased the

activation potential with $-2 < \Delta\Delta G_{\text{act}} < -6$ kcal mol⁻¹ (Wall-Lacelle et al. 2011). It remains to be seen whether the smaller changes in $\Delta\Delta G_{\text{act}}$ observed for Ca_v3.2 suggests that the channel structure is already optimized to open in response to depolarization.

Nonetheless, small $\Delta\Delta G_{\text{act}}$ values yields smaller $\Delta\Delta G_{\text{act,interact}}$ values. Because of the experimental error inherent to the measure of 4 independent experimental parameters, significant $\Delta\Delta G_{\text{act,interact}}$ values are more likely to be identified from coupling two single mutants that are displaying large ΔG_{act} . Point in case, $\Delta\Delta G_{\text{act,interact}}$ was smaller for the double V907A/N1548A than for V907G/N1548G despite the fact that the mutants positions are identical in the two mutants. One might speculate that mutations with residues more hydrophilic than Glycine might increase the $\Delta\Delta G_{\text{act,interact}}$ values. Given the inherent limitations of the analysis, a small $\Delta\Delta G_{\text{act,interact}}$ value hence does not necessarily rule out functional coupling. Double-mutant cycle analysis carried out in Ca_v1.2 and Ca_v2.1 with residues predicted to be aligned with L596 and I701 failed to show any significant energy coupling (Wall-Lacelle et al. 2011) despite the high likelihood that the coupling between S4S5 and S6 involves universally conserved pairs of residues. Caution is thus to be exercised in interpreting $\Delta\Delta G_{\text{act,interact}}$ as this parameter measures the relative coupling energy and not the absolute value of energy coupling. Large $\Delta\Delta G_{\text{act,interact}}$ values are more likely to emerge when coupling individual mutants with large $\Delta\Delta G_{\text{act}}$. Despite these limitations, the thermodynamic mutant analysis remains undeniably a useful tool to qualitatively identify functional hotspots that may not be inferred from static crystal structures.

Model of channel activation

LVA Ca_v channels open in response to smaller depolarization than HVA Ca_v1.2 and Ca_v2.3 channels, yet their S4S5 helices appear to be strongly coupled with S6 residues during channel activation. The

electromechanical model of channel activation states that the channel closed state is stabilized by hydrophobic interactions in the distal S6 region and the upward movement of the voltage sensor is mechanically transduced to the channel pore S6 residues through the S4S5 helices. The role of the S4S5 linker in this process has yet to be elucidated. The S4S5 linker can act as a high-energy bolt that prevents the pore S6 residues from opening. The outward movement of the voltage sensor would be sufficient to disrupt the interaction and the pore would then open passively in the absence of any physical hindrance (Bourdin et al. 2010). It is also possible that the S4S5 linker and the pore S6 residues remain in close contact during activation being pulled away simultaneously as a single unit. In both cases, the interaction between S4S5 and S6 has to occur in the closed state, a conclusion that is also borne out by the Na_v-based molecular models. The observation that the voltage-dependence of the charge movement (Q/Q_{max}) and the conductance (G/G_{max}) were shifted similarly pleads in favor of a model where the energy deployed by the movement of the voltage sensor is directly transduced to the S6 pore residues. The strong interaction energies measured between Domains II and III suggests that activation of Ca_v3.2 occurs in a concerted manner across all 4 voltage sensors rather than by each S4 moving separately in a stochastic manner. It would be highly interesting to investigate whether the changes induced by the glycine mutations in IIS4S5 or in IIIS6 are caused or results from the movement of any S4 segment using voltage-clamp fluorimetry. These questions go beyond the scope of this current investigation and await further structural studies of Ca_v channels.

FOOTNOTES

We thank Drs Ed Perez-Reyes (University of Virginia) and Leanne Cribbs (Loyola University Chicago) for the human $Ca_v3.2$ clone in the pcDNA3 vector; Drs Rikard Blunck and Nazzareno D'Avanzo for discussions; Mr George Haddad for teaching us the rudiments of the cut-open oocyte technique; Ms Julie Verner for oocyte culture; Mr Michel Brunette for the design of the perfusion chamber. This work was completed with grant 262048 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to L. Parent. P.O. Demers-Giroux received a graduate student award from GEPROM, a research group funded by the "Fonds Recherche Québec Santé (FRQS)".

FIGURES

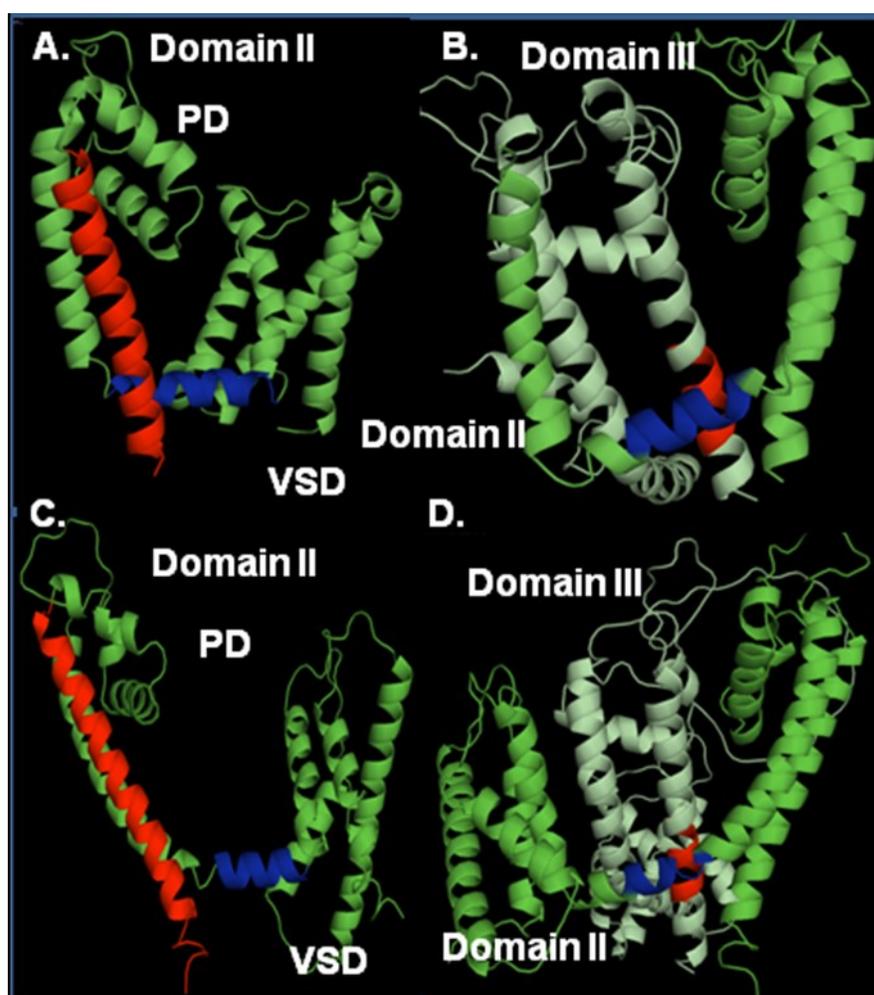


FIGURE 1. Modeling of Domain II and Domain III was based upon the atomic coordinates of Na_vAb (PDB code 3RVY) (panels A, B) and Na_vRh (PDB code 4DXW) (panels C, D). Four different views of the computer-based molecular models of Domain II (panels A, C) and Domain II and III (panels B, D) of $Ca_v3.2$ are shown in a cartoon representation. Modeling was achieved with Modeler 9v4. *Panel A, C*, the regions in red correspond to the IIS6 and the regions in blue correspond to the IIS4S5. *Panel B, D*, the regions in red correspond to the

predicted region in the IIS6 could be interacting with the region in blue in the IIS4S5. PD: Pore Domain. VSD: Voltage sensor domain. Figures were produced using PyMol (DeLano Scientific).

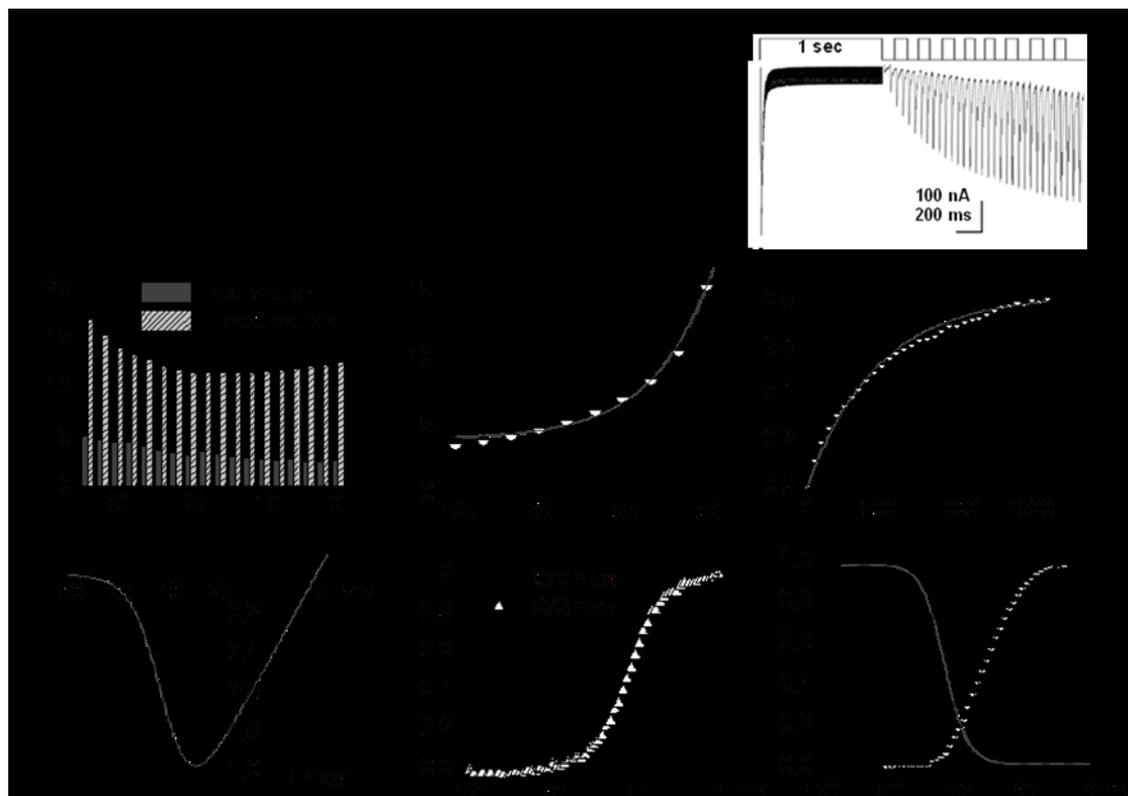


FIGURE 2. **A.** Whole cell current traces are shown for $\text{Ca}_v3.2$ WT. Current traces were obtained using the cut-open oocyte technique in 10 mM Ba^{2+} from a holding potential of -100 mV. Leak subtraction was carried out off-line. **B.** Bar graphs of the mean time constants of activation and inactivation of the $\text{Ca}_v3.2$ WT are shown as a function of the test potential. Leak-subtracted whole-cell current traces were fitted by a sum of two exponential equations, one for the activation and the other one for inactivation (Klockner et al. 1999). **C.** Normalized current-voltage relationships for $\text{Ca}_v3.2$ WT were obtained by fitting the experimental data to a modified Boltzmann equation. **D.** Representative tail currents for $\text{Ca}_v3.2$ WT. Currents were activated during 20-ms conditioning depolarizing voltage pulses at -30 mV. Deactivation was recorded during subsequent repolarization to test potentials from -120 to -20 mV (10-mV increments) as illustrated on the pulse protocol. **E.** The mean time constants of deactivation were obtained from fitting current traces with monoexponential functions. The mean deactivation time constant was 8.4 ± 0.6 ms ($n = 9$) at -50 mV for $\text{Ca}_v3.2$ WT. **F.** Normalized gating charge (Q/Q_{max}) and normalized conductance (G/G_{max}) were plotted against the test voltages for $\text{Ca}_v3.2$ WT. As seen, both curves overlapped in contrast to observations reported in K_v channels where the Q/Q_{max} is left-shifted as compared with the G/G_{max} curve. Mid-points were -44 ± 1 mV ($n=4$) for Q/Q_{max} and -47 ± 1 mV ($n=37$) for G/G_{max} . **G.** Time course of recovery from inactivation for the $\text{Ca}_v3.2$ WT. Recovery was measured using a double pulse protocol. A 1s-prepulse to -20 mV induced inactivation and, after a variable period at -100 mV, a test pulse to the same voltage (-20 mV) was applied to assess the extent to which channels had recovered from inactivation. **H.** Data points from the panel G were

fitted with a single exponential equation of 480 ± 1 ms ($n = 10$). **I.** Voltage dependence of inactivation for $Ca_v3.2$ WT was estimated from isochronal inactivation data points measured after 2 s conditioning pulses applied between -110 and 0 mV from a holding potential of -100 mV. The fraction of the noninactivating current was fitted with a Boltzmann equation yielding $E_{0.5, \text{inact}} = -65 \pm 1$ mV ($n = 10$). Pooled data points are plotted against test voltages and are shown alongside the normalized G/G_{max} curve. As seen, a non-negligible window current is predicted between -65 and -50 mV for $Ca_v3.2$ WT. Numerical values are found in Table I.

S6			
NavAb	193	YAWVFFIPFIFVVTFVMINLVVAI <u>I</u> VDAM	221
NavRh	195	WSWVYFFSFIIICSITILNLVIAI <u>I</u> LVDVV	225
K_v1.2	387	GKIVG--SLCAIAGVLTIAL <u>PVP</u> VIVS-N	413
Ca_v2.3			
II	333	AIYFI--VLTLEFGNYTLLNVFLA <u>I</u> AVDNL	706
Ca_v3.2			
I	394	YNFYFILLIIVGSFFMINLCLVVIATQF	422
II	990	WAALYFVALMTFGNYVLFNLLVAILVEGF	1018
III	1530	WMLLYFISFLLIVSFFVLNMFVGVVVENF	1558
IV	1835	LSPVYFVTFVLVPQFVLVNVVVAVLMKHL	1863

FIGURE 3. The primary sequences of IS6, IIS6, IIS6, and IVS6 of $Ca_v3.2$ were aligned with S6 of Na_vAb , Na_vRh , $K_v1.2$ and the $Ca_v2.3$ domain II using the T-coffee algorithm. Underlined residues have been identified in previous studies as determinants of activation gating; I217 in Na_vAb , PVP locus in K_v channels, and I701 in $Ca_v2.3$. The sequence of residues underlined in $Ca_v3.2$ designate the IIS6 residues studied herein.

