

Université de Montréal

**Étude moléculaire du syndrome du long QT8 :
rôle des résidus glycine dans la fonction du
canal $Ca_v1.2$**

par

Alexandra RAYBAUD

117410778
mv

Département de Physique

Faculté d'arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences
en physique
option biophysique et physiologie moléculaire

Avril, 2006

© Alexandra Raybaud, 2006



clc

3

U54

2006

v 026

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude moléculaire du syndrome du long QT8 : rôle des résidus glycine dans
la fonction du canal $Ca_v1.2$

présenté par :

Alexandra Raybaud

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Joëlle Margot, président-rapporteur
Dr Lucie Parent, directeur de recherche
Dr Rémy Sauvé, co-directeur
Dr Céline Fiset, membre du jury

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les docteurs Lucie Parent et Rémy Sauvé de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires. Les interactions, discussions, débats que j'ai eus avec le docteur Lucie Parent, ont grandement contribué à mon évolution scientifique et à mon esprit d'analyse.

Je voudrais aussi remercier Yolaine Dodier (assistante de recherche du laboratoire du docteur Lucie Parent) pour son enthousiasme, son aide et sa patience au niveau de l'apprentissage des techniques de biologie moléculaire et de biologie des protéines.

Je tiens aussi à souligner la gentillesse et l'appui de tous les membres du personnel du GEPRM, en particulier M. Umberto Banderali pour son aide dans les techniques électrophysiologiques. Je souhaite témoigner ma reconnaissance aux membres du jury, les docteurs Joëlle Margot et Céline Fiset, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Pour finir, je voudrais remercier tout mon entourage familial, en particulier mes parents sans lesquels je n'aurais jamais pu venir étudier au Québec pour entreprendre et réaliser un tel projet, Marc Lapointe pour son appui moral et sa patience ainsi que tous mes amis français et québécois.

RÉSUMÉ

Le canal calcique de type L, $Ca_v1.2$, joue un rôle clé dans le couplage excitation-contraction des myocytes ventriculaires. Le groupe de Keating (Splawski et al. 2005) a récemment montré que les mutations de deux résidus glycine conservés (G402S et G406R) du segment IS6 du canal humain $Ca_v1.2$ seraient impliquées dans le syndrome de Timothy, caractérisé entre autre par un allongement de l'intervalle QT ($QT_c > 500$ ms). Dans le but d'élucider le rôle des résidus glycine, nous avons étudié les mutations G422 (A, P), G432 (A, P, S) et G436 (A, P, R, K, H, D, E, Y) dans IS6 et G770 (A, P) dans IIS6, après expression recombinante des mutants $Ca_v1.2 + Ca_v\beta3$ dans des ovocytes de *Xénope*. Les cinétiques d'inactivation de tous les mutants glycine du IS6 sont significativement plus lentes que $Ca_v1.2$. Par exemple, les courants résiduels mesurés après 800 ms sont : $R_{800} = 0.92 \pm 0.01$ (7) pour G436R, $R_{800} = 0.91 \pm 0.01$ (9) pour G436E comparativement à $R_{800} = 0.47 \pm 0.02$ (33) pour $Ca_v1.2$. Par contre, les propriétés d'activation et d'inactivation des mutants G770A et G770P se comparent avec celles de $Ca_v1.2$. Les propriétés du mutant double G422A+G432A suggèrent que ces positions jouent un rôle clé dans le « gating » de $Ca_v1.2$. De plus, G422 est aligné avec la glycine universelle impliquée dans le « gating » des canaux MthK. Ces résultats suggèrent les trois résidus glycine du IS6 pourraient jouer un rôle critique durant le processus de « gating » des canaux Ca^{2+} activés par de fortes dépolarisations.

Mots-clés : calcium, canal ionique, « gating », mutagenèse dirigée, électrophysiologie.

ABSTRACT

The L-type Ca^{2+} channel plays a key role in excitation-contraction coupling of ventricular cardiac myocytes. It has been recently shown that mutations in two conserved glycine residues (G402S & G406R) in IS6 of the human $\text{Ca}_v1.2$ channel are responsible for the Timothy syndrome characterized by a longer QT interval ($\text{QTc} > 500 \text{ ms}$) (Splawski et al. 2005). In order to investigate the role of conserved glycine residues, we studied the G422 (A, P), G432 (A, P, S), and G436 (A, P, H, K, R, D, E, Y) mutants in IS6 segment and G770 (A, P) in IIS6 after expression of $\text{Ca}_v1.2$ mutants + $\text{Ca}_v\beta3$ in *Xenopus* oocytes. The inactivation kinetics of all IS6 glycine mutants were significantly slower as compared with the control channel. For instance, residual currents measured after 800 ms were : $R_{800} = 0.92 \pm 0.01$ (7) for G436R, $R_{800} = 0.91 \pm 0.01$ (9) for G436E as compared with $R_{800} = 0.47 \pm 0.02$ (33) for control $\text{Ca}_v1.2$. In contrast, the activation and inactivation properties of G770A and G770P in IIS6 were comparable to the control channel. Double G422A + G432A mutant suggest that these positions play a key role in the gating of $\text{Ca}_v1.2$. In particular, G422 is aligned with the universal glycine residue found to play a key role in the gating of MthK channels. Altogether, our results suggest that the flexibility of glycine residues in IS6 could play a critical role in the conformational changes that occur during voltage-dependent gating of high-voltage-activated Ca^{2+} channels.

Keywords : calcium, ion channel, gating, site-directed mutational analysis, electrophysiology.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- A -

A : Alanine (Ala)

AA : Acide Aminé

AMPA : « Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid »

AID : « Alpha Interaction Domain »

- B -

BID : « Beta Interaction Domain »

BTZ : Benzothiazepine

- C -

C : Cystéine (Cys)

CDI : Inactivation Dépendante du Calcium

CHO : « Chinese Hamster Ovary cells »

CICR : « Ca²⁺ Induced Ca²⁺ Release »

- D -

D : Aspartate (Asp)

DHP : Dihydropyridine

- E -

E : Glutamate (Glu)

EAD : « Early After Depolarisation »

EC : Couplage Excitation/Contraction

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

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

- F -

F : Phénylalanine (Phe)

- G -

G : Glycine (Gly)

GABA : « Gamma-Aminobutyric Acid »

GK : « Guanylate Kinases »

- H -

H : Histidine (His)

HVA : « High Voltage Activated »

- I -

I : Isoleucine (Ile)

IP₃ : Inositol-1,4,5-triphosphate

IP₃R : Récepteur à l'inositol-1,4,5-triphosphate

- K -

K : Lysine (Lys)

- L -

L : Leucine (Leu)

LVA : « Low Voltage Activated »

- M -

M : Méthionine (Met)

MAGUK : « Membrane-Associated Guanylate Kinases »

mGluR : Récepteurs métabotropiques au Glutamate

MTSET : « 2-(Triméthylammonium)ethyl methanethiosulfonate »

- N -

N : Asparagine (Asn)

NCX : Échangeur Na⁺/Ca²⁺

NK : « Nucleotide Kinases »

NMDA : « N-methyl-D-Aspartate »

- O -

ω-CTX-GVIA : ω-conotoxine-GVIA

ω-aga-IVA : ω-agatoxine-IVA

- P -

P : Proline (Pro)

PA : Potentiel d'Action

PAA : Phénylalkylamines

PDZ : « Post synaptic Disc-large Zona »

PMCA : « Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase »

- Q -

Q : Glutamine (Gln)

- R -

R : Arginine (Arg)

RE : Réticulum Endoplasmique

RS : Réticulum Sarcoplasmique

ROC : « Receptor Operated Channel »

RyR : Récepteur à la Ryanodine

- S -

S : Sérine (Ser)

SCAM : « Substituted Cysteins Accessibility Method »

SERCA : « Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase »

SH3 : « Src Homology-3 »

SOC : « Stored Operated Channel »

ST : Syndrome de Timothy

- T -

T : Thréonine (Thr)

T_{act} : Constante d'inactivation

T_{inact} : Constante d'inactivation

TRP : « Transient Receptor Potential »

- V -

V : Valine (Val)

VDCC : Canaux Calciques Dépendants du Voltage

VDI : Inactivation Dépendante du Voltage

- W -

W : Tryptophane (Trp)

- X -

X : acide aminé quelconque

- Y -

Y : Tyrosine (Tyr)

TABLE DES MATIÈRES

1.	INTRODUCTION	1
1.1.	Le calcium dans la cellule	1
1.1.1.	Entrée du calcium via les canaux de la membrane plasmique ..	2
1.1.1.1.	Les canaux VDCC	2
1.1.1.2.	Les canaux TRP	7
1.1.1.3.	Les canaux ROC	7
1.1.2.	Couplage excitation/contraction (EC)	8
1.2.	Propriétés des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC) ..	9
1.2.1.	Éléments structuraux	10
1.2.1.1.	La sous-unité principale $Ca_v\alpha 1$	10
1.2.1.2.	La sous-unité $Ca_v\beta$	13
1.2.1.3.	La sous-unité $Ca_v\alpha 2\delta$	16
1.2.1.4.	La sous-unité $Ca_v\gamma$	17
1.2.2.	Propriétés biophysiques	18
1.2.2.1.	Activation	18
1.2.2.2.	Inactivation	23
1.2.3.	Modulation des propriétés de « gating » par les sous-unités auxiliaires	28
1.3.	Le canal $Ca_v 1.2$ impliqué dans un allongement de l'intervalle QT	30
1.3.1.	Activité électrique du cœur	30
1.3.2.	Potentiel d'action cardiaque (PA) et courants ioniques	31
1.3.3.	Long QT (LQT) et Torsades de Pointes	33
1.3.4.	Les différents types de LQT congénitaux	34
1.3.5.	Le syndrome de Timothy (ST)	35
1.4.	Hypothèse	38
2.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	40
2.1.	Techniques de biologie moléculaire	40
2.2.	Expression fonctionnelle des canaux	41

2.3.	Enregistrements électrophysiologiques	42
2.4.	Analyse des données.....	44
2.5.	Immunobuvardage de type « Western »	47
3.	RÉSULTATS	49
3.1.	Les mutations impliquées dans le syndrome de Timothy (LQT8) .	49
3.2.	Mutations à la position G436 du IS6	54
3.3.	« Alanine Scan » du segment IS6.....	58
3.3.1.	Mutations simples.....	58
3.3.2.	Mutations multiples.....	60
3.3.3.	Mutations non-fonctionnelles	64
3.4.	Analyse du résidu G770 du segment IIS6.....	66
4.	DISCUSSION.....	71
4.1.	Les mutations impliquées dans le syndrome de Timothy :.....	72
4.1.1.	G432S et G436R modifient les propriétés de « gating » du canal Ca _v 1.2	72
4.1.2.	Comparaison avec d'autres résultats publiés	75
4.2.	Les mutations de charges en G436 affectent l'empilement de l'hélice α dans IS6	77
4.3.	Mutations en alanine des trois glycines du segment IS6	80
4.4.	Les résidus G422 et G432 sont impliqués dans les propriétés d'activation du canal Ca _v 1.2.....	82
4.5.	Le résidu G770 du segment IIS6 n'est pas impliqué dans les propriétés de « gating » du canal Ca _v 1.2	83
5.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	84
6.	RÉFÉRENCES	89
7.	ARTICLE	101
8.	PUBLICATIONS	130

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Localisation tissulaire et propriétés pharmacologiques des canaux VDCC.....	6
Tableau 2. Propriétés biophysiques des canaux VDCC	6
Tableau 3. Propriétés biophysiques en Ba ²⁺ et Ca ²⁺ des mutations impliquées dans le LQT8	53
Tableau 4. Propriétés biophysiques des canaux Ca _v 1.2 témoin et mutés	70

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure quaternaire des canaux $Ca_v1.2$	9
Figure 2. Structure secondaire prédite de la sous-unité $Ca_v\alpha1$ des VDCC....	10
Figure 3. Alignement des motifs DEKA et EEEE des canaux Na^+ et Ca^{2+}	12
Figure 4. Homologie entre les trois familles de canaux calciques Ca_v1 , Ca_v2 et Ca_v3	13
Figure 5. Structure du complexe $Ca_v\beta2a/Ca_v1.2$ -AID.....	14
Figure 6. Représentation 3D du complexe $Ca_v\beta2a/Ca_v1.2$ -AID.	16
Figure 7. Les trois modèles du senseur à voltage S4.	20
Figure 8. Alignement de séquences de $K_v2.1$, KcSA, MthK et KirBac1.1 avec $Ca_v1.2$	23
Figure 9. Mécanisme d'inactivation rapide des canaux K^+ et Na^+	24
Figure 10. Fonctionnement électrique du cœur et ECG.....	31
Figure 11. Correspondance entre PA ventriculaire et ECG.....	33
Figure 12. LQT congénitaux et le défaut de fonctionnement de leurs protéines associées.....	35
Figure 13. Anomalies morphologiques du ST.	36
Figure 14. Courants Ba^{2+} avec les deux mutations du ST.	37
Figure 15. Prolongement du PA avec la mutation G406R.....	37
Figure 16. Modèle d'inactivation de type « Hinged-Lid ».....	39
Figure 17. Protocoles de pulses.....	43
Figure 18. Courants macroscopiques en Ba^{2+} et Ca^{2+} des mutations G432S et G436R impliquées dans le LQT8.....	50
Figure 19. « Time to peak » en Ba^{2+} et Ca^{2+} des deux mutations impliquées dans le LQT8	51
Figure 20. R_{800} en Ca^{2+} des mutations G432S et G436R impliquées dans le LQT8.....	53
Figure 21. Courants macroscopiques en Ba^{2+} des mutants G436A, P, Y, D, E, H, K et R.	54
Figure 22. « Time to peak » de la position G436 du segment IS6.	55

Figure 23. h_{5000} de la mutation G436A du segment IS6.....	57
Figure 24. Courants macroscopiques en Ba^{2+} des mutations G422A, G432A et G436A.....	59
Figure 25. Courants macroscopiques en Ba^{2+} des mutants double et triple en alanine du segment IS6.	60
Figure 26. Variation du $E_{0.5,act}$ de l' « Alanine Scan » du segment IS6.....	61
Figure 27. « Time to peak » des mutants en alanine du segment IS6.	62
Figure 28. R_{800} de l'« Alanine Scan » du segment IS6.....	63
Figure 29. Immunobuvardage de type « Western » des protéines non-fonctionnelles.	64
Figure 30. Courants macroscopiques en Ba^{2+} avec la glycine G770 mutée en A et P.	66
Figure 31. « Time to peak » de la position G770 du segment IIS6.	67
Figure 32. R_{800} de la position G770 du segment IIS6.	68
Figure 33. h_{5000} de la position G770 du segment IIS6.....	68
Figure 34. Modèle cinétique de $Ca_v1.2$ en condition Ca^{2+} et Ba^{2+}	73
Figure 35. Vue supérieure de segment IS6 en projection hélicoïdale.	84
Figure 36. Modèle hypothétique de « gating » des canaux calciques de type HVA.	86

1. INTRODUCTION

Le calcium est un second messager ubiquitaire impliqué dans de nombreux processus cellulaires comme le couplage excitation/contraction, la libération de neurotransmetteurs au niveau des synapses et de la jonction neuromusculaire, ou encore l'expression des gènes.

Les ions calciques sont répartis de façon asymétrique de chaque côté de la membrane plasmique. C'est l'ion qui produit le plus important gradient de part et d'autre de la membrane. En effet, la concentration de calcium libre dans le cytoplasme est faible, de l'ordre 10^{-4} mM, alors qu'au niveau extracellulaire elle est de 1 à 2 mM (Dong Z. 2006).

1.1. Le calcium dans la cellule

Il existe deux voies principales permettant d'augmenter la concentration calcique dans la cellule : un influx provenant du milieu extérieur via les canaux calciques de la membrane plasmique ou une libération à partir des réserves internes du réticulum endo/sarcoplasmique (RE ou RS). La concentration du calcium dans le RE est assez élevée, de l'ordre de 100 μ M. Cette libération fait intervenir des canaux récepteurs : les récepteurs à la ryanodine (RyR) ou les récepteurs à (IP₃R) (Berridge 1997).

Le maintien de l'homéostasie calcique est assuré par la pompe de type SERCA (« Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase ») située au niveau du RE, l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ (NCX) et la pompe PCMA (« Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase ») au niveau de la membrane plasmique (Berridge et al. 2003).

1.1.1. Entrée du calcium via les canaux de la membrane plasmique

Il y a trois types de canaux permettant l'entrée de calcium dans la cellule : les canaux calciques dépendants du voltage (VDCC), les canaux TRP (« Transient Receptor Potentiel ») et les canaux de type ROC (« Receptor Operated Channel ») (Berridge 1997).

1.1.1.1. Les canaux VDCC

D'après une nouvelle nomenclature, basée sur celle des canaux potassiques, les canaux calciques de type VDCC sont divisés en trois familles : Ca_v1 , Ca_v2 et Ca_v3 .

Ces trois familles représentent un total de dix gènes : quatre pour Ca_v1 , trois pour Ca_v2 et trois pour Ca_v3 . Au niveau de l'ancienne nomenclature, ces canaux sont organisés en cinq types :

- Type L : $\alpha1S$, $\alpha1C$, $\alpha1D$ et $\alpha1F$
- Type P/Q : $\alpha1A$
- Type N : $\alpha1B$
- Type R : $\alpha1E$
- Type T : $\alpha1G$, $\alpha1H$, $\alpha1I$

(Ertel et al. 2000)

Selon leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques, il existe deux classes fonctionnelles. La classe HVA (« High Voltage Activated ») comprend les canaux de types L, P/Q, N et R (ie Ca_v1 et Ca_v2), tandis que les canaux de type T (Ca_v3) appartiennent à la classe LVA (« Low Voltage Activated ») (Ertel et al. 2000, Catterall et al. 2003).

1.1.1.1.1. Les canaux de type HVA

(Voir tableaux 1 et 2)

Cette classe comprend les deux familles de canaux Ca_v1 et Ca_v2 . Ils sont activés par de fortes dépolarisations membranaires. Par contre, ils se distinguent au niveau de leurs cinétiques d'inactivation, de la conductance en Ba^{2+} , de la distribution tissulaire ainsi qu'au niveau de leurs propriétés pharmacologiques.

Les canaux Ca_v1 ou de type L (pour « Long lasting »)

Les canaux Ca_v1 sont impliqués dans le couplage excitation/contraction des myocytes cardiaques (Bers and Perez-Reyes 1999) et dans le maintien de la phase plateau du potentiel d'action (PA) du muscle squelettique et des cellules cardiaques et neuronales (Richards et al. 1999).

Leur distribution tissulaire est ubiquitaire. Leur cinétique d'inactivation en Ba^{2+} est lente ($T_{inact} > 500$ ms) et la conductance du canal est 2 fois plus grande en Ba^{2+} qu'en Ca^{2+} . La principale caractéristique de ces canaux est la sensibilité à certains composés chimiques organiques, tels que les dihydropyridines (DHP), les phénylalkylamines (PAA), les benzothiazepines (BTZ) (Hockerman et al. 1997, Peterson et al. 1997, Huber et al. 2000). Ceux-ci sont souvent utilisés pour le traitement des arythmies cardiaques et de l'hypertension (Huber et al. 2000).

Les canaux Ca_v2

Les canaux Ca_v2 sont neuronaux et souvent impliqués dans la libération de neurotransmetteurs au niveau synaptique. Leur constante d'inactivation en Ba^{2+} est plus rapide que celle des canaux de type L : de l'ordre de 50 à 80 ms, et les conductances en Ba^{2+} et en Ca^{2+} sont égales. Contrairement aux canaux type L, les canaux Ca_v2 ne sont pas sensibles au DHP : leurs inhibiteurs, des toxines, permettent de les différencier.

Le groupe de RW Tsien (Randall and Tsien 1995) a décrit tous les types de canaux calciques dépendants du voltage au niveau des neurones granulaires du cervelet du rat, par l'utilisation d'agents pharmacologiques spécifiques. Après avoir inhibé la partie du courant provenant des canaux de type L par un composé DHP (15%), ils ont mis en évidence tous les canaux de type Ca_v2 . Les canaux de type N (pour Neural), inhibés spécifiquement par la toxine ω -CTx-GVIA issue de l'escargot *Conus geographus*, contribuent à 20% du courant calcique total. Les canaux de type P/Q sont inhibés par une toxine d'araignée, ω -aga-IVA. En utilisant des concentrations différentes d'inhibiteurs, ce même groupe a pu mettre en évidence les deux composantes de ce courant : le type P (11%) et Q (35%). Les canaux de type P, pour Purkinje où ils ont été décrits pour la première fois (Llinas et al. 1989), sont plus sensibles à l' ω -aga-IVA que les canaux de type Q, avec des IC_{50} respectifs de 1 à 3 nM et 90 à 100 nM. Il y a aussi des différences au niveau de leurs cinétiques d'inactivation : le canal de type Q s'inactive plus rapidement que le canal de type P. Cependant, les deux composantes sont complètement inhibées par la toxine de l'escargot *Conus magus* ω -CTx-MV1IC. Le courant résiduel restant (19%), insensible à tous les inhibiteurs introduits, est le résultat des canaux de type R, dont les cinétiques d'inactivation sont les plus rapides de la famille Ca_v2 (Randall and Tsien 1995). Ils sont inhibés spécifiquement par la toxine SNX-482, issue de la tarentule *Hysteroocrates gigas* (Newcomb et al. 1998), qui déplace le potentiel de mi-activation de +70 mV (Bourinet et al. 2001).

1.1.1.1.2. Les canaux de type LVA

Ce sont les canaux de type T (pour « Transient »). Ils s'activent avec de faibles dépolarisations membranaires (proche du potentiel de repos membranaire de la plupart des cellules) et leurs cinétiques d'inactivation sont les plus rapides de tous les VDCC (\approx 20 à 50 ms). Ils se distribuent

principalement au niveau du cerveau et du cœur. Les conductances en Ba^{2+} et Ca^{2+} sont identiques.

L'équipe de Edward Perez-Reyes a identifié la nature moléculaire de ces canaux à la fin des années 1990. Le premier membre de cette famille à être cloné fut $Ca_v3.1$ au niveau du cerveau de rat (Perez-Reyes et al. 1998). Le gène codant pour la sous-unité $Ca_v3.2$ a été cloné à partir de tissu de cœur humain (Cribbs et al. 1998). Le dernier isoforme $Ca_v3.3$ a été cloné à partir d'un cerveau de rat (Lee et al. 1999). Même s'ils appartiennent tous les trois à la famille des canaux Ca_v3 , il y a quelques différences notables au niveau électrophysiologique. Les courants $Ca_v3.3$ s'activent et s'inactivent plus lentement que les deux autres, lorsqu'ils sont exprimés dans les ovocytes de *Xénope* (Lee et al. 1999). D'un point de vue pharmacologique, les canaux de type T sont la cible de certaines drogues et de certains composés inorganiques mais aucun de ces composés n'est vraiment spécifique pour ces canaux. Par exemple, le mibéfradil inhibe spécifiquement les canaux type T ($IC_{50} \approx 1-2 \mu M$) (Perez-Reyes 2003), alors que des doses plus importantes inhibent les canaux de type L : $IC_{50} = 100 - 120 \mu M$ pour $Ca_v1.2$ (Bernatchez et al. 2001a).

Classification fonctionnelle	Type	Canal	$\alpha 1$	Localisation tissulaire	Inhibiteurs
HVA	L	Cav1.1	$\alpha 1S$	Muscles squelettiques et cardiaques neurones, rétine	Dihydropyridines (DHP), phénylalkylamines (PAA), benzothiazépines (BTZ)
		Cav1.2	$\alpha 1C$		
		Cav1.3	$\alpha 1D$		
		Cav1.4	$\alpha 1F$		
	P/Q	Cav2.1	$\alpha 1A$	Neurones	ω -aga- IVA
	N	Cav2.2	$\alpha 1B$		ω -CTx-GVIA
R	Cav2.3	$\alpha 1E$	SNX-482		
LVA	T	Cav3.1	$\alpha 1G$	Neurones et cœur	Mibéfradil, kurtoxine
		Cav3.2	$\alpha 1H$		
		Cav3.3	$\alpha 1I$		

Tableau 1. Localisation tissulaire et propriétés pharmacologiques des canaux VDCC

(Randall and Tsien 1995, Ertel et al. 2000, Catterall et al. 2003)

Classification fonctionnelle	Type	Canal	Zone d'activation en Ba^{2+}	Temps d'inactivation en Ba^{2+}	Conductance relative
HVA	L	Cav1.1	de -60 à -10 mV	> 500 ms	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$
		Cav1.2			
		Cav1.3			
		Cav1.4			
	P/Q	Cav2.1	de -120 à -30 mV	≈ 50 à 80 ms	$Ba^{2+} = Ca^{2+}$
	N	Cav2.2			
R	Cav2.3				
LVA	T	Cav3.1	de -100 à -60 mV	≈ 20 à 50 ms	$Ba^{2+} = Ca^{2+}$
		Cav3.2			
		Cav3.3			

Tableau 2. Propriétés biophysiques des canaux VDCC

(Ertel et al. 2000, Yamakage and Namiki 2002, Catterall et al. 2003)

1.1.1.2. Les canaux TRP

Les canaux TRP (« Transient Receptor Potentiel ») ont été pour la première fois décrits dans des cellules natives et clonés chez la Drosophile. Celle-ci possède des photorécepteurs portant des mutations du gène TRP montrant une dépolarisation transitoire après une stimulation lumineuse continue. C'est par homologie que ces canaux ont été identifiés. Les canaux TRP sont divisés en six familles : TRPC pour « Canonical », TRPV pour « Vanilloïd », TRPM pour « Melastatin », TRPML pour « MucLopins », TRPP pour « Polycystin » et TRPA pour « ANKTM1 ». Ce sont des canaux ioniques qui ne dépendent pas du voltage et qui sont perméables aux cations mono et divalents, à l'exception de TRPM4/5 sélectifs aux ions monovalents, et TRPV5/6 sélectifs au Ca^{2+} (Vennekens et al. 2002, Clapham 2003).

1.1.1.3. Les canaux ROC

Ils sont activés par la liaison d'un ligand du côté extracellulaire. Au niveau synaptique, on distingue les récepteurs inhibiteurs tels que les récepteurs GABA (« Gamma-Aminobutyric Acid ») et à la Glycine, des récepteurs excitateurs comme les récepteurs à l'achétylcholine, à la sérotonine, ou au glutamate. Les récepteurs au glutamate sont divisés en deux groupes : les récepteurs métabotropiques (mGluR1 à 8) dont l'activation est couplée à une cascade biochimique intracellulaire et les récepteurs ionotropiques, dont l'activation est couplée à un canal ionique membranaire. Dans ce deuxième groupe, on compte les récepteurs NMDA (« N-méthyl-D-Aspartate ») et non-NMDA qui incluent les récepteurs kainate et AMPA (« alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid »). Les récepteurs excitateurs sont cationiques (K^+ , Na^+ et Ca^{2+}), cependant les récepteurs NMDA ont une meilleure perméabilité pour le Ca^{2+} (Salt and Eaton 1996, Hille 2001).

1.1.2. Couplage excitation/contraction (EC)

Les canaux de type L sont responsables du couplage EC qui contrôle la relâche du calcium via les récepteurs à la ryanodine. Le mécanisme de couplage est dépendant du type musculaire (Nakai et al. 1998, Lewartowski 2000).

Au niveau du muscle cardiaque, lorsque la concentration interne de calcium atteint 1-100 μM (via les canaux de type L), les RyR libèrent le calcium du réticulum sarcoplasmique (Bers and Perez-Reyes 1999, Lewartowski 2000). Il existe trois isoformes de récepteurs à la ryanodine mais c'est le RyR2 qui est présent au niveau du cœur. C'est le mécanisme CICR : « Ca^{2+} induced Ca^{2+} release » qui implique une co-localisation très proche de ces deux canaux (Sun et al. 1995, Protasi et al. 1996).

Au niveau du muscle squelettique, ce mécanisme se traduit par un couplage mécanique entre le canal $\text{Ca}_v1.1$ et le récepteur RyR1 (Catterall 2000). Il ne nécessite pas l'entrée de calcium extracellulaire mais implique la boucle II-III du canal $\text{Ca}_v1.1$. C'est par construction de chimères entre les canaux de type L des muscles squelettique et cardiaque que le groupe de Numa l'a mise en évidence dans des myotubes dysgéniques qui ne présentaient aucun couplage EC, à cause d'une mutation du gène codant pour les canaux de type L (Tanabe et al. 1988, Tanabe et al. 1990). Les différentes chimères comportaient à la base le canal calcique cardiaque, $\text{Ca}_v1.2$, avec des régions cytoplasmiques du canal de type squelettique, $\text{Ca}_v1.1$. La boucle II-III de $\text{Ca}_v1.1$ est le site le plus important du couplage conformationnel EC, en particulier au niveau de sa moitié N-terminale (Nakai et al. 1998).

1.2. Propriétés des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC)

Les canaux calciques de type VDCC forment des complexes hétéro-oligomériques (Figure 1). La sous-unité principale α_1 possède tout le matériel nécessaire au bon fonctionnement de ces canaux, à savoir le pore, le filtre de sélectivité, le senseur de voltage, les mécanismes de « gating », ainsi que de nombreux sites de régulation (Catterall 2000, Zhen et al. 2005). Les sous-unités $\text{Ca}_v\beta$ et $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ sont auxiliaires, elles jouent un rôle dans l'assemblage, le ciblage à la membrane et les propriétés de gating du canal (Catterall 2000). On trouve parfois une dernière sous-unité, $\text{Ca}_v\gamma$, qui a été initialement identifiée au niveau du canal de type L du muscle squelettique, $\text{Ca}_v1.1$ (Sharp and Campbell 1989, Walker and De Waard 1998).

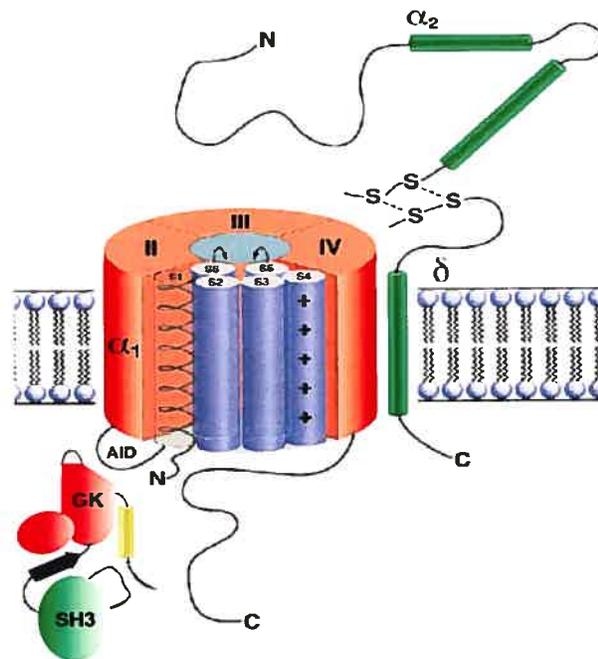


Figure 1. Structure quaternaire des canaux $\text{Ca}_v1.2$. La sous-unité principale $\text{Ca}_v\alpha_1$ (rouge) formant le pore, contient quatre domaines de six segments transmembranaires chacun (violet). Il y a deux autres sous-unités qui s'y associent. La sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ interagirait avec $\text{Ca}_v\alpha_1$ au niveau du AID (« Alpha Interaction Domain ») via son domaine GK (Guanylate Kinase). La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ (vert) possède une partie extracellulaire reliée par un pont disulfure à un segment transmembranaire (Randall and Benham 1999).

1.2.1. Éléments structuraux

1.2.1.1. La sous-unité principale $Ca_v\alpha_1$

Tous les types de canaux VDCC sont définis par différentes sous-unités $Ca_v\alpha_1$ (170-240 kDa). Cependant, leur topologie prédite reste la même. La figure ci-dessous présente la structure secondaire prédite de cette sous-unité.

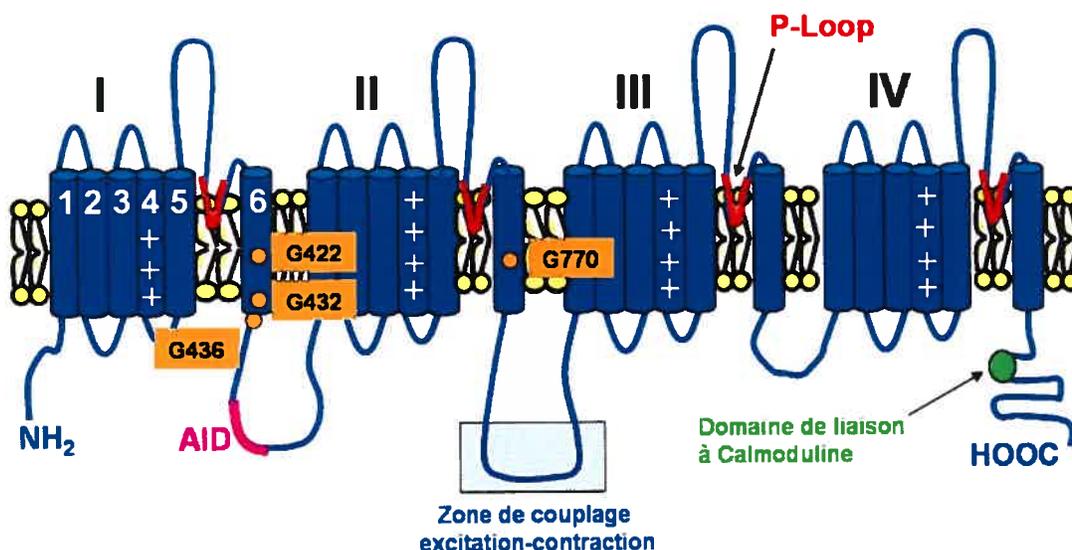


Figure 2. Structure secondaire prédite de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ des VDCC. La sous-unité $Ca_v\alpha_1$, qui forme le pore du canal, contient quatre domaines (I à IV) de six segments transmembranaires chacun (S1 à S6), avec des extrémités N et C-terminales cytoplasmiques. Sa structure primaire montre quatre résidus glycines conservés dans tous les canaux de type HVA : trois dans le segment IS6 (20 acides aminés en amont du AID) et un dans le segment IIS6. La « P-Loop » forme le filtre de sélectivité du canal. Le site de liaison à RyR1 se trouve au niveau de la boucle II-III. Le domaine de liaison de la calmoduline se retrouve dans la partie C-terminale des canaux $Ca_v1.2$ et $Ca_v2.1$ (Walker and De Waard 1998, Randall and Benham 1999, Catterall 2000).

Le segment S4 est le senseur de voltage car il contient de nombreux acides aminés chargés positivement intercalés à travers de nombreux résidus hydrophobes : ce qui permet au canal de ressentir le potentiel membranaire (Hille 2001). Voir section 2.2.1.1.

Les segments S5 et S6 forment le pore interne du canal. Le groupe de Yang a recherché les segments impliqués dans la formation du pore interne du canal de type P/Q en utilisant la méthode du SCAM (« Substituted Cysteins Accessibility Method »). Contrairement aux canaux potassiques où le pore est symétrique, formé de quatre segments M2/S6 identiques, celui des canaux de type VDCC est asymétrique tant au niveau de la structure primaire qu'au niveau fonctionnel (Parent et al. 1995, Swartz 2004, Long et al. 2005). Les quatre S6 ne réagissent pas de la même manière aux MTSET. Cependant, plusieurs positions, au niveau des quatre domaines, sont accessibles aux MTSET. Ils ont aussi observé que certains résidus du segment S5 sont aussi modifiés par ces agents, suggérant aussi que ce segment soit également impliqué dans la formation du pore interne (Zhen et al. 2005).

La boucle reliant les segments S5 et S6 contient une portion, la « P-Loop », qui forme le filtre de sélectivité du canal. L'affinité du canal pour les ions calciques est forte : $K_d \approx 1\mu\text{M}$. L'alignement de ces canaux avec les canaux sodiques dépendants du voltage où la sélectivité dépend de quatre résidus strictement conservés (motif DEKA) montre une conservation d'un locus EEEE (Favre et al. 1996). Un résidu glutamate est conservé sur la « P-Loop » de chaque domaine (Figure 3). Cependant ces quatre résidus ne contribueraient pas de manière égale à la liaison d'ions divalents (Heinemann et al. 1992, Parent and Gopalakrishnan 1995, Favre et al. 1996).

Na_v1.2	{	<u>Na-channel</u>					
		I (398-402)	T	Q	D	Y	W
		II (753-757)	C	G	E	W	I
		III (1235-1239)	T	F	K	G	W
		IV (1527-1531)	T	S	A	G	W
Ca_v1.1	{	<u>Ca-channel</u>					
		I (290-294)	T	M	E	G	W
		II (612-616)	T	G	E	D	W
		III (1012-1016)	T	F	E	G	W
		IV (1321-1325)	T	G	E	A	W

Figure 3. Alignement des motifs DEKA et EEEE des canaux Na⁺ et Ca²⁺. L'alignement des filtres de sélectivité de canal sodique Na_v1.2 et du canal calcique Ca_v1.1, est basé sur la conservation des tryptophanes (W). Modifié de (Favre et al. 1996).

En utilisant la mutagenèse dirigée, le laboratoire de Catterall a impliqué les segments IIIS5, IIIS6 et IVS6 dans l'affinité des canaux de type L pour les DHP (Dihydropyridine), PAA (Phénylalkylamines) et BTZ (Benzothiazépine). (Hockerman et al. 1997). En effet, 11 résidus des segments IIIS6 et IVS6 mutés en alanine montrent une réduction importante de l'affinité du canal pour les DHP (Peterson et al. 1997).

Une partie de la boucle reliant les domaines I et II, le AID (« Alpha Interaction Domain »), permet une interaction avec la sous-unité auxiliaire Ca_vβ. Au niveau des canaux de type HVA, cette séquence de 18 acides aminés comporte neuf résidus strictement conservés (Walker and De Waard 1998). Voir section 2.1.2.2.

La figure 4 présente le pourcentage d'homologie de la sous-unité principale Ca_vα1 des différents canaux VDCC. Au sein d'une même famille, les identités de séquences primaires sont de l'ordre de 75 %. Par contre, ce pourcentage diminue entre les différentes familles : 50 % entre Ca_v1 et Ca_v2 et moins de 30 % entre Ca_v1 ou Ca_v2 et Ca_v3 (Catterall et al. 2003).

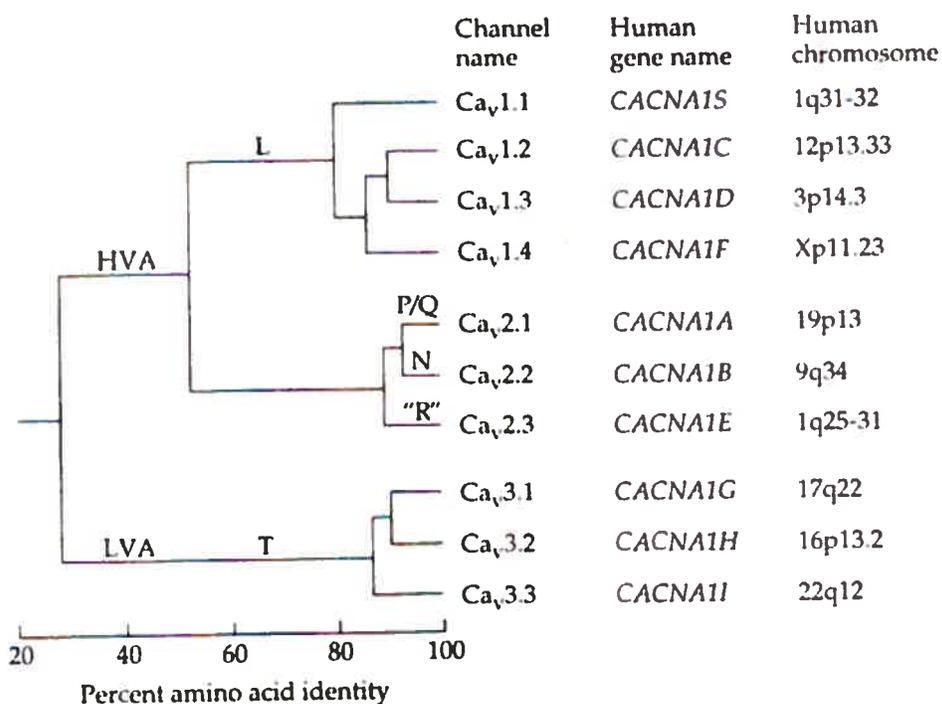


Figure 4. Homologie entre les trois familles de canaux calciques Ca_v1, Ca_v2 et Ca_v3. Elle représente le pourcentage d'homologie de la sous-unité Ca_vα1 entre les trois familles des canaux VDCC ainsi que le nom du gène et sa localisation chromosomique. (Ertel et al. 2000, Hille 2001).

1.2.1.2. La sous-unité Ca_vβ

Ces sous-unités cytoplasmiques appartiennent à la famille des guanylates kinases associées à la membrane (MAGUK). Il existe quatre gènes (un à quatre) dont le poids moléculaire varie entre 52-78 kDa (Walker and De Waard 1998, Rousset et al. 2005). L'une de ces sous-unités, Ca_vβ2a, est ancrée à la membrane plasmique par la palmitoylation de deux cystéines situées à l'extrémité N-terminale qui lui confère des propriétés de modulations particulières (voir section 2.1.5) (Chien et al. 1996, Qin et al. 1998, Dafi et al. 2004, Leroy et al. 2005).

1.2.1.2.1. Relation structure/fonction

La structure de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_{2a}$, co-cristallisée avec le AID du canal $\text{Ca}_v1.2$, est parue en juin 2004 avec une résolution à 1.97 Å (Van Petegem et al. 2004). Les sous-unités $\text{Ca}_v\beta$ possèdent deux domaines très conservés (Figure 5) : le domaine SH3 (Src Homology-3) et le domaine GK ou NK (pour « Guanylate Kinases » ou « Nucleotide Kinases »), et trois régions variables (V1 à 3). Elles se distinguent des autres protéines MAGUK en particulier au niveau du nombre de motifs PDZ (« Post synaptic Disc-large Zona »). Les sous-unités $\text{Ca}_v\beta$ ne possèdent qu'un seul motif PDZ d'interaction protéine-protéine au niveau du domaine V1. Elles interagissent, via le domaine NK, avec les canaux de types VDCC (Van Petegem et al. 2004, Rousset et al. 2005).

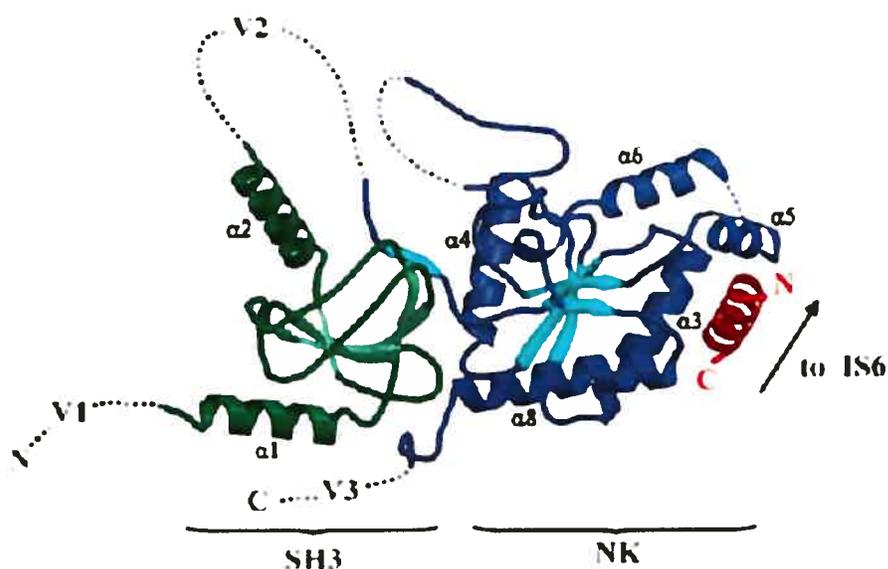


Figure 5. Structure du complexe $\text{Ca}_v\beta_{2a}/\text{Ca}_v1.2\text{-AID}$. Le domaine SH3 (en vert) contient cinq feuillets β antiparallèles (β_1 à β_4), une hélice 3_{10} et deux hélices α (α_1 et α_2). Le domaine NK (en bleu) contient cinq feuillets β parallèles (β_6 à β_{10}) entourés par six hélices α (α_3 à α_8) et deux hélices 3_{10} . L'hélice en rouge correspond au domaine AID. Les parties en pointillé représentent les trois domaines variables, V1 à V3, qui n'ont pu être cristallisés (Van Petegem et al. 2004).

1.2.1.2.2. Interaction avec la sous-unité $Ca_v\alpha 1$

L'interaction entre $Ca_v\alpha 1$ et $Ca_v\beta$ à haute affinité (≈ 20 nM) se fait sur la boucle I-II, au niveau du AID : **QQXEXXLXGYXXWIXXXE** où X est un acide aminé quelconque et les neuf résidus en gras sont strictement conservés au niveau de tous les canaux de type HVA (Walker and De Waard 1998).

Des analyses de mutagenèse dirigée ont montré que trois résidus (Y, W et I) sont importants pour la liaison et l'interaction avec les sous-unités $Ca_v\beta$ (Walker and De Waard 1998). Par contre, seul le résidu W est vraiment essentiel. En effet des mutations hydrophobes, hydrophiles ou aromatiques du résidu Trp du canal $Ca_v 2.3$ empêchent la liaison avec $Ca_v\beta 3$ (Figure 6) (Berrou et al. 2002).

Ces protéines cytoplasmiques sont aussi impliquées dans l'adressage à la membrane plasmique des sous-unités $Ca_v\alpha 1$. La boucle I-II contient un signal de rétention du RE. Il faut donc une forte affinité entre la boucle I-II de $Ca_v\alpha 1$ et la sous-unité $Ca_v\beta$ pour enlever $Ca_v\alpha 1$ du RE et l'amener à la membrane plasmique (Brice et al. 1997, Bichet et al. 2000, Cornet et al. 2002).

Cependant, l'interaction avec le site AID n'explique pas tous les changements dans des propriétés de « gating » et dans des cinétiques d'activation et d'inactivation (Walker and De Waard 1998). En effet, il existe des interactions de faible affinité (environ 30 fois plus faible que celle avec le AID). Elles se font à différents endroits de la protéine, soit au niveau C-terminal : $Ca_v 2.3$ avec $Ca_v\beta 2a$ (Tareilus et al. 1997) ou $Ca_v\beta 4$ (Walker et al. 1998), soit au niveau N-terminal : $Ca_v 2.1$ avec $Ca_v\beta 4$ (Walker et al. 1999).

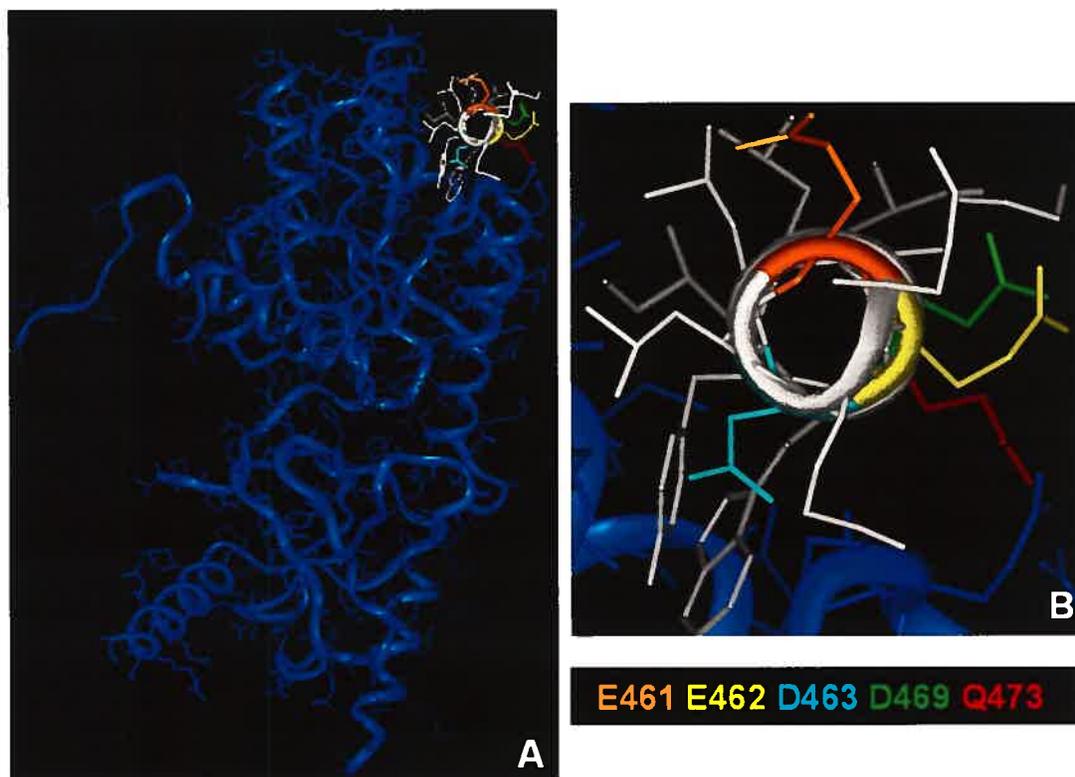


Figure 6. Représentation 3D du complexe $Ca_v\beta2a/Ca_v1.2-AID$. La figure 6.B est un détail de la 6.A. Il s'agit de la co-cristallisation, fichier PDB 1T0J (Van Petegem et al. 2004), de l'hélice du $Ca_v1.2-AID$ (en blanc) avec la sous-unité $Ca_v\beta2a$ (en bleu). Les résidus hydrophiles (en couleur) sont situés du côté opposé à $Ca_v\beta2a$ alors que les résidus aromatiques, comme l'acide aminé conservé W, interagissent avec elle (Berrou et al. 2001, Dafi et al. 2004, Berrou et al. 2005).

1.2.1.3. La sous-unité $Ca_v\alpha2\delta$

La sous-unité $Ca_v\alpha2\delta$ est une glycoprotéine constituée de deux parties : la partie extracellulaire α_2 (avec l'extrémité N-terminale) est reliée à la partie transmembranaire δ (un seul segment transmembranaire avec extrémité C-terminale cytoplasmique) par un pont disulfure (Voir figure 1). Ces deux parties proviennent de l'épissage alternatif d'un même gène (Randall and Benham 1999). Il existe quatre gènes codant pour cette protéine dont le poids moléculaire varie entre 130 et 200 kDa (Qin et al. 2002, Klugbauer et al. 2003).

Au niveau des quatre sous-unités $Ca_v\alpha_2\delta$, Il existe 15 cystéines strictement conservées et de nombreux sites de glycosylation au niveau N-terminal. Les sous-unités $Ca_v\alpha_2\delta$ -1 et 2 sont ubiquitaires alors que $Ca_v\alpha_2\delta$ -3 est spécifique au cerveau (Klugbauer et al. 1999) et que $Ca_v\alpha_2\delta$ -4 se retrouve au niveau du cœur et du muscle squelettique (Qin et al. 2002). En ce qui concerne la structure primaire, les pourcentages d'homologie sont 30, 32, et 61 % entre $Ca_v\alpha_2\delta$ -4 et $Ca_v\alpha_2\delta$ -1, $Ca_v\alpha_2\delta$ -2 et $Ca_v\alpha_2\delta$ -3, respectivement.

1.2.1.4. La sous-unité $Ca_v\gamma$

D'un point de vue structural, $Ca_v\gamma$ est une protéine transmembranaire comportant quatre segments avec des extrémités N et C-terminales cytoplasmiques (Randall and Benham 1999). À ce jour, il existe huit gènes (un à huit) : ces protéines ont un poids moléculaire variant entre 28 et 35 kDa. Une analyse phylogénique révèle que les sous-unités $Ca_v\gamma_2$, γ_3 , γ_4 et γ_8 sont proches, $Ca_v\gamma_5$ et $Ca_v\gamma_7$ sont aussi proches que $Ca_v\gamma_1$ et $Ca_v\gamma_8$ (Black 2003). Certaines régions de grande homologie représentent ainsi les fonctions basales de ces protéines comme des sites de N-glycosylation, des cystéines conservées au niveau extracellulaire ainsi que des motifs PDZ.

Au niveau de la localisation tissulaire, $Ca_v\gamma_1$ a été identifiée dans le muscle squelettique avec le canal $Ca_v1.1$ (Sharp and Campbell 1989). $Ca_v\gamma_2$, γ_3 et γ_4 sont situées au niveau du cerveau, pouvant former des complexes avec les canaux $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ et les récepteurs AMPA (Sharp et al. 2001). La sous-unité $Ca_v\gamma_2$ ou « stargazine » a été la première à être localisée au niveau du cerveau : en effet des souris « stargazer » souffrant d'épilepsie ont montré l'implication d'une mutation dans le gène codant pour la protéine $Ca_v\gamma_2$ (Letts et al. 1998, Letts 2005). Quant aux sous-unités $Ca_v\gamma_4$, γ_6 et γ_7 , elles s'exprimeraient au niveau du cœur tandis que $Ca_v\gamma_8$ se situerait aussi dans le cerveau (Hansen et al. 2004).

1.2.2. Propriétés biophysiques

Le mouvement des ions calciques au travers des canaux de type VDCC dépend du potentiel électrochimique, défini par le potentiel de Nernst :

$$E_{Ca} = \frac{RT}{z_{Ca}F} \ln \frac{[Ca]_{ext}}{[Ca]_{int}} \approx 120 \text{ mV}$$

Avec : $RT/F \approx 25 \text{ mV}$ à 22°C , $z_{Ca} = 2$, $[Ca]_{ext} = 1.5 \text{ mM}$
 et $[Ca]_{int} = 10^{-4} \text{ mM}$

Au potentiel de repos ($\approx -80 \text{ mV}$, défini par les ions K^+), les canaux de type VDCC sont dans l'état fermé. Lorsque la membrane se dépolarise, le canal change de conformation et laisse passer les ions. Au bout d'un certain temps (T_{inact}), le canal passe dans un état inactivé : la protéine change de conformation, ne permettant plus le passage des ions malgré le maintien de la dépolarisation (Voir Tableau 2 pour un résumé des propriétés biophysiques).

La réponse des canaux de type VDCC au changement de potentiel membranaire définit le « gating », à savoir les propriétés des différents états du canal : fermé, activé et inactivé (Yellen 1998, Hille 2001).

1.2.2.1. Activation

Pour les canaux ioniques dépendants du voltage, il y a trois parties importantes pour la dépendance en voltage : le pore, le senseur à voltage S4 et la porte d'activation.

Il est très difficile pour une molécule chargée de traverser une bicouche lipidique spontanément. En effet, les membranes biologiques forment une haute barrière d'énergie pour les molécules chargées. Par contre, le pore du canal leur fournit un environnement favorable diminuant ainsi cette barrière. Le flux des ions dans le pore est proportionnel à : $V - V_R$, où V est le potentiel membranaire et V_R est le potentiel de Nerst de l'ion considéré (Bezanilla 2005). En réponse à une variation du potentiel membranaire, le canal s'ouvre ou s'active par l'intermédiaire du senseur de voltage S4 et de la porte d'activation (Yellen 1998).

1.2.2.1.1. Le senseur de voltage S4

La protéine-canal ressent les changements de potentiel membranaire par le segment S4 car il contient de nombreux acides aminés chargés positivement (arginine et lysine) intercalés à travers de nombreux résidus hydrophobes (Hille 2001). Puisque le potentiel de repos de la cellule est négatif par rapport à l'extérieur, les résidus positifs du S4 tendent à s'orienter vers le côté interne de la cellule. Lors d'une dépolarisation, la polarité cellulaire s'inverse et les résidus positifs du S4 se déplacent vers l'extérieur. C'est le déplacement de ces particules chargées positivement qui crée le courant de « gating » (Bezanilla and Stefani 1998) et qui est responsable du changement de conformation de la protéine (activation du canal) (Bezanilla 2005).

En 1989, le groupe de Numa a été le premier à montrer l'implication des charges positives des segments IS4 et IIS4 dans l'activation du canal sodique de cerveau de rat en introduisant des résidus négatifs ou des résidus non chargés (Stuhmer et al. 1989). Plus tard, Kontis et collaborateurs ont raffiné cette étude en montrant que seulement certaines mutations agissaient sur la dépendance en voltage de l'activation et sur la charge de « gating » (« gating valence », représentée par la pente de la courbe d'activation) (Kontis et al. 1997). Les effets les plus prononcés impliquent le 4^{ième} résidu des domaines

I, II et III. Par exemple, les neutralisations IK4Q et IIK4Q montrent un déplacement significatif du potentiel de mi-activation vers le positif (respectivement, environ +18 mV et +15 mV) et une réduction notable de la charge de « gating ». Au niveau du domaine III, le groupe de Goldin observe un déplacement négatif du potentiel de mi-activation (≈ -18 mV) avec la neutralisation IIIR4Q tandis que la mutation IVR4Q se compare au contrôle. Le segment IVS4 ne semblerait donc pas être impliqué dans la dépendance en voltage de l'activation (Kontis et al. 1997).

La figure 7 décrit trois modèles de mouvement du senseur à voltage. Dans le modèle « vis hélicoïdale », le S4 tourne autour de son axe en même temps qu'il avance, changeant ainsi l'exposition de ses résidus du côté intracellulaire vers le milieu extracellulaire (Figure 7A). Dans le modèle « transporteur », les charges se trouvent dans différentes cavités aqueuses à l'état ouvert ou fermé, le changement de conformation se fait par une rotation et une inclinaison, sans translation du segment (Figure 7B). Pour le modèle de la « pagaie », les charges en périphérie du canal sont enfouies dans la membrane. Quoi qu'il en soit, le segment S4 subit une grande translocation afin que les charges soient exposées du côté extracellulaire lorsque le canal est ouvert (Figure 7C) (Bezanilla 2005).

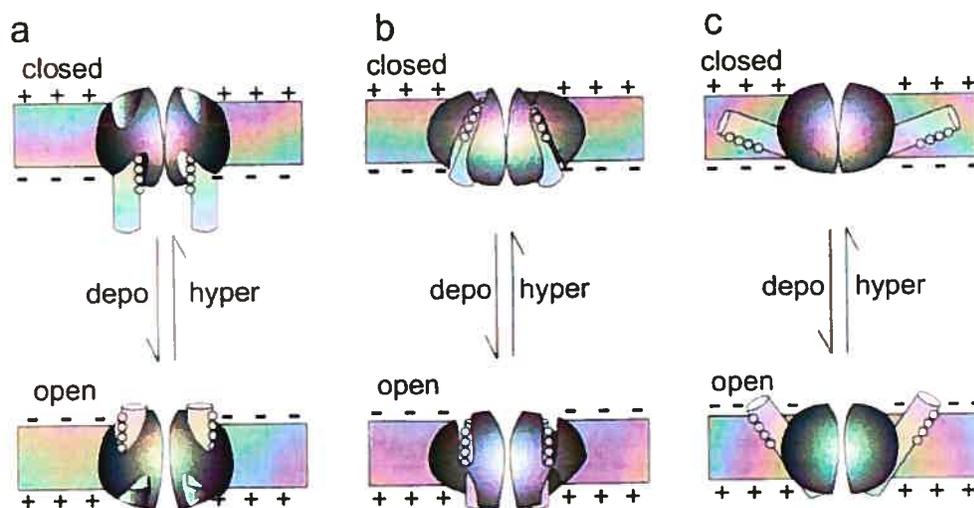


Figure 7. Les trois modèles du senseur à voltage S4. A. le modèle « vis hélicoïdale », B. le modèle « transporteur », C. le modèle de la « pagaie » (Bezanilla 2005).

1.2.2.1.2. La porte d'activation

Au cours des dernières années, de nombreuses structures cristallines de canaux potassiques ont été résolues. À ce jour, quatre canaux bactériens ont été cristallisés : KcsA et KirBac1.1 à l'état fermé, MthK et KvAP à l'état ouvert ainsi qu'un canal présent chez les mammifères $K_v1.2$ (de type *Shaker*). L'analyse de leurs structures montre l'implication du segment M2/S6 (Figure 8) dans la porte d'activation des canaux potassiques (Doyle et al. 1998, Perozo et al. 1999, Hackos et al. 2002, Jiang et al. 2002a, Jiang et al. 2003, Kuo et al. 2003, Long et al. 2005).

Dans la famille des canaux de type *Shaker*, K_v , un motif PXP (où X est un résidu hydrophobe quelconque) est strictement conservé au niveau du segment S6. Cette séquence, non présente sur les canaux K^+ d'origine prokaryote, agirait comme un pivot de la porte d'activation. Une analyse de mutagenèse dirigée dans cette région sur le canal de type *Shaker* montre les effets dramatiques des mutations sur le motif PVP, à savoir des protéines mutées retenues au niveau de RE ou des canaux non fonctionnels (Hackos et al. 2002). Contrairement à ces canaux, il a été proposé pour les canaux KcsA et MthK, un modèle de « gating » basé sur les mouvements des hélices internes à partir d'une glycine conservée (voir figure 8) (Jiang et al. 2002b). En 2004, le groupe de Yellen a proposé un modèle de « gating » qui impliquerait à la fois le motif PXP et le résidu glycine conservé. À partir d'expériences sur le canal de type *Shaker* : formation de ponts-métaux de haute affinité entre le Cd^{2+} et des histidines ou cystéines environnantes (natives ou introduites comme à la place de la valine dans PVP), l'inhibition des ions peut se faire de façon réversible ou irréversible lorsque le pont implique quatre résidus. En combinant des deux modèles, le mouvement d'ouverture se ferait en pivotant autour du résidu glycine, tout en tournant le motif PVP de façon à qu'il reste accessible pour former les ponts-métaux (Webster et al. 2004).

Au niveau évolutif, les canaux calciques de type VDCC sont probablement reliés aux canaux potassiques K_v . Les segments S5 et S6 forment aussi le pore interne (Swartz 2004, Long et al. 2005, Zhen et al. 2005) et les segments S4 ont la même caractéristique, à savoir la conservation de nombreux résidus chargés positivement (Hille 2001). La figure 8 montre que les trois résidus glycine du IS6 conservés au niveau des canaux de type HVA, sont aussi alignés avec la porte d'activation des canaux K^+ , ce qui suggère des mécanismes similaires de « gating ». Le groupe de Yang a localisé la porte d'activation du canal $Ca_v2.1$ en étudiant l'effet des composés MTSET sur la dépendance de l'état ouvert/fermé du canal au niveau des quatre segments S6. Pour le IS6, ils ont placé l'interface membrane/cytoplasme au niveau de la troisième glycine conservée (G3 sur la figure 8). Pour les résidus au dessus de l'interface, leur taux de modification par les MTSET est 1000 fois plus rapide à l'état ouvert qu'à l'état fermé. Par contre, les acides aminés situés à l'interface ou plus bas sont modifiés à la même vitesse dans les deux états du canal. Par conséquent, les segments S6 changeraient de conformation durant le processus de « gating » et la porte d'activation des canaux de type VDCC se situerait dans la partie intracellulaire terminale du pore (Xie et al. 2005).

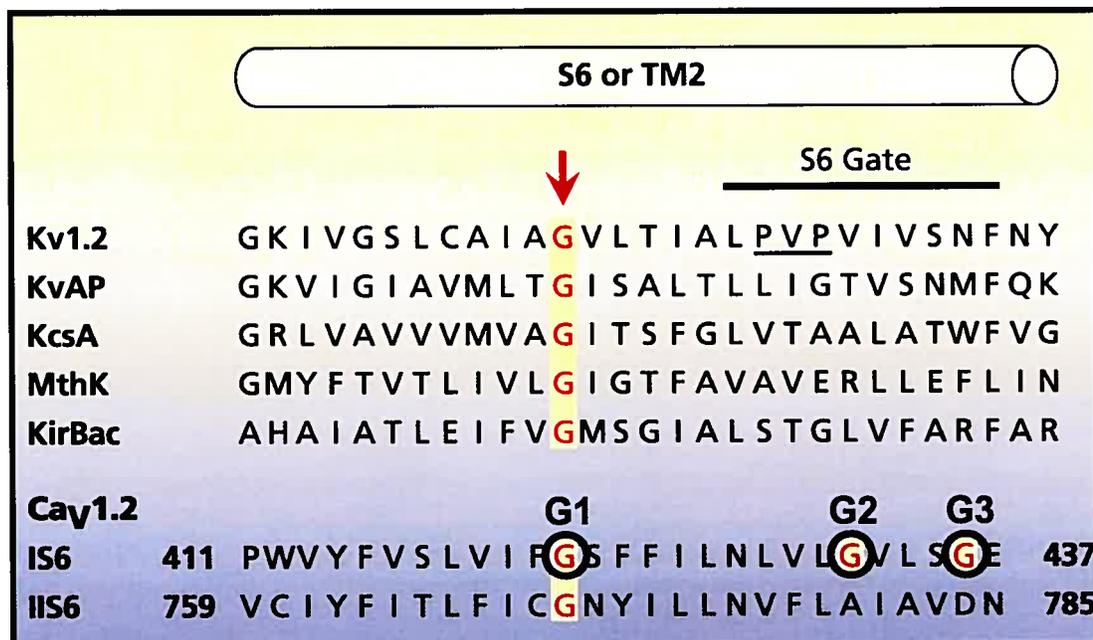


Figure 8. Alignement de séquences de Kv2.1, KcsA, MthK et KirBac1.1 avec Ca_v1.2. L'alignement des canaux potassiques avec Ca_v1.2 se fait à partir du résidu glycine (flèche rouge) susceptible d'agir comme un pivot de la porte d'activation. On note aussi la présence des trois résidus glycine du IS6 (G1, G2 et G3) conservés au niveau des canaux calciques de type HVA. Modifié de (Kitaguchi et al. 2004).

1.2.2.2. Inactivation

1.2.2.2.1. Inactivation dépendante du voltage (VDI)

De façon générale, l'inactivation, commune à plusieurs types de canaux ioniques qui dépendent du voltage, décrit leur tendance à inhiber le passage des ions en réponse à un stimulus électrique prolongé.

L'inactivation de type VDI est bien différente de la fermeture (déactivation) des canaux (Yellen 1998). Deux mécanismes rapides ont été bien étudiés : le modèle de « Ball and Chain » des canaux potassiques et le modèle « Hinged-Lid » des canaux sodiques (Catterall 1996, Stotz and Zamponi 2001a).

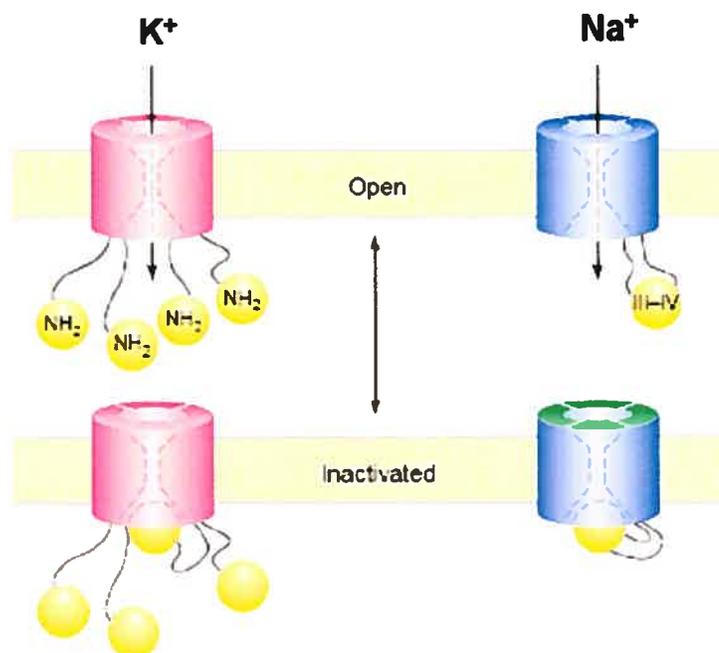


Figure 9. Mécanisme d'inactivation rapide des canaux K^+ et Na^+ . L'inactivation se ferait par une occlusion physique du pore via une particule de gating. Pour les canaux K^+ de type *Shaker*, la partie N-terminale des quatre sous-unités $\alpha 1$ identiques vient se placer sous le pore afin d'inhiber le passage des ions. Pour les canaux sodiques, c'est le motif IFM de la boucle III-IV qui est responsable de leur inactivation rapide (Catterall 1996, Stotz and Zamponi 2001a)

Il existe de nombreux déterminants moléculaires responsables de l'inactivation de type VDI (Zhang et al. 1994, Spaetgens and Zamponi 1999, Stotz et al. 2000). Le groupe de RW Tsien fut le premier groupe à étudier les déterminants moléculaires de l'inactivation. Comme les canaux de type VDCC possèdent des cinétiques d'inactivation spécifiques (Tableau 2), ils ont pu mettre en évidence les régions impliquées par un procédé de chimères entre différents canaux : $Ca_v2.1$, $Ca_v1.2$, et $Ca_v2.3$. Ils en ont conclu que la région du segment IS6 jouait un certain rôle dans les propriétés d'inactivation. Toutefois, il leur a été impossible d'identifier clairement le mécanisme puisque les différences observées étaient peu significatives (Zhang et al. 1994).

Toujours par procédé chimérique (entre $Ca_v1.2$, et $Ca_v2.3$), le groupe de Zamponi a étendu les propriétés d'inactivation à tous les autres domaines, en particulier aux domaines II et III. Ils ont émis l'hypothèse que l'inactivation résultait d'un changement global de la conformation de la protéine comparable à l'inactivation lente de type C des canaux potassiques (constriction du filtre de sélectivité et de la portion externe du pore) (Kukuljan et al. 1995, Yellen 1998, Spaetgens and Zamponi 1999).

Les segments S6 de tous les domaines seraient impliqués. En effet, des substitutions de IIS6 ou IIIS6 de $Ca_v2.3$ dans le canal $Ca_v1.2$ montrent le même phénotype d'inactivation rapide que le canal $Ca_v2.3$ (Stotz et al. 2000). Certaines mutations du canal $Ca_v2.1$ causant la migraine hémiplégique de type familial sont situées au niveau des segments II et IVS6 mais aussi dans le pore au niveau du filtre de sélectivité. Celles localisées au niveau des S6 accélèrent l'inactivation du canal (Kraus et al. 1998, Kraus et al. 2000).

Bien que la partie C-terminale soit surtout impliquée dans l'inactivation dépendante du calcium (Voir section 2.2.3), elle peut être aussi associée à l'inactivation dépendante de voltage. Cela a été décrit par différents procédés : l'expression de plusieurs isoformes (issus de l'épissage alternatif) de $Ca_v1.2$ (Soldatov et al. 1997) ou de $Ca_v2.1$ (Sandoz et al. 2001), ou par des mutations ponctuelles au niveau du glutamate 1537 du motif « EF hand » (Bernatchez et al. 1998).