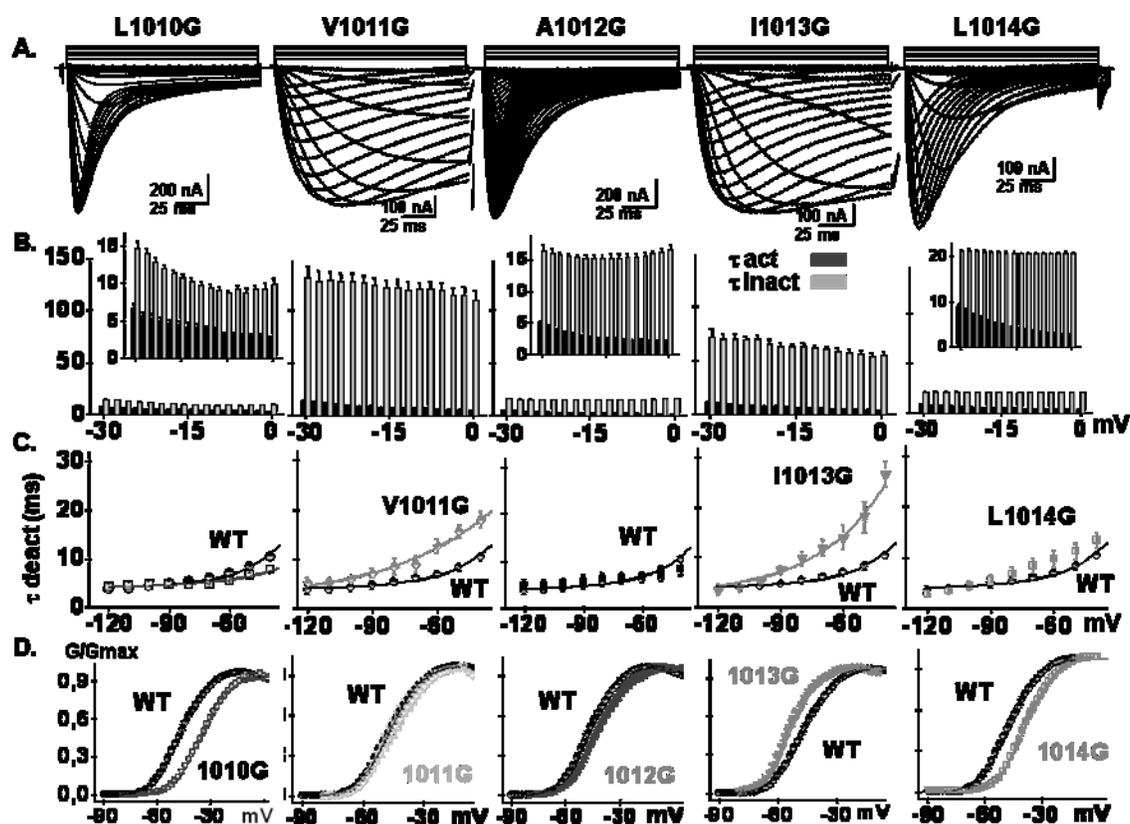


FIGURE 4. A. Whole-cell current traces are shown from left to right for $Ca_v3.2$ L1010G, V1011G, A1012G, I1013G, and L1014G. Current traces were obtained in 10 mM Ba^{2+} from a holding potential of -100 mV. B. Bar graphs showing the mean time constants of activation (dark gray bars) and inactivation (light gray bars) as a function of the test potential from left to right for $Ca_v3.2$ L1010G, V1011G, A1012G, I1013G, and L1014G. All graphs cover the same range but insets emphasize the details for the faster mutants (L1010G, A1012G, and L1014G). Inactivation kinetics were strongly decreased in V1011G and I1013G. C. The mean time constants of deactivation (obtained from fitting current traces from monoexponential functions) from left to right for $Ca_v3.2$ L1010G, V1011G, A1012G, I1013G, and L1014G (square) are shown alongside $Ca_v3.2$ WT (circle). The data points for $Ca_v3.2$ WT are replotted from Fig 1E in each graph to facilitate comparison. As seen the slower inactivating kinetics of V1011G and I1013G were accompanied by slower deactivation kinetics suggesting that the channel open time was stabilized by these mutations. D. Normalized conductance - voltage relationships G/G_{max} (shown from left to right for $Ca_v3.2$ L1010G, V1011G, A1012G, I1013G, and L1014G) were obtained by fitting the experimental data to a Boltzmann equation. The data obtained for the WT channel (dark circles) are shown alongside for comparison. Numerical values are found in Table I.

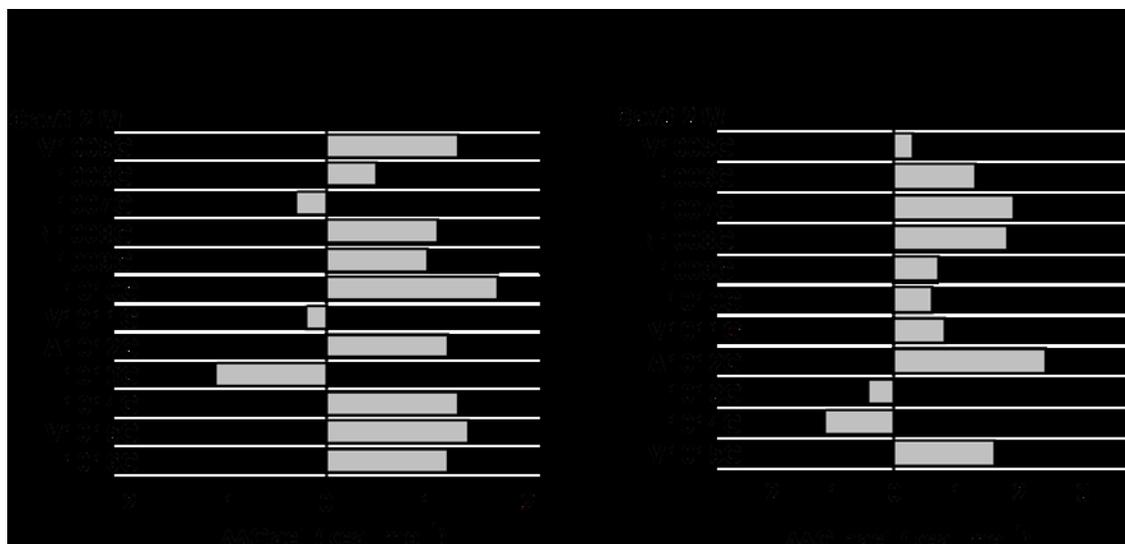


FIGURE 5. **A.** Bar graph of the activation energies ($\Delta\Delta G_{act}$) for the glycine mutants in IIS6 of $Ca_V3.2$. $\Delta\Delta G_{act}$ were obtained from the difference between the ΔG_{act} values for the mutant channels and the ΔG_{act} values for the WT channel such that $\Delta\Delta G_{act} = \Delta G_{act}(mutant) - \Delta G_{act}(WT)$. As seen, only I1013G activated at voltages more negative than the WT channel. **B.** Bar graph of the inactivation energies ($\Delta\Delta G_{inact}$) for the glycine mutants in IIS6 of $Ca_V3.2$. $\Delta\Delta G_{inact}$ were obtained from the difference between the ΔG_{inact} values for the mutant channels and the ΔG_{inact} values for the WT channel such that $\Delta\Delta G_{inact} = \Delta G_{inact}(mutant) - \Delta G_{inact}(WT)$. As seen, none of the mutations inactivated at voltages significantly more negative than the WT channel. Data are shown in $kcal\ mol^{-1}$. Numerical values are found in Table I.

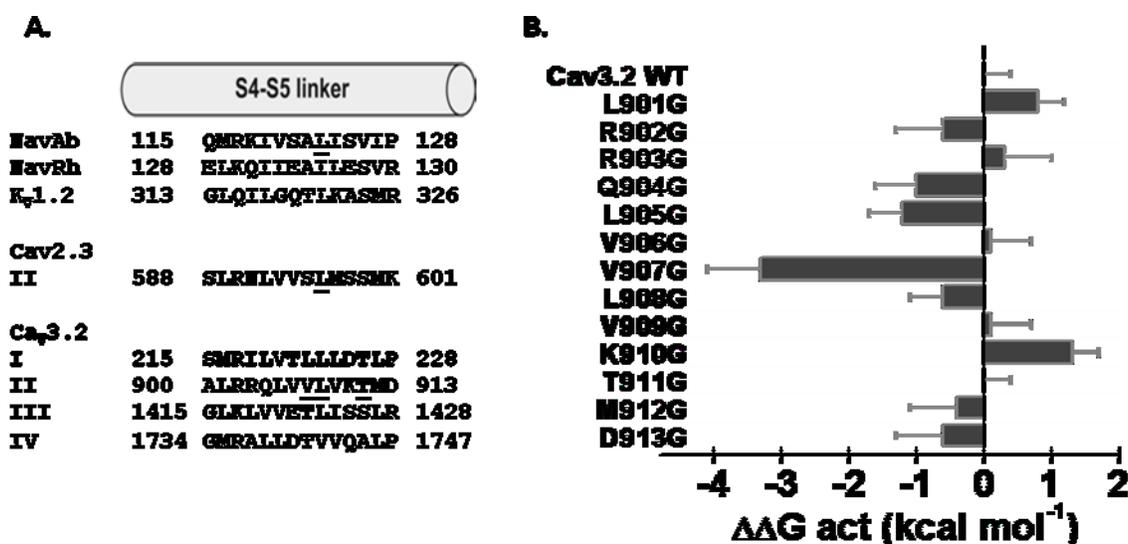


FIGURE 6. **A.** The primary sequences of IS4S5, IIS4S5, IIS4S5, and IVS4S5 of $Ca_V3.2$ were aligned with S4S5 of Na_VAb , Na_VRh , $K_V1.2$ and S4S5 in domain II of $Ca_V2.3$ using the T-coffee algorithm. Underlined residues have been identified in previous studies as modulating

the channel activation gating; L123 in Na_vAb and L596 in Ca_v2.3. The sequence of residues underlined in Ca_v3.2 designate the residues studied herein. **B.** Bar graphs of the activation energies ($\Delta\Delta G_{\text{act}}$) for the glycine mutants in IIS4S5 of Ca_v3.2. $\Delta\Delta G_{\text{act}} = \Delta G_{\text{act,mut}} - \Delta G_{\text{act,WT}}$. V907G activated at significantly more negative voltages than the WT channel with a $\Delta\Delta G_{\text{act}} = -3.3 \pm 0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($n = 11$). The complete sets of numerical values are found in Table II.

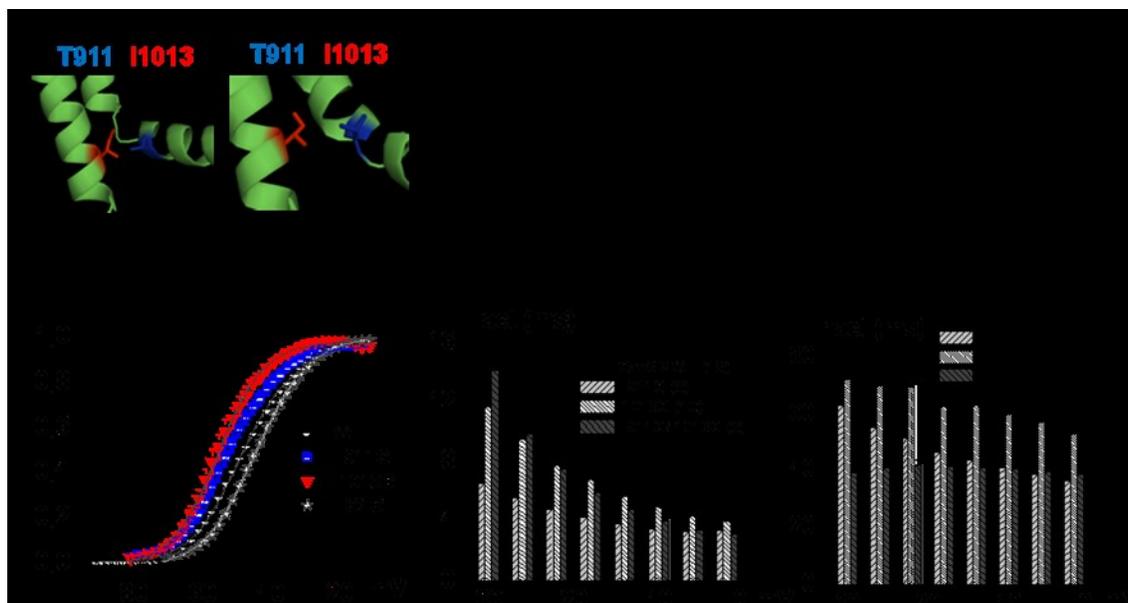


FIGURE 7. A. Computer-based molecular models of Domain II of Ca_v3.2 are shown in a cartoon representation. Modeling of Domain II was based upon the atomic coordinates of Na_vAb (code 3RVY) (left panel) and Na_vRh (PDB code 4DXW) (right panel). T911 (IIS4S5) is shown in stick representation in blue and I1013 (IIS6) is shown in red. **B.** Whole cell current traces are shown from left to right for Ca_v3.2 T911G, I1013G, and the double mutant T911G/I1013G. Current traces were obtained in 10 mM Ba²⁺ from a holding potential of -100 mV. **C.** Normalized conductance (G/G_{max}) for Ca_v3.2 WT (black circles), T911G (blue squares), I1013G (red triangles), and T911G/I1013G (black stars) are plotted against the test voltages. **D.** Bar graphs of the mean time constants of activation for Ca_v3.2 WT (black), T911G (pale grey), I1013G (white) and T911G/I1013G (dark grey) as a function of the test potential. **E.** Bar graphs of the mean time constants of inactivation for Ca_v3.2 WT (black), T911G (pale grey), I1013G (white) and T911G/I1013G (dark grey) as a function of the test potential. Numerical values are found in Tables I, II, and III.