La boucle cytoplasmique reliant les domaines I et II est la région principalement responsable des propriétés d'inactivation dépendantes du voltage dans les canaux calciques de type HVA. Son implication a été décrite par des constructions chimériques entre plusieurs isoformes ou plusieurs canaux. Bourinet et collaborateurs ont travaillé sur le canal $Ca_v2.1$ plus particulièrement sur deux isoformes issus de l'épissage alternatif : $Ca_v2.1_a$ et $Ca_v2.1_b$. Il y a plusieurs différences dont la présence d'une valine

supplémentaire au niveau de la boucle I-II de $Ca_v2.1_b$. Au niveau des propriétés d'inactivation, l'isoforme $Ca_v2.1_b$ possède des cinétiques beaucoup plus lentes et son potentiel de mi-inactivation est déplacé de + 20 mV. La construction de la chimère $Ca_v2.1_a$ avec la boucle I-II de $Ca_v2.1_b$ convertit un phénotype de type Q vers un phénotype de type P (Bourinet et al. 1999). Des études chimériques entre $Ca_v1.2$ et $Ca_v2.3$ dans différents laboratoires confirme que l'insertion de la boucle I-II de $Ca_v2.3$ sur $Ca_v1.2$ confère à ce dernier une inactivation beaucoup plus rapide (Stotz et al. 2000, Bernatchez et al. 2001b, Stotz and Zamponi 2001b). Une analyse de mutagenèse dirigée de la boucle I-II du canal $Ca_v1.2$ (Dafi et al. 2004) implique des résidus chargés négativement de la partie N-terminale du AID (E461, E462 et D463) dans l'inactivation dépendante du voltage. Les chaînes latérales de ces trois résidus se projettent en direction opposée à l'interaction avec la sous-unité $Ca_v\beta$ (Figure 6). Leurs mutations en résidus neutres ou chargés positivement accélèrent les cinétiques d'inactivation du canal $Ca_v1.2$. En effet, la fraction du courant résiduel à 300 ms et à 20 mV est de l'ordre de 0.3 pour $Ca_v1.2$ E462R comparé à 0.7 pour $Ca_v1.2$ de type sauvage. Finalement, un modèle d'inactivation impliquant la boucle I-II, comparable au modèle « Hinged Lid » des canaux sodiques (Voir figures 9 et 16), a été proposé pour les canaux VDCC par plusieurs groupes (Stotz et al. 2000, Bernatchez et al. 2001b). Rappelons que cette boucle contient aussi la région spécifique d'interaction avec les sous-unités $Ca_v\beta$. C'est une interaction clé pour les propriétés de « gating » sur laquelle nous reviendrons (Partie 2.1.2.2).

Bien que l'inactivation soit une propriété intrinsèque de la sous-unité $Ca_v\alpha1$ et que la boucle I-II soit déterminante, d'autres régions participent de façon secondaire, telles que : l'extrémité amino-terminale (Stephens et al. 2000) ou les boucles II-III et III-IV. La délétion d'une partie de la boucle II-III dans le canal $Ca_v2.2$ montre peu d'effet au niveau des cinétiques d'inactivation mais déplace le potentiel de mi-inactivation d'environ +25 mV (Kaneko et al. 2002).

Geid et collaborateurs ont montré par protéines de fusion que la boucle II-III pourrait interagir avec la boucle I-II du canal $Ca_v2.1$ avec une affinité de 350 nM. De plus, la boucle III-IV interagirait aussi avec la boucle I-II. La surexpression de la boucle III-IV accélère les cinétiques d'inactivation du canal $Ca_v2.1$. Cependant, la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta4$ antagonise la liaison de la boucle III-IV sur la boucle I-II (Geib et al. 2002). Des études non publiées effectuées sur le canal $Ca_v2.3$ dans le laboratoire du Dr Lucie Parent n'ont pas permis de reproduire ces résultats (Berrou et al. 2002).

1.2.2.2. Inactivation dépendante du calcium (CDI)

L'inactivation dépendante du calcium (CDI) a d'abord été décrite dans les canaux calciques cardiaque de type L puis sur les canaux de type N et P/Q. Les canaux $Ca_v1.2$ sont fortement régulés par le calcium intracellulaire. Ce mécanisme de rétrocontrôle négatif aboutit à une inactivation CDI plus rapide que la VDI pour ces canaux (Catterall 2000, Lacinova and Hofmann 2005). La présence du motif « EF hand » dans la partie C-terminale a d'abord été impliquée dans l'inactivation dépendante du calcium. En effet, le groupe de Yue l'a mis en évidence par la construction de chimères entre $Ca_v1.2$ et $Ca_v2.3$ car ce dernier ne possède pas d'inactivation de type CDI (de Leon et al. 1995).

Cependant, ce motif ne serait pas le seul responsable de la détection du calcium intracellulaire. En étudiant plusieurs isoformes du canal $Ca_v1.2$, le groupe de Reuter a montré que l'exon responsable de l'accélération de l'inactivation de canal codait pour une séquence possédant un motif IQ (Zuhlke and Reuter 1998), responsable de l'interaction avec la calmoduline (CaM) (Rhoads and Friedberg 1997). En effet, des nombreuses mutations dans ce motif montrent que la CaM a des effets critiques sur l'inactivation de

Ca_v1.2 et la facilitation dépendante du calcium de Ca_v2.1 (Zuhlke et al. 1999, Zuhlke et al. 2000). La récente structure cristalline du complexe Ca²⁺/CaM/Ca_v1.2-IQ a montré que le domaine IQ forme une hélice α qui est enchâssée au milieu des deux lobes C et N-terminaux de la CaM, et qu'il interagit de façon électrostatique et hydrophobique avec le lobe C (Van Petegem et al. 2005).

1.2.3. Modulation des propriétés de « gating » par les sous-unités auxiliaires

L'hétérogénéité et le fonctionnement des canaux de type VDCC pourraient s'expliquer par les différents types d'interaction et donc de modulation avec les sous-unités auxiliaires. Ces interactions leur confèrent entre autres des propriétés de « gating », des cinétiques d'activation et d'inactivation spécifiques, et un adressage membranaire particulier (Walker and De Waard 1998).

Typiquement, la co-injection d'une sous-unité Ca_v β augmente les densités de courants, module les cinétiques d'activation et d'inactivation des canaux Ca_v α 1 de type HVA exprimés dans les ovocytes de *Xénope*. Pour la majorité des canaux HVA, les sous-unités Ca_v β 1 et Ca_v β 3 déplacent les potentiels de mi-activation et de mi-inactivation vers les potentiels hyperpolarisants et accélèrent l'inactivation du canal. Par contre, la sous-unité Ca_v β 2a tend à déplacer l'activation du canal vers des potentiels dépolarisants et à ralentir les cinétiques d'inactivation (Walker and De Waard 1998). Par exemple pour Ca_v2.3, les modifications des cinétiques d'inactivation se font dans l'ordre : Ca_v β 3 > Ca_v β 1 > Ca_v β 4 >> Ca_v β 2a, de la plus rapide à la plus lente (Parent et al. 1997). Le ralentissement est critique avec Ca_v β 2a à cause de sa palmitoylation membranaire (Dafi et al. 2004, Leroy et al. 2005).

La sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$ seule ne semble avoir que très peu d'effet sur les cinétiques d'inactivation et les densités d'expression. Par contre, la co-expression à la fois des sous-unités $Ca_v\beta$ et $Ca_v\alpha_2\delta$ potentialise la modulation. Il s'agit d'un mécanisme de coopérativité entre les deux sous-unités. Par exemple, en présence d'une faible concentration de $Ca_v\beta$, $Ca_v\alpha_2\delta$ semble favoriser l'attachement de $Ca_v\beta$ à $Ca_v\alpha_1$ (Gurnett et al. 1996, Parent et al. 1997, Walker and De Waard 1998). Il est possible que la modulation par les sous-unités auxiliaires change avec le système d'expression. Le groupe de Zamponi a étudié les effets des sous-unités $Ca_v\beta$ (1 à 4) et $Ca_v\alpha_2\delta$ sur les canaux de type L, N et R dans des cellules de mammifères tsA-201. Dans ce cas, la sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$ seule est capable d'augmenter les amplitudes de courant des canaux de la famille Ca_v2 (Yasuda et al. 2004). Cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits par d'autres groupes.

Les principaux effets de la sous-unité $Ca_v\gamma$ seraient d'augmenter les maxima de courant, d'accélérer l'activation et de déplacer le potentiel de mi-activation vers les potentiels hyperpolarisants (Walker and De Waard 1998). Cependant, la modulation dépend du canal et des autres sous-unités auxiliaires présentes. Le laboratoire de Charnet a montré un déplacement vers les potentiels plus négatifs du potentiel de mi-activation et une augmentation de l'inactivation du canal de type P/Q, exprimé dans des ovocytes de *Xénope* en présence des sous-unités $Ca_v\gamma_2$, γ_3 ou γ_4 , $Ca_v\alpha_2\delta$ et de différentes sous-unités $Ca_v\beta$. Néanmoins, l'effet sur les paramètres de « gating » est fonction de la sous-unité $Ca_v\beta$ utilisée : aucun changement n'est observé en présence de $Ca_v\beta_{1b}$ (Rousset et al. 2001). Parmi les huit différentes sous-unités $Ca_v\gamma$, seule la $Ca_v\gamma_6$ module le canal de type T, $Ca_v3.1$. Dans ce cas, les densités de courants sont diminuées significativement et la dépendance en voltage de l'activation et de l'inactivation n'est pas affectée (Hansen et al. 2004).

1.3. Le canal $Ca_v1.2$ impliqué dans un allongement de l'intervalle QT

1.3.1. Activité électrique du cœur

Le cœur est un organe électrique composé de cellules musculaires excitables dont l'activité est mesurable par électrocardiogramme (ECG). Le système électrique du cœur se divise en trois parties : le nœud sinusal, nœud auriculo-ventriculaire et le système His-Purkinje.

L'activité électrique du cœur (Figure 10) prend naissance au niveau du nœud sinusal de l'oreillette droite puis se propage à l'oreillette gauche. Ce nœud est un stimulateur cardiaque naturel du cœur qui détermine la fréquence cardiaque. Le passage de l'influx électrique dans le cœur supérieur où se retrouvent les deux oreillettes, correspond à l'onde P sur l'ECG.

Afin de permettre le remplissage des ventricules, via la contraction des oreillettes, une courte pause se produit lorsque l'impulsion électrique atteint le nœud auriculo-ventriculaire. Ce dernier est un véritable pont électrique du cœur, il permet le passage de l'activité électrique entre les oreillettes et le cœur inférieur où se retrouvent les deux ventricules.

La dépolarisation se répand ensuite dans le système His-Purkinje qui un tissu conducteur permettant ainsi la propagation de l'activité électrique au niveau des deux ventricules. Ce système débute par le faisceau de His qui se sépare ensuite en deux branches (droite et gauche) complétées à la fin par les fibres de Purkinje. L'activation électrique du cœur inférieur se traduit par les ondes Q, R, et S, formant le complexe QRS sur l'ECG.

La dernière phase de l'ECG est l'onde T qui correspond à la repolarisation des myocytes ventriculaires. (Sperelakis N. 2001)

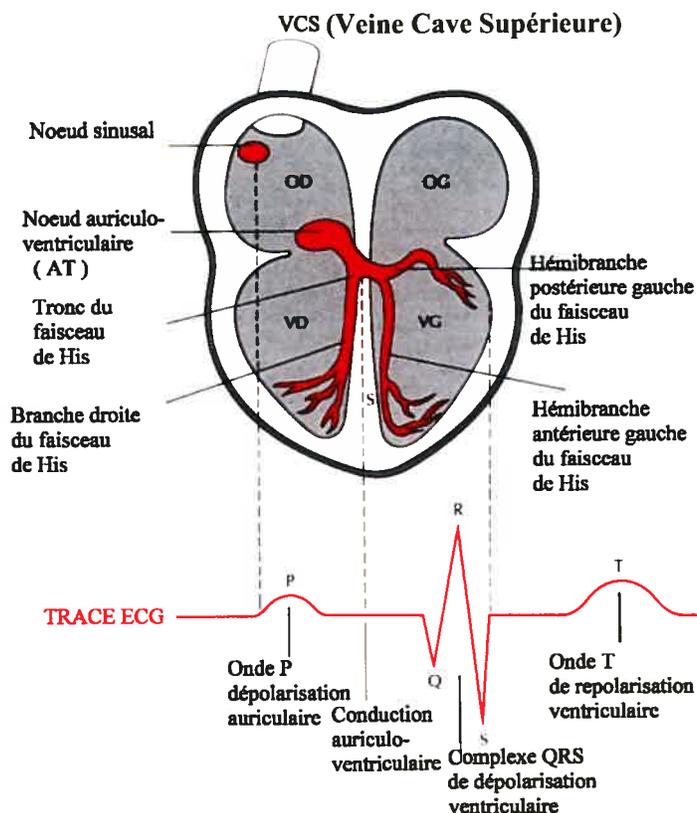


Figure 10. Fonctionnement électrique du cœur et ECG. L'activité électrique prend naissance au niveau du nœud sinusal de l'oreillette droite (OD) puis se propage à l'oreillette gauche (OG), correspondant à l'onde P sur l'ECG. Après une courte pause permettant le remplissage des ventricules droit et gauche (VD et VG), l'impulsion électrique atteint ensuite le faisceau de His qui se sépare en deux branches afin de propager l'activation électrique au niveau des deux ventricules, ce qui correspond au complexe QRS sur l'ECG. La repolarisation des myocytes ventriculaires correspond à l'onde T sur l'ECG (Sperelakis N. 2001). Figure modifiée de www.chusa.jussieu.fr/pedagogie/pcem1/biophysique.

1.3.2. Potentiel d'action cardiaque (PA) et courants ioniques

Il existe plusieurs formes du PA cardiaque en fonction de la région considérée (Nerbonne and Kass 2005) ; pour le syndrome du long QT, celui qui nous intéresse est le PA ventriculaire. Plusieurs courants sont responsables de chaque phase qui le compose. On distingue cinq phases (Figure 11) :

- La phase 0 correspond à la dépolarisation rapide. Elle implique l'entrée massive d'ions Na^+ dans la cellule via les canaux sodiques dépendants du voltage ($\text{Na}_v1.5$).
- La phase 1 est une phase de repolarisation transitoire due à l'inactivation des canaux Na_v et à l'activation des courants potassiques transitoires sortants indépendants du calcium (I_{t01}).
- La phase 2 est le plateau. Le potentiel membranaire reste relativement constant à cause d'un équilibre entre charges positives sortantes (K^+) et entrantes (Ca^{2+}). Les courants potassiques proviennent des canaux K^+ à rectification retardée (composantes ultra-rapides et rapides : respectivement, I_{Kur} et I_{Kr}) et des canaux K^+ dépendants du calcium intracellulaire (I_{t02}). Les courants calciques sont assurés majoritairement par les canaux de type L au niveau des cellules des ventricules. Les canaux de type T interviennent dans d'autres types cellulaires.
- La phase 3 est la phase de repolarisation finale durant laquelle il y a inactivation des canaux calciques dépendants du voltage et une augmentation des courants potassiques sortants impliquant les courants I_{Ks} et I_{Kr} des canaux K^+ à rectification retardée ainsi que les courants I_{K1} des canaux à rectification entrante.
- La phase 4 correspond au maintien du potentiel de repos membranaire assuré par les courants I_{K1} . Cette phase correspond aussi à la restauration des gradients ioniques qui est assurée par la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

(Pond and Nerbonne 2001, Sperelakis N. 2001, Nerbonne and Kass 2005)

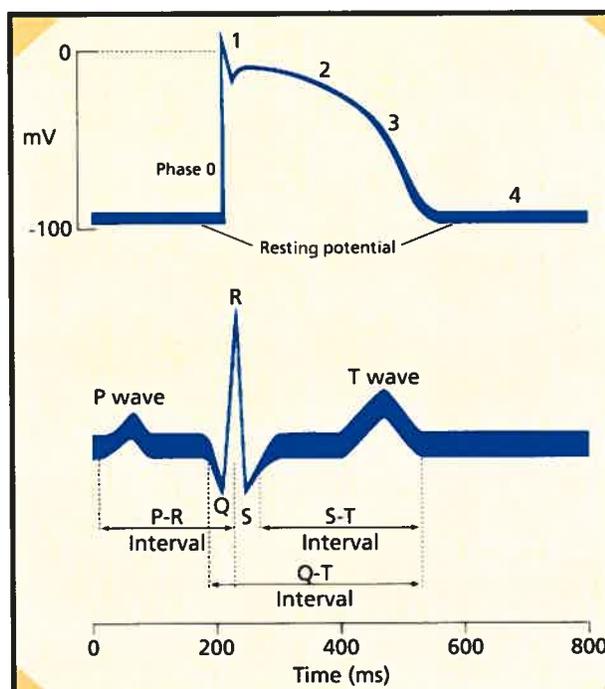


Figure 11. Correspondance entre PA ventriculaire et ECG. Plusieurs courants ioniques sont responsables des cinq phases du PA ventriculaire. La phase 0 correspond à une dépolarisation rapide (activation des canaux $Na_v1.5$). La phase 1 est une phase de repolarisation transitoire (inactivation des Na_v et activation des courants potassiques I_{to1}). La phase 2 est le plateau (activation des canaux $Ca_v1.2$ et courants potassiques I_{kur} , I_{kr} et I_{to2}). La phase 3 est la repolarisation finale (courants I_{ks} , I_{kr} , I_{k1} et inactivation des canaux $Ca_v1.2$). La phase 4 correspond au maintien du potentiel de repos assuré par les canaux K_{ir} (I_{k1}) et à la restauration de gradient ionique par la pompe $Na^+/K^+-ATPase$ et l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (Pond and Nerbonne 2001, Sperelakis N. 2001, Nerbonne and Kass 2005).

1.3.3. Long QT (LQT) et Torsades de Pointes

L'intervalle QT correspond à la durée de la repolarisation ventriculaire, représentée par le complexe QRS et l'onde T. Sa valeur varie avec le rythme cardiaque (intervalle RR sur ECG) d'un individu et lui est inversement proportionnelle. Par conséquent, sa valeur est corrigée (QTc) selon la formule de Bazett (Bazett 1920): $QTc = QT / RR^{1/2}$.

Il y a allongement de l'intervalle QT lorsque le QTc dépasse 450 ms pour un homme et 470 ms pour une femme (Schwartz et al. 1993). Il existe deux types d'allongement de l'intervalle QT : le long QT congénital (section suivante) et le long QT acquis. Ce dernier est induit par de nombreux médicaments qui peuvent inclure la quinine (Dessertenne et al. 1969) ou des drogues antipsychotiques (Glassman and Bigger 2001).

L'allongement de l'intervalle QT correspond à un délai dans la repolarisation des myocytes ventriculaires pouvant aboutir à l'apparition de Torsades de Pointes. Les Torsades de Pointes sont des tachycardies ventriculaires polymorphes souvent asymptomatiques quand elles sont brèves mais elles peuvent dégénérer en fibrillation ventriculaire et provoquer la mort subite lorsqu'elles sont répétées ou de longue durée. Elles seraient probablement initiées par l'apparition de post-dépolarisations précoces ou « Early After Depolarisation » (EAD) à cause de l'allongement de l'intervalle QT qui retarde la repolarisation ventriculaire. Les Torsades de Pointes sont caractérisées par des complexes QRS très rapides, d'amplitude élargie et de polarité variable (les complexes oscillent autour de l'axe isoélectrique) (Viskin 1999, Glassman and Bigger 2001, Khan 2002).

1.3.4. Les différents types de LQT congénitaux

Il existe huit différents LQT congénitaux connus à ce jour (Figure 12) qui impliquent les canaux potassiques, sodiques, calciques cardiaques et une protéine d'ancrage (Ankyrine B). Il existe deux causes principales de l'allongement de l'intervalle QT congénital. Premièrement, les courants de dépolarisation (entrants) peuvent augmenter, par exemple par un défaut dans l'inactivation des canaux $Na_v1.5$ et $Ca_v1.2$. Deuxièmement, les courants de repolarisation (sortants) peuvent être réduits du fait d'un problème dans le ciblage de certains canaux K^+ . La majorité des mutations impliquent les sous-

unités α des canaux K^+ (LQT1, 2 et 7), Na^+ (LQT3) et la sous-unité α_1 des canaux Ca^{2+} (LQT8). Ces mutations sont nombreuses et réparties aléatoirement sur toute la structure de la sous-unité impliquée. Des mutations ponctuelles touchent aussi les sous-unités β des canaux K^+ (LQT5 et 6). (Splawski et al. 2004, Priori and Cerrone 2005, Splawski et al. 2005, Tester et al. 2005)

Gènes associés à l'allongement de l'intervalle QT					
Phénotype	Locus	Transmission	Gène	Protéine	Défaut
LQT1	11p15.5	Dominante autosomale (DA)	<i>KCNQ1</i>	Sous-unité alpha du canal K^+ I_{Ks} (KvLQT1)	Ciblage/adressage (perte de fonction)
LQT2	7q35-q36	DA	<i>KCNH2</i>	Sous-unité-alpha du canal K^+ I_{Kr} (HERG)	Ciblage/adressage (perte de fonction)
LQT3	3p21	DA	<i>SCN5A</i>	Sous-unité alpha du canal Na^+ cardiaque ($Na_v1.5$)	Inactivation incomplète (gain de fonction)
LQT4	4q25-q27	DA	<i>ANK2</i>	Protéine d'ancrage, Ankyrine B	Ancrage déficient (perte de fonction)
LQT5	21q22.1-q22.2	DA	<i>KCNE1</i>	Sous-unité bêta du canal K^+ I_{Ks} (MinK)	Ciblage/adressage (perte de fonction)
LQT6	21q22.1-q22.2	DA	<i>KCNE2</i>	Sous-unité bêta du canal K^+ I_{K1} (MiRP)	Ciblage/adressage (perte de fonction)
LQT7	17q23.1-q24.2	DA	<i>KCNJ2</i>	Canal K^+ à rectification entrante I_{K1} (Kir2.1)	Ciblage/adressage (perte de fonction)
LQT8	12q13.3	DA	<i>CACNA1C</i>	Sous-unité alpha du canal calcique cardiaque de type-L ($Ca_v1.2$)	Inactivation ralentie (gain de fonction)

Figure 12. LQT congénitaux et le défaut de fonctionnement de leurs protéines associées. Modifié à partir de (Priori and Cerrone 2005)

1.3.5. Le syndrome de Timothy (ST)

Au cours des deux dernières années, le groupe de Keating (Splawski et al. 2004, Splawski et al. 2005) a caractérisé des mutations présentes dans le syndrome de Timothy (ST). Le syndrome de Timothy une maladie infantile très rare, causant des arythmies cardiaques, des anomalies congénitales comme les syndactylies (Figure 13), et plus rarement l'autisme. Deux mutations ponctuelles ont été identifiées sur le canal calcique humain $Ca_v1.2$: G402S et G406R. Après une série de dépolarisations de 2 s, le canal

s'inactive respectivement à 9 % et 12 % pour G402S et G406R en présence de Ba^{2+} , en comparaison de 90 % avec le canal de type sauvage. Seule la mutation G406R montre un décalage de -9 mV au niveau du potentiel d'activation, alors qu'il est comparable au canal de type sauvage dans l'autre cas (≈ 4.5 mV). À la position G406R, les auteurs ont aussi testé d'autres mutants (E, K, P, S, V et A) : quelque soit la nature physicochimique de la chaîne latérale introduite, les propriétés d'inactivation du canal semblent affectées (Splawski et al. 2005).

Chacune des deux mutations entraîne une abolition presque complète de l'inactivation du canal en présence de Ba^{2+} (Figure 14) : on a donc un gain de fonction au niveau de la phase plateau du PA (Phase 2 sur la figure 13). Un flux entrant et maintenu d'ions Ca^{2+} va retarder la repolarisation du cardiomyocyte (30% avec la mutation G406R sur l'exon 8 : voir figure 15) et allonger l'intervalle QT ($QTc \approx 650$ ms) sur l'ECG. Par conséquent, la probabilité d'apparition d'arythmies ventriculaires comme les Torsades de Pointes est augmentée (Splawski et al. 2004, Splawski et al. 2005).



Figure 13. Anomalies morphologiques du ST. Le syndrome de Timothy cause des anomalies morphologies comme les syndactylies congénitales (Splawski et al. 2004).

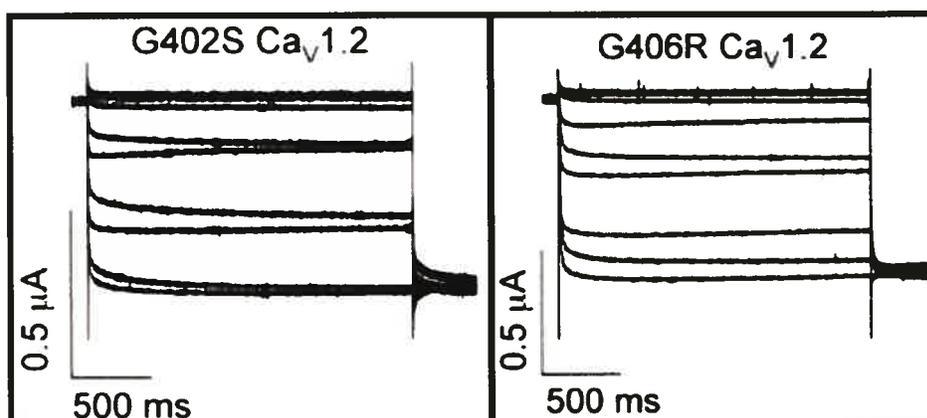


Figure 14. Courants Ba^{2+} avec les deux mutations du ST. Chacune des deux mutations du syndrome de Timothy entraîne une abolition presque complète de l'inactivation du canal. La position des courants de déactivation de ces deux enregistrements indiquent une surcompensation du protocole de soustraction (Splawski et al. 2005).

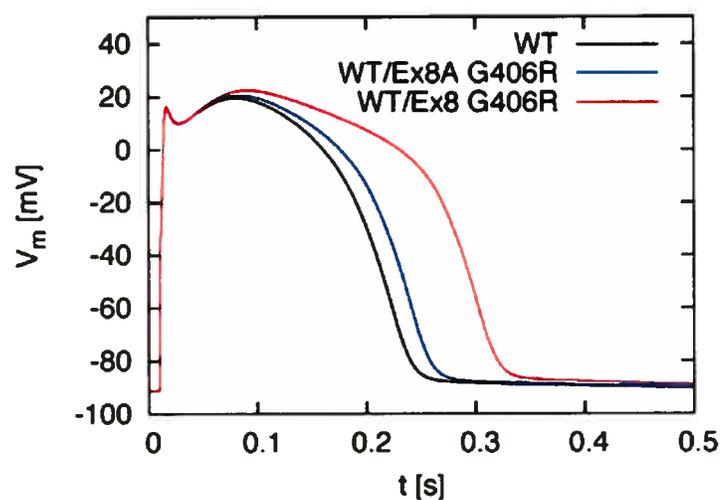


Figure 15. Prolongement du PA avec la mutation G406R. La modélisation du potentiel d'action cardiaque montre un retard dans la repolarisation du cardiomyocyte : 30 % avec la mutation G406R sur l'exon 8 (exon dominant) et 8 % avec la mutation G406R sur l'exon 8A (Splawski et al. 2005)

1.4. Hypothèse

Le gating des canaux de type VDCC implique le segment IS6 et la boucle cytoplasmique I-II. L'étude de la structure primaire de la région IS6 et d'une partie de la boucle I-II (avant le AID) au niveau des canaux calciques HVA montre que trois résidus glycine sont strictement conservés. La première est alignée avec la « glycine hinge » des canaux potassiques et les deux autres sont situées au niveau la porte d'activation de ces mêmes canaux (Figure 8 et section 2.2.1.2).

De plus, cette région présenterait une structure secondaire en hélice, tout comme celle du AID (« Alpha Interaction Domain ») co-cristallisée avec la sous-unité $Ca_v\beta 2a$. De part sa structure simple, la glycine confère une certaine flexibilité aux chaînes hélicoïdales. Ces trois résidus seraient peut-être impliqués dans l'activation et l'inactivation des canaux calciques, permettant ainsi à la boucle I-II de se déplacer. La glycine G436, située à l'interface membrane/cytoplasme du segment IS6 pourrait servir de pivot dans le modèle d'inactivation de type « hinged-lid » : suivant de longues dépolarisations, la boucle I-II se replierait sous le pore afin d'inhiber le passage des ions (Figure 16).

Une étude de mutagenèse dirigée nous permettra d'élucider le rôle de ces résidus glycine, en particulier celui de la glycine G436, dans le fonctionnement du canal $Ca_v1.2$, impliqué dans un allongement de l'intervalle QT (Syndrome de Timothy). Des mutations en A et P seront introduites pour tester la flexibilité des hélices : l'alanine favorise les structures hélicoïdales, alors que la proline tend à les casser. Pour tester les interactions électrostatiques et l'empilement de l'hélice, des mutations chargées et aromatiques seront introduites. Les effets de ces mutations seront étudiés en voltage imposé à deux électrodes, après expression recombinante des mutants dans des ovocytes de *Xénope*.

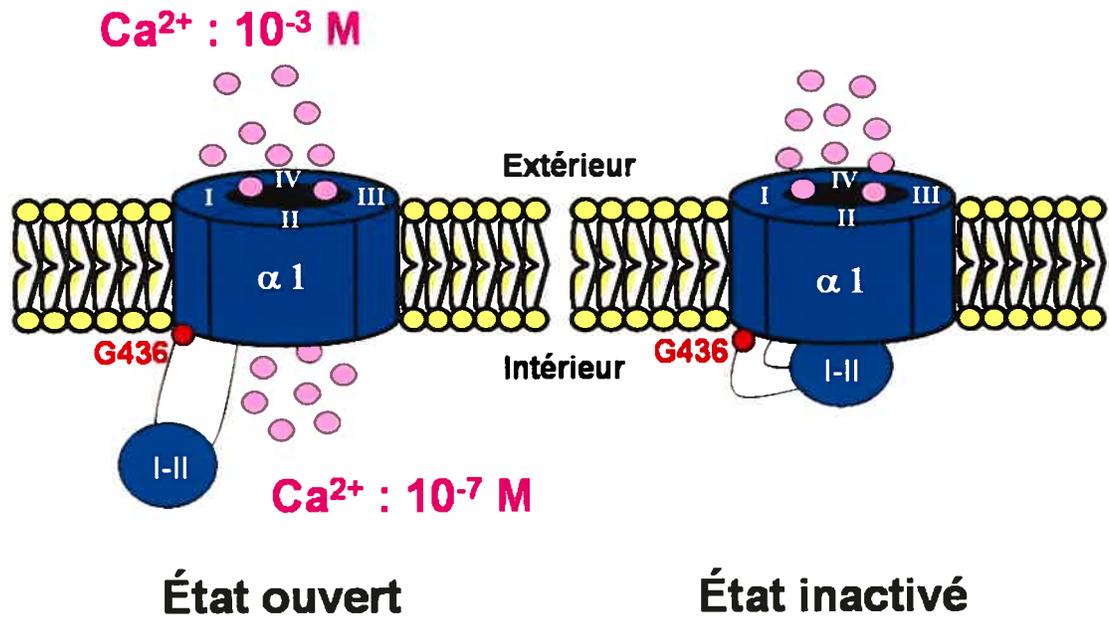


Figure 16. Modèle d'inactivation de type « Hinged-Lid ». Grâce à la glycine G436, située à l'interface membrane/cytoplasme du segment IS6, la boucle I-II se replierait sous le pore afin d'inhiber le passage des ions (Stotz et al. 2000, Bernatchez et al. 2001b)

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Techniques de biologie moléculaire

Les ADNc codants pour les protéines de type sauvage $Ca_v1.2$ (lapin, GenBank X15539), $Ca_v\beta3$ (rat, GenBank M88751) nous ont été donnés par le Dr. Edward Perez-Reyes. Quant à la sous-unité $Ca_v\alpha2\delta$ (rat, GenBank NM_00722), elle nous a été offerte par le Dr. Terry Snutch.

Un site de restriction pour l'enzyme *XhoI* a tout d'abord été introduit sur la boucle I-II du canal $Ca_v1.2$ à la position 511 (G511R). La protéine résultante $Ca_v1.2$ témoin montre des cinétiques d'activation et d'inactivation comparables à celles du canal de type sauvage (Berrou et al. 2001, Dafi et al. 2004). Les mutations des résidus glycine du IS6 ont été effectuées sur un fragment de $Ca_v1.2$, inclus entre les positions 956 (site naturel de restriction *SacI*) et 1530 nucléotides (site *XhoI* préalablement introduit), sous-clonée dans le vecteur pBlueScript. Les mutations du segment IIS6 (G770A et G770P) ont été directement introduites dans le canal $Ca_v1.2$ de type sauvage (vecteur pGEM). Les mutations sont introduites par PCR (*Polymerase Chain Reaction*), via la trousse *QuickChange™ XL* (Stratagene, La Jolla, CA), avec des amorces sens et anti-sens de 39 nucléotides chacune. Après avoir digéré l'ADN parental par l'enzyme *DpnI*, les produits de PCR sont amplifiés dans les bactéries ultracompétentes X-gold fournies avec la trousse *QuickChange™ XL* (Stratagene, La Jolla, CA). À ce stade, l'ADN muté est extrait en utilisant la trousse QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen, Mississauga, Ont). En utilisant les enzymes de restriction *SacI* et *XhoI*, les constructions du segment IS6 sont vérifiées sur gel d'agarose 1 % (révélé au bromure d'éthidium). Après purification de ce dernier, via la trousse Sephaglas™ BandPrep (Amersham Biosciences, Piscataway), le fragment muté est réintroduit, à l'aide de l'enzyme *T4 DNA Ligase*, entre les sites *SacI* et *XhoI* du canal $Ca_v1.2$ de type sauvage (vecteur pGEM) (Wei et al. 1991). Les

bactéries compétentes DH5 α sont transformées pour augmenter le nombre de copies de l'ADN. Finalement, ce dernier est extrait grâce à la trousse QIAfilter™ Plasmid Midi (Qiagen, Mississauga, Ont) et la construction vérifiée par séquençage automatisé dans les deux directions (Bio S&T, Lachine, Québec).

Avant la transcription en ARNm, la matrice d'ADN doit être linéarisée car elle est contenue dans un plasmide circulaire. L'enzyme de restriction *HindIII* permet d'effectuer cette étape sur les canaux mutés et de type sauvage. Les plasmides sous-unités auxiliaires Ca $v\beta$ 3 et Ca $v\alpha$ 2 δ sont linéarisées par l'enzyme *NotI*. Les ARNm sont obtenus grâce à la trousse de transcription mMessage T7 mMachine® (Ambion, Austin, TX). Après vérification de leur poids moléculaire et de leur intégrité sur gel d'agarose 1% (révélé au bromure d'éthidium), ils sont stockés à -20°C.

2.2. Expression fonctionnelle des canaux

L'expression fonctionnelle des canaux se fait au stade V et VI des ovocytes de grenouille, *Xenopus Laevis* (Nasco, Fort Atkinson, WI). Après une incubation dans une solution sans calcium (en mM : 82.5 NaCl; 2.5 KCl; 1 MgCl $_2$; 5 HEPES; pH 7.6) contenant 2 mg/ml de collagénase (Gibco, Burlington, Ontario, Canada), leur membrane folliculaire est détruite. Les ovocytes sont alors incubés dans une solution de Barth (en mM : 100 NaCl ; 2 KCl ; 1,8 CaCl $_2$; 1 MgCl $_2$; 5 HEPES ; 2,5 d'acide pyruvique ; 100 unités/ml de pénicilline ; 50 μ g/ml de gentamicine ; pH 7.6) pendant quelques heures avant leur utilisation. On prépare d'abord la solution à injecter (10 μ l) contenant 6 μ g d'ARNc codant pour le canal muté ou de type sauvage (Ca $v\alpha$ 1), ainsi que les ARNc des sous-unités auxiliaires Ca $v\beta$ 3 (3 μ g) et Ca $v\alpha$ 2 δ (2 μ g). On injecte un volume variant entre 4.6 et 46 nl (selon les

expériences à faire) de ce mélange dans les ovocytes qui seront incubés à 19°C dans une solution de Barth pendant 2 à 5 jours.

2.3. Enregistrements électrophysiologiques

Les courants macroscopiques en Ba^{2+} ou en Ca^{2+} sont mesurés par la technique du voltage imposé à deux électrodes via l'amplificateur OC-725C (Warner instruments, Hamdes, CT). Les deux électrodes en verre finement étirées sont remplies d'une solution contenant en mM : 3000 KCl, 1 EGTA et 10 HEPES (pH 7.4), dans le but d'obtenir une diffusion minimale lors des manipulations. La première électrode sert à imposer le voltage tandis que la seconde permet d'injecter mesurer le courant afin de maintenir ce voltage. Pour prévenir l'activation des courants Cl^- stimulés par le calcium intracellulaire, nous injectons dans les ovocytes 23 nl d'une solution d'EGTA 50 mM (Sigma, St-Louis, Mo), un chélateur de calcium, environ une demi-heure avant le début des expériences.

L'ovocyte est perforé avec les deux électrodes dans une solution contenant en mM : 120 NaCl, 2 KCl, 1 EGTA, 20 HEPES (pH = 7.4). En utilisant une perfusion par gravité à un débit de 2 ml/min, nous changeons la solution du bain : soit avec une solution de 10 Ba^{2+} (en mM : 10 $Ba(OH)_2$; 110 NaOH ; 1 KOH ; 20 HEPES ; pH 7.4 ajusté avec MeS) ou une solution de 10 Ca^{2+} (en mM : 10 $Ca(OH)_2$; 110 NaOH ; 1 KOH ; 20 HEPES ; pH 7.4 ajusté avec MeS). Nous mesurons ainsi les courants macroscopiques Ba^{2+} ou Ca^{2+} .

L'acquisition des données se fait avec le logiciel Clampex 8.2 (Molecular Devices, Axon instruments, Foster City, CA), à une fréquence de 5 kHz filtrée à 1 kHz grâce au filtre intégré de l'amplificateur. Deux protocoles de pulses enregistrent deux séries de données. Le premier (figure 17A) sert à obtenir la relation courant/voltage (I/V) pour caractériser les paramètres d'activation et

les propriétés des cinétiques d'inactivation du canal. À partir d'un potentiel de repos de -80 mV, nous appliquons une série de pulses dépolarisants entre -40 et $+50$ mV (par intervalle de 5 mV) durant 900 ms chacune. Grâce au deuxième protocole (figure 17B), la dépendance en voltage de l'inactivation du canal est mesurée (h_{5000}). En effet, à partir d'un potentiel de repos de -100 mV, nous nous plaçons à un potentiel test où le canal est ouvert ($+10$ mV), puis nous refermons le canal (-120 mV). Nous appliquons une série de voltages dépolarisants (de -100 à $+30$ mV par intervalle de 10 mV) pendant un temps suffisamment long, 5 s, pour que le canal puisse s'inactiver. Nous imposons ensuite le même potentiel test où nous mesurons la proportion des canaux ouverts (courants résiduels).

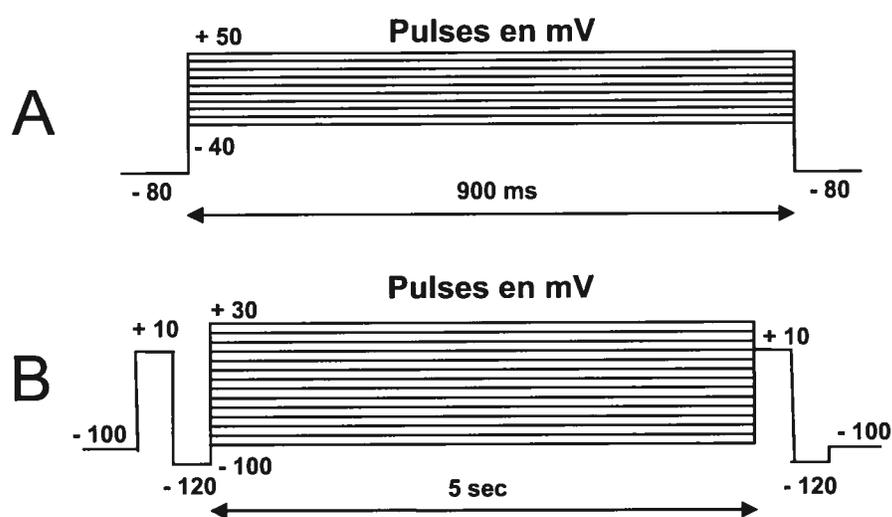


Figure 17. Protocoles de pulses. 17A. Protocole pour obtenir la courbe I/V. 17B. Protocole pour obtenir la dépendance en voltage de l'inactivation.

2.4. Analyse des données

Les données brutes (courants, voltages et temps), directement issues des protocoles A et B, sont extraites grâce à l'analyse statistique du logiciel Clampfit 8.2 (Molecular Devices, Axon Instruments, Foster City, CA). Elles sont ensuite transférées dans le logiciel Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA) pour y être analysées.

Dans Origin 7.0, nous utilisons deux lissages pour analyser les résultats. Le premier permet de tracer la courbe I/V . Pour chaque pulse appliqué, nous relèvons le courant maximal obtenu, puis les résultats sont ajustés avec une courbe de Boltzmann (Équation 1):

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

Avec : $E_{0.5,act}$ = potentiel de mi-activation, G_{rel} = conductance normalisée,
 z = paramètre de pente, V_m = potentiel test, V_{rev} = potentiel d'inversion,
 $RT/F \approx 25$ mV à 22°C

Le deuxième lissage permet d'évaluer la dépendance en voltage de l'inactivation. Pour chaque voltage imposé, nous faisons le rapport entre les courants maximums aux deux potentiels test, c'est-à-dire : avant et après la série de dépolarisations de 5 s (courbe h_{5000}). L'inactivation du canal $Ca_v1.2$ n'est que partielle car il faudrait des dépolarisations supérieures à 30 s pour obtenir une inactivation complète. Cette mesure n'est donc pas faite à des temps infinis car les courants Cl^- endogènes se superposeraient aux courants Ba^{2+} ou Ca^{2+} . Les données sont ensuite ajustées avec une équation de type Boltzmann (Équation 2) :

$$\frac{I}{I_{\max}} = 1 - \frac{(1 - Y_0)}{1 + \exp\left[-\frac{zF(V_m - E_{0.5,inact})}{RT}\right]} \quad (2)$$

Avec : $E_{0.5, inact}$ = potentiel de mi-inactivation, z = paramètre de pente,
 Y_0 = fraction de courant non inactivé, V_m = prépotentiel,
 $RT/F \approx 25$ mV à 22°C

Nous avons utilisé quatre paramètres pour décrire les propriétés biophysiques d'activation et d'inactivation du canal $Ca_v1.2$:

- Le « Time to peak » est directement issu de l'analyse statistique du logiciel Clampfit 8.2. Il représente le temps pour atteindre le maximum de courant macroscopique en Ba^{2+} ou Ca^{2+} et reflète les cinétiques d'activation du canal (Données provenant du protocole A).
- Le potentiel de mi-activation, $E_{0.5,act}$, est évalué à partir du lissage individuel de la courbe I/V (Équation 1) de chaque enregistrement (Données provenant du protocole A).
- Le R_{800} reflète les cinétiques d'inactivation du canal. Il représente la fraction de courant résiduel à 800 ms à un voltage donné pour chaque enregistrement (Données provenant du protocole A).
- Le potentiel de mi-inactivation, $E_{0.5,inact}$, est évalué à partir du lissage individuel de la courbe h_{5000} (Équation 2) de chaque enregistrement (Données provenant du protocole B).

Remarques : toutes les analyses ont été effectuées à partir des données normalisées par rapport aux maximums des courants (« Peak current »). Les valeurs obtenues à partir des courbes individuelles ont par la suite été moyennées (SEM expérimentales) par le logiciel Origin 7.0. Ce dernier nous a aussi permis d'effectuer des tests de variance (« *One-Way ANOVA* ») sur les paramètres de « gating », afin de vérifier statistiquement leurs variations entre les canaux Ca_v1.2 mutés et témoin (représentées par la valeur p). Nous considérons que, si $p < 0.001$: les populations sont statistiquement différentes.

Nous avons aussi introduit deux critères qui sont liés à nos méthodes de mesure et à leur limite (durée des protocoles de pulse et contamination par les courants Cl⁻ endogènes), afin que les quatre paramètres décrivant les propriétés biophysiques d'activation et d'inactivation du canal témoin aient un sens physique :

- **Critère 1** : il est basé sur les cinétiques d'activation du canal muté. La valeur du « Time to peak » à 10 mV nous a servi de critère pour calculer les R₈₀₀. Lorsque le temps d'activation est supérieur à 450 ms, ce qui représente la moitié de la durée d'un pulse dans le protocole I/V (Figure 17A), les courants résiduels à 800 ms ne sont pas évalués. En effet, nous ne pouvons pas évaluer l'inactivation d'un canal lorsque celui-ci n'est pas complètement activé.
- **Critère 2** : la dépendance en voltage de l'inactivation n'a été mesurée que pour les canaux possédant un R₈₀₀ < 0.75 à 10 mV. En effet, lorsque les cinétiques d'inactivation sont trop lentes, il est impossible d'évaluer le potentiel de mi-inactivation (E_{0.5,inact}) car le lissage de la courbe décrite par l'équation 2 n'est plus possible.

2.5. Immunobuvardage de type « Western »

Isolation des membranes totales d'ovocytes

Sept (7) ovocytes sont rincés avec une solution de Barth (en mM: 90 NaCl ; 3 KCl ; 0.82 MgSO₄ ; 0.4 CaCl₂ ; 0.33 Ca(NO₃)₂ ; 5 HEPES ; pH 7.6) et homogénéisés en pipettant avec une p200 dans 500 µl de tampon de lyse contenant : 500 µl de PBS (« Phosphate Buffer Saline ») + 0.5 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich). Les homogénats sont ensuite centrifugés à 500 × g pendant 5 min à 4°C. Les débris cellulaires tombent au fond. Nous récupérons le surnageant pour le centrifuger de nouveau à 10 000 × g pendant 30 min à 4°C. Le culot contenant les membranes totales d'ovocytes est suspendu dans 20 µl de tampon de lyse.

Préparation enrichie en membranes plasmiques d'ovocytes

Après avoir rincé 40 ovocytes avec une solution de Barth, nous les incubons 10 min à température de la pièce dans une solution de MBSS (en mM : 80 NaCl, 20 MES, pH 6.0) contenant 0.005% de subtilisine A (Sigma-Aldrich), sous une faible agitation, dans le but de digérer partiellement la membrane vitelline des œufs. La polymérisation de la membrane plasmique se fait en deux étapes, dans une solution de MBSS contenant : dans la première étape 1% de Ludox (Sigma-Aldrich) et dans la deuxième étape 0.1% d'acide polyacrylique (Sigma-Aldrich). Les deux étapes se font sous une faible agitation, à 4°C et pendant 60 min. Entre les deux étapes, les ovocytes sont bien rincés avec du MBSS. Ils sont ensuite homogénéisés à l'aide d'une pipette p200 dans 500 µl de HBA (en mM: 5 MgCl₂ ; 5 NaH₂PO₄ ; 1 EDTA ; 80 sucrose ; 20 Tris ; pH 7.4) contenant 5 µl de cocktail d'inhibiteur de protéases. La solution ainsi obtenue contient des amas de membranes plasmiques attachés à la membrane vitelline des ovocytes qui seront rendus visibles au cours des prochaines étapes de centrifugation.

Dans un premier temps, nous rajoutons 1 ml de HBA puis une centrifugation à $16 \times g$ est effectuée pendant 30 s, à 4°C . Nous enlevons le surnageant en laissant environ 150 μl dans le fond du tube Eppendorf puis nous complétons le volume à 1.5 ml avec du HBA en mélangeant lentement. Nous répétons cette étape une deuxième fois : les amas membranaires devraient être visibles. En utilisant les mêmes procédures dans les mêmes conditions, nous centrifugeons les homogénats à $25 \times g$ puis à $35 \times g$. Une centrifugation finale, $14\,000 \times g$ pendant 30 min, permet de récupérer les membranes plasmiques. Les culots sont ensuite suspendus dans 10 μl de HBA et congelés à -20°C jusqu'à utilisation.

Immunobuvardage de type « Western »

Les échantillons provenant à la fois de l'isolation des membranes totales et plasmiques sont séparés sur un gel de polyacrylamide 6% (SDS-PAGE) pendant 1h30 à 120 V, puis transférés (100 V durant 2 h) sur des membranes de nitrocellulose Hybond C (Amersham Biosciences, Piscataway). Un rouge Ponceau permet d'évaluer la qualité du transfert et du chargement des protéines dans les puits. Les membranes sont incubées dans une solution de PBS contenant 5% de lait, afin de bloquer les sites non spécifiques.

Les protéines sont révélées avec l'anticorps primaire anti- $\text{Ca}_v1.2$ (Alomone ; 1:200) ainsi qu'avec l'anticorps secondaire anti-lapin-HRP (Jackson Immunoresearch ; 1:10000). Finalement, les protéines sont détectées par chimioluminescence (Western LightningTM Chemiluminescence Reagent, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA).

3. RÉSULTATS

Le groupe de Keating (Splawski et al. 2004, Splawski et al. 2005) a caractérisé l'origine génétique d'une maladie infantile rare : le syndrome de Timothy dont la principale caractéristique est d'allonger l'intervalle QT sur l'ECG (LQT8). Deux mutations ponctuelles ont été identifiées sur le canal calcique humain de type L $Ca_v1.2$: G402S et G406R (équivalentes aux mutations G432S et G436R sur le canal calcique de lapin). Les mutations causent une diminution significative de l'inactivation du canal $Ca_v1.2$. Ces deux glycines impliquées dans ce syndrome font partie des quatre résidus glycine strictement conservés au niveau de tous les canaux de type HVA : trois dans le segment IS6 (G422, G432, G436) et un dans le segment IIS6 (G770). Nous avons donc émis l'hypothèse que chacune de ces glycines jouerait un rôle dans les cinétiques du canal $Ca_v1.2$. Les mutations ont été introduites par mutagenèse et leurs effets ont été étudiés en voltage imposé à deux électrodes, après expression recombinante des mutants dans des ovocytes de *Xénope*.

3.1. Les mutations impliquées dans le syndrome de Timothy (LQT8)

Nous avons effectué des expériences en conditions Ba^{2+} et Ca^{2+} (cation de conduction physiologique) pour les deux mutations du canal $Ca_v1.2$ impliquées dans l'allongement de l'intervalle QT (LQT8), soient G432S et G436R (Figure 18).

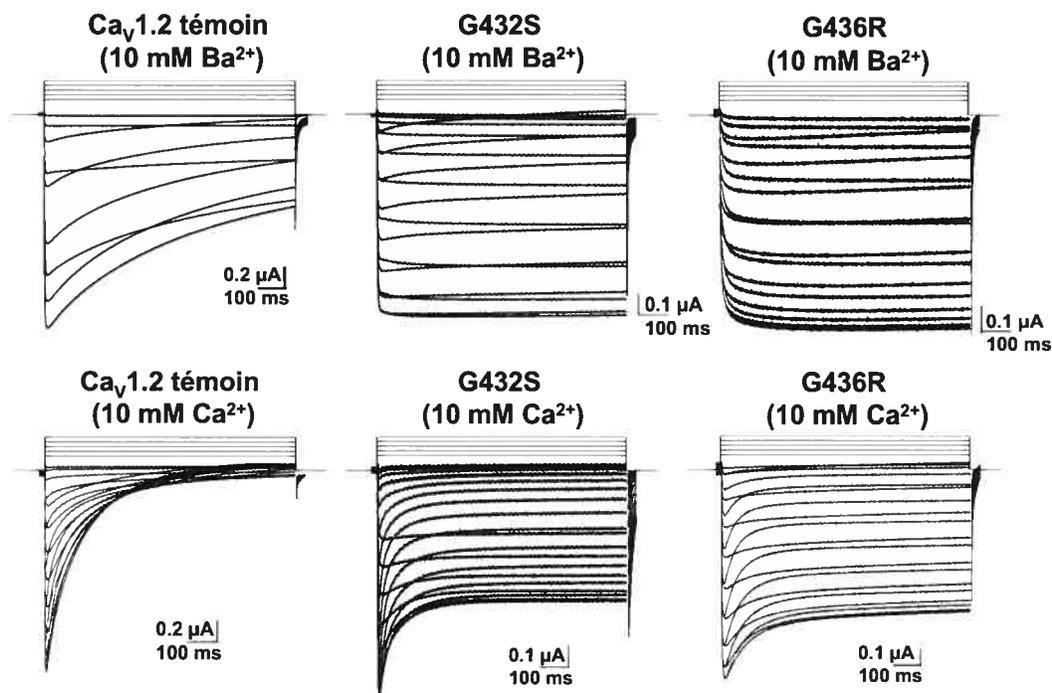


Figure 18. Courants macroscopiques en Ba^{2+} et Ca^{2+} des mutations G432S et G436R impliquées dans le LQT8. Les courants macroscopiques ont été enregistrés dans des solutions de 10 mM Ba^{2+} (les trois figures du haut) ou 10 mM Ca^{2+} (les trois figures du bas). À partir d'un potentiel de repos de -80 mV, une série de pulses dépolarisants (de -40 à +50 mV par intervalle de 5 mV) a été appliquée. Que l'on soit en Ba^{2+} ou en Ca^{2+} , les deux mutations ralentissent significativement l'inactivation lorsque comparées au canal $Ca_v1.2$ témoin.

Pour les expériences en Ba^{2+} , la valeur du potentiel de mi-activation (évalué à partir de la moyenne des courbes individuelles) est significativement différente à $p < 1E-5$ pour le mutant G436R par rapport au canal témoin, respectivement : -13.9 ± 0.7 mV ($n = 7$) vs -7.0 ± 0.9 mV ($n = 33$). Même si l'on voit un léger déplacement dépolarisant avec la mutation G432S (-4.2 ± 0.6 mV) ($n = 22$), le $E_{0.5,act}$ n'est pas significativement différent du témoin ($p > 0.02$). Si l'on compare avec les résultats obtenus en Ba^{2+} et en Ca^{2+} , le potentiel de mi-activation du canal témoin est du même ordre de grandeur : -7.1 ± 0.9 mV ($n = 11$) ($p > 0.9$). Par contre, les deux mutations déplacent significativement leur $E_{0.5,act}$ vers les potentiels plus positifs en Ca^{2+} : $+4.0 \pm 0.5$ mV ($n = 17$) pour G432S ($p < 1E-11$) et -1.34 ± 1.33 mV ($n = 13$) pour

G436R ($p < 1E-9$) (Tableau 3 à la fin de cette section). En ce qui concerne les valeurs du « Time to peak » des deux mutants, elles ne sont pas significativement différentes du canal témoin en Ca^{2+} (< 40 ms). Par contre pour les expériences en Ba^{2+} , ils sont bien plus élevés : 711 ± 43 ms ($n = 22$) pour G432S et 445 ± 39 ms ($n = 7$) pour G436R comparé à 49 ± 3 ms ($n = 33$) pour le canal témoin à 10 mV (Figure 19 et tableau 3).

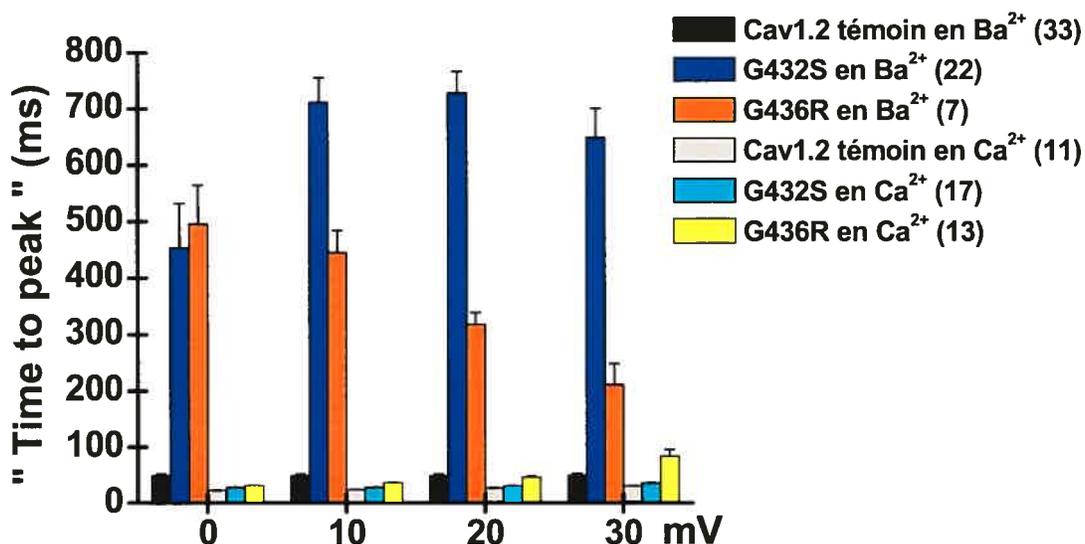


Figure 19. « Time to peak » en Ba^{2+} et Ca^{2+} des deux mutations impliquées dans le LQT8. Le « Time to peak » représente le temps pour atteindre le maximum de courant et reflète les cinétiques d'activation du canal témoin ou muté. Il est évalué à partir des courants macroscopiques en Ba^{2+} ou Ca^{2+} puis moyenné par le nombre d'enregistrements effectués (nombre entre parenthèses sur le graphique). Pour les expériences en Ba^{2+} , les cinétiques d'activation des deux mutations sont beaucoup plus lentes (> 10 fois à 0 mV) alors que les expériences en Ca^{2+} montrent des cinétiques d'activation comparables à $Ca_v1.2$.

Au niveau des propriétés d'inactivation, les deux mutations en Ba^{2+} abolissent pratiquement l'inactivation du canal $Ca_v1.2$. En effet, le R_{800} n'a pu être évalué que pour la mutation G436R : 0.92 ± 0.01 ($n = 7$) contre 0.47 ± 0.02 ($n = 33$) pour le témoin (Tableau 3). Alors que les cinétiques d'activation ne semblent pas être affectées par les mutations, les cinétiques en Ca^{2+} des deux mutants montrent une inactivation qui est significativement ralentie par

rapport au témoin : $R_{800} = 0.37 \pm 0.02$ ($n = 17$) pour G432S et 0.71 ± 0.02 ($n = 13$) pour G436R contre 0.02 ± 0.01 ($n = 11$) pour $Ca_v1.2$ témoin (Figure 20 et tableau 3). On constate aussi sur les enregistrements de la figure 18 que les cinétiques d'inactivation en Ca^{2+} des deux mutants semblent être gouvernées par deux constantes d'inactivation : une constante rapide en début d'inactivation contrôlée par le Ca^{2+} puis une constante plus lente contrôlée par le voltage qui forme une phase plateau après environ 300 ms. Que l'on parle du canal témoin ou des deux mutations impliquées dans le LQT8, toutes les cinétiques d'inactivation sont toujours plus rapides en Ca^{2+} qu'en Ba^{2+} : l'inactivation dépendante du calcium (CDI) domine l'inactivation dépendante du voltage (VDI). Nous en discutons en détail dans la section discussion (Section 4.1.1).

La dépendance en voltage de l'inactivation du témoin (évaluée à partir de la moyenne des courbes individuelles) n'est pas affectée par la nature de l'ion perméant pour le canal témoin ($p > 0.2$) mais elle n'a pu être quantifiée pour les deux mutations (Tableau 3). L'injection d'un chélateur de calcium (EGTA) dans les ovocytes n'était pas suffisante pour prévenir l'activation des courants Cl^- stimulés par le calcium intracellulaire. Le protocole de pulse utilisé pour obtenir les propriétés d'inactivation du canal (Figure 17B) est au moins six fois plus long que celui utilisé pour le potentiel de mi-activation (Figure 17A). L'émergence de courants Cl^- endogènes activés par le Ca^{2+} intracellulaire contamine les cinétiques des courants $Ca_v1.2$.

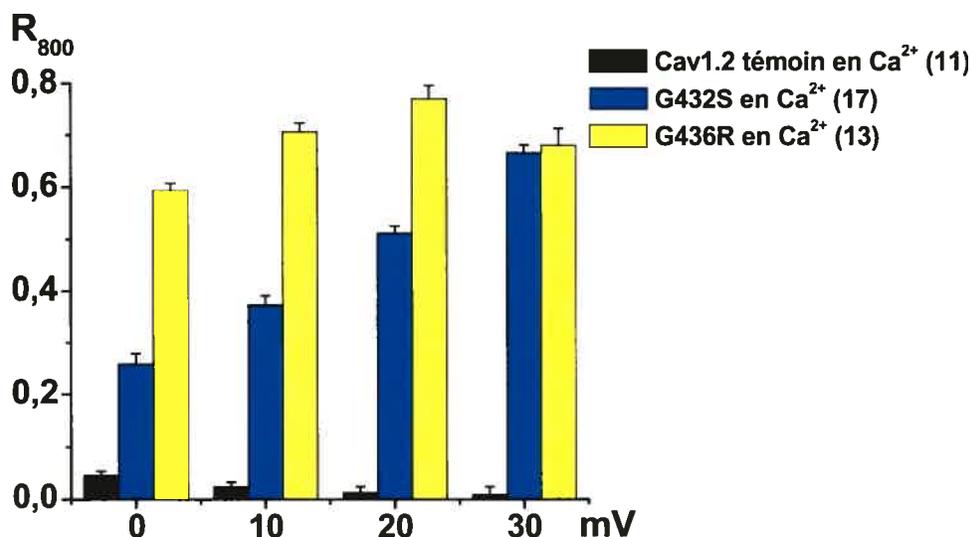


Figure 20. R_{800} en Ca^{2+} des mutations G432S et G436R impliquées dans le LQT8. Le R_{800} représente la fraction du courant résiduel à 800 ms pour un voltage donné. Il a été évalué à partir des courants macroscopiques en Ca^{2+} puis moyenné par le nombre d'enregistrements effectués (nombre entre parenthèses sur le graphique). Chacune des deux mutations réduit significativement l'inactivation du canal $Ca_v1.2$.

$Ca_v1.2/\alpha2\delta/\beta3$		Activation		Inactivation	
		$E_{0.5,act}$ (mV)	"Time to peak" (ms)	$E_{0.5,inact}$ (mV)	R_{800} à 10 mV
10 mM Ba^{2+}	$Ca_v1.2$ témoin	-7.0 ± 0.9 (33)	49 ± 3 (33)	-22.7 ± 0.9 (33)	0.47 ± 0.02 (33)
	G432S	-4.2 ± 0.6 (22)	711 ± 43 (22)	n.d.	n.d.
	G436R	-13.9 ± 0.7 (7)	445 ± 39 (7)	n.d.	0.92 ± 0.01 (7)
10 mM Ca^{2+}	$Ca_v1.2$ témoin	-7.1 ± 0.9 (11)	24 ± 1 (11)	-25.2 ± 0.3 (5)	0.02 ± 0.01 (11)
	G432S	4.0 ± 0.5 (17)	28 ± 1 (17)	n.d.	0.37 ± 0.02 (17)
	G436R	-1.3 ± 1.3 (13)	39 ± 2 (13)	n.d.	0.71 ± 0.02 (13)

Tableau 3. Propriétés biophysiques en Ba^{2+} et Ca^{2+} des mutations impliquées dans le LQT8. Les paramètres : $E_{0.5,act}$, « Time to peak » et R_{800} , ont été extraits à partir des données provenant du protocole de pulse I/V (Figure 17A) et du lissage utilisant l'équation 1 (pour $E_{0.5,act}$). Le paramètre d'inactivation, $E_{0.5,inact}$, a été déterminé en utilisant le protocole de pulse h_{5000} (Figure 17B) et le lissage utilisant l'équation 2 (Voir section 2). On trouve entre parenthèses le nombre d'enregistrements et n.d = non-déterminé.

3.2. Mutations à la position G436 du IS6

La mutation G436R montrait un certain déplacement hyperpolarisant du potentiel d'activation (Tableau 4 en fin de section), cette observation nous a ensuite amenés à effectuer d'autres mutations de charges à cette position (Figure 21).

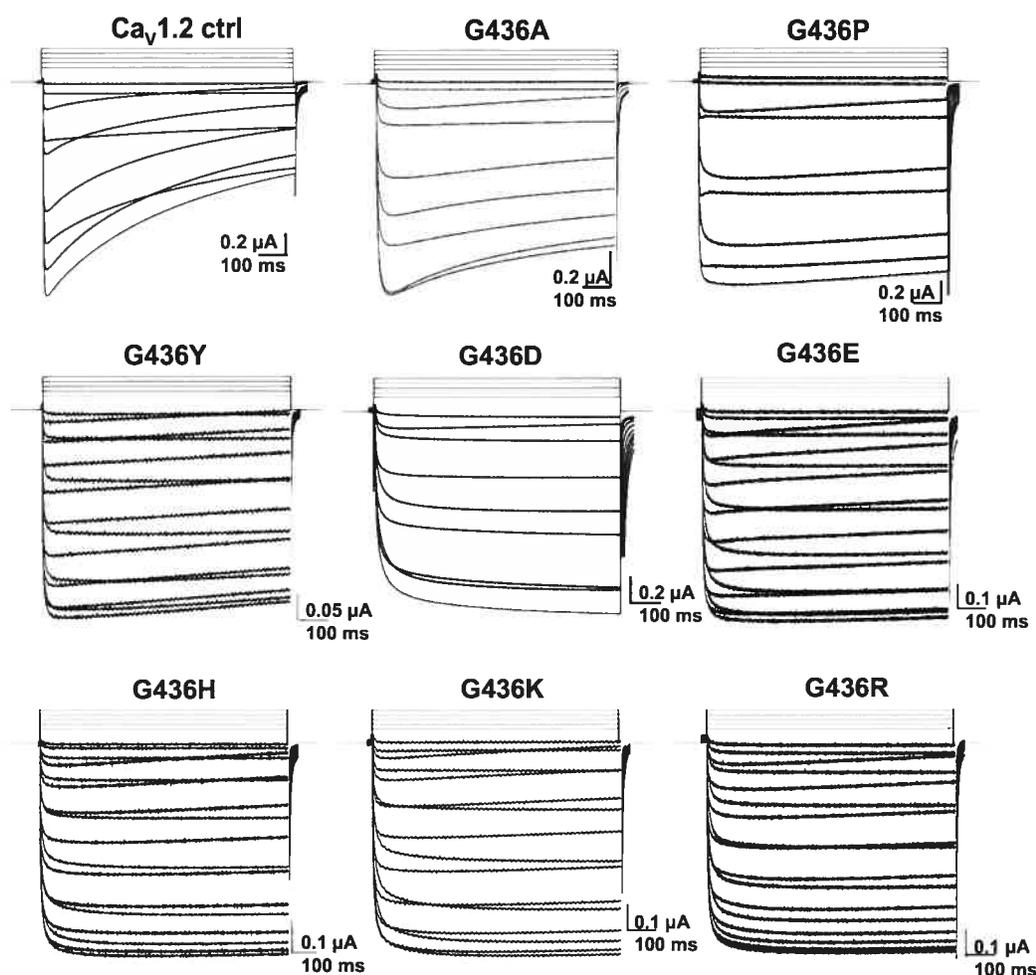


Figure 21. Courants macroscopiques en Ba^{2+} des mutants G436A, P, Y, D, E, H, K et R. La position G436 est équivalente à la position G406 du canal calcique humain impliqué dans le syndrome de Timothy (LQT8). La figure montre les courants Ba^{2+} enregistrés avec $Ca_v1.2$ témoin, deux mutations en A et P, une mutation aromatique (Y), deux mutations de charge négative (D et E) ainsi que trois mutations de charge positives (H, K et R) (de gauche à droite et de haut en bas).

Toutes les cinétiques d'activation sont significativement ralenties par rapport au canal témoin ($p < 0.0001$), à l'exception du mutant G436A. Les mutations en Pro et Tyr montrent des temps d'activation intermédiaires avec des valeurs de : 124 ± 29 ms ($n = 8$) pour G436P et 201 ± 28 ms ($n = 14$) pour G436Y. Par contre, pour les mutations de charges positives (H, K et R) ou négatives (D et E), l'activation du canal est beaucoup plus lente, en particulier pour les mutants H, K et D où le paramètre « Time to peak » est supérieur à 600 ms. Pour les deux mutations de charges G436R et G436D, les cinétiques d'activation sont 7 à 10 fois plus élevées que celles du témoin (Figure 23 et tableau 4).

En regardant les enregistrements en Ba^{2+} de la mutation G436D (Figure 21) ainsi que la valeur « Time to peak » extrêmement lente : 765 ± 26 ms ($n = 9$), nous ne pouvons exclure la possibilité que nos enregistrements aient été contaminés par des conductances Cl^- endogènes, malgré l'injection d'EGTA dans les œufs.

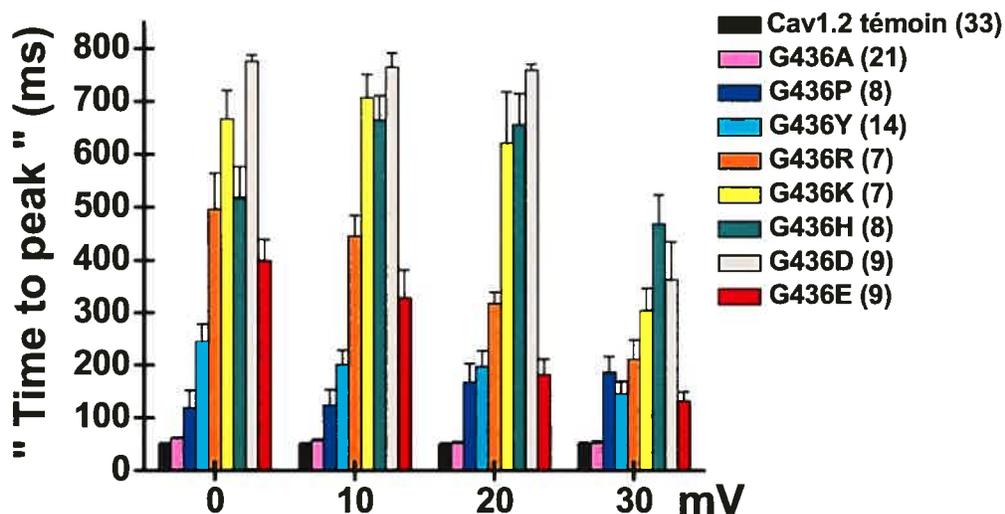


Figure 22. « Time to peak » de la position G436 du segment IS6. Les mutations de charges positives ou négatives à la position G436 ralentissent significativement l'activation du canal (environ 10 fois plus lente que pour le témoin). Les mutations G436P et G436Y montrent des effets intermédiaires alors que le temps d'activation de la mutation G436A se compare à celui du canal $Ca_v1.2$.

Les potentiels de mi-activation ($E_{0.5,act}$) des mutations en résidus non chargés, ie A, P et Y, sont comparables à celui du témoin (Tableau 4) : $p > 0.7$ dans les trois cas. En ce qui concerne les mutants chargés, seule la mutation G436H se compare à $Ca_v1.2$ ($p = 0.7$), ce qui suggère un pH local intracellulaire inférieur au pKa de la chaîne latérale de l'histidine (pKa évalué entre 6 et 7).

Les autres mutations (G436R, K, D ou E) déplacent le potentiel de mi-activation vers les voltages hyperpolarisants, et de façon significative avec les mutations G436D et G436R, respectivement : -11.7 ± 0.9 mV ($n = 9$) ($p = 6E-4$), -13.9 ± 0.7 mV ($n = 7$) ($p = 1E-5$) contre -7.0 ± 0.9 mV ($n = 33$) pour $Ca_v1.2$. Même si les mutations G436E (-11.68 ± 0.60 mV) ($n = 9$) ($p = 0.02$) et G436K (-13.73 ± 1.49 mV) ($n = 7$) ($p = 0.01$) montrent aussi un décalage des $E_{0.5,act}$ vers les potentiels plus négatifs, les résultats ne sont pas significativement différents du témoin, p n'est pas inférieur à 0.001 : les variations expérimentales se sont avérées trop importantes (Tableau 4).