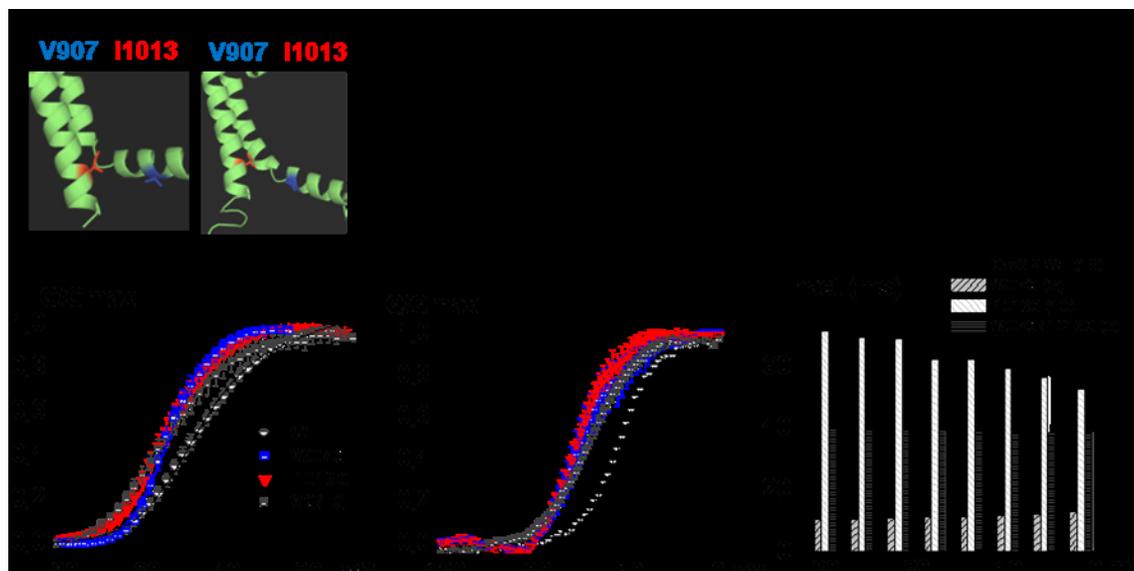


FIGURE 8. A. Computer-based molecular model of and Domain II of $Ca_v3.2$ are shown in a cartoon representation. Modeling of Domain II was based upon the atomic coordinates of Na_vAb (PDB code 3RVY) (left panel) and Na_vRh (PDB code 4DXW) (right panel). V907 (IIS4S5) is shown in stick representation in blue and I1013 (IIS6) is shown in red. **B.** Whole cell current traces are shown from left to right for $Ca_v3.2$ V907G, I1013G, and the double mutant V907G/I1013G. Current traces were obtained in 10 mM Ba^{2+} from a holding potential of -100 mV. **C.** Normalized conductance (G/G_{max}) for $Ca_v3.2$ WT (black circles), V907G (blue squares), I1013G (red triangles), and V907G/I1013G (black squares) are plotted against the test voltages. **D.** Normalized gating charge (Q/Q_{max}) was plotted against voltage plot for $Ca_v3.2$ WT (black circles), V907G (blue squares), I1013G (red triangles), and V907G/I1013G (black squares). Mid-points of charge movement Q/Q_{max} were -44 ± 1 mV ($n = 4$) for WT, -57 ± 4 mV ($n = 6$) for V907G, -56 ± 2 mV ($n = 5$) for I1013G, and -57 ± 2 mV ($n = 6$) for V907G/I1013G. **E.** Bar graphs of the mean time constants of inactivation for $Ca_v3.2$ WT (black), V907G (pale grey), I1013G (white) and V907G/I1013G (dark grey) as a function of the test potential. Numerical values are found in Tables I, II, and III.

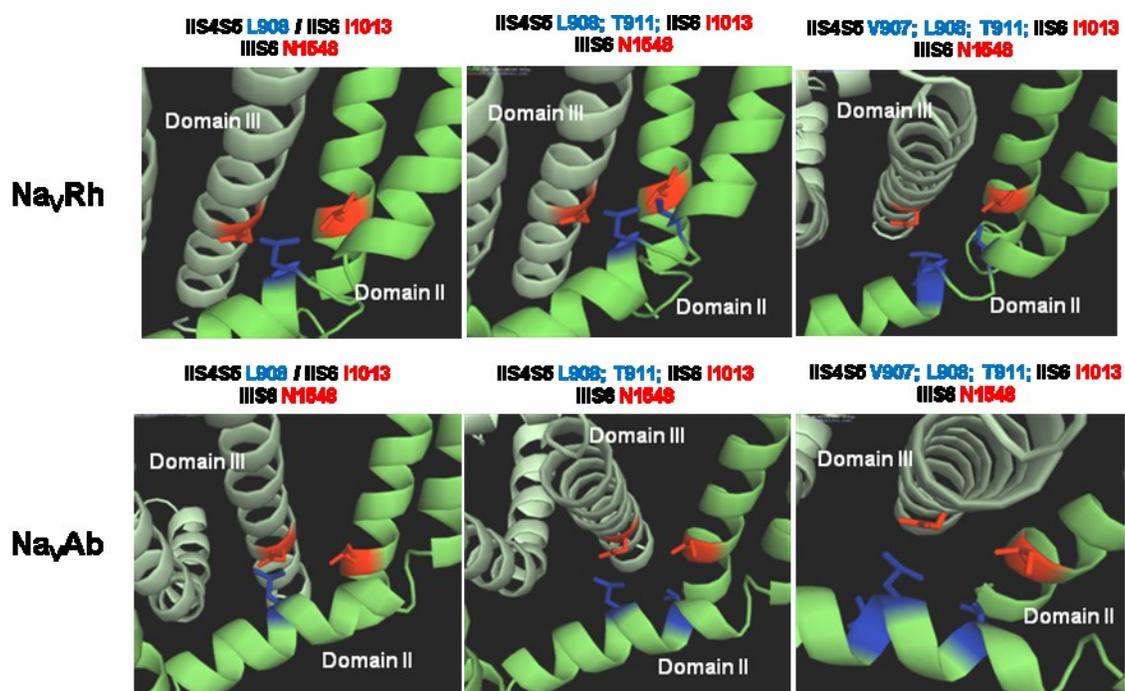


FIGURE 9. Computer-based molecular models of Domain II and III (panels B, D) of Ca_v3.2 are shown in a cartoon representation. Modeling of Domain II and Domain III was based upon the atomic coordinates of Na_vAb (PDB code 3RVY) (panels D, E, F) and Na_vRh (PDB code 4DXW) (panels A, B, C). *Panels A, D*, L908 (IIS4S5) is shown in stick representation in blue and I1013 (IIS6) and N1548 (IIIS6) are shown in red. *Panels B, E*, L908 and T911 (IIS4S5) are shown in stick representation in blue and I1013 (IIS6) and N1548 (IIIS6) are shown in red. *Panels C, F*, V907, L908 and T911 (IIS4S5) are shown in stick representation in blue and I1013 (IIS6) and N1548 (IIIS6) are shown in red.

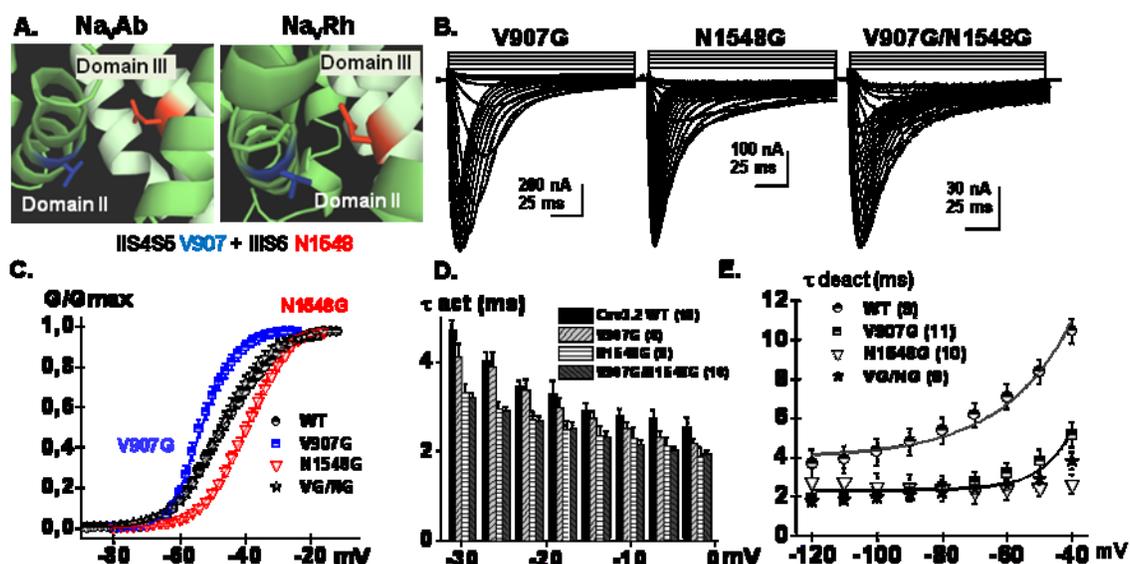


FIGURE 10. **A.** Computer-based molecular models of Domain II and Domain III of Ca_v3.2 are shown in a cartoon representation. Modeling of Domain II and Domain III was based upon the atomic coordinates of Na_vAb (PDB code 3RVY) (left panel) and Na_vRh (PDB code 4DXW) (right panel) and was achieved with Modeler 9v4. V907 (IIS4S5) is shown in stick representation in blue and N1548 (IIS6) is shown in red. The shortest distance between V907 and N1548 was estimated to be 6.3 Å for the model based with Na_vAb and 4.3 Å for the model based with Na_vRh. **B.** Whole cell current traces are shown from left to right for Ca_v3.2 V907G, N1548G, and V907G/N1548G. Current traces were obtained in 10 mM Ba²⁺ from a holding potential of -100 mV. **C.** Normalized conductance for Ca_v3.2 WT (black circles), V907G (blue squares), N1548G (red triangles) and V907G/N1548G (black stars) were obtained by fitting the experimental data to a Boltzmann equation. **D.** Bar graphs of the mean time constants of activation for Ca_v3.2 WT (black), V907G (pale grey), N1548G (white), and V907G/N1548G (dark grey) as a function of the test potential. **E.** The mean time constants of deactivation were obtained from fitting tail currents with monoexponential functions. The deactivation time constants measured at -50 mV were 8.4 ± 0.6 ms (n = 9) for WT, 3.8 ± 0.6 ms (n = 11) for V907G, 2.5 ± 0.5 ms (n = 10) for N1548G, and 2.9 ± 0.3 ms (n = 6) for V907G/N1548G. Numerical values are found in Tables I, II, and III.

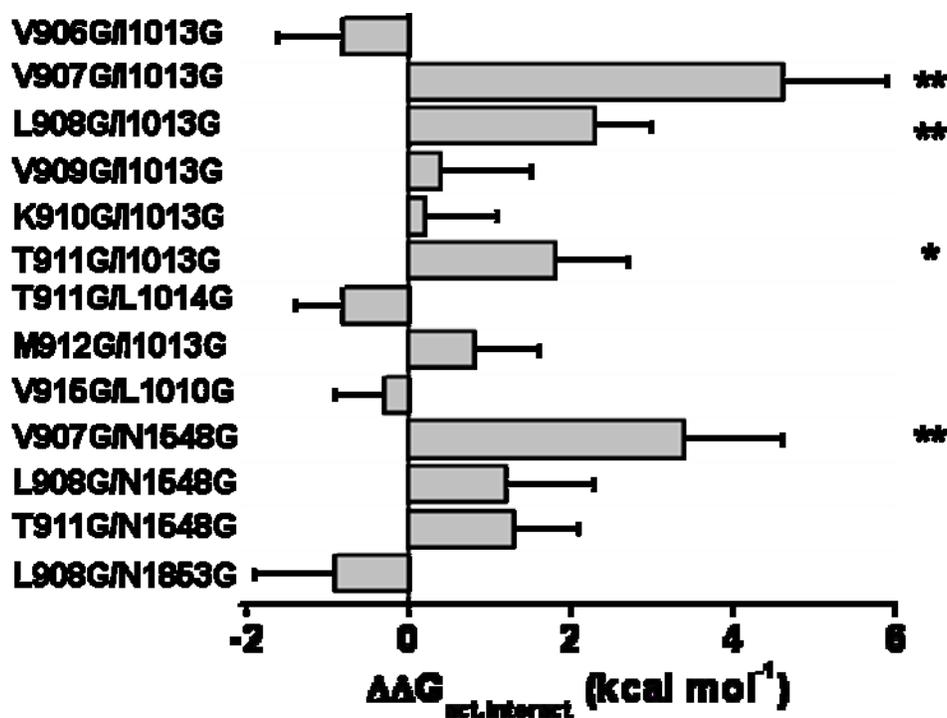


FIGURE 11. Bar graph of the coupling energies ($\Delta\Delta G_{act,interact}$) for the double glycine mutants of Ca_v3.2. $\Delta\Delta G_{act,interact} = (\Delta G_{act, WT} + \Delta G_{act, double}) - (\Delta G_{act, S4S5} + \Delta G_{act, S6})$. As seen, the interaction energies were significantly stronger for V907G/ I1013G and V907G/N1548G than for any other double mutant. Data are shown in kcal mol⁻¹. Symbols * and ** identify double mutants with interaction energies significantly larger than 1.5 kcal mol⁻¹ at $p < 0.05$ and at $p < 0.01$, respectively. Numerical values are found in Table III.