Les cinétiques d'activation sont tellement ralenties (Figure 22) que seulement quelques mutants sont activés après 800 ms. En effet, la fraction des courants résiduels (R_{800} à 10 mV) n'a pu être évaluée que pour les mutations G436A, G436P, G436Y, G436E et G436R (Tableau 4). À la vue des résultats obtenus avec les R_{800} et des enregistrements en Ba^{2+} de la figure 21 (inactivation pratiquement abolie avec toutes les mutations de charges), nous ne pouvons pas parler d'inactivation pour ces canaux. Seul le mutant G436A échappe à cette règle et sa dépendance en voltage de l'inactivation a été évaluée. Elle se compare d'ailleurs à celle du témoin, on obtient -21.4 ± 0.6 mV ($n = 12$) ($p > 0.4$) contre -22.7 ± 0.9 mV ($n = 33$) pour $Ca_v1.2$. En revanche, le niveau des courants résiduels après une série de dépolarisations de 5 s demeure plus élevée pour le G436A : 0.47 ± 0.02 ($n = 12$) contre 0.20 ± 0.01 ($n = 33$) pour le témoin (Figure 23).

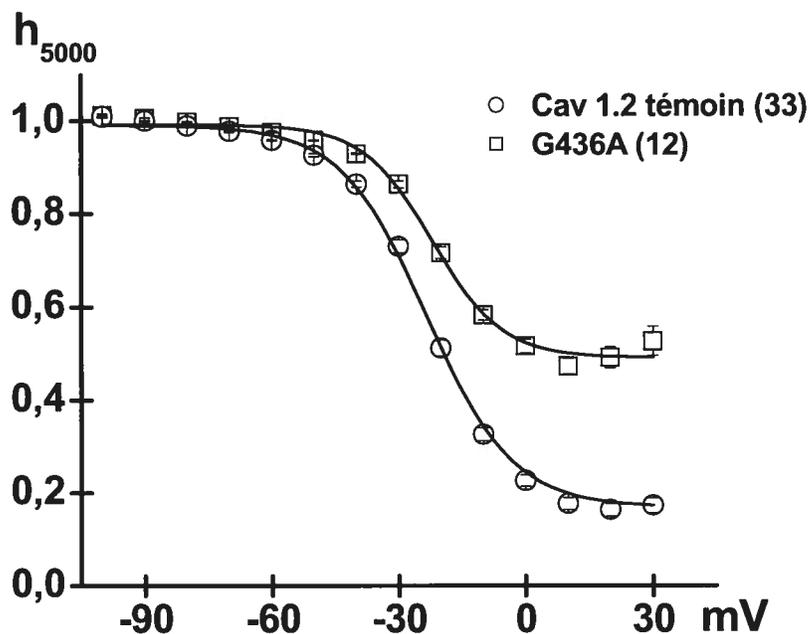


Figure 23. h_{5000} de la mutation G436A du segment IS6. Le h_{5000} permet de déterminer la dépendance en voltage de l'inactivation du canal. À partir d'un potentiel de repos de -100 mV, on applique un potentiel test où le canal est ouvert (+10 mV). Une série de voltages dépolarisants s'ensuit (de -100 à +30 mV par intervalle de 10 mV) pendant 5 s, pour que le canal puisse s'inactiver. On impose ensuite le même potentiel test où l'on mesure la proportion des canaux ouverts. À partir de la moyenne de chaque courbe individuelle et du lissage via l'équation 2, on obtient le potentiel de mi-inactivation. Le $E_{0,5,inact}$ de la mutation G436A se compare à celui de $Ca_v1.2$.

3.3. « Alanine Scan » du segment IS6

Nous avons ensuite élargi notre étude à l'analyse de tous les résidus glycine du segment IS6 (Figure 24 et 25). Après la glycine, l'alanine est le plus petit résidu hydrophobe. Elle se différencie de la glycine par un groupement méthyle au niveau de sa chaîne latérale (à la place d'un hydrogène sur la glycine). Après avoir analysé les effets des mutations ponctuelles, nous avons effectué des mutations multiples en alanine (Figure 25). Nous avons aussi construit des mutants simples proline qui ont tendance à casser les hélices α (Chou and Fasman 1974, Pace and Scholtz 1998). Les mutations G422P et G432P ne montraient aucun courant macroscopique en Ba^{2+} (section 3.3.3), tandis que les résultats obtenus avec la mutation G436P ont été présentés à la section précédente.

3.3.1. Mutations simples

Le potentiel de mi-activation ($E_{0.5,act}$) du canal est légèrement déplacé vers les potentiels dépolarisants avec les mutations G422A et G432A respectivement : -2.5 ± 1.3 mV ($n = 12$) ($p = 0.005$) et -1.8 ± 1.1 mV ($n = 21$) ($p = 8E-4$), comparativement à -7.0 ± 0.9 mV ($n = 33$) pour le canal témoin (Tableau 4). Ce déplacement est significatif pour la mutation G432A car $p < 0.001$. En revanche, le mutant G436A montre un $E_{0.5,act}$ comparable au témoin (tel que discuté à la section 3.2).

Leurs valeurs de « time to peak », temps nécessaire pour atteindre le maximum du courant et reflétant les cinétiques d'activation du canal, sont du même ordre de grandeur que celui de $Ca_v1.2$ (49 ± 3 ms) ($n = 33$). En effet, les trois mutations ponctuelles s'activent dans des temps < 75 ms. (Figure 27 et tableau 4).

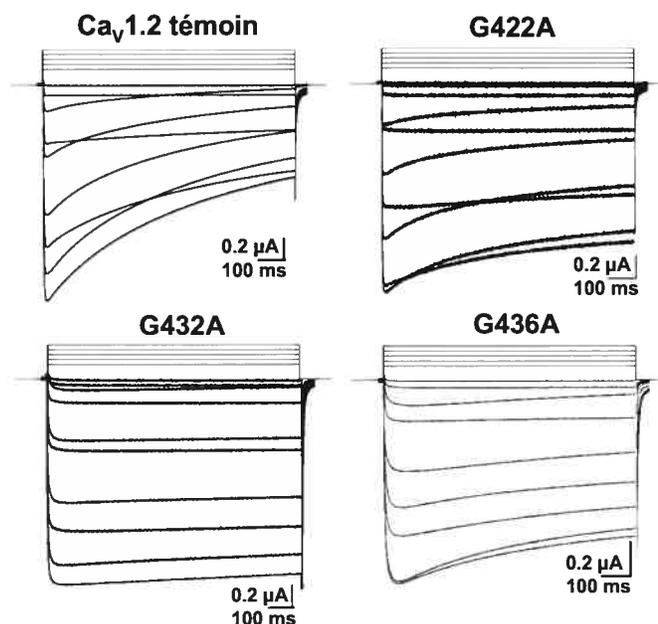


Figure 24. Courants macroscopiques en Ba^{2+} des mutations G422A, G432A et G436A. Les cinétiques d'inactivation des trois mutations ponctuelles G422A, G432A et G436A (de gauche à droite et de haut en bas) sont significativement ralenties par rapport à $Ca_V1.2$.

Les changements sont plus prononcés en ce qui concerne l'inactivation du canal. Les enregistrements représentant les courants macroscopiques en Ba^{2+} de ces mutants montrent que leurs cinétiques d'inactivation sont plus lentes que celle de $Ca_V1.2$ (Figure 24). L'analyse des R_{800} à 10 mV confirme que la proportion des courants résiduels est augmentée après la mutation des glycines : $R_{800} = 0.81 \pm 0.02$ ($n = 12$) pour G422A, 0.91 ± 0.01 ($n = 13$) pour G432A et 0.70 ± 0.01 ($n = 12$) pour G436A comparativement à 0.47 ± 0.02 ($n = 33$) pour le canal témoin (Figure 28).

La dépendance en voltage de l'inactivation n'a pu être évaluée que pour la mutation G436A (section 3.2). En effet, l'inactivation des deux autres mutants est bien trop lente pour évaluer la dépendance en voltage de l'inactivation (Figure 28 et tableau 4).

3.3.2. Mutations multiples

Le but de ces constructions multiples est d'évaluer la coopérativité des glycines dans les mécanismes de « gating » du canal $Ca_v1.2$. Nous avons construit et testé quatre mutations multiples (Figure 25) : trois mutations double (G422A+G432A, G422A+G436A et G432A+G436A) et une mutation triple (G422A+G432A+G436A ou GGGAAA). Seule la mutation double, G422A+G432A, ne montre aucun courant macroscopique en Ba^{2+} (Section 3.3.3).

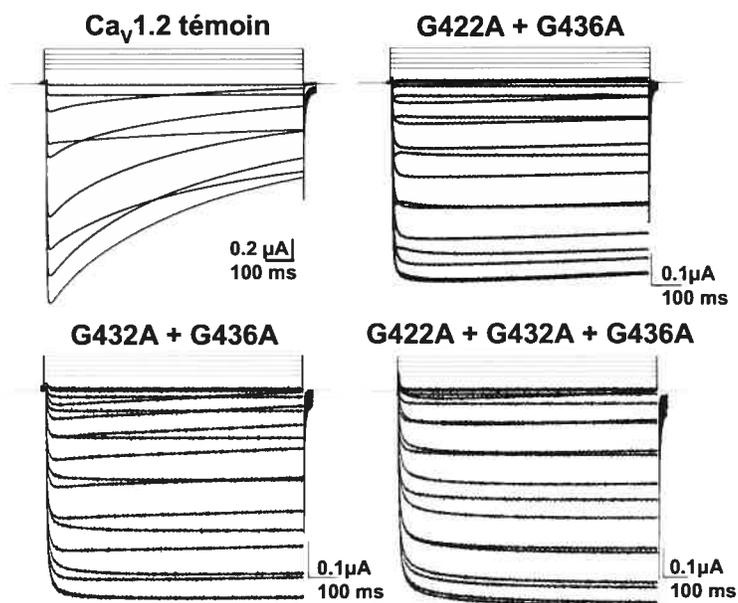


Figure 25. Courants macroscopiques en Ba^{2+} des mutants double et triple en alanine du segment IS6. La figure montre les courants Ba^{2+} (10 mM) pour $Ca_v1.2$ témoin, pour les deux mutations doubles : G422A+G436A et G432A+G436A, et la mutation triple GGGAAA (de gauche à droite et de haut en bas). L'inactivation est significativement ralentie dans les trois cas.

À partir de la figure 26, représentant la variation du potentiel de mi-activation par rapport au canal $Ca_v1.2$, seules les mutations G422A, G432A et GGGAAA déplacent de façon positive le $E_{0.5,act}$. Les effets sur $E_{0.5,act}$ varient de la manière suivante :

$$G432A \approx G422A \approx GGGAAA \gg G432A+G436A \approx G436A \approx G422A+G436A.$$

Le déplacement des $E_{0.5,act}$ est significatif pour les mutations G432A, G422A et GGGAAA mais plus significatif pour G432A avec $p < 0.001$.

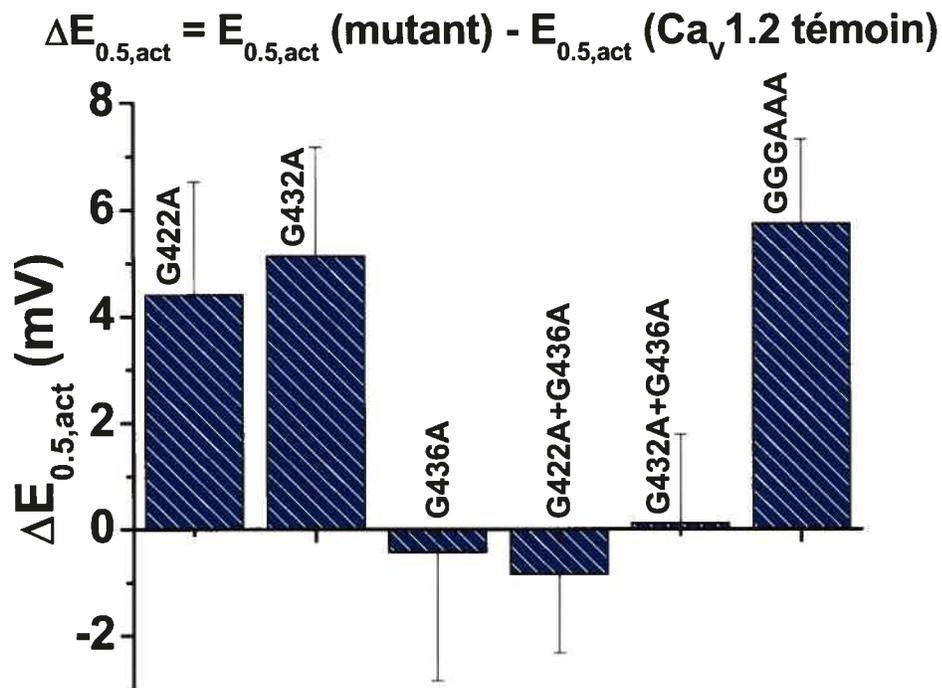


Figure 26. Variation du $E_{0.5,act}$ de l' « Alanine Scan » du segment IS6. La référence est le potentiel de mi-activation du canal $Ca_v1.2$ témoin (-7.0 ± 0.9 mV). Les $\Delta E_{0.5,act}$ ont été calculés selon l'équation décrite sur le graphique et les $E_{0.5,act}$ du tableau 4. Les valeurs de $E_{0.5,act}$ et les erreurs ont été évaluées à partir de la moyenne du lissage de la courbe IV de chaque courbe individuelle (Équation 1) : $p = 8E-4$ pour G432A ($n = 21$), $p = 0.002$ ($n = 11$) pour GGGAAA, $p = 0.005$ ($n = 12$) pour G422A, $p = 0.7$ ($n = 12$) pour G422A+G436A, $p = 0.8$ ($n = 21$) pour G436A et $p = 0.96$ ($n = 8$) pour G432A+G436A.

Ce sont donc les mutations G422A, G432A et GGGAAA qui ont le plus d'effet sur le déplacement du $E_{0.5,act}$: environ +4.5 mV pour G422A, +5 mV pour G432A et +6 mV pour GGGAAA (Figure 26). Cependant même si le mutant G436A a un potentiel de mi-activation comparable au témoin, il semble compenser les déplacements dus à G422A ou G432A dans les mutations doubles G422A+G436A et G432A+G436A.

Les cinétiques d'activation de mutants multiples sont toutes très lentes et supérieures à celle du témoin (49 ± 3 ms), en particulier pour les mutations G432A+G436A et GGGAAA où la valeur du « Time to peak » est supérieure à 600 ms. En revanche, celui du mutant G422A+G436A est intermédiaire avec une valeur de l'ordre de 200 ms à 10 mV (Figure 27).

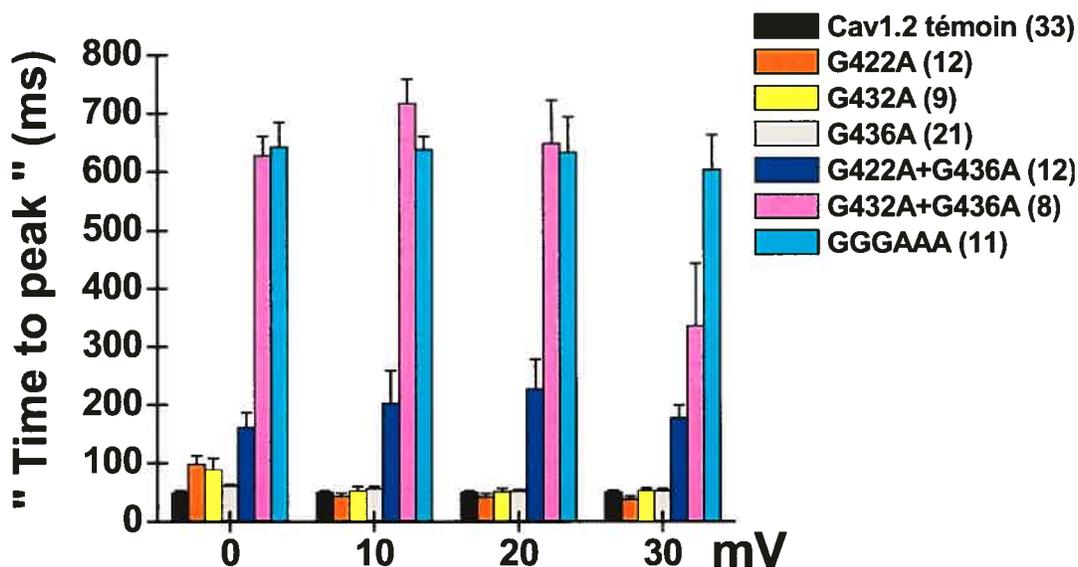


Figure 27. « Time to peak » des mutants en alanine du segment IS6. Les mutations simples G422A, G432A et G436A s'activent dans des temps comparables à $Ca_v1.2$ (< 100 ms) alors que la mutation double G432A+G436A et la mutation triple G422A+G432A+G436A ont besoin de plus de 600 ms pour s'activer complètement.

Les protéines qui contiennent plus d'une mutation en glycine montrent des cinétiques d'activation beaucoup plus lentes que les mutants individuels. La position G432 semble toutefois avoir un effet déterminant sur les cinétiques d'activation. Les mutations double et triple (G432A+G436A et GGGAAA) qui incluent G432 sont toutes plus lentes que les autres mutations.

La plupart des cinétiques d'activation des mutants multiples est trop lente pour estimer la fraction des courants inactivés à 800 ms. Seul le R_{800} de la mutation double G422A+G436A a pu être évalué : 0.85 ± 0.06 ($n = 12$). Si l'on prend en compte les R_{800} à 10 mV de toutes les mutations en alanine du segment IS6, les cinétiques d'inactivation sont significativement ralenties : Cav1.2 témoin > G436A > G422A \approx G432A \approx G422A+G436A (de la plus rapide à la plus lente) (Figure 28 et tableau 4).

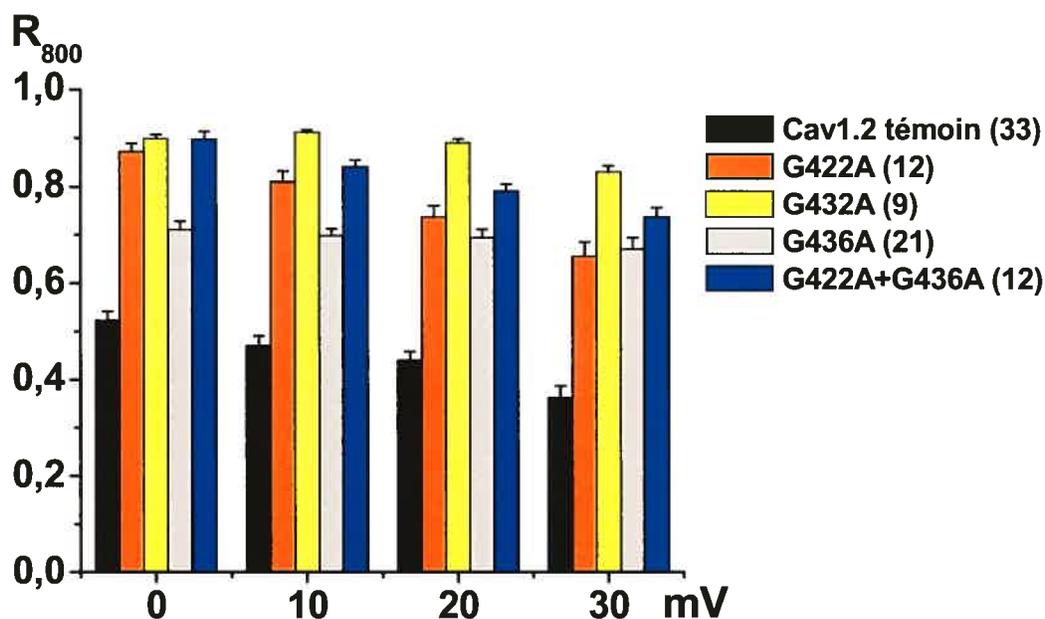


Figure 28. R_{800} de l'« Alanine Scan » du segment IS6. Les cinétiques d'inactivation sont significativement ralenties pour toutes les mutations en alanine du segment IS6.

Au niveau de l'inactivation du canal, la mutation en alanine d'une seule des trois glycines conservées (G422, G432 ou G436) est suffisante pour altérer les propriétés d'inactivation du canal $Ca_v1.2$. En effet, on observe dans tous les cas, un ralentissement significatif des cinétiques d'inactivation.

3.3.3. Mutations non-fonctionnelles

Sur toutes les mutations effectuées, trois mutants : G422P, G432P et G422A + G432A, ne montraient aucun courant Ba^{2+} lors de l'expression dans les ovocytes de *Xénope*. Deux lots différents d'ovocytes ont été injectés deux fois avec chacune des trois protéines mutées. Les expériences électrophysiologiques ont été faites sur une période de six jours sans jamais détecter d'augmentation du courant total en Ba^{2+} . Nous avons donc effectué un immunobuvargage de type « Western » des membranes totales et plasmiques pour détecter la présence de ces protéines non-fonctionnelles (Figure 29).

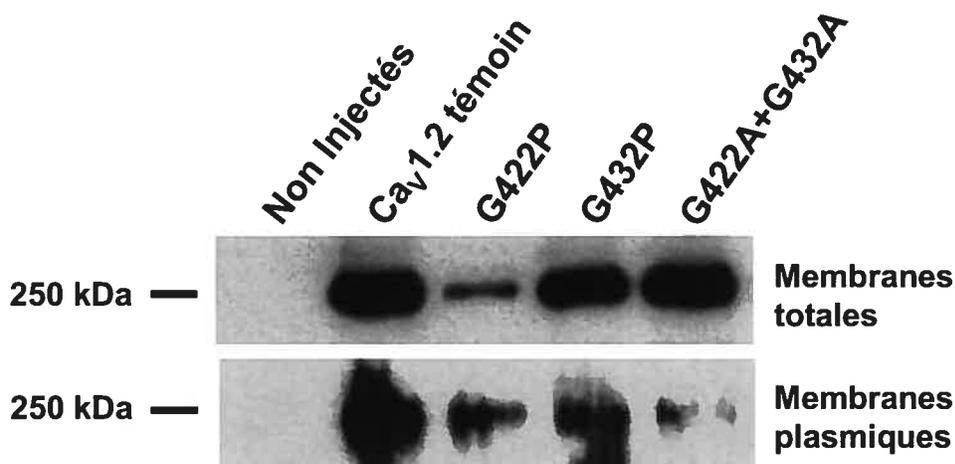


Figure 29. Immunobuvardage de type « Western » des protéines non-fonctionnelles. L'injection dans les ovocytes ainsi que l'isolation des membranes totales et plasmiques ont été décrites à la section 2.5. La figure montre de gauche à droite : le contrôle négatif (Ovocytes non injectés), le contrôle positif ($Ca_v1.2$ témoin) et les trois protéines mutées non-fonctionnelles (G422P, G432P et G422A+G432A).

L'immunobuvargage de type « Western » des membranes totales nous indique que les protéines mutées sont traduites correctement dans les œufs avec le poids moléculaire attendu (249 kDa). L'immunobuvargage de type « Western » des membranes plasmiques nous permet de vérifier le bon ciblage membranaire. Les trois protéines non-fonctionnelles sont correctement adressées à la membrane plasmique, avec le bon poids moléculaire.

La non-fonctionnalité des protéines mutées pourrait principalement s'expliquer par un mauvais repliement des protéines lors de l'insertion dans la membrane plasmique ne permettant plus le passage des ions.

Le niveau d'expression à la membrane plasmique des mutants G422P et G422A+G432A est toutefois moins élevé que celui du canal témoin. Dans ces deux cas, leur non-fonctionnalité pourrait s'expliquer par le plus faible niveau d'expression à la membrane plasmique, ne permettant pas de détecter de trop faibles courants macroscopiques Ba^{2+} en voltage imposé à deux électrodes. Comme les protéines n'ont pas été dosées, il serait important de comparer l'expression de nos mutants avec celle d'une protéine endogène de l'œuf comme la β -globuline. Ceci nous permettrait également de vérifier notre préparation de membranes : la β -globuline devrait être présente dans les lysats totaux et non dans les membranes plasmiques.

3.4. Analyse du résidu G770 du segment IIS6

La glycine G770 est la seule glycine conservée du segment IIS6 du canal $Ca_v1.2$. Elle est aussi présente au niveau tous les canaux calciques HVA. Nous avons effectué des mutations en alanine et en proline à cette position (Figure 30).

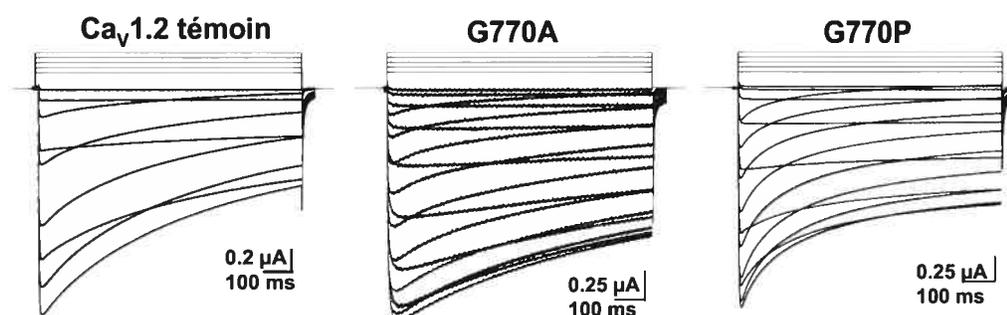


Figure 30. Courants macroscopiques en Ba^{2+} avec la glycine G770 mutée en A et P. Les courants macroscopiques ont été enregistrés dans une solution de 10 mM Ba^{2+} . À partir d'un potentiel de repos de -80 mV, une série de pulses dépolarisants (de -40 à +50 mV par intervalle de 5 mV) a été appliquée.

Les potentiels de mi-activation sont légèrement décalés vers les potentiels hyperpolarisants mais ils ne sont pas significativement différents du témoin (p non inférieur à 0.001). On observe : $E_{0.5,act} = -9.8 \pm 0.8$ mV ($n = 17$) ($p = 0.03$) pour G770A et $E_{0.5,act} = -11.3 \pm 1.2$ mV ($n = 9$) ($p = 0.05$) pour G770P, vs -7.0 ± 0.9 mV pour $Ca_v1.2$ (Tableau 4).

Les valeurs du paramètre « Time to peak » de la mutation G770A se comparent avec celles du canal témoin, respectivement : 52 ± 2 ms ($n = 17$) et 49 ± 3 ms ($n = 33$). En revanche celles du mutant G770P sont significativement plus rapides ($p < 0.0005$) avec une valeur de « Time to peak » aux environs de 27 ms à 10 mV (Figure 31).

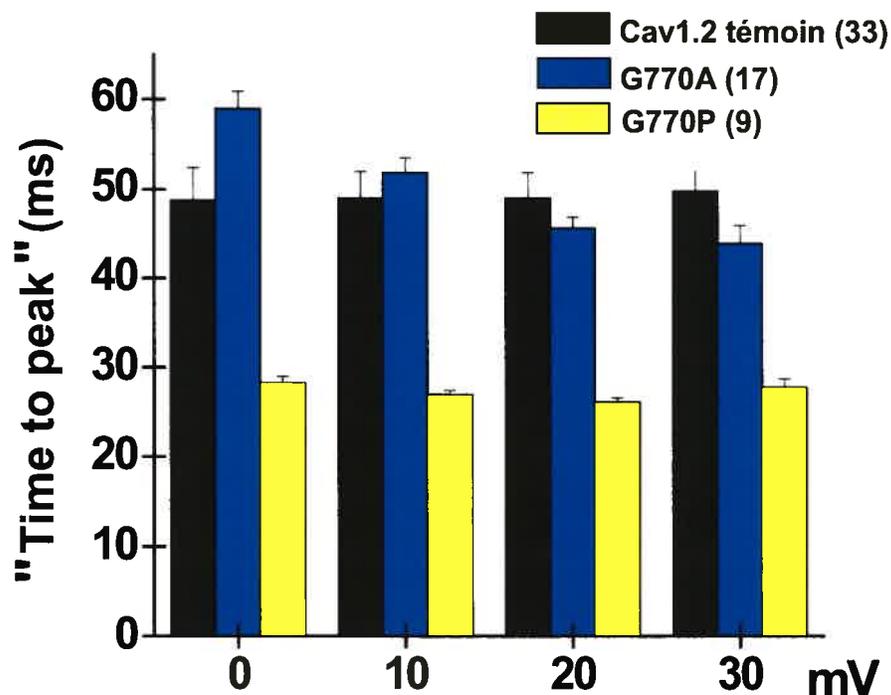


Figure 31. « Time to peak » de la position G770 du segment IIS6. La mutation G770A s'active dans des temps comparables au canal $\text{Ca}_v1.2$ témoin (≈ 50 ms), alors que les cinétiques d'activation du mutant G770P sont significativement plus rapides : $p < 0.0005$.

Au niveau de la dépendance en voltage de l'inactivation, la mutation G770A se comporte comme le canal témoin (de l'ordre de -23 mV) ($p > 0.7$), alors que la mutation G770P s'inactive à un potentiel $E_{0.5,\text{inact}}$ un peu plus positif (≈ -19 mV), qui n'est pas statistiquement différent du canal témoin ($p > 0.2$) (Figure 33). En ce qui concerne les cinétiques d'inactivation, la fraction du courant résiduel à 800 ms des deux mutations est comparable à celle du canal témoin : $R_{800} = 0.58 \pm 0.02$ ($n = 17$) pour le mutant G770A et 0.46 ± 0.02 ($n = 9$) pour le mutant G770P mesurés à $+10$ mV (Figure 32). En revanche, la proportion de courant résiduel mesuré à 10 mV après un pulse dépolarisant de 5 s (Figure 33) est plus élevée pour G770P : 0.46 ± 0.07 ($n = 5$) par rapport au témoin (0.20 ± 0.01) ($n = 33$), alors qu'elle se compare au témoin pour G770A : 0.26 ± 0.01 ($n = 8$).

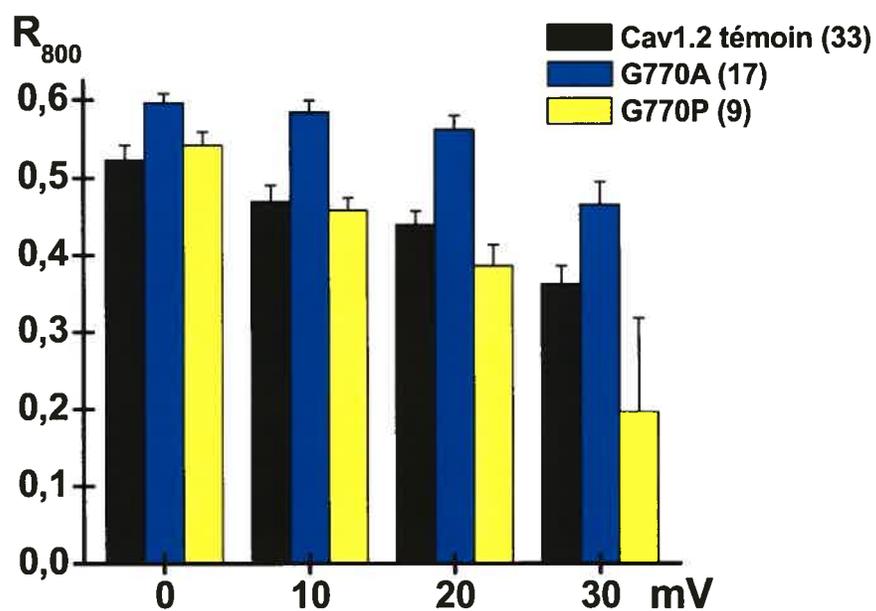


Figure 32. R_{800} de la position G770 du segment IIS6. Les cinétiques d'inactivation sont légèrement plus lentes avec la mutation G770A alors que le mutant G770P génère des cinétiques d'inactivation comparables à $Ca_v1.2$.

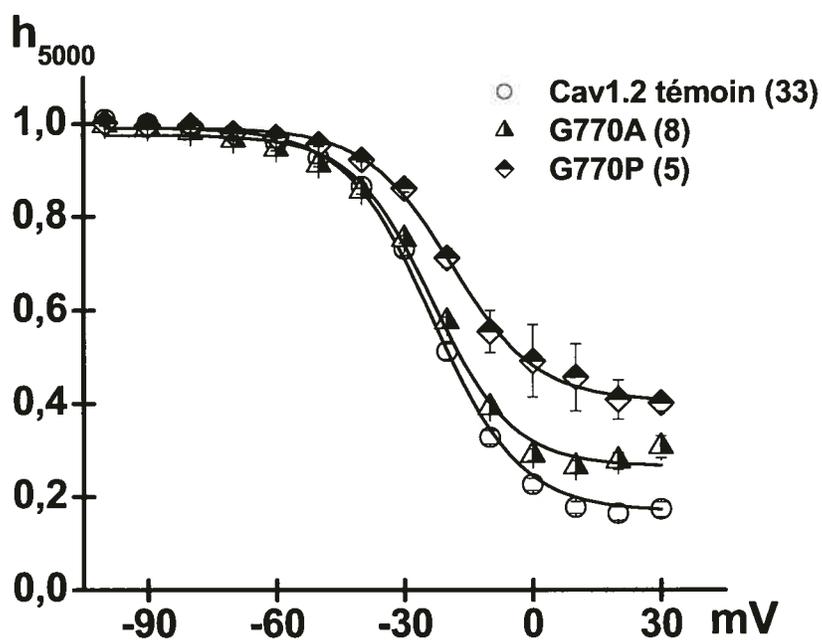


Figure 33. h_{5000} de la position G770 du segment IIS6. La dépendance en voltage de l'inactivation de la mutation G770A est comparable à celle du canal témoin (de l'ordre de -23 mV), alors que la mutation G770P s'inactive à un potentiel $E_{0.5,inact}$ un peu plus positif (+4 mV).

En comparant les graphiques R_{800} (Figure 32) et h_{5000} (Figure 33), nous nous apercevons que la valeur du R_{800} à 10 mV de la mutation G770P est plus petite que celle de G770A tandis qu'il y a une inversion pour les courants résiduels du graphique h_{5000} . Cette contradiction apparente peut s'expliquer par les différences des cinétiques d'inactivation des deux mutants. La cinétique du mutant G770P semble être gouvernée par deux constantes d'inactivation : une rapide et une plus lente à partir de 300 ms. C'est la cinétique rapide qui domine à 800 ms alors que c'est la cinétique lente qui contrôle l'inactivation après 5000 ms. La mutation G770A semble s'inactiver en suivant une seule constante de temps. La cinétique intermédiaire de mutant G770A l'amène toutefois à s'inactiver plus rapidement après 5 s.

Ca _v 1.2/α2δ/β3 10 mM Ba ²⁺	Activation		Inactivation	
	E _{0.5,act} (mV)	" Time to peak" (ms)	E _{0.5,inact} (mV)	R ₈₀₀ à 10 mV
Ca _v 1.2 témoin	-7.0 ± 0.9 (33)	49 ± 3 (33)	-22.7 ± 0.9 (33)	0.47 ± 0.02 (33)
G422A	-2.5 ± 1.2 (12)	22 ± 2 (12)	n.d.	0.81 ± 0.02 (12)
G422P	N/E (2)	N/E (2)	N/E (2)	N/E (2)
G432A	-1.8 ± 1.1 (21)	71 ± 15 (13)	n.d.	0.91 ± 0.01 (13)
G432P	N/E (2)	N/E (2)	N/E (2)	N/E (2)
G432S	-4.2 ± 0.6 (22)	711 ± 43 (22)	n.d.	n.d.
G436A	-7.4 ± 1.5 (21)	57 ± 3 (21)	-21.4 ± 0.6 (12)	0.70 ± 0.01 (21)
G436P	-6.0 ± 1.4 (9)	124 ± 29 (8)	n.d.	0.92 ± 0.01 (8)
G436R	-13.9 ± 0.7 (7)	445 ± 39 (7)	n.d.	0.92 ± 0.01 (7)
G436K	-13.7 ± 1.5 (7)	707 ± 44 (7)	n.d.	n.d.
G436H	-7.7 ± 0.9 (9)	628 ± 57 (9)	n.d.	n.d.
G436E	-11.7 ± 0.6 (9)	327 ± 54 (9)	n.d.	0.91 ± 0.01 (9)
G436D	-11.7 ± 0.9 (9)	765 ± 26 (9)	n.d.	n.d.
G436Y	-7.5 ± 0.7 (10)	201 ± 28 (14)	n.d.	0.87 ± 0.02 (14)
G422A+G432A	N/E (2)	N/E (2)	N/E (2)	N/E (2)
G422A+G436A	-7.8 ± 0.8 (12)	202 ± 57 (12)	n.d.	0.85 ± 0.06 (12)
G432A+G436A	-6.8 ± 0.7 (8)	717 ± 42 (8)	n.d.	n.d.
GGGAAA	-1.2 ± 0.6 (11)	631 ± 27 (11)	n.d.	n.d.
G770A	-9.8 ± 0.8 (17)	52 ± 2 (17)	-23.2 ± 0.3 (8)	0.58 ± 0.02 (17)
G770P	-11.3 ± 1.2 (9)	27 ± 1 (9)	-19.4 ± 0.5 (5)	0.46 ± 0.02 (9)

Tableau 4. Propriétés biophysiques des canaux Ca_v1.2 témoin et mutés. Les paramètres : E_{0.5,act}, « Time to peak », R₈₀₀ et E_{0.5,inact} ont été déterminés selon les méthodes décrites à la section 2. Il y a entre parenthèses le nombre d'enregistrements, n.d = non-déterminé et N/E = Absence d'expression fonctionnelle.

4. DISCUSSION

Le canal calcique cardiaque de type L $Ca_v1.2$ appartient à la famille HVA des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC). Il est entre autres impliqué dans le maintien de la phase plateau du potentiel d'action cardiaque (Richards et al. 1999).

Tous les canaux de la famille HVA possèdent quatre résidus glycine qui sont strictement conservés : trois glycines dans le segment IS6 et une glycine dans le segment IIS6. Dernièrement, deux mutations de résidus glycine conservés du IS6 du canal humain $Ca_v1.2$ (G402S et G406R) ont été impliquées dans une maladie infantile très rare : le syndrome de Timothy. Sa principale caractéristique est l'allongement de l'intervalle QT pouvant conduire à l'apparition d'arythmies ventriculaires (Splawski et al. 2004, Splawski et al. 2005), ce qui lui a valu d'être aussi classé comme la 8^{ième} forme du long QT congénital (LQT8).

Comme les mécanismes de « gating » des canaux calciques de type VDCC sont peu connus, des analogies avec les canaux potassiques pourraient nous aider à comprendre ces propriétés. La première glycine du IS6 (G422) s'aligne avec la glycine-pivot des canaux KcsA, Mthk, KirBac1.1, KvAP et $K_v1.2$. Les deux autres résidus conservés (G432 et G436) s'alignent avec la porte d'activation PXP des canaux de type *Shaker* (Kitaguchi et al. 2004).

4.1. Les mutations impliquées dans le syndrome de Timothy :

4.1.1. G432S et G436R modifient les propriétés de « gating » du canal $Ca_v1.2$

La mutation G406R du segment IS6 sur le canal humain de type L $Ca_v1.2$, a été la première mutation à être impliquée dans le syndrome de Timothy (Splawski et al. 2004). Du fait d'une perte quasi-totale de l'inactivation dépendante du voltage (VDI), cette mutation confère donc au canal $Ca_v1.2$ un gain de fonction : ce qui retarde la repolarisation du cardiomyocyte et se traduit par un allongement de l'intervalle QT. L'année dernière, une autre mutation du segment IS6, G402S, sur ce même canal a été mise en évidence avec des propriétés d'inactivation similaires à la mutation G406R (Splawski et al. 2005). Ces deux mutations correspondent aux mutants G432S et G436R sur le canal $Ca_v1.2$ de lapin.

Nous avons commencé par tester ces deux mutants en condition Ba^{2+} pour mettre en évidence la dépendance en voltage de l'inactivation (VDI). Ensuite, des expériences en Ca^{2+} (cation de conduction physiologique) ont été faites pour voir si la dépendance en calcium de l'inactivation (CDI) était aussi affectée. Les deux mutations ponctuelles entraînent un ralentissement significatif de l'inactivation dans toutes les conditions par rapport au canal témoin. Si l'on considère que les expériences en Ba^{2+} ne reflètent que l'inactivation de type VDI, alors que les expériences en Ca^{2+} contiennent à la fois les inactivations de type VDI et CDI, alors la dépendance en voltage de l'inactivation est beaucoup plus affectée par ces mutations.

Lorsque l'on regarde les cinétiques d'activation en Ba^{2+} , les deux canaux mutés montrent des cinétiques d'activation plus lentes que le canal témoin, en particulier avec la mutation G432S. La différence entre les temps d'activation des deux mutants pourrait s'expliquer par leur position au sein du segment IS6. D'après la figure 2, la glycine G432 est située dans la membrane plasmique alors que l'interface membrane/cytoplasme serait au niveau de la glycine G436 (Zhen et al. 2005).

Par opposition aux expériences Ba^{2+} , le paramètre « Time to peak » des deux mutants est du même ordre de grandeur que celui de $Ca_v1.2$ en condition Ca^{2+} . En étudiant le modèle cinétique en Ca^{2+} et en Ba^{2+} (Figure 34) (Bernatchez et al. 2001a), l'inactivation dépendante du voltage semble être le processus le plus affecté par les mutations G432S et G436R. En présence de Ca^{2+} , l'inactivation de type CDI est le processus dominant (Paramètre « Time to peak » des deux mutants comparables à $Ca_v1.2$): le canal passe rapidement dans l'état inactivé. Par contre en condition Ba^{2+} , la déactivation domine (Paramètre « Time to peak » des deux mutants significativement ralentis par rapport à $Ca_v1.2$): le canal oscille entre les états C et O avant de s'inactiver.

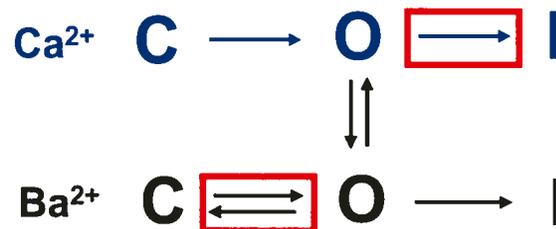


Figure 34. Modèle cinétique de $Ca_v1.2$ en condition Ca^{2+} et Ba^{2+} . Le modèle est décrit au minimum par trois états : C (« Closed »), O (Ouvert) et I (Inactivé). En présence de Ca^{2+} , l'inactivation domine alors qu'en Ba^{2+} la déactivation est le processus dominant.

Le ralentissement des cinétiques d'inactivation en Ca^{2+} des deux mutants pourrait donc s'expliquer par le fait que les deux mécanismes coexistent.

Les potentiels d'activation et d'inactivation du canal $\text{Ca}_v1.2$ sont peu affectés par les changements de l'ion conducteur. Dans les conditions de nos expériences en Ca^{2+} , solution de 10 mM, le changement en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ n'est pas suffisant pour observer des déplacements du potentiel $E_{0.5,\text{act}}$ du canal $\text{Ca}_v1.2$. En effet, pour les canaux calciques dépendants du voltage (VDCC), les changements de concentration en calcium externe doivent être importants (> 50 mM) pour observer un déplacement significatif du $E_{0.5,\text{act}}$ (Hille 2001).

Les propriétés de « gating » de tous les autres canaux dépendants du voltage (sauf les canaux à rectification entrante) sont affectées par un changement de la concentration en Ca^{2+} extracellulaire. On observe des déplacements positifs du potentiel d'activation lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ augmente et des déplacements négatifs quand elle diminue. Ces déplacements du potentiel d'activation en fonction de la concentration externe de Ca^{2+} peuvent s'expliquer par la théorie des potentiels de surface. Les ions Ca^{2+} extracellulaires vont se lier aux groupements acides ionisés de la membrane plasmique et créer ainsi des champs électriques locaux qui vont influencer le senseur à voltage S4 des canaux dépendants du voltage (Frankenhaeuser and Hodgkin 1957, Hille 2001, Hong et al. 2001).

Les mutations G432S et G436R restaurent ce déplacement dépolarisant du potentiel d'activation lors des expériences en Ca^{2+} (même en condition 10 mM de Ca^{2+}), respectivement : environ +8 mV et +13 mV par rapport aux expériences en Ba^{2+} . Le fait d'introduire des résidus hydrophiles S et R (chargé positivement avec R) pourrait changer les champs électriques locaux de la membrane plasmique conduisant ainsi au déplacement dépolarisant du potentiel d'activation des deux canaux mutés en condition 10 mM Ca^{2+} .

Les résultats observés avec les mutations G432S et G436R sont renforcés par le fait que ces deux glycines s'alignent avec la porte d'activation PXP des canaux potassiques de type *Shaker*.

4.1.2. Comparaison avec d'autres résultats publiés

Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par le groupe de Keating sur le canal calcique humain $Ca_v1.2$ malgré des différences au niveau des conditions expérimentales. Dans leur premier article où la mutation G406R a été premièrement impliqué dans le syndrome de Timothy, ce groupe a effectué des expériences de « Patch-Clamp » en configuration « Whole-cell » sur des cellules CHO (15 mM Ca^{2+} , transfection des sous-unités $Ca_v\beta_{2b}$ et $Ca_v\alpha_{2\delta}$) (Splawski et al. 2004) ainsi que des expériences en voltage imposé à deux électrodes (40 mM Ba^{2+} , co-injection des sous-unités $Ca_v\beta_{2b}$ et $Ca_v\alpha_{2\delta}$) (Splawski et al. 2004, Splawski et al. 2005). En effet, ce groupe observe des potentiels de mi-activation comparables pour G402S et $Ca_v1.2$, un déplacement hyperpolarisant (-9 mV) du $E_{0.5,act}$ de G406R par rapport au contrôle et un ralentissement significatif des cinétiques d'inactivation avec G402S et G406R (Splawski et al. 2005).

Il y a quelques différences notables au niveau des valeurs des potentiels de mi-activation et de mi-inactivation. Par exemple, le potentiel de mi-activation de G406R se compare à celui de $Ca_v1.2$ alors que nous observons un décalage de +6 mV avec G436R en présence de Ca^{2+} . La dépendance en voltage de l'inactivation en Ba^{2+} de $Ca_v1.2$ a été évaluée à environ -8 mV alors que nous la situons autour de -23 mV. Nous n'avons pas caractérisé la dépendance en voltage de l'inactivation du mutant G436R car ses cinétiques d'inactivation étaient beaucoup trop lentes. Par contre, le groupe de Keating l'a évaluée aux environs de 0 mV malgré une courbe d'inactivation non spécifique.

Les différences observées pourraient s'expliquer par plusieurs points :

- Les sous-unités auxiliaires utilisées : $Ca_v\beta 2b$ vs $Ca_v\beta 3$. La sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta$ module les propriétés de « gating » du canal avec lequel elle s'assemble. Nous avons choisi d'utiliser la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta 3$ parce qu'elle stimule les cinétiques d'inactivation avec le plus d'efficacité (Parent et al. 1997) (Voir section 1.2.3).
- Les systèmes d'expression : cellules CHO vs ovocytes de *Xénope*. La modulation par les sous-unités auxiliaires change avec les systèmes d'expression (Yasuda et al. 2004) (Voir section 1.2.3). De plus, la contamination par les courants Cl^- endogènes reste un problème dans les ovocytes de *Xénope* malgré l'injection d'EGTA.
- Les enregistrements électrophysiologiques : « Patch-Clamp » en configuration « Whole-cell » vs voltage imposé à deux électrode. Les techniques de « Patch-Clamp » permettent de compenser les courants capacitifs tandis qu'il y a une diminution de la résolution temporelle à des temps très courts pour les expériences en voltage imposé en double électrode. De plus, il y a une légère différence au niveau des protocoles de pulse : les intervalles de 5 mV que nous utilisons donnent une meilleure estimation des paramètres de « gating » que les intervalles 10 mV utilisés par le groupe de Keating.

4.2. Les mutations de charges en G436 affectent l'empilement de l'hélice α dans IS6

Le point de départ de cette étude de mutations de charge au niveau de la glycine G436 du segment IS6 est la mutation G436R qui est impliquée dans le syndrome du LQT8. En effet, son potentiel d'activation est environ décalé de -7 mV et ses cinétiques d'inactivation en Ba^{2+} sont significativement ralenties par rapport au canal $Ca_v1.2$.

La mutation de charge conservée, G436K, se comporte comme le mutant G436R. Cette concordance entre les phénotypes des mutants G436R et G436K n'est pas surprenante car les résidus R et K sont tous les deux chargés positivement et la taille de leur chaîne latérale est comparable. La dernière mutation de charge positive, G436H, montre les mêmes propriétés cinétiques. En revanche, le potentiel d'activation du mutant G436H se compare à celui du canal témoin. L'histidine se différencie des deux autres acides aminés positifs par la présence du noyau imidazole sur sa chaîne latérale. La valeur du pKa de sa chaîne latérale est de l'ordre de 6 à 7 : ce qui lui confère une forte proportion de forme non-ionisée à pH = 7. D'ailleurs, la protonation de son noyau imidazole aboutit à un noyau imidazolium qui est stabilisé par résonance (Rawn 1990). Nos résultats suggèrent donc que la chaîne latérale de l'histidine est non chargée au pH local intracellulaire (pH < pKa).

Des mutations de charges négatives (D et E) ont aussi été introduites pour vérifier si la charge seule pouvait affecter le comportement du canal $Ca_v1.2$. Les mutants G436D et G436E montrent des caractéristiques comparables aux mutations de charges positives G436R et G436K. Il semble que toute charge introduite à la position G436 affecte les propriétés de « gating » du canal $Ca_v1.2$.

Après avoir testé les mutations par des résidus chargés, nous avons introduit une mutation par un acide aminé aromatique et hydrophile, G436Y (groupement hydroxyle sur le cycle aromatique). Cette mutation n'affecte pas le potentiel de mi-activation. En revanche, ses cinétiques d'activation sont intermédiaires entre les mutants chargés et le canal témoin, et les cinétiques d'inactivation sont significativement ralenties par rapport à Ca_v1.2.

Pour tester la flexibilité de la position G436, nous avons introduit des mutations en A et en P : l'alanine favorise les structures hélicoïdales alors que la proline tend à les casser (Chou and Fasman 1974, Pace and Scholtz 1998). La mutation G436A change peu le volume du résidu : après la glycine, l'alanine est le plus petit résidu hydrophobe et la probabilité de retrouver ce résidu au sein d'une hélice α est élevée (Pace and Scholtz 1998). Les résultats observés avec cette mutation ressemblent le plus à notre canal témoin tant en terme de potentiels d'activation et d'inactivation que de cinétiques, même si l'on voit un léger ralentissement au niveau des cinétiques d'inactivation. Le mutant G436P ralentit significativement les cinétiques d'inactivation sans affecter le potentiel d'activation. La proline est un résidu particulier car elle possède un noyau pyrrole très rigide qui insère des contraintes géométriques dans les structures protéiques. De façon générale, les hélices α sont stabilisées par des ponts hydrogènes entre le groupement aminé d'un résidu et le groupement carboxylique d'autre résidu situé quatre acides aminés plus loin (Un pas d'hélice). De par la présence de son cycle, la proline n'a plus d'hydrogène libre nécessaire à la stabilité des hélices α (Rawn 1990). On se serait attendu à ce que le phénotype du mutant G436P soit bien différent de celui du canal Ca_v1.2 : comme l'interface membrane/cytoplasme se situe en G436, peut-être qu'il ne s'agit plus vraiment d'une hélice α à cette position. La seule différence notable avec la mutation G436P est le ralentissement significatif au niveau des cinétiques d'inactivation. Ce délai pourrait s'expliquer par le fait que la proline insérerait une distorsion géométrique non favorable au repliement de la boucle I-II

impliquée dans le modèle d'inactivation de type « Hinged-Lid » des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC).

En résumé, aucune des mutations que nous avons introduites ne reproduit le phénotype du canal $Ca_v1.2$. Seule la mutation G436A s'en rapproche légèrement. Quelle que soit la nature de la charge introduite à cette position, on observe un ralentissement marqué des cinétiques d'activation et un déplacement hyperpolarisant des potentiels de mi-activation qui favorise l'ouverture du canal. Il y a un résidu glutamate (chargé négativement) proximal de la glycine G436 : l'introduction d'une autre charge à cette position déstabiliserait l'empilement du segment IS6. Les propriétés d'activation observées avec les mutants G436A, P et Y ne montrent aucun changement par rapport à celles du canal $Ca_v1.2$.

Au niveau de l'inactivation, il est plus difficile d'établir une relation simple entre la nature du résidu et le phénotype observé. Tous les mutants introduits à la position G436 ralentissent les cinétiques d'inactivation et dans la majeure partie des cas, les cinétiques d'inactivation sont beaucoup trop lentes pour évaluer la dépendance en voltage de l'inactivation. Empilement et flexibilité à cette position sont importants au bon fonctionnement du mécanisme d'inactivation : la structure simple de la glycine, ie absence de chaîne latérale, semble donc être nécessaire à cette position.

4.3. Mutations en alanine des trois glycines du segment IS6

Après l'analyse détaillée de la position G436, nous avons introduit des mutations ponctuelles en alanine au niveau des deux autres résidus glycine conservés du segment IS6.

Les cinétiques d'inactivation des mutations simples G422A et G432A sont encore plus ralenties par rapport au canal témoin que celles observées avec le mutant G436A. Nous observons aussi un déplacement de l'activation vers des potentiels un peu plus positifs, ce qui favorise l'état fermé du canal. Nous avons donc introduit des mutations multiples pour tester les propriétés additives des potentiels d'activation des mutants simples en alanine. En effet, des mutations dans une protéine se traduisent par des variations de l'énergie libre ($\Delta\Delta G$). Dans la majorité des cas, la somme des changements d'énergie provenant de mutations simples est approximativement égale au changement d'énergie de la mutation multiple (Wells 1990) :

$$\Delta\Delta G_{(X;Y)} = \Delta\Delta G_{(X)} + \Delta\Delta G_{(Y)} + \Delta G_1 \approx \Delta\Delta G_{(X)} + \Delta\Delta G_{(Y)} \quad (3)$$

Où X et Y représentent les mutations simples, (X ; Y) est la mutation double et ΔG_1 est une énergie de couplage entre X et Y qui s'annule lorsqu'il n'y a aucune interaction entre les chaînes latérales des résidus X et Y (Wells 1990).

D'après les résultats obtenus, aucune tendance additive n'est décelée au niveau des potentiels d'activation des mutations multiples. Cependant, les variations du potentiel d'activation des mutants double et triple en alanine nous permettent de relever quelques points importants. Même si le potentiel d'activation du mutant G436A se compare avec celui du canal témoin, sa

présence au sein des mutations doubles G422A + G436A et G432A + G436A semble annuler les effets observés avec les mutations simples G422A et G432A. En effet, les potentiels d'activation de ces mutations doubles sont similaires au canal témoin. En revanche, la mutation triple GGGAAA montre un déplacement dépolarisant du potentiel d'activation, il faut donc la présence des glycines G422 et G432, pour compenser les effets de la G436 : ce qui suggère que les résidus G422 et G432 ont un effet déterminant sur l'activation.

Au niveau des cinétiques d'inactivation, la mutation en alanine de l'une des trois glycines conservées du IS6 est suffisante pour ralentir significativement les cinétiques d'inactivation du canal $Ca_v1.2$. Les mutations double et triple confèrent des cinétiques d'inactivation comparables à celles des mutations simples. En revanche, les cinétiques d'activation des mutations multiples sont significativement ralenties par rapport aux cinétiques des mutants simples qui se comparent au canal témoin : la présence de deux glycines non mutées est nécessaire pour observer des cinétiques d'activation comparables à $Ca_v1.2$.

4.4. Les résidus G422 et G432 sont impliqués dans les propriétés d'activation du canal Ca_v1.2

Les décalages dépolarisants du potentiel d'activation observés avec G422A et G432A nous indiquent que les positions G422 et G432 seraient impliquées dans les propriétés d'activation du canal Ca_v1.2. Les propriétés fonctionnelles des mutants G422P et G432P auraient pu nous aider à confirmer cette hypothèse.

G422P et G432P ne présentent aucun courant macroscopique en Ba²⁺. Cette observation, ainsi que la non-fonctionnalité de la mutation double G422A + G432A, renforce indirectement notre conclusion concernant l'implication des résidus glycine G422 et G432 dans les propriétés d'activation du canal Ca_v1.2. L'immunobuvardage de type « Western » des membranes totales et de la préparation enrichies en membranes plasmiques nous indique qu'elles sont correctement traduites et adressées à la membrane plasmique avec le poids moléculaire attendu. La non-fonctionnalité de ces mutants pourrait s'expliquer par un mauvais repliement de ces trois protéines mutées lors de l'insertion dans la membrane plasmique ou alors par un changement dramatique des propriétés d'activation du canal. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la contamination par des échantillons de membranes totales lors de l'isolation des membranes plasmiques d'ovocytes.

Il est intéressant de noter que la mutation triple GGGAAA est fonctionnelle alors qu'elle possède les deux mutations G422A et G432A. La diminution de la flexibilité introduite par la présence de l'alanine en position 422 et 432 pourrait aboutir à une contrainte géométrique dans un sens. Nous suggérons que la présence d'une autre alanine en 436 pourrait compenser cet effet en introduisant une autre contrainte géométrique dans le sens opposé.

4.5. Le résidu G770 du segment IIS6 n'est pas impliqué dans les propriétés de « gating » du canal Ca_v1.2

Contrairement aux canaux potassiques qui forment des tétramères de sous-unités α identiques (Yellen 1998), les canaux calciques Ca_v, tout comme les canaux sodiques Na_v, sont des pseudo-tétramères composés d'une seule protéine : la sous-unité Ca_v α 1 qui possède quatre domaines homologues mais non identiques (Catterall 1996, Hille 2001).

Par analogie avec les canaux potassiques, où les quatre domaines participent au mécanisme de « gating » (Catterall 1996, Stotz and Zamponi 2001a), nous avons étudié le rôle du résidu G770 dans le segment IIS6. Comme G770 se situe au centre du segment IIS6, nous avons introduit des mutations en alanine et proline pour tester l'importance de la flexibilité de ce résidu dans les processus de « gating » du canal Ca_v1.2.

La majorité des quatre paramètres utilisés pour caractériser les propriétés d'activation et d'inactivation n'a pas été significativement altérée par les mutations G770A et G770P. Ces observations suggèrent que le résidu G770 ne participe pas au « gating » du canal Ca_v1.2.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Toutes les mutations effectuées au niveau des glycines du segment IS6 affectent les propriétés biophysiques du canal $Ca_v1.2$. En revanche, les glycines du segment IIS6 tendent à se comporter comme le canal témoin. Par conséquent, seules les trois glycines du segment IS6 semblent participer aux propriétés de « gating » du canal $Ca_v1.2$. Nos résultats suggèrent donc que chacun de ces résidus joue un rôle soit dans l'activation soit dans l'inactivation du canal $Ca_v1.2$. Leur rôle pourrait aussi être influencé par leur position au sein du segment IS6 : en représentation hélicoïdale, les trois glycines sont situées du même côté (Figure 34). Il serait intéressant de tester le rôle de l'orientation des glycines sur l'activation du canal en introduisant des mutations en glycine de l'autre côté de l'hélice.

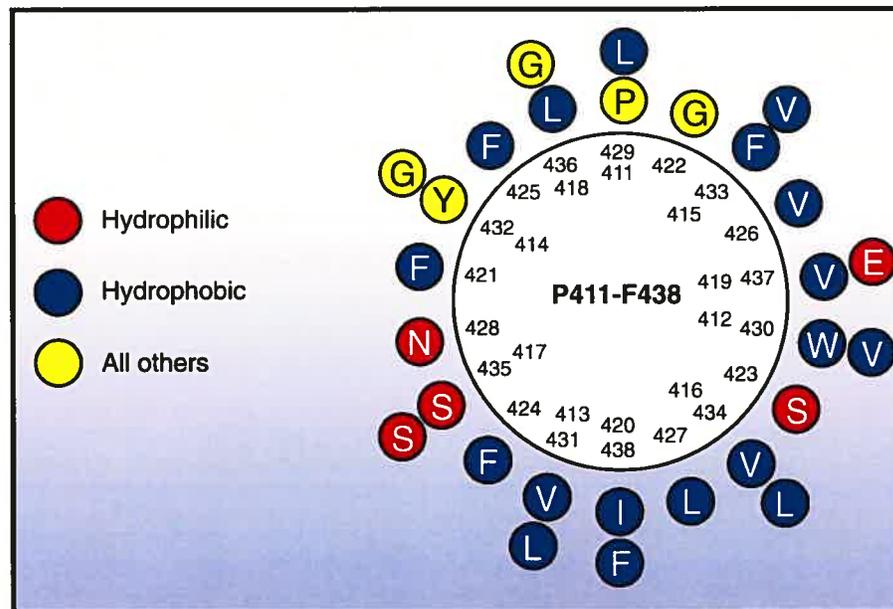


Figure 35. Vue supérieure de segment IS6 en projection hélicoïdale. La projection hélicoïdale du segment IS6 a été obtenue avec *Antherprot*. Les trois glycines conservées au niveau de tous les canaux de type HVA sont situées du même côté de l'hélice.

La glycine G422, située environ au milieu du segment IS6, semble jouer un rôle au niveau de l'activation du canal. D'ailleurs, G422 s'aligne avec la « glycine hinge » des canaux potassiques (KcsA, Mthk, KirBac1.1, KvAP et Kv1.2) et du canal sodique bactérien NaChBac (Kitaguchi et al. 2004, Zhao et al. 2004). Par analogie avec la structure cristalline en configuration ouverte du canal potassique bactérien MthK (Jiang et al. 2002a, b), G422 pourrait servir de pivot au segment IS6, participant ainsi l'ouverture du canal. Bien que les effets observés sur les paramètres d'activation soient significatifs, ils ne sont pas aussi importants que ceux observés dans les autres canaux ci-haut cités. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que G422A ne modifie qu'un seul des quatre segments S6. En effet, les déplacements du potentiel d'activation du canal de type *Shaker* sont beaucoup moins importants lorsque les mutations de la « glycine hinge » (Ding et al. 2005) ou de la porte d'activation PXP (Labro et al. 2003) ne concernent qu'un seul des quatre segments S6.

Les effets observés avec les mutations en G432 et G436 affectent à la fois des cinétiques d'activation et d'inactivation du canal Ca_v1.2. En considérant leur alignement avec la porte d'activation des canaux potassique de type *Shaker* (Kitaguchi et al. 2004) et le modèle cinétique à trois états au minimum du canal Ca_v1.2 en condition Ba²⁺ (Figure 34), nous suggérons que le ralentissement causé par les mutations des résidus G432 et G436 sur les cinétiques d'activation se répercutent sur les cinétiques d'inactivation. En effet, l'inactivation et l'activation sont couplées dans le canal Ca_v1.2. Notons aussi que le IS6 se situe en amont du AID : principale région responsable de l'inactivation dépendante du voltage (Bourinet et al. 1999, Cens et al. 1999, Stotz et al. 2000, Bernatchez et al. 2001b, Berrou et al. 2001, Stotz and Zamponi 2001a, Berrou et al. 2002, Dafi et al. 2004, Berrou et al. 2005).

L'empilement et la flexibilité du résidu G436 seraient donc critiques pour le mécanisme d'inactivation. On peut suggérer que ce résidu ne soit pas dans

une hélice α et qu'il agirait à titre de pivot pour la porte d'inactivation du canal $Ca_v1.2$: la boucle I-II se replierait sous le pore afin d'inhiber le passage des ions (modèle d'inactivation de type « Hinged-Lid »).

Le modèle de « gating » (Figure 36) implique la flexibilité du segment IS6 : G422 comme pivot dans l'activation et G436 comme pivot dans l'inactivation). Ce modèle combine toutes les observations récentes de notre laboratoire et plus spécifiquement nos travaux sur l'inactivation (Berrou et al. 2001, Dafi et al. 2004, Berrou et al. 2005). Il ne serait valable que pour les canaux de type HVA, en effet les canaux de la famille Ca_v3 ne possèdent pas la région AID qui est essentielle au mécanisme d'inactivation.

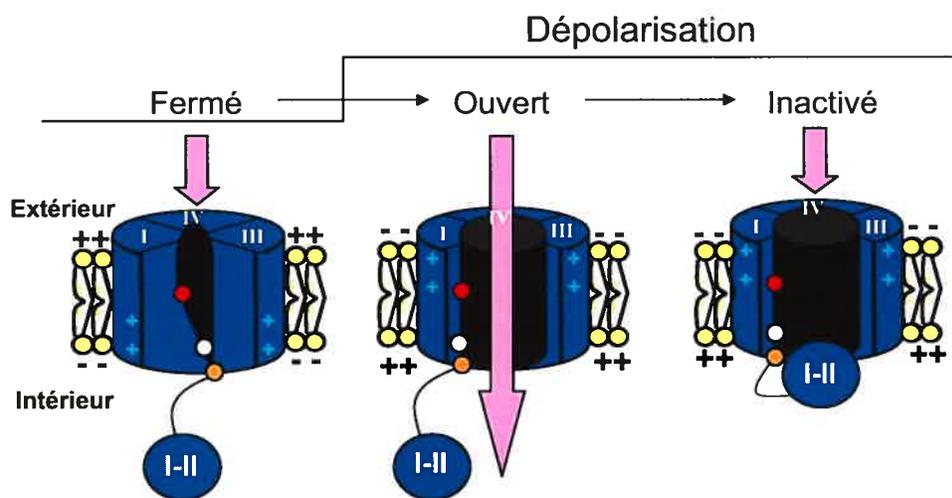


Figure 36. Modèle hypothétique de « gating » des canaux calciques de type HVA. À l'état fermé, les charges positives du senseur à voltage S4 sont situées du côté cytoplasmique. Lors de la dépolarisation, le potentiel de la membrane plasmique s'inverse et les charges du IS4 se déplacent vers le côté extracellulaire en entraînant le mouvement du segment IS5 et IS6 via la glycine-pivot G422 qui participerait à l'ouverture du canal. L'inactivation serait causée par les glycinés G432 et G436 qui permettent le repliement de la boucle I-II sous le pore du canal afin d'inhiber le passage des ions. Pour la figure, le domaine II a été enlevé afin de montrer le pore. Seuls les mouvements hypothétiques du IS6 sont montrés car pour les autres segments le mécanisme n'est pas connu. Les cercles de couleur représentent les trois glycinés conservés du IS6 : G422 en rouge, G432 en gris clair et G436 en orange.

Dans ce projet, nous avons donc étudié les glycines conservées dans les segments S6 de tous les canaux calciques qui s'activent avec de fortes dépolarisations (HVA).

Si l'on regarde la structure primaire des quatre segments S6 du canal $Ca_v1.2$, on constate qu'il y a dans chaque cas des motifs hydrophobes qui sont strictement conservés dans tous les canaux de type HVA. En effet, dans le segment IS6, la glycine G432 appartient au motif LVLGVL. Dans les trois autres segments, ces séquences hydrophobes se lisent : VFLAIAV dans IIS6, IFV dans IIS6 et LFVAVIM dans IVS6. Le groupe de Hering a mis en évidence l'implication du résidu I781 du motif LAIA du segment IIS6 du canal $Ca_v1.2$ par une étude de mutagenèse dirigée. La mutation I781P décale de façon dramatique (-37 mV) le potentiel d'activation (Hohaus et al. 2005). D'autre part, la mutation I1811L du motif hydrophobe LFVAVIM (IVS6) du canal $Ca_v2.1$ causant la migraine hémiplégique de type familiale, montre aussi des changements hyperpolarisants au niveau de l'activation de ce canal (Kraus et al. 1998, Kraus et al. 2000).

Dans notre laboratoire, des travaux ont déjà été effectués au niveau du motif hydrophobe LFVAVIM (IVS6) du canal $Ca_v2.3$ (projet de maîtrise de Ebru-Eylem Baspinar). Une étude de mutagenèse dirigée du résidu I1721 (équivalent au I1811 du canal $Ca_v2.1$) et des résidus adjacents lui a permis d'impliquer le motif VAVIM dans les propriétés d'activation et d'inactivation du canal $Ca_v2.3$.

Beaucoup de travail reste encore à faire sur ce projet pour comprendre et améliorer le modèle de « gating » des canaux de type HVA :

- Dans un premier temps, il faudrait étudier par mutagenèse dirigée les quatre motifs hydrophobes des quatre segments S6 en testant flexibilité et empilement hélicoïdal pour raffiner le modèle de « gating » des canaux de type HVA.
- Dans un second temps, il serait intéressant de construire des mutations multiples sur des positions qui ont des rôles différents sur l'activation et l'inactivation. Nous suggérons que la mutation double G436R + E462R, où le mutant E462R du AID accélère les cinétiques d'inactivation (Berrou et al. 2001, Dafi et al. 2004), rétablirait les cinétiques d'inactivation du canal Cav1.2,

6. RÉFÉRENCES

- Bazett, H. 1920.** An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 7: 353-370.
- Bernatchez, G., D. Talwar, and L. Parent. 1998.** Mutations in the EF-hand motif impair the inactivation of barium currents of the cardiac α_1C channel. *Biophys J* 75: 1727-39.
- Bernatchez, G., R. Sauve, and L. Parent. 2001a.** State-dependent inhibition of inactivation-deficient $Ca_v1.2$ and $Ca_v2.3$ channels by mibefradil. *J Membr Biol* 184: 143-59.
- Bernatchez, G., L. Berrou, Z. Benakezouh, J. Ducay, and L. Parent. 2001b.** Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the $Ca_v2.3$ channel. *Biochim Biophys Acta* 1514: 217-29.
- Berridge, M. J. 1997.** Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* 200: 315-9.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, and H. L. Roderick. 2003.** Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 517-29.
- Berrou, L., G. Bernatchez, and L. Parent. 2001.** Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of α_1E ($Ca_v2.3$) calcium channels. *Biophys J* 80: 215-28.
- Berrou, L., H. Klein, G. Bernatchez, and L. Parent. 2002.** A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in $Ca_v2.3$ calcium channels. *Biophys J* 83: 1429-42.
- 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 Ca_v beta subunit interaction and modulation of $Ca_v2.3$ channels. *J Biol Chem* 280: 494-505.
- Bers, D. M., and E. Perez-Reyes. 1999.** Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* 42: 339-60.
- Bezanilla, F. 2005.** Voltage-gated ion channels. *IEEE Trans Nanobioscience* 4: 34-48.
- Bezanilla, F., and E. Stefani. 1998.** Gating currents. *Methods Enzymol* 293: 331-52.