TABLES

	$E_{0.5. act}$ (mV)	ΔG_{act} (kcal mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G_{act}$ (kcal mol ⁻¹)	I_{peak} (nA)	$E_{0.5. inact}$ (mV)	ΔG_{inact} (kcal mol ⁻¹)	τ_{act} -20 mV (ms)	τ_{inact} -20 mV (ms)	Deact -50mV (ms)
Ca_v3.2 WT	-47 ± 1 (37)	-4.3 ± 0.2	n.a	-1300 ± 200	-65 ± 1 (10)	-8.6 ± 0.5	3.2 ± 0.1 (18)	11.6 ± 0.2	8.4 ± 0.6 (9)
V1005A	-36 ± 1 (5)	-3.3 ± 0.2	1.0 ± 0.4	-160 ± 40	-58.2 ± 0.5 (5)	-7.3 ± 0.5	3.5 ± 0.2 (5)	13.3 ± 0.6*	3.9 ± 0.9* (5)
V1005G	-37 ± 1 (5)	-3.0 ± 0.3 *	1.3 ± 0.5	-170 ± 40	-61 ± 1 (4)	-8.3 ± 0.6	2.62 ± 0.09 (5)	17.2 ± 0.4**	5 ± 1 (5)
L1006A	-43 ± 2 (5)	-4.5 ± 0.5	0.2 ± 0.7	-210 ± 70	-67 ± 1 (5)	-7.1 ± 0.7	3.0 ± 0.3 (5)	13 ± 1	4 ± 1* (5)
L1006G	-39 ± 2 (6)	-3.8 ± 0.3	0.5 ± 0.5	-300 ± 100	-63 ± 1 (6)	-7.3 ± 0.8	3.3 ± 0.1 (6)	12.5 ± 0.3	3.0 ± 0.9** (6)
F1007G	-48.6 ± 0.7 (7)	-4.7 ± 0.2	-0.4 ± 0.4	-140 ± 40	-65 ± 2 (7)	-6.7 ± 0.4	4.3 ± 0.3** (7)	43 ± 2 **	7.5 ± 2 (8)
N1008A	-35 ± 2 (4)	-3.1 ± 0.3	1.2 ± 0.5	-120 ± 20	-62 ± 1 (5)	-6.6 ± 0.4	3.2 ± 0.6 (4)	8.2 ± 0.6 **	3.0 ± 0.8** (5)
N1008G	-38.8 ± 0.9 (5)	-3.2 ± 0.2	1.1 ± 0.4	-200 ± 100	-65 ± 1 (4)	-6.8 ± 0.5	2.4 ± 0.4 (5)	7.1 ± 0.9**	2.5 ± 0.5** (5)
L1009A	-39 ± 2 (11)	-3.2 ± 0.4 *	1.1 ± 0.6	-500 ± 200	-71 ± 3 (5)	-5.9 ± 0.4	5.4 ± 0.6 (7)	16 ± 3	3.0 ± 0.7** (6)
L1009G	-44 ± 2 (6)	-3.3 ± 0.3	1.0 ± 0.5	-900 ± 400	-63 ± 1 (6)	-7.9 ± 0.6	3.6 ± 0.2 (6)	15.6 ± 0.4**	7 ± 1 (6)
L1010A	-26 ± 1 (5)	-1.3 ± 0.1 **	3.0 ± 0.3	-170 ± 30	-58 ± 3 (3)	-6.9 ± 0.4	4.0 ± 0.3 ** (5)	16.0 ± 0.8 **	3.5 ± 0.9* (4)
L1010G	-34.9 ± 0.9 (9)	-2.6 ± 0.2 **	1.7 ± 0.4	-600 ± 100	-67.5 ± 0.7 (3)	-8.0 ± 0.3	4.4 ± 0.6 (9)	10.6 ± 0.6	6.7 ± 0.5 (4)
V1011A	-45 ± 2 (6)	-4.2 ± 0.4	0.1 ± 0.6	-800 ± 200	-63 ± 2 (3)	-8.4 ± 0.4	4.2 ± 0.6 * (6)	28.4 ± 0.7 **	17 ± 1** (5)
V1011G	-50 ± 1 (9)	-5.0 ± 0.3	-0.7 ± 0.5	-900 ± 200	-67 ± 1 (11)	-7.8 ± 0.4	5.2 ± 0.5** (11)	115 ± 16 **	8 ± 1 (4)
A1012G	-41 ± 3 (5)	-3.1 ± 0.4*	1.2 ± 0.6	-500 ± 200	-66.0 ± 0.4 (3)	-6.2 ± 0.4	3.1 ± 0.1 (5)	15.2 ± 0.6 **	11.3 ± 0.7 (5)
I1013A	-41 ± 1 (10)	-3.6 ± 0.2	0.7 ± 0.4	-400 ± 100	-64 ± 2 (9)	-7.7 ± 0.6	4.8 ± 0.5** (10)	55 ± 1 **	20 ± 4** (3)
I1013G	-54 ± 1 (10)	-5.4 ± 0.3 *	-1.1 ± 0.5	-390 ± 90	-66.8 ± 0.7 (5)	-9 ± 1	8.5 ± 0.4** (10)	68 ± 4 **	30 ± 9* (5)
I1013L	-41 ± 2 (5)	-3.2 ± 0.4	1.1 ± 0.3	-170 ± 60	-63.3 ± 0.7 (4)	-6.4 ± 0.1	3.7 ± 0.3 (5)	18.4 ± 0.3 **	10.4 ± 0.5 (5)

I1013V	-45.5 ± 0.8 (7)	-4.2 ± 0.3	0.1 ± 0.5	-220 ± 60	-66 ± 1 (6)	-8.0 ± 0.3	2.21 ± 0.07 (7) **	18.1 ± 0.5**	8 ± 2 (7)
L1014A	-39 ± 1 (6)	-3.1 ± 0.3 *	1.2 ± 0.5	-700 ± 300	-66 ± 2 (6)	-7.8 ± 0.6	5.2 ± 0.4 (6)	17.7 ± 0.4**	11.0 ± 0.8 (6)
L1014G	-38 ± 1 (5)	-3.0 ± 0.2 *	1.3 ± 0.4	-1100 ± 500	-67.0 ± 0.9 (5)	-9.9 ± 0.5	5.1 ± 0.4 ** (5)	20.8 ± 0.3 **	11 ± 2 (5)
V1015A	-42 ± 1 (5)	-2.5 ± 0.1 **	1.8 ± 0.3	-330 ± 50	n.d.	n.d.	4.0 ± 0.3 (5)	12 ± 1	n.d.
V1015G	-43 ± 1 (5)	-2.7 ± 0.1 *	1.4 ± 0.3	-330 ± 30	-75 ± 2 (4)	-7.0 ± 0.5	4.9 ± 0.4 ** (7)	24 ± 1 **	3.6 ± 0.8** (5)
E1016A	-47 ± 1 (6)	-4.0 ± 0.2	0.3 ± 0.4	-400 ± 100	-67 ± 1 (6)	-8.8 ± 0.6	4.1 ± 0.2 ** (6)	15.9 ± 0.6 **	10.7 ± 0.5 (6)
E1016G	-43 ± 3 (6)	-3.1 ± 0.4 *	1.2 ± 0.6	-160 ± 30	n.d.	n.d.	5.9 ± 0.5 ** (6)	36 ± 3 **	n.d.
N1548A	-42 ± 1 (5)	-3.9 ± 0.1	0.4 ± 0.3	-400 ± 300	-80 ± 1 (4)	-6.0 ± 0.2*	3.4 ± 0.2 (5)	9.5 ± 0.8 **	3 ± 1 (5)
N1548G	-40.2 ± 0.9 (8)	-3.9 ± 0.2	0.4 ± 0.4	-400 ± 100	-66 ± 2 (8)	-8.1 ± 0.4	2.6 ± 0.2 (8) **	6.8 ± 0.8 **	2.9 ± 0.5** (10)
M1549A	-42 ± 2 (7)	-3.1 ± 0.2*	1.2 ± 0.4	-400 ± 100	-68 ± 2 (4)	-6.2 ± 0.4	6.3 ± 0.5** (7)	29 ± 2 **	11 ± 3 (5)
N1853A	-37 ± 1 (5)	-3.2 ± 0.3*	1.1 ± 0.5	-400 ± 200	n.d.	n.d.	5.0 ± 0.3** (5)	14.1 ± 0.3 **	n.d.
N1853G	-37 ± 3 (5)	-2.2 ± 0.3**	2.1 ± 0.5	-500 ± 200	n.d.	n.d.	3.4 ± 0.2 (5)	11.6 ± 0.5	n.d.

TABLE I. Biophysical parameters of Ca_v3.2 wild-type and S6 mutant channels were estimated from recordings obtained with the cut-open oocyte technique in the presence of 10 mM Ba²⁺. Activation properties ($E_{0.5,act}$ and z) were estimated from the mean I-V relationships and fitted to a Boltzmann equation where z is the slope factor. Activation and inactivation energies were calculated as follows: $\Delta G_{act} = z F E_{0.5,act}$; $\Delta \Delta G_{act} = \Delta G_{act,mut} - \Delta G_{act,wt}$; $\Delta G_{inact} = z F E_{0.5,inact}$; and $\Delta \Delta G_{inact} = \Delta G_{inact,mut} - \Delta G_{inact,wt}$. The voltage-dependence of inactivation was determined from the peak currents after 2 s depolarizing pulses from a holding potential of -120 mV. The data are shown with the mean ± S.E.M. of the individual experiments and the number of experiments appears in parentheses. n.a. not applicable. n.d.: not determined; * $p < 0.01$ **; $p < 0.001$ as compared with Ca_v3.2 WT.

	$E_{0.5.act}$ (mV)	ΔG_{act} (kcal mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G_{act}$ (kcal mol ⁻¹)	I_{peak} (nA)	$E_{0.5.inact}$ (mV)	ΔG_{inact} (kcal mol ⁻¹)	τ_{act} -20 mV (ms)	τ_{inact} -20 mV (ms)	$Deact$ -50mV (ms)
Ca_v3.2 WT	-47 ± 1 (37)	-4.3 ± 0.2	n.a.	-1300 ± 200	-65 ± 1 (10)	-8.6 ± 0.5	3.2 ± 0.1 (18)	11.6 ± 0.2	8.4 ± 0.6 (9)
L901G	-44 ± 1 (4)	-3.5 ± 0.2	0.8 ± 0.4	-260 ± 30	n.d.	n.d.	5.7 ± 0.2 ** (4)	25.7 ± 0.4 **	n.d.
R902G	-47.9 ± 0.5 (5)	-4.9 ± 0.5	-0.6 ± 0.7	-500 ± 100	-71 ± 1 (3)	-5.8 ± 0.5	5.6 ± 0.4 ** (5)	29 ± 3 **	16 ± 3 * (5)
R903G	-41 ± 1 (5)	-4.0 ± 0.5	0.3 ± 0.7	-180 ± 30	-60 ± 2 (4)	-6.2 ± 0.7	2.8 ± 0.2 (5)	10.6 ± 0.4	5.3 ± 0.7 (4)
Q904G	-54.6 ± 0.8 (7)	-5.3 ± 0.3	-1.0 ± 0.6	-230 ± 20	-74 ± 2 (6)	-6.7 ± 0.4	5.5 ± 0.2 ** (7)	46 ± 2 **	19 ± 1 ** (4)
L905G	-51 ± 1 (5)	-5.5 ± 0.4*	-1.2 ± 0.5	-500 ± 100	-70 ± 2 (4)	-7.7 ± 0.7	2.8 ± 0.2 (5)	13 ± 0.7	5 ± 1 * (5)
V906G	-43 ± 2 (5)	-4.2 ± 0.6	0.1 ± 0.6	-120 ± 20	-68 ± 4 (5)	-5.4 ± 0.4*	4.0 ± 0.6 (5)	14.1 ± 0.6**	3.4 ± 0.6 ** (5)
V907A	-41 ± 1 (6)	-4.8 ± 0.3	-0.5 ± 0.5	-240 ± 70	-74.2 ± 0.9 (5)	-7.2 ± 0.4	2.6 ± 0.3 (6)	11.9 ± 0.3	2.8 ± 0.5 ** (6)
V907G	-54 ± 1 (11)	-7.6 ± 0.6**	-3.3 ± 0.8	-310 ± 80	-74.6 ± 0.9 (9)	-7.7 ± 0.1	3.2 ± 0.2 (11)	11.1 ± 0.4	3.8 ± 0.6 ** (11)
L908A	-41 ± 1 (5)	-4.8 ± 0.4	-0.5 ± 0.6	-240 ± 70	-63.0 ± 0.8 (6)	-9.1 ± 0.8	2.7 ± 0.4 (5)	14.0 ± 0.9 *	7 ± 1 (7)
L908G	-51 ± 2 (11)	-4.9 ± 0.3	-0.6 ± 0.5	-800 ± 200	-73 ± 2 (9)	-7.4 ± 0.4	2.6 ± 0.1 (6)	12.5 ± 0.3	8 ± 2 (5)
V909G	-41 ± 1 (5)	-4.2 ± 0.4	0.1 ± 0.6	-200 ± 50	-62 ± 1 (4)	-7.6 ± 0.3	5.0 ± 0.2 (5)**	11.9 ± 0.9	6 ± 1 (5)
K910G	-36.9 ± 0.6 (5)	-3.0 ± 0.2*	1.3 ± 0.4	-290 ± 80	-68 ± 2 (6)	-6.9 ± 0.4	3.8 ± 0.3 (5)	13.7 ± 0.6**	4.0 ± 0.7 * (6)
T911A	-45 ± 2 (6)	-3.5 ± 0.3	0.8 ± 0.5	-290 ± 50	n.d.	n.d.	7.4 ± 0.4 ** (7)	77 ± 4 **	n.d.
T911G	-52 ± 1 (11)	-4.3 ± 0.2	0.0 ± 0.4	-200 ± 30	-62 ± 2 (5)	-8.5 ± 0.6	4.2 ± 0.3 * (11)	39 ± 5**	10 ± 1 (5)
M912G	-44 ± 1 (4)	-4.7 ± 0.5	-0.4 ± 0.7	-400 ± 300	-69.1 ± 0.7 (5)	-10 ± 1	2.7 ± 0.3 (5)	11.8 ± 0.8	8 ± 2 (5)
D913G	-47 ± 2 (6)	-4.9 ± 0.5	-0.6 ± 0.7	-1700 ± 400	-66 ± 2 (6)	-8.4 ± 0.4	3.2 ± 0.3 (6)	10.0 ± 0.3*	6.7 ± 0.4 (6)
N914A	-35 ± 2 (5)	-3.0 ± 0.4*	1.3 ± 0.6	-500 ± 100	-63 ± 2 (4)	-8.0 ± 0.3	4.5 ± 0.2 ** (5)	14 ± 1 *	6 ± 1 (5)
N914G	-38 ± 2 (8)	-3.2 ± 0.4 *	1.1 ± 0.6	-300 ± 70	-62.0 ± 0.6 (5)	-6.9 ± 0.5	3.4 ± 0.4 (8)	13.0 ± 0.7	6 ± 2 (5)