- 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: 177-90.
- Black, J. L., 3rd. 2003.** The voltage-gated calcium channel gamma subunits: a review of the literature. *J Bioenerg Biomembr* 35: 649-60.
- Bourinet, E., S. C. Stotz, R. L. Spaetgens, G. Dayanithi, J. Lemos, J. Nargeot, and G. W. Zamponi. 2001.** Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca_v2.3) calcium channels. *Biophys J* 81: 79-88.
- Bourinet, E., T. W. Soong, K. Sutton, S. Slaymaker, E. Mathews, A. Monteil, G. W. Zamponi, J. Nargeot, and T. P. Snutch. 1999.** Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 2: 407-15.
- 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: 749-59.
- Catterall, W. A. 1996.** Molecular properties of sodium and calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 28: 219-30.
- Catterall, W. A. 2000.** Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 521-55.
- 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: 579-81.
- Cens, T., S. Restituito, S. Galas, and P. Charnet. 1999.** Voltage and calcium use the same molecular determinants to inactivate calcium channels. *J Biol Chem* 274: 5483-90.
- Chien, A. J., K. M. Carr, R. E. Shirokov, E. Rios, and M. M. Hosey. 1996.** Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel beta2a subunit and effects on channel function. *J Biol Chem* 271: 26465-8.
- Chou, P. Y., and G. D. Fasman. 1974.** Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13: 222-45.

- Clapham, D. E. 2003.** TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517-24.
- Cornet, V., D. Bichet, G. Sandoz, I. Marty, J. Brocard, E. Bourinet, Y. Mori, M. Villaz, and M. De Waard. 2002.** Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *Eur J Neurosci* 16: 883-95.
- 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: 103-9.
- Dafi, O., L. Berrou, Y. Dodier, A. Raybaud, R. Sauve, and L. Parent. 2004.** Negatively charged residues in the N-terminal of the AID helix confer slow voltage dependent inactivation gating to Cav1.2. *Biophys J* 87: 3181-92.
- de Leon, M., Y. Wang, L. Jones, E. Perez-Reyes, X. Wei, T. W. Soong, T. P. Snutch, and D. T. Yue. 1995.** Essential Ca²⁺-binding motif for Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *Science* 270: 1502-6.
- Dessertenne, F., P. Coumel, and A. Fabiato. 1969.** [Ventricular fibrillation and twisted peaks]. *Presse Med* 77: 193-6.
- Ding, S., L. Ingleby, C. A. Ahern, and R. Horn. 2005.** Investigating the putative glycine hinge in Shaker potassium channel. *J Gen Physiol* 126: 213-26.
- Dong Z., S. P., Weinberg JM., Venkatachama MA. 2006.** Calcium in Cell Injury and Death. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1: 405-34.
- 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: 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: 533-5.
- 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: 3110-25.
- Frankenhaeuser, B., and A. L. Hodgkin. 1957.** The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J Physiol* 137: 218-44.

- Geib, S., G. Sandoz, V. Cornet, K. Mabrouk, O. Fund-Saunier, D. Bichet, M. Villaz, T. Hoshi, J. M. Sabatier, and M. De Waard. 2002.** The interaction between the I-II loop and the III-IV loop of $\text{Ca}_v2.1$ contributes to voltage-dependent inactivation in a beta⁻-dependent manner. *J Biol Chem* 277: 10003-13.
- Glassman, A. H., and J. T. Bigger, Jr. 2001.** Antipsychotic drugs: prolonged QTc interval, torsade de pointes, and sudden death. *Am J Psychiatry* 158: 1774-82.
- Gurnett, C. A., M. De Waard, and K. P. Campbell. 1996.** Dual function of the voltage-dependent Ca^{2+} channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16: 431-40.
- Hackos, D. H., T. H. Chang, and K. J. Swartz. 2002.** Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker K^+ channel. *J Gen Physiol* 119: 521-32.
- 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 ($\text{Ca}_v3.1$) calcium current. *J Mol Cell Cardiol* 37: 1147-58.
- Heinemann, S. H., H. Terlau, W. Stuhmer, K. Imoto, and S. Numa. 1992.** Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356: 441-3.
- Hille, B. 2001.** *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- 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: 361-96.
- 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: 38471-7.
- Hong, K. H., C. M. Armstrong, and C. Miller. 2001.** Revisiting the role of Ca^{2+} in Shaker K^+ channel gating. *Biophys J* 80: 2216-20.
- Huber, I., E. Wappl, A. Herzog, J. Mitterdorfer, H. Glossmann, T. Langer, and J. Striessnig. 2000.** Conserved Ca^{2+} -antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity dihydropyridine-binding domain. *Biochem J* 347 Pt 3: 829-36.

- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 2002a.** Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417: 515-22.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 2002b.** The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417: 523-6.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 2003.** X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423: 33-41.
- Kaneko, S., C. B. Cooper, N. Nishioka, H. Yamasaki, A. Suzuki, S. E. Jarvis, A. Akaike, M. Satoh, and G. W. Zamponi. 2002.** Identification and characterization of novel human Ca_v2.2 (alpha 1B) calcium channel variants lacking the synaptic protein interaction site. *J Neurosci* 22: 82-92.
- Khan, I. A. 2002.** Long QT syndrome: diagnosis and management. *Am Heart J* 143: 7-14.
- Kitaguchi, T., M. Sukhareva, and K. J. Swartz. 2004.** Stabilizing the closed S6 gate in the Shaker Kv channel through modification of a hydrophobic seal. *J Gen Physiol* 124: 319-32.
- Klugbauer, N., E. Marais, and F. Hofmann. 2003.** Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr* 35: 639-47.
- Klugbauer, N., L. Lacinova, E. Marais, M. Hobom, and F. Hofmann. 1999.** Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* 19: 684-91.
- Kontis, K. J., A. Rounaghi, and A. L. Goldin. 1997.** Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J Gen Physiol* 110: 391-401.
- 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: 5586-90.
- Kraus, R. L., M. J. Sinnegger, A. Koschak, H. Glossmann, S. Stenirri, P. Carrera, and J. Striessnig. 2000.** Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca²⁺ channel kinetics. *J Biol Chem* 275: 9239-43.

- Kukuljan, M., P. Labarca, and R. Latorre. 1995.** Molecular determinants of ion conduction and inactivation in K⁺ channels. *Am J Physiol* 268: C535-56.
- Kuo, A., J. M. Gulbis, J. F. Antcliff, T. Rahman, E. D. Lowe, J. Zimmer, J. Cuthbertson, F. M. Ashcroft, T. Ezaki, and D. A. Doyle. 2003.** Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300: 1922-6.
- Labro, A. J., A. L. Raes, I. Bellens, N. Ottschytch, and D. J. Snyders. 2003.** Gating of shaker-type channels requires the flexibility of S6 caused by prolines. *J Biol Chem* 278: 50724-31.
- Lacinova, L., and F. Hofmann. 2005.** Ca²⁺- and voltage-dependent inactivation of the expressed L-type Ca_v1.2 calcium channel. *Arch Biochem Biophys* 437: 42-50.
- 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: 1912-21.
- Leroy, J., M. W. Richards, A. J. Butcher, M. Nieto-Rostro, W. S. Pratt, A. Davies, and A. C. Dolphin. 2005.** Interaction via a key tryptophan in the I-II linker of N-type calcium channels is required for beta1 but not for palmitoylated beta2, implicating an additional binding site in the regulation of channel voltage-dependent properties. *J Neurosci* 25: 6984-96.
- Letts, V. A. 2005.** Stargazer-a mouse to seize! *Epilepsy Curr* 5: 161-5.
- Letts, V. A., R. Felix, G. H. Biddlecome, J. Arikath, C. L. Mahaffey, A. Valenzuela, F. S. Bartlett, 2nd, Y. Mori, K. P. Campbell, and W. N. Frankel. 1998.** The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat Genet* 19: 340-7.
- Lewartowski, B. 2000.** Excitation-contraction coupling in cardiac muscle revisited. *J Physiol Pharmacol* 51: 371-86.
- Llinas, R. R., M. Sugimori, and B. Cherksey. 1989.** Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann N Y Acad Sci* 560: 103-11.
- Long, S. B., E. B. Campbell, and R. Mackinnon. 2005.** Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309: 897-903.

- Nakai, J., T. Tanabe, T. Konno, B. Adams, and K. G. Beam. 1998.** Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* 273: 24983-6.
- Nerbonne, J. M., and R. S. Kass. 2005.** Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 85: 1205-53.
- Newcomb, R., B. Szoke, A. Palma, G. Wang, X. Chen, W. Hopkins, R. Cong, J. Miller, L. Urge, K. Tarczy-Hornoch, J. A. Loo, D. J. Dooley, L. Nadasdi, R. W. Tsien, J. Lemos, and G. Miljanich. 1998.** Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37: 15353-62.
- Pace, C. N., and J. M. Scholtz. 1998.** A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophys J* 75: 422-7.
- Parent, L., and M. Gopalakrishnan. 1995.** Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca^{2+} channel. *Biophys J* 69: 1801-13.
- Parent, L., T. Schneider, C. P. Moore, and D. Talwar. 1997.** Subunit regulation of the human brain alpha 1E calcium channel. *J Membr Biol* 160: 127-40.
- Parent, L., M. Gopalakrishnan, A. E. Lacerda, X. Wei, and E. Perez-Reyes. 1995.** Voltage-dependent inactivation in a cardiac-skeletal chimeric calcium channel. *FEBS Lett* 360: 144-50.
- Perez-Reyes, E. 2003.** Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83: 117-61.
- 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: 896-900.
- Perozo, E., D. M. Cortes, and L. G. Cuello. 1999.** Structural rearrangements underlying K^{+} -channel activation gating. *Science* 285: 73-8.
- 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: 18752-8.

- Pond, A. L., and J. M. Nerbonne. 2001.** ERG proteins and functional cardiac I(Kr) channels in rat, mouse, and human heart. *Trends Cardiovasc Med* 11: 286-94.
- Priori, S. G., and M. Cerrone. 2005.** Molecular genetics: is it making an impact in the management of inherited arrhythmogenic syndromes? *Hellenic J Cardiol* 46: 83-7.
- Protasi, F., X. H. Sun, and C. Franzini-Armstrong. 1996.** Formation and maturation of the calcium release apparatus in developing and adult avian myocardium. *Dev Biol* 173: 265-78.
- Qin, N., S. Yagel, M. L. Momplaisir, E. E. Codd, and M. R. D'Andrea. 2002.** Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Mol Pharmacol* 62: 485-96.
- Qin, N., D. Platano, R. Olcese, J. L. Costantin, E. Stefani, and L. Birnbaumer. 1998.** Unique regulatory properties of the type 2a Ca²⁺ channel beta subunit caused by palmitoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4690-5.
- Randall, A., and R. W. Tsien. 1995.** Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15: 2995-3012.
- Randall, A., and C. D. Benham. 1999.** Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Mol Cell Neurosci* 14: 255-72.
- Rawn, J. D. 1990.** *Traité de Biochimie*. Édition Universitaire, Paris.
- Rhoads, A. R., and F. Friedberg. 1997.** Sequence motifs for calmodulin recognition. *Faseb J* 11: 331-40.
- Richards, S., P. Lorente, and J. Nargeot. 1999.** Les hauts et les bas des courants calciques dans le développement de l'insuffisance cardiaque et le paradoxe des stratégies thérapeutiques. *Médecine/Sciences* 15: 329-37.
- Rousset, M., P. Charnet, and T. Cens. 2005.** Structure de la sous-unité Béta du canal calcique : la place du Beta-interaction domain. *Médecine/Sciences* 21: 279-83.
- Rousset, M., T. Cens, S. Restituito, 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: 583-93.

- Salt, T. E., and S. A. Eaton. 1996.** Functions of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in sensory transmission in the mammalian thalamus. *Prog Neurobiol* 48: 55-72.
- Sandoz, G., D. Bichet, V. Cornet, Y. Mori, R. Felix, and M. De Waard. 2001.** Distinct properties and differential beta subunit regulation of two C-terminal isoforms of the P/Q-type Ca²⁺-channel alpha(1A) subunit. *Eur J Neurosci* 14: 987-97.
- Schwartz, P. J., A. J. Moss, G. M. Vincent, and R. S. Crampton. 1993.** Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 88: 782-4.
- 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: 2816-25.
- 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: 599-617.
- Soldatov, N. M., R. D. Zuhlke, A. Bouron, and H. Reuter. 1997.** Molecular structures involved in L-type calcium channel inactivation. Role of the carboxyl-terminal region encoded by exons 40-42 in alpha1C subunit in the kinetics and Ca²⁺ dependence of inactivation. *J Biol Chem* 272: 3560-6.
- Spaetgens, R. L., and G. W. Zamponi. 1999.** Multiple structural domains contribute to voltage-dependent inactivation of rat brain alpha(1E) calcium channels. *J Biol Chem* 274: 22428-36.
- Sperelakis N., K. Y., Terzic A., Cohen MV. 2001.** *Heart Physiology and Pathophysiology*, San Diego.
- Splawski, I., K. W. Timothy, N. Decher, P. Kumar, F. B. Sachse, A. H. Beggs, M. C. Sanguinetti, and M. T. Keating. 2005.** Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8089-96; discussion 8086-8.
- Splawski, I., K. W. Timothy, L. M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C. Napolitano, P. J. Schwartz, R. M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S. G. Priori, M. C. Sanguinetti, and M. T. Keating. 2004.** Ca_v1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119: 19-31.

- Stephens, G. J., K. M. Page, Y. Bogdanov, and A. C. Dolphin. 2000.** The alpha1B Ca²⁺ channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J Physiol* 525 Pt 2: 377-90.
- Stotz, S. C., and G. W. Zamponi. 2001a.** Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca²⁺ channels. *Trends Neurosci* 24: 176-81.
- Stotz, S. C., and G. W. Zamponi. 2001b.** Identification of inactivation determinants in the domain IIS6 region of high voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 276: 33001-10.
- Stotz, S. C., J. Hamid, R. L. Spaetgens, S. E. Jarvis, and G. W. Zamponi. 2000.** Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism? *J Biol Chem* 275: 24575-82.
- Stuhmer, W., F. Conti, H. Suzuki, X. D. Wang, M. Noda, N. Yahagi, H. Kubo, and S. Numa. 1989.** Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339: 597-603.
- Sun, X. H., F. Protasi, M. Takahashi, H. Takeshima, D. G. Ferguson, and C. Franzini-Armstrong. 1995.** Molecular architecture of membranes involved in excitation-contraction coupling of cardiac muscle. *J Cell Biol* 129: 659-71.
- Swartz, K. J. 2004.** Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 5: 905-16.
- Tanabe, T., K. G. Beam, J. A. Powell, and S. Numa. 1988.** Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 336: 134-9.
- Tanabe, T., K. G. Beam, B. A. Adams, T. Niidome, and S. Numa. 1990.** Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 346: 567-9.
- Tareilus, E., M. Roux, N. Qin, R. Olcese, J. Zhou, E. Stefani, and L. Birnbaumer. 1997.** A *Xenopus* oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1703-8.
- Tester, D. J., M. L. Will, C. M. Haglund, and M. J. Ackerman. 2005.** Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2: 507-17.

- Van Petegem, F., F. C. Chatelain, and D. L. Minor, Jr. 2005.** Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the $\text{Ca}_v1.2$ IQ domain- Ca^{2+} /calmodulin complex. *Nat Struct Mol Biol* 12: 1108-15.
- 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: 671-5.
- Vennekens, R., T. Voets, R. J. Bindels, G. Droogmans, and B. Nilius. 2002.** Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium* 31: 253-64.
- Viskin, S. 1999.** Long QT syndromes and torsade de pointes. *Lancet* 354: 1625-33.
- Walker, D., and M. De Waard. 1998.** Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca^{2+} channels: role in channel function. *Trends Neurosci* 21: 148-54.
- Walker, D., D. Bichet, K. P. Campbell, and M. De Waard. 1998.** A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca^{2+} channel alpha 1A subunit. *J Biol Chem* 273: 2361-7.
- Walker, D., D. Bichet, S. Geib, E. Mori, V. Cornet, T. P. Snutch, Y. Mori, and M. De Waard. 1999.** A new beta subtype-specific interaction in alpha1A subunit controls P/Q-type Ca^{2+} channel activation. *J Biol Chem* 274: 12383-90.
- Webster, S. M., D. Del Camino, J. P. Dekker, and G. Yellen. 2004.** Intracellular gate opening in Shaker K^+ channels defined by high-affinity metal bridges. *Nature* 428: 864-8.
- Wei, X. Y., E. Perez-Reyes, A. E. Lacerda, G. Schuster, A. M. Brown, and L. Birnbaumer. 1991.** Heterologous regulation of the cardiac Ca^{2+} channel alpha 1 subunit by skeletal muscle beta and gamma subunits. Implications for the structure of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 266: 21943-7.
- Wells, J. A. 1990.** Additivity of mutational effects in proteins. *Biochemistry* 29: 8509-17.
- Xie, C., X. G. Zhen, and J. Yang. 2005.** Localization of the activation gate of a voltage-gated Ca^{2+} channel. *J Gen Physiol* 126: 205-12.

- Yamakage, M., and A. Namiki. 2002.** Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth* 49: 151-64.
- Yasuda, T., L. Chen, W. Barr, J. E. McRory, R. J. Lewis, D. J. Adams, and G. W. Zamponi. 2004.** Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells. *Eur J Neurosci* 20: 1-13.
- Yellen, G. 1998.** The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys* 31: 239-95.
- Zhang, J. F., P. T. Ellinor, R. W. Aldrich, and R. W. Tsien. 1994.** Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 372: 97-100.
- Zhao, Y., V. Yarov-Yarovoy, T. Scheuer, and W. A. Catterall. 2004.** A gating hinge in Na⁺ channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron* 41: 859-65.
- Zhen, X. G., C. Xie, A. Fitzmaurice, C. E. Schoonover, E. T. Orenstein, and J. Yang. 2005.** Functional architecture of the inner pore of a voltage-gated Ca²⁺ channel. *J Gen Physiol* 126: 193-204.
- Zuhlke, R. D., and H. Reuter. 1998.** Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3287-94.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, R. W. Tsien, and H. Reuter. 2000.** Ca²⁺-sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca²⁺ channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(alpha)1C subunit. *J Biol Chem* 275: 21121-9.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, K. Deisseroth, R. W. Tsien, and H. Reuter. 1999.** Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399: 159-62.

7. ARTICLE

THE ROLE OF THE G(X)₆G(X)₃G MOTIF IN THE VOLTAGE-DEPENDENT GATING OF THE Ca_v1.2 CHANNEL

Running title: Role of G422 in activation gating

Alexandra Raybaud, Yolaine Dodier,
Pierre Bissonnette, Daniel G. Bichet, Rémy Sauvé, Lucie Parent*.

Département de Physiologie
Membrane Protein Research Group
Université de Montréal
P.O. Box 6128, Downtown Station
Montréal, Qué, H3C 3J7
Canada

* Corresponding author.
Phone: (514) 343-6673
Fax: (514) 343-7146



**Key words: Alpha-1C, L-type, Gating hinge, GXXXG motif,
Inactivation, Hinged-lid mechanism, LQT8**

ABSTRACT

The putative hinge point revealed by the crystal structure of the MthK potassium channel is a glycine residue that is conserved in many ion channels. In high-voltage activated Ca^{2+} channels, the mid-S6 glycine residue is only present in IS6 (G422) and IIS6 (G770). Two additional glycine residues (G432 and G436) are found in the distal portion of IS6. A mutational analysis was undertaken to investigate the role of glycine residues in channel gating. Alpha-helix breaking proline mutants (G422P and G432P) as well as the double G422A+G432A channel did not produce functional channels. G422A, G432A, and the triple IS6 GGG-AAA mutant activated at more positive voltages whereas G436A, G422A + G436A, G432A + G436A, and G770A activated within the same voltage range as $\text{Ca}_v1.2$. The macroscopic inactivation kinetics were significantly decreased with $\text{Ca}_v1.2 \cong \text{G770A} > \text{G436A} \cong \text{G422A} > \text{G432A}$ (from the fastest to the slowest). These data suggest that G770 in mid-IIS6 is not critical but that the $\text{G(X)}_3\text{G(X)}_3\text{G}$ motif in IS6 is required for the typical voltage-dependent gating of $\text{Ca}_v1.2$. A model is proposed where $\text{Ca}_v1.2$ gating is controlled by the triglycine motif in IS6 with the proximal $\text{G(X)}_3\text{G}$ residues promoting channel activation and the distal $\text{G(X)}_3\text{G}$ motif forming the inactivation gating hinge that is propelling the I-II linker/ $\text{Ca}_v\beta$ lid toward the intracellular channel mouth.

INTRODUCTION

Voltage-dependent calcium channels (VDCC) are large (≈ 2000 amino acids) membrane-bound proteins that form aqueous pores for the diffusion of Ca^{2+} ions across the plasma membrane (1;2). Native Ca^{2+} channels are described as an oligomeric structure composed of the pore-forming $\text{Ca}_v\alpha_1$, the disulfur-linked dimer $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$, the intracellular $\text{Ca}_v\beta$ subunits (β_1 - β_4), and in some cases the $\text{Ca}_v\gamma$ subunit (3). To this date, molecular cloning has identified the primary structures for 10 distinct calcium channel $\text{Ca}_v\alpha_1$ subunits (1;4-9) that are classified into three main subfamilies according to their gating properties (Ca_v1 , Ca_v2 , and Ca_v3). Whereas all voltage-gated Ca^{2+} channel α_1 subunits activate and inactivate in response to membrane depolarisation, the HVA Ca_v1 and Ca_v2 α_1 subunits operate at markedly more positive membrane potentials than low-voltage activated (LVA) Ca_v3 channel α_1 subunits.

Little is known about the structural determinants of the channel inner pore as well as the molecular mechanism underlying the activation of $\text{Ca}_v\alpha_1$ subunits. Structural studies have revealed that the architecture of the ion selective pore is conserved in the homologous α subunit of different K^+ channels (12-15) with the S6/TM2 helices lining of the channel inner pore. In the closed KcsA structure, the inner helices form an "inverted teepee" conformation that cross over near the intracellular surface at a junction that is called the closed bundle (12). Functional studies confirm that the cytoplasmic end of the inner helix forms a major activation gate in voltage-gated K^+ channels (16). In contrast, the crystal structure of a Ca^{2+} -gated K^+ channel (MthK) obtained in the presence of bound Ca^{2+} showed that the pore-lining helices are bent about 30° near G83 and the helical bundle is splayed open (13;17). Based on these static crystal structures, it was proposed that K^+ channels could open by bending the pore-lining α -helix near a glycine residue located in the middle of the pore lining helix (17;18). However, the significance of this proposed gating mechanism for voltage-gated channels in general and VDCC remains unclear even though the potential hinge Gly is conserved in bacterial 6-TM voltage-gated Ca^{2+} , Na^+ , K^+ channels as well as in cyclic nucleotide-modulated (CNG) ion channels (19) (Fig 1). It is worthy of note that the recently published 3-D structure of Kv1.2 does not display the wide opening at the glycine hinge observed in MthK channels (20).

Indeed, the activation gating of 6-TM Kv channels (16;21;22) appears to rely extensively upon the PxP locus (where x represents a hydrophobic residue). This motif is highly conserved in the lower part of S6 within the Kv1-4 family members that includes the Kv1.2 channel (20). Prolines tend to destabilize α -helices by the lack of a backbone hydrogen bond, normally formed by the amide nitrogen and by steric constraints (23;24). Due to their typical ϕ - ψ bond angles, proline residues bend by at least 20° the axis of the α -helix. Based on the molecular properties of the residues, the PxP motif was thus proposed to form a "hinge" structure (25). Although the tandem proline motif is needed for activation, the position itself could vary along the S6 (21). Hence, during pore opening, the inner helix could bend at a flexible site often referred to as the activation hinge either controlled by the flexibility of a Gly (13) or shaped by a helix-bending Pro residue (16;26). Although both mechanisms predict a movement of S6 away from the permeation pathway, the PxP hinge would keep the upper S6 relatively still in contrast to the large outward movement of S6 helices swivelling at the conserved Gly in the KcsA-MthK model of gating (16).

High-voltage activated (HVA) Ca_v1 and Ca_v2 channels possess four distinct S6 but none possesses the tandem PxP motif that has been implicated in the activation gating of Kv channels. In $\text{Ca}_v1.2$, IS6 displays three Gly residues (G422, G432, and G436) and one Gly (G770) in mid-IIS6 that are

absolutely conserved in all HVA Ca_v channels. No Gly or Pro residues are present in IIS6 and IVS6. Since G422 in IS6 and G770 in IIS6 could be aligned with the hinge Gly 83 in MthK (17;27) (Fig 1), we hypothesized that the α -helix flexibility conferred by these residues could be essential for the activation of $\text{Ca}_v1.2$. We hence undertook a mutational analysis of G422, G432, G436, and G770 residues in $\text{Ca}_v1.2$ channels by alanine substitution, the amino acid residue that has been consistently found to stabilize α -helices (28-30). G422A, G432A, and the triple IS6 GGG-AAA mutant activated at more positive voltages whereas activation potentials of G436A, G422A + G436A, G432A + G436A, and G770A were not significantly different than the control channel indicating that Gly in IIS6 plays a minor role in the voltage-dependent gating of $\text{Ca}_v1.2$. Double and triple alanine mutations of Gly in IS6 confirmed that a minimum of 2 Gly residues in are required in IS6 for typical voltage-dependent activation gating of $\text{Ca}_v1.2$ channels.

MATERIAL AND METHODS

Recombinant DNA techniques. cDNAs coding for wild-type rabbit $Ca_v1.2$ (GenBank X15539) and rat $Ca_v\beta3$ (Genbank M88751) (31) were kindly donated by Dr. E. Perez-Reyes. The rat brain $Ca_v\alpha2b\delta$ subunit provided by Dr. T.P. Snutch is > 90% similar to Genbank NM_000722 (32).

Point mutations in $Ca_v1.2$ were obtained with the Quick-Change XL-mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA 92037) using 39 bp primers as detailed before (33). $Ca_v1.2$ mutations were performed by cassette cloning using the naturally occurring *SacI* (956) site and the *XhoI* site that was engineered at position 1530 nt in the I-II linker of $Ca_v1.2$ (42 residues before IIS1) (33-35). This is a non-silent mutation creating a Gly to Arg mutation (G511R). The resulting $Ca_v1.2$ (*XhoI*) channel (that will be referred to herein as $Ca_v1.2$ control channel) displayed inactivation and activation kinetics similar to the wild-type $Ca_v1.2$ (34;35). Constructs were verified by restriction mapping after religation of the mutated fragment into the *SacI* / *XhoI* sites of the wild-type $Ca_v1.2$. Recombinant clones were screened by double-stranded sequence analysis of the entire ligated cassette. cDNA constructs for the wild-type and mutated $Ca_v1.2$ subunits were linearized at the 3' end by *Hind III* digestion, whereas the rat brain $Ca_v\beta3$ subunit was digested by *Not I*. Run-off transcripts were prepared using methylated cap analog m⁷G (5')ppp(5')G and T7 RNA polymerase with the mMessage mMachine[®] transcription kit (Ambion, Austin, TX). The final cRNA products were resuspended in DEPC-treated H₂O and stored at -20°C. The integrity of the final product and the absence of degraded RNA were determined by a denaturing agarose gel stained with ethidium bromide.

Functional expression of wild-type and mutant channels. Oocytes were obtained from female *Xenopus laevis* clawed frog (Nasco, Fort Atkinson, WI) as described previously (33;36). Individual oocytes free of follicular cells were obtained after 30-40 minutes incubation in a calcium-free solution (in mM): 82.5 NaCl; 2.5 KCl; 1 MgCl₂; 5 Hepes; pH 7.6 containing 2 mg/ml collagenase (Invitrogen – Gibco, Burlington, Ontario, Canada). Forty-six (46) nl of a solution containing between 35 and 50 ng of cRNA coding for the wild-type or mutated $Ca_v\alpha1$ subunit was injected 16 hours later into stage V and VI oocytes. cRNA coding for rat brain $Ca_v\alpha2b\delta$ and rat brain $Ca_v\beta3$ were co-injected with the $\alpha1$ subunit at a 3:2:1 weight ratio. Oocytes were incubated at 18°C in a Barth's solution (in mM): 100 NaCl; 2 KCl; 1.8 CaCl₂; 1 MgCl₂; 5 HEPES; 2.5 pyruvic acid; 100 units/ml of penicillin; 50 µg/ml gentamicin; pH 7.6. The biophysical properties of each mutant were studied in a minimum of 3 different oocyte batches. Furthermore, the control channel was tested periodically over time and measured in the same oocyte batch as the mutants, thus insuring that the channel properties were recorded under the same level of endogenous $Ca_v\beta$ subunits (37;38).

Total and purified membranes. Western blots were performed on both total membranes and purified plasma membranes isolated from *X. laevis* oocytes as detailed elsewhere (39). Briefly, homogenates from total membranes prepared from 6 oocytes were centrifuged at 250 x g at 4°C to discard cell debris. Supernatants were centrifuged at 16,000 g for 20 minutes to pellet down total membranes. Total membranes were resuspended in a saline solution and frozen until use. For preparations enriched in plasma membranes, 40 oocytes were rinsed in MBSS (in mM): 80 NaCl, 20 MES pH 6.0 and incubated at room temperature with 0.005% subtilisin A (Sigma- Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) to partially digest the vitelline membrane. Polymerization was performed by two sequential 60 minutes incubations in MBSS first with 1% ludox, then with 0.1% polyacrylic acid (Sigma-Aldrich). The oocytes were then homogenised in cold HbA (in mM): 5 MgCl₂, 5 NaH₂PO₄, 1 EDTA, 80 sucrose, and 20 Tris pH 7.4 with a protease inhibitor cocktail. The homogenates

centrifuged twice at 16 x g for 30 sec at 4°C, then at 25 x g and finally at 35 x g. A final centrifugation step at 16,000 x g for 20 minutes is used to pellet the purified plasma membranes which are resuspended in 10 µl HbA and frozen until use. Proteins were analyzed using the primary antibody against Cav1.2 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel; dilution 1:200) and the secondary anti-rabbit-HRP antibody (Super Signal, Pierce Biotechnology, Rockford, IL; 1:25000). The quality of the overall procedure was monitored by Ponceau red staining.

Electrophysiological recordings in oocytes. Wild-type and mutant channels were screened at room temperature for macroscopic Ba²⁺ currents 2 to 6 days after RNA injection using a two-electrode voltage-clamp amplifier (OC-725C, Warner Instruments) as described earlier (33;34;36). Voltage and current electrodes were filled with 3 M KCl; 1 mM EGTA; 10 mM HEPES (pH 7.4). Whole-cell currents were measured in a 10 Ba²⁺ solution (in mM); 10 Ba(OH)₂; 110 NaOH; 1 KOH; 20 Hepes titrated to pH 7.3 with methane sulfonic acid (MeS) or occasionally in a 10 Ca²⁺ solution where Ca(OH)₂ replaced Ba(OH)₂. To minimize kinetic contamination by the endogenous Ca²⁺ activated Cl⁻ current, oocytes were injected with 18.4 nl of a 50 mM EGTA (ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) (Sigma, St-Louis, MO) 0.5 to 2 hours before the experiments. Oocytes were superfused by gravity flow at a rate of 2 ml/min that was fast enough to allow complete chamber fluid exchange within 30 seconds. Experiments were performed at room temperature (20 – 22°C).

Data Acquisition and Analysis. PClamp software 8.2 (Molecular Devices, Axon instruments, Foster City, CA) was used for on-line data acquisition and analysis. Unless stated otherwise, data were sampled at 10 kHz and low pass filtered at 5 kHz using the amplifier built-in filter. For most recordings, a series of 900-ms voltage pulses were applied from a holding potential of -80 mV at a frequency of 0.2 Hz from -40 to +50 mV. Isochronal inactivation data (h5000) were obtained from normalized currents measured at 0 or +10 mV after a series of 5 sec prepulses that varied from -100 to +30 mV (33). For the isochronal inactivation figures, data points represent the mean of $n \geq 4$ and were fitted to the Boltzmann equation 1.

$$\frac{i}{i_{\max}} = 1 - \frac{1 - Y_0}{1 + \left\{ \exp - \frac{zF}{RT} (V_m - E_{0.5}) \right\}} \quad (1)$$

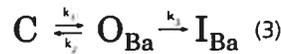
Pooled data points (mean ± S.E.M.) were fitted to equation 1 using user-defined functions and the fitting algorithms provided by Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA) analysis software. Equation 1 accounts for the fraction of non-inactivating current with E_{0.5}, mid-point potential; z, slope parameter; Y₀, fraction of non-inactivating current; V_m, the prepulse potential, and RT/F with their usual meanings. The fitting process generated values estimating errors on the given fit values.

Activation parameters were estimated from the mean I-V curves obtained for each channel combination. The I-V relationships were normalized to the maximum amplitude and were fitted to the Boltzmann equation 2.

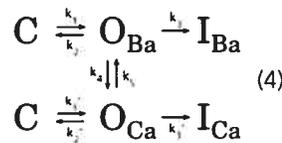
$$\frac{i}{i_{\max}} = \frac{1}{1 + \left\{ \exp - \frac{zF}{RT} (V_m - E_{0.5}) \right\}} \quad (2)$$

$E_{0.5}$ is the potential for 50 % activation; z , slope parameter; V_m , the test potential, and RT/F with their usual meanings. The fitting process generated values estimating errors on the given fit values. For statistical analysis however, the experimental errors were estimated by calculating the individual $E_{0.5 \text{ act}}$ for each I-V curve and extracting the S.E.M. from the mean of individual $E_{0.5 \text{ act}}$. Inactivation kinetics were quantified using r800 values, that is the ratio of the whole-cell current remaining at the end of a 800 ms pulse. "Time to peak" values were extracted from the worksheet generated with Clampfit 8.2. Capacitive transients were erased for clarity in the final figures. Statistical analyses were performed using the One-way Anova (Tukey test) for two independent populations fitting routines provided by Origin 7.0. Data were considered statistically significant for $p < 0.001$.

Kinetic modelling of $Ca_v1.2$ wild-type and mutant whole-cell current traces. Activation and inactivation gating of $Ca_v1.2$ are presumed to be coupled as shown elsewhere (40-42). Two kinetic models were used to describe the macroscopic kinetics of the mutants analyzed in this work with the minimal numbers of conformational states required to account for the data. As seen, the channel needs to open for inactivation to set in whether the recordings were made in Ba^{2+} or in Ca^{2+} solutions. For simplicity purposes, only 1 closed state is shown.



In the presence of Ca^{2+} ions, there are two open states (O_{Ba} and O_{Ca}) with distinct single-channel conductances.



Numerical simulations were carried out at $V_m = 0$ mV by solving the Fourier integral of the inverse matrix of the rates of transitions (43) using Mathematica[®] (Wolfram Corporation). The time course of whole-cell Ba^{2+} current traces was simulated using the analytical solution to the kinetic model (3) (41), with the following time constants: $k_1 = 85 \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 15 \text{ s}^{-1}$; $k_3 = 2 \text{ s}^{-1}$ for the control channel and $k_1 = 97 \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 3 \text{ s}^{-1}$; $k_3 = 0.2 \text{ s}^{-1}$ for G436R with $P(\text{closed}) = 1$ at time $t = 0$. The time course of whole-cell current traces for the control and the G436R channel in the presence of 10 mM Ca^{2+} simulated using the analytical solution to the kinetic model (4) with the following time constants: $k_1 = 85 \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 15 \text{ s}^{-1}$; $k_3 = 2 \text{ s}^{-1}$; $k_4 = 40 \text{ s}^{-1}$; $k_5 = 0.0001 \text{ s}^{-1}$; $k_1' = 1 \text{ s}^{-1}$; $k_2' = 0.01 \text{ s}^{-1}$; $k_3' = 10 \text{ s}^{-1}$ for the control channel and $k_1 = 97 \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 3 \text{ s}^{-1}$; $k_3 = 0.05 \text{ s}^{-1}$; $k_4 = 40 \text{ s}^{-1}$; $k_5 = 0.0001 \text{ s}^{-1}$; $k_1' = 1 \text{ s}^{-1}$; $k_2' = 0.1 \text{ s}^{-1}$; $k_3' = 0.1 \text{ s}^{-1}$ for G436R with $P(\text{closed}) = 1$ at time $t = 0$ at $V_m = 0$ mV. The current traces were computed with I_{\max} (total currents) normalized to 1. It was assumed that $k_4 \gg k_5$ meaning that the transition rate from O_{Ba} to O_{Ca} was almost irreversible.