TABLE II. Biophysical parameters of Ca_v3.2 wild-type and S4S5 mutant channels from Domain II (IIS4S5) were estimated from recordings obtained with the cut-open oocyte technique in the presence of 10 mM Ba²⁺. Activation properties ($E_{0.5,act}$ and z) were estimated from the mean I-V relationships and fitted to a Boltzmann equation where z is the slope factor. Activation and inactivation energies were calculated as follows: $\Delta G_{act} = z F E_{0.5,act}$; $\Delta\Delta G_{act} = \Delta G_{act,mut} - \Delta G_{act,wt}$; $\Delta G_{inact} = z F E_{0.5,inact}$; and $\Delta\Delta G_{inact} = \Delta G_{inact,mut} - \Delta G_{inact,wt}$. The voltage-dependence of inactivation was determined from the peak currents after 2 s depolarizing pulses from a holding potential of -120 mV. The data are shown with the mean \pm S.E.M. of the individual experiments and the number of experiments appears in parentheses. n.a.: not applicable, .n.d.: not determined. * $p < 0.01$ **; $p < 0.001$ as compared with Ca_v3.2 WT.

	$V_{0.5, act}$ (mV)	ΔG_{act} (kcal mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G_{act}$ (kcal mol ⁻¹)	I_{peak} (nA)	$V_{0.5, inact}$ (mV)	ΔG_{inact} (kcal mol ⁻¹)	τ_{act} -20 mV (ms)	τ_{inact} -20 mV (ms)	$\Delta\Delta G_{interact}$ (act) (kcal mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G_{interact}$ (inact) (kcal mol ⁻¹)
Ca_v3.2 WT	-47 ± 1 (37)	-4.3 ± 0.2	n.a.	-1300 ± 200	-65 ± 1 (10)	-8.6 ± 0.5	3.2 ± 0.1 (18)	11.6 ± 0.2	n.a.	n.a.
V906G/I1013G	-54 ± 2 (5)	-6.1 ± 0.7**	-1.8 ± 0.9	-300 ± 100	-69.1 ± 0.6 (4)	-7.9 ± 0.6	4.2 ± 0.3*(5)	48 ± 2 **	-0.8 ± 1.8	-2.1 ± 2.5
V907G/I1013G	-54 ± 1 (6)	-4.3 ± 0.2	0.0 ± 0.4	-190 ± 40	-78.2 ± 0.2 (3)	-7.8 ± 0.5	2.9 ± 0.3 (6)	40 ± 1 **	4.4 ± 1.3	0.3 ± 2.1
L908G/N1008G	-50 ± 3 (5)	-5.0 ± 0.7	-0.7 ± 0.9	-80 ± 20	-76 ± 1 (4)	-6.9 ± 0.3	2.8 ± 0.3 (5)	11 ± 1	-1.3 ± 1.9	-0.5 ± 1.9
L908A/I1013A	-52 ± 1 (5)	-5.4 ± 0.3	-1.1 ± 0.5	-160 ± 40	-67 ± 1 (5)	-5.8 ± 0.6 *	3.4 ± 0.3 (5)	72 ± 2 **	-1.3 ± 1.2	2.4 ± 2.5
L908G/I1013G	-48 ± 1 (6)	-3.9 ± 0.3	0.4 ± 0.5	-120 ± 20	-72 ± 1 (4)	-7.2 ± 0.4	3.7 ± 0.5 (6)	25.0 ± 0.8 **	2.1 ± 1.1	0.6 ± 2.5
V909G/I1013G	-48 ± 1 (4)	-4.9 ± 0.9	-0.6 ± 1.1	-170 ± 40	-65 ± 2 (3)	-6.9 ± 0.8	5.0 ± 0.5**(4)	53 ± 3 **	0.4 ± 1.8	1.1 ± 2.6
K910G/I1013G	-46.7 ± 0.6 (5)	-3.9 ± 0.2	0.4 ± 0.4	-150 ± 30	-65 ± 1 (4)	-6.2 ± 0.2	3.6 ± 0.2 (5)	47 ± 4 **	0.2 ± 0.9	1.1 ± 2.3
T911A/I1013A	-46 ± 2 (6)	-4.4 ± 0.4	-0.1 ± 0.6	-340 ± 80	-60.5 ± 0.8 (6)	-6.9 ± 0.5	6.1 ± 0.5**(6)	71 ± 5 **	-1.6 ± 1.2	n.d.
T911G/I1013G	-43.4 ± 0.8 (6)	-3.6 ± 0.2	0.7 ± 0.4	-260 ± 30	-66 ± 1 (6)	-6.0 ± 0.5*	6.7 ± 0.5**(6)	41 ± 2 **	1.8 ± 0.9	2.9 ± 2.6
T911G/L1014G	-47 ± 2 (6)	-3.8 ± 0.4	0.5 ± 0.6	-200 ± 100	-75 ± 1 (4)	-8 ± 1	8 ± 1 ** (6)	26 ± 1**	-0.8 ± 1	1.8 ± 2.8
M912G/I1013G	-48.6 ± 0.7 (6)	-4.7 ± 0.1	-0.4 ± 0.3	-180 ± 60	-68 ± 1 (6)	-7.5 ± 0.4	5.0 ± 0.6**(6)	42 ± 1**	1.1 ± 1.1	2.3 ± 2.8
N914G/E1016G	-36.5 ± 0.9 (6)	-2.8 ± 0.2 **	1.5 ± 0.4	-90 ± 10	-61.0 ± 0.7 (6)	-7.0 ± 0.4	3.9 ± 0.2 * (6)	15.0 ± 0.3**	-0.8 ± 1.2	n.d.
V915G/L1010G	-27 ± 3 (6)	-1.6 ± 0.3 **	2.7 ± 0.5	-110 ± 30	-58 ± 1 (3)	-8.6 ± 0.6	5.1 ± 0.6**(6)	14.9 ± 0.9**	-0.3 ± 0.6	n.d.
V907A/N1548A	-43 ± 3 (4)	-3.4 ± 0.6	0.9 ± 0.8	-50 ± 10	-90 ± 2 (2)	-6 ± 2	3.1 ± 0.2 (4)	12 ± 2	1 ± 1.2	-1.4 ± 3.1
V907G/N1548G	-47 ± 1 (10)	-3.8 ± 0.2	0.5 ± 0.4	-110 ± 17	-82 ± 2 (6)	-5.7 ± 0.6*	2.6 ± 0.1 (10)	15 ± 1**	3.4 ± 1.2	1.6 ± 1.6

L908A/N1548A	-39 ± 2 (6)	-3.6 ± 0.3	0.7 ± 0.5	-180 ± 30	-74.6 ± 0.9 (6)	-7.3 ± 0.2	4.0 ± 0.3 * (6)	9.9 ± 0.3 **	0.8 ± 1.0	-0.8 ± 1.7
L908G/N1548G	-35 ± 1 (11)	-3.3 ± 0.4 *	1.0 ± 0.6	-220 ± 60	-74 ± 1 (9)	-7.2 ± 0.5	3.5 ± 0.2 (11)	16.5 ± 0.4 **	1.2 ± 1.1	-0.3 ± 2.0
T911A/N1548A	-36 ± 2 (7)	-2.9 ± 0.4**	1.4 ± 0.6	-240 ± 70	-73 ± 2 (6)	-8.4 ± 0.5	4.0 ± 0.2*(7)	10.0 ± 0.7 *	0.2 ± 1.0	n.d.
T911G/N1548G	-37 ± 2 (7)	-2.6 ± 0.2**	1.7 ± 0.4	-100 ± 20	-74 ± 2 (4)	-7.6 ± 0.4	3.4 ± 0.4 (7)	13 ± 1	1.3 ± 0.8	0.4 ± 1.9
L908G/N1853G	-43.4 ± 0.9 (9)	-3.8 ± 0.2	0.5 ± 0.4	-180 ± 30	-70 ± 2 (5)	-7.9 ± 0.6	3.5 ± 0.2 (9)	17.2 ± 0.4**	-1 ± 1	n.d.

TABLE III. Biophysical parameters of Ca_v3.2 wild-type and double mutant channels were estimated from recordings obtained with the cut-open oocyte technique in the presence of 10 mM Ba²⁺. Double mutants are shown with the IIS4S5 mutant always to the left of the pair. Most double mutants were made between IIS4S5 and IIS6. Double mutants with N1548 in IIS6 and N1853 in IVS6 are shown below and are separated by a double line. Activation properties ($E_{0.5,act}$ and z) were estimated from the mean I-V relationships and fitted to a Boltzmann equation where z is the slope factor. Activation and inactivation energies were calculated as follows: $\Delta G_{act} = z F E_{0.5,act}$; $\Delta\Delta G_{act} = \Delta G_{act,mut} - \Delta G_{act,wt}$; $\Delta G_{inact} = z F E_{0.5,inact}$; and $\Delta\Delta G_{inact} = \Delta G_{inact,mut} - \Delta G_{inact,wt}$. The voltage-dependence of inactivation was determined from the peak currents after 2 s depolarizing pulses from a holding potential of -120 mV. The data are shown with the mean ± S.E.M. of the individual experiments and the number of experiments appears in parentheses. n.d.: not determined. * $p < 0.01$ **; $p < 0.001$ as compared with Ca_v3.2 WT.

4. DISCUSSION

4.1. Limites du projet

Pour étudier le couplage entre les domaines du canal $Ca_v3.2$ plusieurs techniques ont été utilisées et chaque technique possède ses propres limites et contraintes.

4.1.1. Limites des modèles

Les modèles ont été faits à partir de la structure à haute résolution du canal Na_vAb avec une résolution de 2,7 Å et du canal Na_vRh avec une résolution de 3.05 Å. Avec de telles résolutions, la marche d'erreur de l'emplacement des chaînes latérales des résidus reste assez élevée pour ces deux canaux. De plus, l'alignement des séquences des différents domaines de $Ca_v3.2$ avec les séquences des canaux sodiques possède plusieurs « GAP », ce qui veut dire qu'il n'y a pas le même nombre d'acides aminés. Surtout pour le domaine I du canal $Ca_v3.2$, qui possède une très longue boucle extracellulaire d'une centaine d'acides aminés entre l'hélice S5 et S6 qui diminue grandement la fiabilité du modèle pour ce domaine. Les autres domaines possèdent un nombre de « GAP » plus restreint, le modèle est plus fiable pour ces domaines. Avec les résolutions importantes des structures des canaux sodiques et le nombre de « GAP » dans l'alignement des séquences, on obtient un modèle pour le canal $Ca_v3.2$ possédant des limites non-négligeables. L'emplacement des résidus et de leurs chaînes latérales peut varier de la réalité. Les modèles ont donc servi de guide afin d'orienter nos recherches et d'identifier les résidus qui pourraient interagir ensemble, pour ensuite tester le couplage à l'aide de techniques d'électrophysiologie.

Les deux structures à haute résolution des canaux Na_v sont dans un état pré-ouvert. Ce qui veut dire que les senseurs au voltage sont activés, mais que les hélices du pore, les S6, sont fermées. Il aurait été intéressant de

comparer cet état pré-ouvert avec un autre état soit fermé ou mieux encore ouvert. Dans un état où le canal est complètement activé, les parties distales des hélices S6 devraient être plus près du S4S5, si le couplage est effectivement durant l'activation du canal.

4.1.2. Appareillage de COVC

4.1.2.1. Avantages du COVC

L'appareillage de COVC a beaucoup d'avantages sur celui du double-électrode (two-electrode voltage clamp (TEVC)). En COVC, on obtient une résolution temporelle dans la première milliseconde (0,2 à 0,3 ms). Tandis que la résolution en TEVC est un peu plus lente (2 à 3 ms). Étant donné que le canal $Ca_v3.2$ s'active rapidement, il est donc intéressant d'avoir la meilleure résolution temporelle possible.

Les courants capacitifs sont aussi moins grands en COVC qu'en TEVC. Car en COVC, les courants sont calculés seulement sur une portion de l'ovocyte (environ le 1/10), tandis qu'en TEVC les courants sont calculés à partir de l'ovocyte complet. Ce qui a pour avantage, de faciliter la mesure des courants de « gate ». Car, en ayant moins de courant capacitif, il est possible d'éliminer grandement ou complètement les courants capacitifs qui normalement sont superposés au courant de « gate ». Le courant capacitif peut être éliminé de deux façons, soit sur le logiciel grâce à la commande « leak subtraction » qui a été la façon utilisée ou bien encore manuellement sur l'amplificateur du COVC.

Un autre avantage avec l'appareillage de COVC, est qu'on peut contrôler la solution interne. Dans le cas du canal $Ca_v3.2$, pour éliminer les courants Cl^- endogènes, il suffit d'ajouter un chélateur de calcium (EGTA) dans la solution interne. Ces canaux Cl^- sont activés pour les ions Ca^{2+} intracellulaires. Avec l'appareillage de TEVC, on doit injecter préalablement directement dans

l'ovocyte de l'EGTA, environ 30 minutes avant les manipulations, afin d'enrayer ces courants endogènes. Donc en contrôlant, le milieu intracellulaire on évite une injection qui pourrait esquinter les ovocytes.

4.1.2.2. Limites et contraintes du COVC

Bien que le COVC comporte quelques avantages sur le TEVC, ce type d'appareillage possède aussi certaines limites et contraintes. En effet, le fait de travailler seulement sur une portion de l'ovocyte en COVC réduit non seulement le courant capacitif, mais réduit également le courant ionique. Il faut donc laisser un plus grand délai entre l'injection de l'ARNm et les manipulations en COVC pour avoir un courant minimalement mesurable. Ce qui augmente les chances d'avoir des ovocytes en moins bon état. De plus, pour calculer le courant de « gate », il faut une bonne expression du canal, car ce courant est 50 fois moins grand que le courant ionique. Pour le canal K_v de type shaker, ceci n'est pas un problème, car après seulement une journée d'incubation, suite à l'injection d'ARNm, les ovocytes génèrent des courants ioniques au-delà de $1 \mu A$, ce qui est très suffisant pour calculer le courant de « gate ». Par contre, pour le canal $Ca_v3.2$, pour obtenir un courant d'environ $1 \mu A$, l'incubation doit être au minimum trois jours et peut aller jusqu'à sept jours. Nous avons aussi remarqué que les courants ioniques étaient souvent plus petits lors d'injection de canal possédant une double mutation. Il était donc plus difficile d'obtenir les courants de « gate » pour ces canaux. Ceci s'explique peut-être par le fait que ces doubles mutations engendreraient un plus grand pourcentage de protéines mal-repliées, donc moins de protéines à la membrane et moins de protéines fonctionnelles.

Malgré que nous puissions contrôler le milieu interne, nous avons quand même eu quelquefois des contaminations par les courants Cl^- entrants. L'injection directement d'EGTA dans les ovocytes aurait peut-être réglé le problème, mais les ovocytes en COVC subissent une pression provoquée

par la chambre supérieure. Cette pression, suite à une injection récente, aurait probablement détruit l'ovocyte. Les contaminations par les courants Cl^- étaient surtout présentes lorsqu'on utilisait le « online leak subtraction » ce qui permet de réduire la capacitance et le courant de fuite durant l'enregistrement des courants ioniques. Le « online leak subtraction » soustrait le courant de fuites et capacitif suite à plusieurs pulses à des potentiels très dépolarisants (-120 mV), un potentiel où normalement il n'y a pas de courant ionique. Mais, ces canaux Cl^- semblent être activés à ces voltages ce qui provoque des tracés pour les courants Ca^{2+} complètement aberrants. Pour éviter ce problème, nous avons enlevé le courant de fuites, suite à l'obtention des résultats bruts, ce qu'on nomme le « offline leak subtraction ».

La technique de COVC exige aussi de travailler avec les ovocytes de *Xenopus leavis*. Les ovocytes sont de grosses cellules faciles à manipuler. Ce système d'expression est très souvent utilisé pour étudier les protéines membranaires. Les ovocytes sont des candidats idéals pour la technique de VCF dû à leur grosseur et la présence d'un pôle foncé qui permet la détection de la fluorescence émise. Pour le COVC, on doit utiliser des ovocytes assez gros, sinon on ne peut pas appliquer une assez grande pression sur l'ovocyte pour permettre une séparation de l'ovocyte en trois chambres distinctes. Si la pression n'est pas suffisante les courants de fuites sont alors trop grands pour l'étude des courants ioniques. Ils doivent être aussi résistants et assez élastiques pour résister justement à cette pression émise sur l'ovocyte. De plus pour le VCF, le pôle animal, le pôle qui est plus foncé, doit être très foncé sinon il est très difficile de détecter la fluorescence émise par les sondes. Les ovocytes sont incubés dans une solution contenant des ions Ca^{2+} et possèdent un potentiel de repos d'environ -30 mV, donc suite à l'injection des ARNm codant pour le canal $\text{Ca}_v3.2$, il peut y avoir une entrée d'ions Ca^{2+} , les ions Ca^{2+} sont des messagers seconds importants qui peuvent aboutir aux déclenchements de plusieurs mécanismes dont

l'apoptose. Il y a aussi une grande variation expérimentale entre les ovocytes. On pensait qu'en utilisant un appareillage de COVC, on réduirait cette variation due aux avantages de cette technique, mais il s'est avéré que la variation était la même qu'en TEVC et peut-être même un peu plus grande. De plus, les ovocytes ne sont pas un système d'expression humain. Les canaux réagissent peut-être de façons différentes lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules humaines.

Pour éviter plusieurs des problèmes obtenus en COVC, on aurait pu mesurer les propriétés biophysiques à l'aide d'un appareillage de « Patch clamp ». Premièrement, avec cet appareil, on peut travailler avec des cellules humaines, donc un système d'expression plus près physiologiquement de l'humain que les ovocytes de xénope. La résolution temporelle permet une étude de l'activation du canal $Ca_v3.2$ très satisfaisante. Il n'y a peu ou pas de courant endogène Cl^- . Avec l'appareillage du « Patch clamp » on peut réduire de façon manuelle le courant de fuites directement sur l'ampli à l'aide d'un oscilloscope durant l'enregistrement des courants. La variation expérimentale semble moins grande avec cette technique, car nous travaillons avec des lignées cellulaires, donc toutes les cellules sont supposées avoir le même génotype. Nous n'avons pas utilisé cette méthode, car nous voulions initialement faire du VFC. La technique de VCF se fait uniquement avec l'appareillage de COVC. Nous avons donc déjà plusieurs résultats accumulés et nous avons toujours espoir de faire du VCF avec le canal $Ca_v3.2$. Toutefois, la technique de COVC, reste une très bonne méthode pour étudier les propriétés biophysiques du canal calcique $Ca_v3.2$.

4.1.3. Limites de l'analyse cyclique de doubles mutants

Les ΔG_{act} et les $\Delta\Delta G_{interact}$ obtenues avec les mutants en glycine du canal $Ca_v3.2$ sont significativement inférieures à celles estimées entre le L596G du

IIS4S5 et le I701G du IIS6 pour le canal $\text{Ca}_v2.3$. La structure du canal $\text{Ca}_v3.2$ semble donc optimisée pour ouvrir suite à de petites dépolarisations, ce qui expliquerait les petites valeurs obtenues pour les ΔG_{act} et les $\Delta\Delta G_{\text{interact}}$. Donc, le couplage entre les résidus est plus difficile à déterminer pour ce canal avec cette méthode. De plus, dû à la grande variation expérimentale des ΔG_{act} , la marche d'erreur pour les valeurs $\Delta\Delta G_{\text{interact}}$ est grande, car cette valeur est obtenue par quatre valeurs de ΔG_{act} indépendantes l'une de l'autre. Certaines expériences semblent aussi démontrer qu'un petit $\Delta\Delta G_{\text{interact}}$ ne veut pas nécessairement dire qu'il n'y a pas de couplage. En effet, une étude d'analyse cyclique de doubles mutants sur les résidus du canal $\text{Ca}_v1.2$ prédits comme étant alignés aux résidus L596 et I701 du canal $\text{Ca}_v2.3$, ne démontre aucune énergie de couplage significatif, en défaut d'une grande homologie structurale et fonctionnelle entre ces deux canaux. L'ensemble de ces éléments pourrait expliquer pourquoi il n'y a pas de couplage mécanique lorsque les résidus sont mutés en Ala. Malgré ces limitations, l'analyse cyclique de doubles mutants reste une très bonne méthode pour étudier le couplage entre différentes régions.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons étudié les mécanismes d'activation du canal calcique $Ca_v3.2$ grâce à des mutations et des modèles tridimensionnels. Les plus grandes modulations de l'énergie d'activation ont été obtenues suite à des mutations ponctuelles sur la boucle S4S5 et sur les résidus distaux du domaine II. Ce qui correspond aux résultats publiés sur le canal $Ca_v2.3$. Les canaux Ca_v sont asymétriques, il semble donc normal que la contribution de chaque domaine dans l'activation soit différente.

Suite à une analyse cyclique de doubles mutants en Gly, nos résultats suggèrent un couplage mécanique entre la boucle S4S5 et les résidus distaux de l'hélice S6 dans le domaine II. Ce mécanisme d'activation est aussi présent dans le canal HVA $Ca_v2.3$. Cependant, les énergies d'interactions sont moins grandes pour le canal $Ca_v3.2$ étant donné que ce canal nécessite de moins grandes énergies pour s'activer.

Comme semblait le suggérer les structures à haute résolution des canaux Na_v , l'analyse cyclique de doubles mutants en Gly, semble révéler un couplage entre deux domaines durant l'activation du canal $Ca_v3.2$, soit le résidu V907 segment S4S5 du domaine II et le N1548 de l'hélice S6 du domaine III. Ceci est la première fois qu'un phénomène de couplage entre deux domaines dans un canal dépendant du voltage est démontré de façon expérimentale.

Les grandes énergies d'interaction entre les résidus du S4S5 du domaine II et des S6 des domaines II et III mesurées, suite à des mutations en Gly, suggèrent de fortes interactions de van der Waals entre les résidus. De plus, la présence de ces interactions entre le S4S5 du domaine II et le S6 du domaine III suggère que l'activation du canal $Ca_v3.2$ se fait de concert aux travers les quatre senseurs aux voltages, plutôt que des déplacements individuels et aléatoires de chaque S4.

Il y a plusieurs perspectives de recherche suite aux résultats obtenus. Entre autres, de voir les effets que produisent les mutations en Gly sur le mouvement des hélices S4 grâce aux techniques de fluorimétrie en voltage imposé (VCF). De plus, il serait intéressant de détecter la présence de couplage mécanique entre les autres domaines (exemple : entre les domaines III et IV, I et IV, I et II). Les résidus Asp dans le IIS6 qui est couplé avec le S4S5 du domaine II sont fortement conservés dans tous les canaux Ca_v et Na_v . Ce phénomène peut donc être présent dans les autres domaines et dans d'autres canaux.

La structure des canaux LVA a été très peu étudiée. Il pourrait être intéressant d'étudier le rôle de la grande boucle extracellulaire dans le segment S5S6 du domaine I de ces canaux et d'approfondir les recherches sur la région « gating brake » située dans la boucle intracellulaire qui relie le domaine I au domaine II. Cette région, en plus d'être située au même endroit que la région AID des canaux HVA, semble aussi avoir des effets homologues, comme dans le cas de l'adressage membranaire.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Allen T.G. and D.A. Brown (1993).** M2 muscarinic receptor-mediated inhibition of the Ca²⁺ current in rat magnocellular cholinergic basal forebrain neurones. *J Physiol* 466:173-189.
- Amaral C., V. Carnevale, M.L. Klein and W. Treptow (2012).** Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations. *PNAS* 109: 21336-21341.
- Arias-Olguin I.I., I. Vitko, M. Fortuna, J.P. Baumgart, S. Sokolova, I.A. Shumilin, A. Van Deusen, M. Soriano-Garcia, J.C. Gomora and E. Perez-Reyes (2008).** Characterization of the gating brake in the I-II loop of Ca(v)3.2 T-type Ca(2+) channels. *J Biol Chem* 283(13):8136-8144.
- Arikkath, J. and K. P. Campbell (2003).** Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13(3): 298-307.
- Armstrong, C. M. (1966).** Time course of TEA(+)-induced anomalous rectification in squid giant axons. *J Gen Physiol* 50(2): 491-503.
- Autret L., I. Mechaly, F.d.r. Scamps, J. Valmier, P. Lory and G. Desmadryl (2005).** The involvement of Cav3.2/alpha1H T-type calcium channels in excitability of mouse embryonic primary vestibular neurons. *J Physiol* 567: 67-78.
- Batulan Z., G.A. Haddad and R. Blunck (2010).** An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K⁺ channels. *J Biol Chem* 285: 14005-14019.
- Baumgart J.P., I. Vitko, I. Bidaud, A. Kondratskyi, P. Lory and E. Perez-Reyes (2008).** I-II loop structural determinants in the gating and surface expression of low voltage-activated calcium channels. *PLoS one* 3(8):e2976.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003).** Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 517-529.

- Berridge, M. J., P. Lipp and M. Bootman (1999).** Calcium signalling. *Curr Biol* 9(5): R157-159.
- Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000).** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 11-21.
- Berrou L., G. Bernatchez and L. Parent (2001).** Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of alpha1E (CaV2.3) Ca²⁺ channels. *Biophys J* 80: 215-228.
- Berrou L., Y. Dodier, A. Raybaud, A. Tousignant, O. Dafi, J.N. Pelletier and L. Parent (2005).** The C-terminal residues in the alpha-interacting domain (AID) helix anchor CaV beta subunit interaction and modulation of CaV2.3 channels. *J Biol Chem* 280: 494-505.
- Beyl S., K. Depil, A. Hohaus, A. Stary-Weinzinger, T. Linder, E. Timin and S. Hering (2012).** Neutralisation of a single voltage sensor affects gating determinants in all four pore-forming S6 segments of CaV1.2: a cooperative gating model. *Eur J Physiol* 464: 391-401.
- Bezanilla, F. (2000).** The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 80(2): 555-592.
- Bezanilla, F. (2002).** Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 120(4): 465-473.
- Bezanilla, F. and E. Stefani (1998).** Gating Currents. *Methods Enzymol* 293: 331-352.
- Bichet, D., V. Cornet, S. Geib, E. Carlier, S. Volsen, T. Hoshi, Y. Mori and M. De Waard (2000).** The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25(1): 177-190.
- Biel M., P. Ruth, E. Bosse, R. Hullin, W. Stuhmer, V. Flockerzi and F. Hofmann (1990).** Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett* 269(2):409-412.
- Birnbaumer L., K.P. Campbell, W.A. Catterall, M.M. Harpold, F. Hofmann, W.A. Horne, Y. Mori, A Schwartz, T.P. Snutch and T. Tanabe (1994).** The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 13: 505-506.

- Blunck R. and Z. Batulan (2012).** Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Frontiers in Pharmacology* 3.
- Boitano, S., E. R. Dirksen and M. J. Sanderson (1992).** Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* 258(5080): 292-295.
- Brice, N. L., N. S. Berrow, V. Campbell, K. M. Page, K. Brickley, I. Tedder and A. C. Dolphin (1997).** Importance of the different beta subunits in the membrane expression of the alpha1A and alpha2 calcium channel subunits: studies using a depolarization-sensitive alpha1A antibody. *Eur J Neurosci* 9(4): 749-759.
- Bosse E., S. Regulla, M. Biel, P. Ruth, H.E. Meyer, V. Flockerzi, and F. Hofmann (1990).** The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 267(1):153-156.
- Bourdin, B., F. Marger, S. Wall-Lacelle, T. Schneider, H. Klein, R. Sauve and L. Parent (2010).** Molecular determinants of the CaVbeta induced plasma membrane targeting of the CaV1.2 channel." *J Biol Chem* 285(30): 22853-22863.
- Cao Y. Q. and R.W. Tsien (2005).** Effects of familial hemiplegic migraine type 1 mutations on neuronal P/Q-type Ca²⁺ channel activity and inhibitory synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 102: 2590-2595.
- Carafoli, E., L. Santella, D. Branca and M. Brini (2001).** Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36(2): 107-260.
- Carbone E., A. Giaccipoli, A. Marcantoni, D. Guido and V. Carabelli (2006).** A new role for T-type channels in fast low-threshold exocytosis. *Cell Calcium* 40: 147-154.
- Carbone E. and D. Swandulla (1989).** Neuronal calcium channels: kinetics, blockade and modulation. *Prog Biophys Mol Biol* 54(1):31-58.
- Carbone, E. and H. D. Lux (1984).** A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310(5977): 501-502.

- Carl S. L., K. Felix, A.H. Caswell, N.R. Brandt, W.J. Ball, W, P.L. Jr. Vaghy, G. Meissner and D.G. Ferguson (1995).** Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J Cell Biol* 129: 673-682.
- Catterall, W. A. (1986).** Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem* 55: 953-985.
- Catterall W. A. (2000).** Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 521-555.
- Catterall W. A. (2010).** Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67: 915-928.
- Catterall, W. A., J. Striessnig, T. P. Snutch and E. Perez-Reyes (2003).** International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* 55(4): 579-581.
- Chen C.C., K.G. Lamping, D.W. Nuno, R. Barresi, S.J. Prouty, J.L. Lavoie, L.L. Cribbs. S.K. England, C.D. Sigmund, R.M. Weiss, R.A. Williamson, J.A. Hill and K.P. Campbell (2003a).** Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels. *Science* 302(5649):1416-1418.
- Chen Y., J. Lu, H. Pan, Y. Zhang, H. Wu, K. Xu, X. Liu, Y Jiang, X. Bao, Z. Yao, K. Ding, W.H. Lo, B. Quiang, P. Chan, Y. Shen and X. Wu (2003b).** Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol* 54(2):239-243.
- Choi, K. L., C. Mossman, J. Aube and G. Yellen (1993).** The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron* 10(3): 533-541.
- Cribbs L.L., J.C. Gomora, A.N. Daud, J.H. Lee and E. Perez-Reyes (2000).** Molecular cloning and functional expression of CaV3.1, a T-type calcium channel from human brain. *FEBS Lett* 466(1):54-58.
- Cribbs L.L., J.H. Lee, J. Yang, J. Satin, Y. Zhang, A. Daud, J. Barclay, M.P. Williamson, M. Fox, M. Rees and E. Perez-Reyes (1998).** Cloning and Characterization of alpha1H From Human Heart, a Member of the T-Type Ca²⁺ Channel Gene Family. *Circ Res* 83(1):103-109.

- Curtis, B. M. and W. A. Catterall (1984).** Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23(10): 2113-2118.
- Curtis, B. M. and W. A. Catterall (1986).** Reconstitution of the voltage sensitive calcium channel purified from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 25(11): 3077-3083.
- Dai S., D.D. Hall and J.W. Hell (2009).** Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev* 89: 411-452.
- Dolphin, A. C. (2009).** Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol* 19: 237-244.
- Dong, Z., P. Saikumar, J. M. Weinberg and M. A. Venkatachalam (2006).** Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol* 1: 405-434.
- Dostal, D. E. and K. M. Baker (1998).** Angiotensin and endothelin: messengers that couple ventricular stretch to the Na⁺/H⁺ exchanger and cardiac hypertrophy. *Circ Res* 83(8): 870-873.
- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon (1998).** The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280(5360): 69-77.
- Ertel, E. A., K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien and W. A. Catterall (2000).** Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25(3): 533-535.
- Eswar, N., B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Y. Shen, U. Pieper and A. Sali (2007).** Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 2: Unit 2 9.
- Fatt, P. and B. L. Ginsborg (1958a).** The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. *J Physiol* 142(3): 516-543.

- Fatt, P. and B. L. Ginsborg (1958b)**. The production of regenerative responses in crayfish muscle fibres by the action of calcium, strontium and barium. *J Physiol* 140(2): 59-60P.
- Favre, I., E. Moczydlowski and L. Schild (1996)**. On the structural basis for ionic selectivity among Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the voltage-gated sodium channel. *Biophys J* 71(6): 3110-3125.
- Fiser, A., R. K. Do and A. Sali (2000)**. Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci* 9(9): 1753-1773.
- Gao B., Y. Sekido, A. Maximov, M. Saad, E. Forgacs, F. Latif, M.H. Wei, M. Lerman, E. Perez-Reyes, I. Bezprozvanny and J.D. Minna (2000)**. Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *J Biol Chem* 275(16):12237-12242.
- Gao T., T.S. Puri, B.L. Gerhardstein, A.J. Chien, R.D. Green and M.M. Hosey (1997)**. Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium channels and adenylyl cyclase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 272 : 19401-19407.
- Glauner K.S., L.M. Mannuzzu, C.S. Gandhi and Y.E. Isacoff (1999)**. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* 402(6763):813-817.
- Gurnett C.A., M. De Waard and K.P. Campbell (1996)**. Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16(2):431-440.
- Guy, H. R. and P. Seetharamulu (1986)**. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(2): 508-512.
- Hagiwara N., H. Irisawa and M. Kameyama (1988)**. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 395:233-253.
- Hagiwara, S. and K. I. Naka (1964)**. The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low intracellular Ca²⁺. *J Gen Physiol* 48: 141-162.

- Hagiwara, S., S. Ozawa and O. Sand (1975).** Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 65(5): 617-644.
- Hans M., S. Luvisetto, M.E. Williams, M. Spagnolo, A. Urrutia, A. Tottene, P.F. Brust, E.C. Johnson, M.M. Harpold, K.A. Stauderman and D. Pietrobon (1999).** Functional consequences of mutations in the human alpha1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci* 19: 1610-1619.
- Hansen, J. P., R. S. Chen, J. K. Larsen, P. J. Chu, D. M. Janes, K. E. Weis and P. M. Best (2004).** Calcium channel gamma6 subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current. *J Mol Cell Cardiol* 37(6): 1147-1158.
- Hemara-Wahanui, A., S. Berjukow, C. I. Hope, P. K. Dearden, S. B. Wu, J. Wilson-Wheeler, D. M. Sharp, P. Landon-Treweek, G. M. Clover, J. C. Hoda, J. Striessnig, R. Marksteiner, S. Hering and M. A. Maw (2005).** A CACNA1F mutation identified in an X-linked retinal disorder shifts the voltage dependence of Cav1.4 channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(21): 7553-7558.
- Hering, S., S. Beyl, A. Stary, M. Kudrnac, A. Hohaus, H. R. Guy and E. Timin (2008).** Pore stability and gating in voltage-activated calcium channels. *Channels (Austin)* 2(2).
- Hessa T., H. Kim, K. Bihlmaier, C. Lundin, J. Boekel, H. Andersson, I. Nilsson, S.H. White and G. von Heijne (2005).** Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* 433: 377-381.
- Hille, B. (2001).** *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA.
- Hobom M., S. Dai, E. Marais, L. Lacinova, F. Hofmann and N. Klugbauer (2000).** Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel alpha2delta-2 subunit. *Eur J Neurosci* 12(4):1217-1226.
- Hockerman, G. H., B. Z. Peterson, B. D. Johnson and W. A. Catterall (1997).** Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 361-396.

- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952).** A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117(4): 500-544.
- Hofmann F., L. Lacinova and N. Klugbauer (1999).** Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev physiol, biochem pharmacol* 139:33-87.
- Hohaus, A., S. Beyl, M. Kudrnac, S. Berjukow, E. N. Timin, R. Marksteiner, M. A. Maw and S. Hering (2005).** Structural determinants of L-type channel activation in segment IIS6 revealed by a retinal disorder. *J Biol Chem* 280(46): 38471-38477.
- Horovitz, A. (1996).** Double-mutant cycles: a powerful tool for analyzing protein structure and function. *Fold Des* 1(6): R121-126.
- Huang B., D. Qin, L. Deng, M. Boutjdir M and N. El-Sherif (2000).** Reexpression of T-type Ca²⁺ channel gene and current in post-infarction remodeled rat left ventricle. *Cardiovasc Res* 46(3):442-449
- Islas, L. D. and F. J. Sigworth (1999).** Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels. *J Gen Physiol* 114(5): 723-742.
- Jay, S. D., S. B. Ellis, A. F. McCue, M. E. Williams, T. S. Vedvick, M. M. Harpold and K. P. Campbell (1990).** Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 248(4954): 490-492.
- Karmazinova M., J.P. Baumgart, E. Perez-Reyes and L. Lacinova (2011).** The voltage dependence of gating currents of the neuronal CA(v)3.3 channel is determined by the gating brake in the I-II loop. *Eur J Physiol* 61(4):461-468.
- Karmazinova M., S. Beyl, A. Stary-Weinzinger, C. Suwattanasophon, N. Klugbauer, S. Hering and L. Lacinova (2010).** Cysteines in the loop between IS5 and the pore helix of Cav3.1 are essential for channel gating. *Pflugers Archiv Eur J Physiol* 460: 1015-1028.
- Kass R.S. (1987).** Voltage-dependent modulation of cardiac calcium channel current by optical isomers of Bay K 8644: implications for channel gating. *Circ Res* 61(4 Pt 2):I1-5.

- Kawai F. and E. Miyachi (2001).** Enhancement by T-type Ca²⁺ currents of odor sensitivity in olfactory receptor cells. *J Neurosci* 21(10):RC144.
- Khosravani H. and G.W. Zamponi (2006).** Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Rev* 86(3):941-966.
- Kitchens S.A., J Burch and T.L. Creazzo (2003).** T-type Ca²⁺ current contribution to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in developing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 35(5):515-523.
- Klockner, U., J. H. Lee, L. L. Cribbs, A. Daud, J. Hescheler, A. Pereverzev, E. Perez-Reyes and T. Schneider (1999).** Comparison of the Ca²⁺ currents induced by expression of three cloned alpha1 subunits, alpha1G, alpha1H and alpha1I, of low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels. *Eur J Neurosci* 11(12): 4171-4178.
- Klugbauer, N., L. Lacinova, E. Marais, M. Hobom and F. Hofmann (1999).** Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* 19(2): 684-691.
- Klugbauer N., S. Dai, V. Specht, L. Lacinova, E. Marais, G. Bohn and F. Hofmann (2000).** A family of gamma-like calcium channel subunits. *FEBS Lett* 470(2):189-197.
- Kozlov A.S., F. McKenna, J.H. Lee, L.L. Cribbs, E. Perez-Reyes, A. Feltz and R.C. Lambert (1999).** Distinct kinetics of cloned T-type Ca²⁺ channels lead to differential Ca²⁺ entry and frequency-dependence during mock action potentials. *Eur J Neurosci* 11(12):4149-4158.
- Kraus, R. L., M. J. Sinnegger, H. Glossmann, S. Hering and J. Striessnig (1998).** Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca²⁺ channel kinetics. *J Biol Chem* 273(10): 5586-5590.
- Kudrnac, M., S. Beyl, A. Hohaus, A. Stary, T. Peterbauer, E. Timin and S. Hering (2009).** Coupled and independent contributions of residues in IS6 and IIS6 to activation gating of CaV1.2. *J Biol Chem* 284(18): 12276-12284.
- Kuo C.C. and S. Yang (2001).** Recovery from inactivation of t-type Ca²⁺ channels in rat thalamic neurons. *J Neurosci* 21(6):1884-1892.

- Kurejova M., L. Lacinova, M. Pavlovicova, M. Eschbach and N. Klugbauer (2007).** The effect of the outermost basic residues in the S4 segments of the CaV3.1 T-type calcium channel on channel gating. *Pflugers Arch* 455: 527-539.
- Kusch, J., T. Zimmer, J. Holschuh, C. Biskup, E. Schulz, V. Nache and K. Benndorf (2010).** Role of the S4-S5 Linker in CNG Channel Activation. *Biophys J* 99(8): 2488-2496.
- Labro A. J., I.R. Boulet, F.S. Choveau, E. Mayeur, T. Bruyns, G. Loussouarn, A.L. Raes and D.J. Snyders (2011).** The S4-S5 linker of KCNQ1 channels forms a structural scaffold with the S6 segment controlling gate closure. *J Biol Chem* 286: 717-725.
- Lacinova, L. (2005).** Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1: 1-78.
- Lacinova L. and N. Klugbauer (2004).** Modulation of gating currents of the Ca(v)3.1 calcium channel by alpha 2 delta 2 and gamma 5 subunits. *Arch Biochem Biophys* 425(2):207-213.
- Lacinova L., N. Klugbauer and F. Hofmann (2000).** Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *Gen Physiol Biophys* 19(2):121-136.
- Lacinova, L., N. Klugbauer and F. Hofmann (2002).** Gating of the expressed Cav3.1 calcium channel. *FEBS Lett* 531(2): 235-240.
- Laine M., M.C. Lin, J.P. Bannister, W.R. Silverman, A.F. Mock, B. Roux and D.M. Papazian (2003).** Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels. *Neuron* 39: 467-481.
- Lambert R.C., Y. Maulet, J. Mouton, R. Beattie, S. Volsen, M. De Waard and A. Feltz (1997).** T-type Ca²⁺ current properties are not modified by Ca²⁺ channel beta subunit depletion in nodosus ganglion neurons. *J Neurosci* 17(17):6621-6628.
- Ledwell, J. L. and R. W. Aldrich (1999).** Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J Gen Physiol* 113(3): 389-414.

- Lee J.H., A.N. Daud, L.L. Cribbs, A.E. Lacerda, A. Pereverzev, U. Klockner, T. Schneider and E. Perez-Reyes (1999).** Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19(6):1912-1921.
- Lee S. Y., A. Banerjee and R. MacKinnon (2009).** Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K⁺ channels. *PLoS Biol* 7, e1000047.
- Leuranguer V., A. Monteil, E. Bourinet, G. Dayanithi and J. Nargeot (2000).** T-type calcium currents in rat cardiomyocytes during postnatal development: contribution to hormone secretion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279(5):H2540-2548
- Leuranguer V., E. Bourinet, P. Lory and J. Nargeot (1998).** Antisense depletion of beta-subunits fails to affect T-type calcium channels properties in a neuroblastoma cell line. *Neuropharmacology* 37(6):701-708.
- Liu, Y., M. Holmgren, M. E. Jurman and G. Yellen (1997).** Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron* 19(1): 175-184.
- Llinas, R. and Y. Yarom (1981).** Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol* 315: 549-567.
- Logothetis D.E., S. Movahedi, C. Satler, K. Lindpaintner and B. Nadal-Ginard (1992).** Incremental reductions of positive charge within the S4 region of a voltage-gated K⁺ channel result in corresponding decreases in gating charge. *Neuron* 8(3):531-540.
- Loirand G., C. Mironneau, J. Mironneau and P. Pacaud (1989).** Two types of calcium currents in single smooth muscle cells from rat portal vein. *J Physiol* 412:333-349.
- Long, S. B., E. B. Campbell and R. Mackinnon (2005a).** Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309(5736): 897-903.
- Long, S. B., E. B. Campbell and R. Mackinnon (2005b).** Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309(5736): 903-908.

- Lopez, G. A., Y. N. Jan and L. Y. Jan (1994).** Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K⁺ channel comprises part of the pore. *Nature* 367(6459): 179-182.
- Lu, Z., A. M. Klem and Y. Ramu (2001).** Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413(6858): 809-813.
- Lu, Z., A. M. Klem and Y. Ramu (2002).** Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J Gen Physiol* 120(5): 663-676.
- Marksteiner R., P Schurr, S. Berjukow, E. Margreiter, E. Perez-Reyes and S. Hering (2001).** Inactivation determinants in segment IIIIS6 of Cav3.1. *J Physiol* 537 : 27-34.
- Marks, T. N. and S. W. Jones (1992).** Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line. An allosteric model for calcium channel activation and dihydropyridine agonist action. *J Gen Physiol* 99(3): 367-390.
- Martinez M.L., M.P. Heredia and C. Delgado (1999).** Expression of T-type Ca²⁺ channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 31(9):1617-1625.
- Marti-Renom, M. A., A. C. Stuart, A. Fiser, R. Sanchez, F. Melo and A. Sali (2000).** Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 291-325.
- McCormack, K., M. A. Tanouye, L. E. Iverson, J. W. Lin, M. Ramaswami, T. McCormack, J. T. Campanelli, M. K. Mathew and B. Rudy (1991).** A role for hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of Shaker K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2931-2935.
- McCusker E. C., C. Bagnieris, N.C. Naylor, A.R. Cole, N. D'Avanzo, C.G. Nichols and B.A. Wallace (2012).** Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nat Commun* 3: 1102.
- Mitra, R. and M. Morad (1986).** Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(14): 5340- 5344.

- Mittman S., J. Guo, M.C. Emerick, W.S. Agnew (1999).** Structure and alternative splicing of the gene encoding alpha1I, a human brain T calcium channel alpha1 subunit. *Neurosci Lett* 269(3):121-124.
- Monteil A., J. Chemin, E. Bourinet, G. Mennessier, P. Lory and J. Nargeot (2000a).** Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem* 275(9):6090-60100.
- Monteil A., J. Chemin, V. Leuranguer, C. Altier, G. Mennessier, E. Bourinet, P. Lory and J. Nargeot (2000b).** Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha 1I subunit. *J Biol Chem* 275(22):16530-16535.
- Nelson M.T., S.M. Todorovic and E. Perez-Reyes (2006).** The role of T-type calcium channels in epilepsy and pain. *Curr Pharm Des* 12(18):2189-2197.
- Nilius B., K. Talavera and A. Verkhratsky (2006).** T-type calcium channels: the never ending story. *Cell calcium* 40(2):81-88.
- Nuss H.B. and S.R. Houser (1993).** T-type Ca²⁺ current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ Res* 73(4):777-782.
- Olcese R., A. Neely, N. Qin, X. Wei, L. Birnbaumer and E. Stefani (1996).** Coupling between charge movement and pore opening in vertebrate neuronal alpha 1E calcium channels. *J Physiol* 497: 675-686.
- Pan Z.H., H.J. Hu, P. Perring and R. Andrade (2001).** T-type Ca²⁺ channels mediate neurotransmitter release in retinal bipolar cells. *Neuron* 32(1):89-98.
- Parent, L. and M. Gopalakrishnan (1995).** Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca²⁺ channel. *Biophys J* 69(5): 1801-1813.
- Payandeh, J., T. Scheuer, N. Zheng and W.A. Catterall (2011).** The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475(7356):353-358.

- Payandeh, J., T.M. Gamal El-Din, T. Scheuer, N. Zheng and W.A. Catterall (2012).** Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 486(7401):135-139.
- Perez-Reyes, E. (2003).** Molecular physiology of low-voltage-activated type calcium channels. *Physiol Rev* 83(1): 117-161.
- Perez-Reyes, E., L. L. Cribbs, A. Daud, A. E. Lacerda, J. Barclay, M. P. Williamson, M. Fox, M. Rees and J. H. Lee (1998).** Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391(6670): 896-900.
- Peterson, B. Z., B. D. Johnson, G. H. Hockerman, M. Acheson, T. Scheuer and W. A. Catterall (1997).** Analysis of the dihydropyridine receptor site of L-type calcium channels by alanine-scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 272(30): 18752-18758.
- Peterson B. Z., C.D. DeMaria, J.P. Adelman and D.T. Yue (1999).** Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22: 549-558.
- Qu Y. and M. Boutjdir (2001).** Gene expression of SERCA2a and L- and T-type Ca channels during human heart development. *Pediatr Res* 50(5):569-574.
- Randall, A. and C. D. Benham (1999).** Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Mol Cell Neurosci* 14(4-5): 255-272..
- Ranganathan, R., J. H. Lewis and R. MacKinnon (1996).** Spatial localization of the K⁺ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* 16(1): 131-139.
- Raybaud, A., E. E. Baspinar, F. Dionne, Y. Dodier, R. Sauve and L. Parent (2007).** The role of distal S6 hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of CaV2.3 channels. *J Biol Chem* 282(38): 27944-27952.
- Raybaud, A., Y. Dodier, P. Bissonnette, M. Simoes, D. G. Bichet, R. Sauve and L. Parent (2006).** The role of the GX9GX3G motif in the gating of high voltage-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 281(51): 39424-39436.

- Rousset, M., T. Cens, S. Restituto, C. Barrere, J. L. Black, 3rd, M. W. McEnery and P. Charnet (2001).** Functional roles of gamma2, gamma3 and gamma4, three new Ca²⁺ channel subunits, in P/Q-type Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 532(Pt 3): 583-593.
- Ruta, V., J. Chen and R. MacKinnon (2005).** Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel. *Cell* 123(3): 463-475.
- Sali, A. and T. L. Blundell (1993).** Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234(3): 779-815.
- Sanguinetti, M. C. and Q. P. Xu (1999).** Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 514 (Pt 3): 667-675.
- Serrano J.R., E. Perez-Reyes and S.W. Jones (1999).** State-dependent inactivation of the alpha1G T-type calcium channel. *J Gen Physiol* 114(2):185-201.
- Shakeri B., B. Bourdin, P.O. Demers-Giroux, R. Sauve and L. Parent (2012).** A quartet of leucine residues in the guanylate kinase domain of CaVbeta determines the plasma membrane density of the CaV2.3 channel. *J Biol Chem* 287(39):32835-32847.
- Sharp, A. H., J. L. Black, 3rd, S. J. Dubel, S. Sundarraj, J. P. Shen, A. M. Yunker, T. D. Copeland and M. W. McEnery (2001).** Biochemical and anatomical evidence for specialized voltage-dependent calcium channel gamma isoform expression in the epileptic and ataxic mouse, stargazer. *Neuroscience* 105(3): 599-617.
- Sharp, A. H. and K. P. Campbell (1989).** Characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor using subunit-specific polyclonal antibodies. Evidence for a 32,000-Da subunit. *J Biol Chem* 264(5): 2816-2825.
- Singh B., A. Monteil, I. Bidaud, Y. Sugimoto, T. Suzuki, S. Hamano, H. Oguni, M. Osawa, M.E. Alonso, A.V. Delgado-Escueta, Y. Inoue, N. Yasai Furukori, S. Kaneko, P. Lory and K. Yamakawa (2007).** Mutational analysis of CACNA1G in idiopathic generalized epilepsy. *Hum Mutat* 28(5):524-525.

- Siwek M., C. Henseler, K. Broich, A. Papazoglou and M. Weiergraber (2012).** Voltage-gated Ca²⁺ channel mediated Ca²⁺ influx in epileptogenesis. *Adv Exp Med Biol* 740:1219-1247.
- Snutch T. P. and P.B. Reiner (1992).** Ca channels : diversity of form and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 247-253.
- Staes M, K. Talavera, N. Klugbauer, J. Prenen, L. Lacinova, G. Droogmans, F. Hofmann and B. Nilius (2001).** The amino side of the C-terminus determines fast inactivation of the T-type calcium channel alpha1G. *J Physiol* 530: 35-45.
- Stefani E. and F. Bezanilla (1998).** Cut-open oocyte voltage-clamp technique. *Methods in Enzymology.* 293: 300-318.
- Striessnig, J., K. Moosburger, A. Goll, D. R. Ferry and H. Glossmann (1986).** Stereoselective photoaffinity labelling of the purified 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent calcium channel. *Eur J Biochem* 161(3): 603-609.
- Swartz, K. J. (2004).** Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 5(12): 905-916.
- Swynghedauw B (1999).** Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 79(1):215-262.
- Talavera K and B. Nilius (2006).** Evidence for common structural determinants of activation and inactivation in T-type Ca²⁺ channels. *Pflugers Arch.* 453: 189-201.
- Todorovic S.M., V. Jevtovic-Todorovic, A. Meyenburg, S. Mennerick, E. Perez-Reyes, C. Romano, J.W. Olney and C.F. Zorumski (2001).** Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* 31(1):75-85.
- Tombola, F., M. M. Pathak and E. Y. Isacoff (2006).** How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 23-52.
- Tottene A., T. Fellin, S. Pagnutti, S. Luvisetto, J. Striessnig, C. Fletcher and D. Pietrobon (2002).** Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca²⁺ influx through single human CaV2.1 channels and decrease maximal CaV2.1 current density in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:13284-13289.

- Van Petegem, F., K. A. Clark, F. C. Chatelain and D. L. Minor, Jr. (2004).** Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 429(6992): 671-675.
- Vitko I., I. Bidaud, J.M. Arias, A. Mezghrani, P. Lory and E. Perez-Reyes (2007).** The I-II loop controls plasma membrane expression and gating of Ca(v)3.2 T-type Ca²⁺ channels: a paradigm for childhood absence epilepsy mutations. *J Neurosci* 27(2):322-330.
- Walker, D. and M. De Waard (1998).** Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. *Trends Neurosci* 21(4): 148-154.
- Wall-Lacelle, S., M. I. Hossain, R. Sauve, R. Blunck and L. Parent (2011).** Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in the IIS4S5 linker for the activation of the Ca(V)2.3 calcium channel. *J Biol Chem* 286(31): 27197-27205.
- White G., D.M. Lovinger and F.F. Weight (1989).** Transient low-threshold Ca²⁺ current triggers burst firing through an afterdepolarizing potential in an adult mammalian neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* (17):6802-6806.
- Williams M.E., M.S. Washburn, M. Hans, A. Urrutia, P.F. Brust, P. Prodanovich, M.M. Harpold and K.A. Stauderman (1999).** Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J Neurochem* 72(2):791-799.
- Wyatt C.N., K.M. Page, N.S. Berrow, N.L. Brice and A.C. Dolphin (1998).** The effect of overexpression of auxiliary Ca²⁺ channel subunits on native Ca²⁺ channel currents in undifferentiated mammalian NG108-15 cells. *J Physiol* 510(2):347-360.
- Yang Y., S.D. Dib-Hajj, J. Zhang, Y. Zhang, L. Tyrrell, M. Estacion and S.G. Waxman (2012).** Structural modelling and mutant cycle analysis predict pharmacoresponsiveness of a NaV1.7 mutant channel. *Nat Commun* 3: 1186.
- Yellen, G. (1998).** The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys* 31: 239-295.

- Zagotta, W. N. and R. W. Aldrich (1990).** Voltage-dependent gating of Shaker A-type potassium channels in *Drosophila* muscle. *J Gen Physiol* 95(1): 29-60.
- Zhang J. F., A.D. Randall, T.P. Ellinor, W.A. Horne, W.A. Sather, T. Tanabe, T.L. Schwarz and R.W. Tsien (1993).** Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32: 1075-1088.
- Zhang, X., W. Ren, P. DeCaen, C. Yan, X. Tao, L. Tang, J. Wang, K. Hasegawa, T. Kumasaka, J. He, J. Wang, D.E. Clapham and N. Yan (2012).** Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* 486(7401):130-134.
- Zhou Z. and S.L. Lipsius (1994).** T-type calcium current in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. *J Mol Cell Cardiol* 26(9):1211-1219.