RESULTS

The mid-glycine residues in IS6 are involved in voltage-dependent activation gating

High-voltage activated $\text{Ca}_v1.2$ channels possess three Gly residues (G422, G432, G436 or G(X)₉G(X)₃G) in IS6 and one Gly residue G770 in mid-IIS6. A mutational analysis was thus undertaken at these positions using either Pro to bend α -helices or Ala to promote α -helical conformation, to elucidate the role of glycine residues in the activation gating of $\text{Ca}_v1.2$.

Control and mutant channels were expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of $\text{Ca}_v\beta3$. Figure 2 shows whole-cell current recordings for the control $\text{Ca}_v1.2$, G422A, G432A, G436A, G422A + G436A, G432A + G436A measured in the 10 mM Ba^{2+} solution. As seen, most IS6 alanine mutants yielded high-voltage activated inward Ba^{2+} currents that were however slower to express significant whole-cell currents than the control channel. In addition, all the IS6 mutants displayed slower kinetics than the control channel. The analysis of their activation and inactivation gating, reported in Table I, suggests two classes of mutants. G422A, G432A, and the triple G422A + G432A + G436A (GGG-AAA) mutants activated at slightly more positive voltages than the control channel with $E_{0.5,act}$ values of -2.5 ± 1.2 mV (26), -1.8 ± 1.1 mV (21), and -1.2 ± 0.6 mV (11) as compared with -7.0 ± 0.9 mV (33) for the control channel. Although relatively small, the rightward +5 to +7 mV shifts were nonetheless significant at $p < 10^{-4}$ when compared with the activation of the control channel (Fig 3). In contrast, the activation potentials of G436A, G770A, G422A + G436A, and G432A + G436A varied between -10 and -7 mV and were not significantly different ($p > 0.1$) from each other or from the control channel (Fig 3 and Table I). The activation potential of the triple G422A + G432A + G436A (GGG-AAA) mutant was not the sum of the activation potentials ($\Delta\Delta G$) of the individual glycine mutations G422A, G432A, and G436A suggesting the three glycine residues work synergically toward channel opening (44;45).

The double G422A + G432A channel as well as the α -helix breaking proline single mutants G422P and G432P did not produce functional channels but Western blots confirmed that the proteins were properly routed to the plasma membrane (Fig 4). This suggests that proline substitutions in S6 segments may seriously disrupt the conducting pore as also shown for the proline mutants in IIS6 (46). Altogether, these data suggest that glycine residues at positions 422 and 432 are critical for the typical voltage-dependent activation gating of $\text{Ca}_v1.2$ channel and that substitutions at these positions with a residue as small and hydrophobic as alanine, significantly altered the channel normal gating.

Macroscopic activation gating of $\text{Ca}_v1.2$ requires a minimum of 2 glycine residues in IS6

Whereas G422A and G432A activated at voltages slightly more positive than the control channel, their macroscopic activation kinetics, as estimated by the "time to peak" values were not significantly different from the control channel with values going from 45 ± 3 ms (26) for G422A to 57 ± 3 ms (21) for G436A as compared to 49 ± 3 ms (33) for the control channel at $V_m = 10$ mV (Fig 5A). The slightly slower activation kinetics of G422A and G432A channels observed at 0 mV ($p < 0.01$) might be accounted for by a +5 mV shift in their activation potentials. Mutating two or three glycine residues in IS6, as seen in the G422A + G436A, G432A + G436A, and the triple GGG-AAA mutants, increased the channel "time to peak" values to times higher than 200-300 ms (Fig 5B). Under our experimental conditions, the "time to peak" value is a complex product of the microscopic activation, deactivation and inactivation rate constants such that any decrease in the activation, deactivation and/or inactivation time constants could lead to an increase in the macroscopic

activation kinetics. It is worth mentioning however that a decrease in the activation time constant would be the most effective way to increase macroscopic activation kinetics in a simple model such as the one shown in equation (3) described in Discussion. The “time to peak” values increased 4-fold from 49 ± 3 ms (33) for the control channel to 202 ± 57 ms (12) for the G422A + G436A mutant ($p < 10^{-4}$). Double and triple mutants that incorporated G432A displayed even larger “time to peak” values with 717 ± 42 ms (8) for G432A + G436A and 631 ± 27 ms (11) for the triple GGG-AAA mutant although 90% of the whole-cell currents peaked within 300 ms at all voltages. In contrast, the G770A mutant in IIS6 displayed a “time to peak” value of 52 ± 2 ms (17) that is not significantly different ($p > 0.01$) from the control channel suggesting that glycine residues in IS6 are more critical than the glycine residue in IIS6 for the activation gating of Cav1.2.

Single Gly mutants in IS6 showed decreased macroscopic inactivation kinetics

The macroscopic inactivation kinetics of the GA mutants in IS6 were all significantly decreased ($10^{-6} < p < 10^{-3}$). The r800 values (ratio of the whole-cell peak currents remaining after 800 ms of a depolarizing pulse) ranged from 0.47 ± 0.02 (33) for the control channel, to 0.70 ± 0.01 (21) for G436A, to 0.78 ± 0.01 (26) for G422A, to 0.85 ± 0.06 (12) for G422A + G436A, and to 0.91 ± 0.01 (21) for G432A (all different at $p < 10^{-6}$) at $V_m = 10$ mV (Fig 5C). Furthermore the inactivation kinetics of the IS6 mutants did not appreciably increase with depolarization. In contrast, the inactivation of the G770A mutant in IIS6 was similar to the control channel with $r800 = 0.58 \pm 0.02$ (17) for G770A ($p > 0.01$). With their long-winded activation kinetics, whole-cell Ba²⁺ currents of G432A + G436A and GGG-AAA mutants did not appreciably inactivate within the 900-ms voltage pulse in our experiments. Given that inactivation and activation gating are strongly coupled in Cav1.2 (41;42;47), a decrease in the macroscopic inactivation kinetics is equally compatible with a decrease in the rate of inactivation (increased mean open time) or an increase in the rate of deactivation (decreased mean open time) and it is difficult to distinguish the two processes under our experimental conditions.

Mutations with polar residues within GXXXG decreased macroscopic inactivation kinetics

Mutations of the two distal glycine residues in IS6 of the human Cav1.2 were found to be responsible for the Timothy syndrome, characterized by lethal arrhythmias (48;49). The two mutants G402S and G406R (equivalent to positions G432 and G436 in our construct) produced whole-cell currents with kinetics seemingly slower than our GA mutants suggesting that the charge and/or the volume of the residues at these positions could play a role in channel gating. Whole-cell Ba²⁺ currents were recorded after expression of the G432 and G436 mutants under the same conditions as the GA mutants.

Except for the G432A, G432S, and G432E mutants, the G432 mutations (P, H, R, D, and K) expressed whole-cell Ba²⁺ currents that were generally too small to characterize or failed to express any currents at all. Western blots of G432R, G432K, and G432D mutations confirmed that the proteins were processed and targeted to the membrane (results not shown). G432E and G432S yielded whole-cell Ba²⁺ currents with macroscopic kinetics significantly slower than the control channel. Although the mid-potentials of activation ($E_{0.5,act}$) were not significantly different from the control channel ($p > 0.02$) (Table I), whole-cell currents peaked within 116 ± 10 ms (6) and 711 ± 43 ms (22) respectively as compared with 71 ± 15 ms (21) for G432A at $V_m = 10$ mV (Fig 5D). The macroscopic kinetics were thus slower for the G432S mutant, identified in the Timothy Syndrome, than for G432A and G432E.

G436 appeared to be more tolerant to mutations and most mutants, including G436P, expressed significant whole-cell Ba^{2+} currents (Fig 6A-D). G436 mutations did not alter the mid-activation potential (G436A, G436P, G436H, and G436Y) or either shifted the activation potentials toward negative voltages (G436R, G436K, G436D, and G436E) suggesting that the activated state could be promoted by hydrophilic mutations (Table I). Mutants activated in response to depolarization but peaked slowly as a function of time from 57 ± 3 ms (21) for G436A; 124 ± 29 ms (8) for G436P; 201 ± 28 ms (14) for G436Y; 327 ± 54 ms (9) for G436E; 445 ± 39 ms (7) for G436R; 628 ± 57 ms (9) for G436H; 707 ± 44 ms (7) for G436K; and 765 ± 26 ms (9) for G436D (Fig 6E), values that are significantly different from the control channel ($10^{-10} < p < 10^{-3}$). The r_{800} values followed a similar pattern with faster activating mutants showing the faster inactivating kinetics. These observations suggest that the volume is the key determinant at this position with larger residues slowing further the channel kinetics.

The distal Gly residues in IS6 participate to the voltage-dependent inactivation gating

$Ca_v1.2$ channels inactivate through the combined effect of voltage (VDI) and Ca^{2+} (CDI) (50-53) although Ca^{2+} -dependent inactivation (CDI) arises as the prominent inactivation mechanism under physiological conditions. VDI and CDI gating are however strongly coupled (47) such that a change in the deactivation time constant from the open state is predicted to affect both VDI and CDI gating (53). In order to sort out the contribution of VDI in the altered gating properties of the Gly mutants, we evaluated and compared the gating properties of the G432S and the G436R mutants, identified in Timothy Syndrome, in both Ba^{2+} and Ca^{2+} solutions.

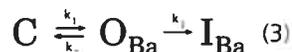
Whole-cell currents of G432S and G436R mutants were recorded both in Ba^{2+} and in the presence of Ca^{2+} (Fig 7). As discussed earlier, Ba^{2+} -dependent inactivation was completely wiped out by mutations of the Gly residues. In contrast, G432S and G436R inactivated significantly in the presence of Ca^{2+} although the inactivation was only partially completed after 800 ms-long pulses with r_{800} values = 0.37 ± 0.02 (17) and 0.71 ± 0.02 (13) respectively as compared with 0.02 ± 0.01 (11) for the control channel measured under the same conditions (Table II). The Ca^{2+} current traces inactivated following a bi-exponential time course with the fast time constant seemingly conserved in the Gly mutants. Indeed, the time to peak values measured in Ca^{2+} were not found to be significantly affected by mutations of either Gly residue (Fig 8).

DISCUSSION

Mutations within the G(X)₃G motif stabilized the closed state of Ca_v1.2

Computer-based database searches as well as experimental observations have shown that two glycine residues separated by three intervening residues (GxxxG) provide a framework for specific transmembrane helix-helix and dimerization interactions when found on a helical framework (54-58). This arrangement of glycine residues allows the close approach of interacting helices, whereupon extensive packing interactions take place between pairs of surrounding residues. Such a motif is found in the IS6 domain of every high-voltage activated (HVA) Ca_v channels (from Ca_v1.1 to Ca_v2.3). In HVA Ca_v, this G(X)₃G motif is preceded by an additional Gly residue that is aligned with the universal gating-hinge residue found in the MthK channel. There is no evidence that the triglycine motif G(X)₃G(X)₃G is involved in protein-protein interaction in Ca_v channels. Our data showed that mutating any of the single Gly residue within that motif significantly altered the gating of Ca_v1.2. At the macroscopic level, mutations of any of these residues by the relatively conserved alanine slowed the macroscopic kinetics of the channel. The non-functionality of the proline mutants within the G(X)₃G motif suggests that introducing a rigid artificial kink is incompatible with normal activation gating of Ca_v1.2. In contrast, mutating G770 to either Ala or Pro did not affect significantly on channel gating suggesting the specificity of the glycine residues in IS6. The minor role that the single mid-glycine residue in IIS6 plays in channel gating was also reported by others (46).

The slower kinetics of Alanine-substituted Glycine G422A and G432A residues were accompanied by a positive shift in activation potentials and a decrease in the macroscopic inactivation kinetics without any significant change in the time to peak values and in the apparent tail current kinetics. In the simple kinetic model shown below and discussed elsewhere (41), where channel inactivation is strongly coupled to activation, these changes could be altogether compatible with either an increase in k_2/k_1 ratio (deactivation over activation), and/or a decrease in k_3 (inactivation kinetics).



Our macroscopic data do not allow us to exclude either mechanism. Nonetheless, because the G422A and G432A altered the activation potentials, we propose that the increase in the k_2/k_1 ratio (transition from the open to closed state or deactivation over the transition from the closed to open state or activation) was the dominant effect. Since a significant decrease in k_1 (transition from the closed to open state) should have produced an increase in the time to peak values which we did not observe, the alteration in the macroscopic current kinetics probably reflect changes from k_2 (deactivation kinetics). While in theory, faster deactivation kinetics should manifest itself by faster tail currents, it would be difficult to detect faster k_2 deactivation kinetics under our conditions since any increase in the deactivation kinetics would be masked by the large capacitive transient of the oocyte in the two-electrode voltage-clamp configuration. The increase in k_2 (deactivation kinetics) would decrease the open channel probability thus destabilizing the channel open state and consequently yield lower peak Ba²⁺ currents as we have reported for the GA mutants. It is worth mentioning that changes in k_3 (inactivation kinetics) could also account for the slower kinetics observed with the proximal GA mutants although the decrease in the mean open time caused by a faster k_2 will ultimately yield slower macroscopic inactivation kinetics (41).

The destabilization of the open state through an increase in k_2/k_1 fits with current gating models for ion channels where the S6 bundle-crossing region undergoes a conformational change inducible to channel opening. We speculate that the flexibility of the glycine residues in IS6 is critical for that motion such that the presence of the α -helix favorable alanine would tend to bring the channel back into the closed state.

Could G436 control the inactivation hinge in Cav1.2?

We have previously shown that the negatively charged EED cluster (E461, E462, D463) located in the N-terminal end of the AID helix within the I-II linker could account for the slower VDI kinetics of Cav1.2 (33). The crystal structures of the AID-Cav β complex from L-type Cav1.1 and Cav1.2 channels (59-61) have confirmed that the hydrophilic residues face the direction opposite to the Cav β subunit and could hence participate to VDI through a hinged-lid type mechanism. The crystal structures have also shown that the AID in the cytoplasmic I-II linker adopts a α -helical conformation upon binding to Cav β (59) suggesting that the α -helix is uninterrupted from the beginning of S6 to the end of the AID region in the I-II linker. By analogy with the MthK channel (13) and GIRK1 (18), we postulate that VDCC activation results from S4-S5 moves creating a lateral torque on IS6 that is causing its helix to bend near a flexible residue ultimately leading to channel opening. G436 is a leading candidate to fill that role. Predicted secondary structure models position G436 at a distance of 14 residues distal from the mid-S6 glycine residue that is conserved in all K⁺ channels. By analogy with the known 3-D structure of these channels, G436 is then most likely to sit at the junction between S6 and the I-II linker. G436 was found to tolerate a wide range of point mutations including proline substitutions suggesting a minimum of structural constraints in its local environment. G436 substitutions wiped out the fast component of Ba²⁺-inactivation more significantly than the triple IIS6 + IIIS6 + IVS6 (A752T+I1165T+I1475T) mutant of the human Cav1.2 (62). Furthermore, G436 mutant channels activated at voltages, that were either similar (G436A, G436P, and G436Y) or else more negative (G436R, G436K, G436D, and G436E) than the control channel indicating that G436 is not critical for activation gating.

Numerical simulations performed with the coupled kinetic model (equation 3) indicate that the gating properties of the G436A in presence of Ba²⁺ could be accounted for by either a decrease in k_2/k_1 and/or a decrease in k_3 (inactivation) which would both lead to a stabilization of the open time. The larger time to peak values coupled to the negative shift in the $E_{0.5,act}$ values reported for the charged mutations at position G436, including G436R, are compatible with both processes (Fig 9A). In addition, the single-channel analysis of the G436R mutant showed a significant increase in “mode 2” gating (63), a gating mode characterized by an increase in the channel mean open time, suggesting that G436R *decreased* k_2 (deactivation kinetics). Slower deactivation kinetics alone could not however explain the larger time to peak values we measured for the charged G436 mutants. Based upon these data, we can speculate that mutations of G436 decreased the k_2/k_1 ratio and k_3 by stabilizing the channel open state. It remains to be seen whether the stabilization of the open state results from a hyperphosphorylation of the channel protein as suggested (63) since we have observed that substitutions of G436 by residues of different hydrophobicity, size and polarity decreased the channel macroscopic inactivation kinetics without forming putative CaMKII phosphorylation sites with S439 (RXXS/T). Nonetheless, the glycine residue at position 436 appears to play a pivotal role to bring the channel into the inactivated state.

Toward an asymmetrical model of gating in high-voltage activated Ca_v channels

The structural changes underlying the opening and closing of the activation gate remained largely speculative for most ion channels. Although a key role for the mid-S6 glycine residue has been postulated, few experimental data have been gathered in support of that theory. In the 6-TM NaBaCh channel, the G219P mutant in S6 greatly stabilized the open state by shifting by -51 mV the voltage dependence of activation as well as slowed deactivation and voltage-dependent inactivation kinetics by 2000-fold and 1200-fold respectively (66). These results are among the strongest ones that support a gating model in which all four S6 of NaBaCh undergo a concerted transition to the open state by bending at the glycine activation hinge (66). In contrast, in *Shaker* K^+ channels, the conserved glycine residue appears to be involved in channel biogenesis (67). The results with the glycine-shifted double G466A+V467G mutant (displayed a right-shifted activation curve) are the only evidence supporting that flexibility in mid-S6 is required for activation gating of *Shaker* channels. Isoform specificity has however been noted. In KCNQ1 channels, the PAG motif was found to be more important for channel function than the glycine hinge although the latter is critical for KCNQ2 function (26).

The selectivity filter of $\text{Ca}_v1.2$ is known to be functionally asymmetrical with each of the four glutamate residues present in the four pore loops contributing in a unique fashion to the high-affinity cation binding site (68-70). Given the asymmetrical nature of their permeation pathway, voltage-gated Ca^{2+} channels possess only 2 out of the 4 glycine residues found in tetrameric K^+ channels. As reported herein, mutations of the glycine in IIS6 had little impact on gating and kinetics. Instead of relying upon glycine residues located symmetrically around the pore axis, $\text{Ca}_v1.2$ may exploit glycine residues positioned in series with G422 and G432 working in concert to bring the channel into the open state (Fig 10). Proline mutations at any of these positions wiped out function whereas G436P and G770P yielded high-voltage-activated Ba^{2+} currents. In addition, the double G422A + G432A mutant was the only alanine mutant that failed to form functional channels.

Each S6 segment seems adapted to play a distinct but complementary task. Mutations of hydrophobic residues within the LAIA motif located in the lower third of segment IIS6 caused large negative shifts in the voltage dependence of activation as well as slower activation, deactivation, and inactivation kinetics (46). These observations suggest that hydrophobic residues in IIS6 modulate channel gating either by destabilizing the closed state (increasing in the forward transition to the open state) and/or by stabilizing the open state (decreasing in the backward transition to the closed state). In agreement with previous studies on the gating of K^+ channels, we propose that the closed state could be stabilized by the hydrophobic interactions in the IIS6-bundle crossing region. The concept of "hydrophobic seals" preventing ion flow in the closed state has been introduced for the gating of KcsA (71) and applied more recently to the study of the *Shaker* K^+ channels (72). Hence, mutational analyses in IS6 and IIS6 converge toward an asymmetric model of gating in $\text{Ca}_v1.2$ whereby hydrophobic residues in the lower part of IIS6 are required to maintain the $\text{Ca}_v1.2$ channel into the closed state while the $\text{G}(\text{X})_9\text{G}(\text{X})_3\text{G}$ motif in IS6 is rather promoting the channel activation gating. The activation gating of high-voltage activated Ca^{2+} channels could thus arise from the unique combination of distinct mechanisms carried out by their four distinct S6 segments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Ed Perez-Reyes for the $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\beta_2a$, and the $Ca_v1.2$ clones; Julie Verner for assistance with oocyte culture; and Claude Gauthier for artwork. This work was completed with grant MOP13390 from the Canadian Institutes of Health Research and from a grant of the Canadian Heart and Stroke Foundation to L. P.

References

1. Catterall, W.A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:521-555.
2. Catterall, W.A., E.Perez-Reyes, T.P.Snutch, and J.Striessnig. 2005. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 57:411-425.
3. Arikath, J. and K.P.Campbell. 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13:298-307.
4. Snutch, T.P. and P.B.Reiner. 1992. Ca channels : diversity of form and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2:247-253.
5. Zhang, J.F., A.D.Randall, P.T.Ellinor, W.A.Horne, W.A.Sather, T.Tanabe, T.L.Schwarz, and R.W.Tsien. 1993. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32:1075-1088.
6. 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.
7. 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.* 391:896-900.
8. 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 α_{1H} from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circulation Research* 83:103-109.
9. Randall, A. and C.D.Benham. 1999. Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Mol. Cell Neurosci.* 14:255-272.
10. Catterall, W.A. 1991. Functional subunit structure of voltage-gated calcium channels. *Science.* 250:1499-1500.
11. Isom, L.L., K.S.DeJongh, and W.A.Catterall. 1994. Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron* 12:1183-1194.
12. Doyle, D.A., J.M.Cabral, R.A.Pfuetzner, A.Kuo, J.M.Gulbis, S.L.Cohen, B.T.Chait, and R.MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science.* 280:69-77.
13. Jiang, Y., A.Lee, J.Chen, M.Cadene, B.T.Chait, and R.MacKinnon. 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417:515-522.
14. Jiang, Y., A.Lee, J.Chen, V.Ruta, M.Cadene, B.T.Chait, and R.MacKinnon. 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K channel. *Nature.* 423:33-41.
15. Kuo, A., J.M.Gulbis, J.F.Antcliff, T.Rahman, E.D.Lowe, J.Zimmer, J.Cuthbertson, F.M.Ashcroft, T.Ezaki, and D.A.Doyle. 2003. Crystal Structure of the Potassium Channel KirBac1.1 in the Closed State. *Science.* 300:1922-1926.

16. Webster, S.M., D. Del Camino, J.P. Dekker, and G. Yellen. 2004. Intracellular gate opening in Shaker K⁺ channels defined by high-affinity metal bridges. *Nature*. 428:864-868.
17. Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B.T. Chait, and R. MacKinnon. 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*. 417:523-526.
18. Jin, T., L. Peng, T. Mirshahi, T. Rohacs, K.W. Chan, R. Sanchez, and D.E. Logothetis. 2002. The $\beta\gamma$ subunits of G proteins gate a K channel by pivoted bending of a transmembrane segment. *Mol. Cell* 10:469-481.
19. Flynn, G.E. and W.N. Zagotta. 2001. Conformational changes in S6 coupled to the opening of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron*. 30:689-698.
20. Long, S.B., E.B. Campbell, and R. MacKinnon. 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K channel. *Science*. 309:897-903.
21. Labro, A.J., A.L. Raes, I. Bellens, N. Ottschytch, and D.J. Snyders. 2003. Gating of Shaker-type channels requires the flexibility of S6 caused by prolines. *J. Biol. Chem.* 278:50724-50731.
22. Del Camino, D., M. Holmgren, Y. Liu, and G. Yellen. 2000. Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications. *Nature*. 403:321-325.
23. Blaber, M., X.J. Zhang, and B.W. Matthews. 1993. Structural basis of amino acid alpha helix propensity. *Science*. 260:1637-1640.
24. MacArthur, M.W. and J.M. Thornton. 1991. Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* 218:397-412.
25. Bright, J.N., I.H. Shrivastava, F.S. Cordes, and M.S. Sansom. 2002. Conformational dynamics of helix S6 from Shaker potassium channel: simulation studies. *Biopolymers*. 64:303-313.
26. Seebohm, G., N. Strutz-Seebohm, O.N. Ureche, R. Baltaev, A. Lampert, G. Kornichuk, K. Kamiya, T.V. Wuttke, H. Lerche, M.C. Sanguinetti, and F. Lang. 2006. Differential roles of S6 domain hinges in the gating of KCNQ potassium channels. *Biophys. J.* 90:2235-2244.
27. Shealy, R.T., A.D. Murphy, R. Ramarathnam, E. Jakobsson, and S. Subramaniam. 2003. Sequence-function analysis of the K-selective family of ion channels using a comprehensive alignment and the KcsA channel structure. *Biophys. J.* 84:2929-2942.
28. O'Neil, K.T. and W.F. DeGrado. 1990. A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science*. 250:646-651.
29. Chakrabarty, A., J.A. Schellman, and R.L. Baldwin. 1991. Large differences in the helix propensities of alanine and glycine. *Nature*. 351:586-588.
30. 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.
31. Castellano, A., X. Wei, L. Birnbaumer, and E. Perez-Reyes. 1993. Cloning and expression of a third calcium channel β subunit. *J. Biol. Chem.* 268:3450-3455.
32. Williams, M.E., D.H. Feldman, A.F. McCue, R. Brenner, G. Velicelebi, S.B. Ellis, and M.M. Harpold. 1992. Structure and functional expression of α_1 , α_2 , and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8:71-84.
33. Dafi, O., L. Berrou, Y. Dodier, A. Raybaud, R. Sauve, and L. Parent. 2004. Negatively charged residues in the N-terminal of the AID helix confer slow voltage dependent inactivation gating to CaV1.2. *Biophys. J.* 87:3181-3192.
34. Berrou, L., G. Bernatchez, and L. Parent. 2001. Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of α_1E (Ca_v2.3) Ca²⁺ channels. *Biophys. J.* 80:215-228.

35. Bernatchez,G., L.Berrou, Z.Benakezouh, J.Ducay, and L.Parent. 2001. Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the Ca_v2.3 channel. *Bioch. Biophys. Acta* 1514:217-229.
36. 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.
37. Lacerda,A.E., E.Perez-Reyes, X.Wei, A.Castellano, and A.M.Brown. 1994. T-type and N-type calcium channels of *Xenopus* oocytes: evidence for specific interactions with β subunits. *Biophys. J.* 66:1833-1843.
38. Tareilus,E., M.Roux, N.Qin, R.Olcese, J.Zhou, E.Stefani, and L.Birnbaumer. 1997. A *Xenopus* oocyte β subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 94:1703-1708.
39. Leduc-Nadeau,A., P.Bissonnette, K.Lahjouji, J.Y.Lapointe, and D.G.Bichet. 2006. Elaboration of a novel technique for the purification of plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes. *Am. J Physiol Cell Physiol* In press.
40. Yue,D.T., S.Herzig, and E.Marban. 1990. Beta-adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 87:753-757.
41. Bernatchez,G., R.Sauvé, and L.Parent. 2001. State-dependent inhibition of inactivation-deficient Ca_v1.2 and Ca_v2.3 channels by mibefradil. *J. Memb. Biol.* 184:143-159.
42. Tanskanen,A.J., J.L.Greenstein, B.O'Rourke, and R.L.Winslow. 2005. The role of stochastic and modal gating of cardiac L-type Ca²⁺ channels on early after-depolarizations. *Biophys. J* 88:85-95.
43. Roux,B. and R.Sauve. 1985. A general solution to the time interval omission problem applied to single channel analysis. *Biophys. J.* 48:149-158.
44. Wells,J.A. 1990. Additivity of mutational effects in proteins. *Biochemistry.* 29:8509-8517.
45. Skinner,M.M. and T.C.Terwilliger. 1996. Potential use of additivity of mutational effects in simplifying protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 93:10753-10757.
46. 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.* 280:38471-38477.
47. Yue,D.T., P.H.Backx, and J.P.Imredy. 1990. Calcium-sensitive inactivation in the gating of single calcium channels. *Science.* 250:1735-1738.
48. Splawski,I., K.W.Timothy, L.M.Sharpe, N.Decher, P.Kumar, R.Bloise, C.Napolitano, P.J.Schwartz, R.M.Joseph, K.Condouris, H.Tager-Flusberg, S.G.Priori, M.C.Sanguinetti, and M.T.Keating. 2004. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell.* 119:19-31.
49. Splawski,I., K.W.Timothy, N.Decher, P.Kumar, F.B.Sachse, A.H.Beggs, M.C.Sanguinetti, and M.T.Keating. 2005. Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 102:8089-8096.
50. Kass,R.S. and M.C.Sanguinetti. 1984. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J. Gen. Physiol.* 84:705-726.
51. Lee,K.S., E.Marban, and R.W.Tsien. 1985. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol. (Lond)* 334:395-411.

52. Imredy, J.P. and D.T. Yue. 1994. Mechanism of Ca^{2+} -sensitive inactivation of L-type Ca^{2+} channels. *Neuron* 12:1301-1318.
53. Bernatchez, G., D. Talwar, and L. Parent. 1998. Mutations in the EF-hand motif of the cardiac α_{1C} calcium channel impair the inactivation of barium currents. *Biophys. J.* 75:1727-1739.
54. Brosig, B. and D. Langosch. 1998. The dimerization motif of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues. *Protein Sci.* 7:1052-1056.
55. Russ, W.P. and D.M. Engelman. 2000. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol. Biol.* 296:911-919.
56. Senes, A., M. Gerstein, and D.M. Engelman. 2000. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol. Biol.* 296:921-936.
57. Lee, S.F., S. Shah, C. Yu, W.C. Wigley, H. Li, M. Lim, K. Pedersen, W. Han, P. Thomas, J. Lundkvist, Y.H. Hao, and G. Yu. 2004. A conserved GXXXG motif in APH-1 is critical for assembly and activity of the gamma-secretase complex. *J Biol. Chem.* 279:4144-4152.
58. Bustos, D.M. and J. Velours. 2005. The modification of the conserved GXXXG motif of the membrane-spanning segment of subunit g destabilizes the supramolecular species of yeast ATP synthase. *J Biol. Chem.* 280:29004-29010.
59. Opatowsky, Y., C.C. Chen, K.P. Campbell, and J.A. Hirsch. 2004. Structural Analysis of the Voltage-Dependent Calcium Channel beta Subunit Functional Core and Its Complex with the alpha1 Interaction Domain. *Neuron* 42:387-399.
60. 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.* 429:671-675.
61. Chen, Y.H., M.H. Li, Y. Zhang, L.L. He, Y. Yamada, A. Fitzmaurice, Y. Shen, H. Zhang, L. Tong, and J. Yang. 2004. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca channels. *Nature.* 429:675-680.
62. Shi, C. and N.M. Soldatov. 2002. Molecular determinant of voltage dependent slow inactivation of Ca^{2+} channel. *J Biol Chem* 277:6813-6821.
63. Erxleben, C., Y. Liao, S. Gentile, D. Chin, C. Gomez-Alegria, Y. Mori, L. Birnbaumer, and D.L. Armstrong. 2006. Cyclosporin and Timothy syndrome increase mode 2 gating of CaV1.2 calcium channels through aberrant phosphorylation of S6 helices. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 103:3932-3937.
64. Nishida, M. and R. MacKinnon. 2002. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell.* 111:957-965.
65. Van Petegem, F., F.C. Chatelain, and D.L. Minor, Jr. 2005. Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca/calmodulin complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:1108-1115.
66. Zhao, Y., V. Yarov-Yarovoy, T. Scheuer, and W.A. Catterall. 2004. A gating hinge in Na⁺ channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron.* 41:859-865.
67. Ding, S., L. Ingleby, C.A. Ahern, and R. Horn. 2005. Investigating the putative glycine hinge in Shaker potassium channel. *J Gen. Physiol.* 2005. Sep. ;126. (3):213. -26. Epub. 2005. Aug. 15. 126:213-226.
68. Yang, J., P.T. Ellinor, W.A. Sather, J.F. Zhang, and R.W. Tsien. 1993. Molecular determinants of Ca^{2+} selectivity and ion permeation in L-type Ca^{2+} channels. *Nature.* 366:158-161.

69. Parent, L. and M. Gopalakrishnan. 1995. Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca^{2+} channel. *Biophys. J.* 69:1801-1813.
70. Chen, X.H., I. Bezprozvanny, and R. W. Tsien. 1996. Molecular basis of proton block of L-type Ca^{2+} channels. *Journal of General Physiology* 108:363-374.
71. Armstrong, C.M. 2003. Voltage-gated K channels. *Sci STKE*. 2003:re10.
72. Kitaguchi, T., M. Sukhareva, and K. J. Swartz. 2004. Stabilizing the closed S6 gate in the Shaker Kv channel through modification of a hydrophobic seal. *J Gen. Physiol.* 124:319-332.
73. Kobrinsky, E., S. Tiwari, V. A. Maltsev, J. B. Harry, E. Lakatta, D. R. Abernethy, and N. M. Soldatov. 2005. Differential role of the alpha1C subunit tails in regulation of the Cav1.2 channel by membrane potential, beta subunits, and Ca^{2+} ions. *J Biol. Chem.* 280:12474-12485.

Table I. Biophysical properties of Ca_v1.2 mutants

Ca _v 1.2/α2δ/β3 10 mM Ba ²⁺	Activation			Inactivation	
	E _{0.5,act} (mV)	Peak I _{Ba} (μA)	" Time to peak" (ms)	E _{0.5,inact} (mV)	R _{∞0} at 10 mV
wt	-8.0 ± 2.0 (23)	-2.5 ± 0.3 (23)	n.d.	-23.0 ± 1.0 (21)	n.d.
Ca _v 1.2 ctrl	-7.0 ± 0.9 (33)	-3.2 ± 0.5 (33)	49 ± 3 (33)	-22.7 ± 0.9 (33)	0.47 ± 0.02 (33)
G422A	-2.5 ± 1.2 (26)	-1.5 ± 0.2 (26)	45 ± 3 (26)	n.d.	0.78 ± 0.01 (26)
G432A	-1.8 ± 1.1 (21)	-1.1 ± 0.1 (21)	71 ± 15 (21)	n.d.	0.91 ± 0.01 (21)
G432E	-12.4 ± 0.8 (6)	-1.2 ± 0.1 (6)	116 ± 10 (6)	n.d.	0.90 ± 0.01 (6)
G432S	-4.2 ± 0.6 (22)	-1.2 ± 0.1 (22)	711 ± 43 (22)	n.d.	n.d.
G436A	-7.4 ± 1.5 (21)	-3.1 ± 0.2 (21)	57 ± 3 (21)	-21.4 ± 0.6 (12)	0.70 ± 0.01 (21)
G436P	-6.0 ± 1.4 (8)	-1.2 ± 0.2 (8)	124 ± 29 (8)	n.d.	0.92 ± 0.01 (8)
G436R	-13.9 ± 0.7 (7)	-0.57 ± 0.08 (7)	445 ± 39 (7)	n.d.	0.92 ± 0.01 (7)
G436K	-13.7 ± 1.5 (7)	-0.64 ± 0.04 (7)	707 ± 44 (7)	n.d.	n.d.
G436H	-7.7 ± 0.9 (9)	-0.61 ± 0.03 (9)	628 ± 57 (9)	n.d.	n.d.
G436E	-11.7 ± 0.6 (9)	-0.57 ± 0.06 (9)	327 ± 54 (9)	n.d.	0.91 ± 0.01 (9)
G436D	-11.7 ± 0.9 (9)	-0.8 ± 0.1 (9)	765 ± 26 (9)	n.d.	n.d.
G436Y	-7.5 ± 0.7 (14)	-0.71 ± 0.07 (14)	201 ± 28 (14)	n.d.	0.87 ± 0.02 (14)
G422A+G432A	N/E (2)	N/E (2)	N/E (2)	N/E (2)	N/E (2)
G422A+G436A	-7.8 ± 0.8 (12)	-2.2 ± 0.3 (12)	202 ± 57 (12)	n.d.	0.85 ± 0.06 (12)
G432A+G436A	-6.8 ± 0.7 (8)	-1.1 ± 0.1 (8)	717 ± 42 (8)	n.d.	n.d.
GGGAAA	-1.2 ± 0.6 (11)	-0.60 ± 0.04 (11)	631 ± 27 (11)	n.d.	n.d.
G770A	-9.8 ± 0.8 (17)	-1.8 ± 0.2 (17)	52 ± 2 (17)	-23.2 ± 0.3 (8)	0.58 ± 0.02 (17)
G770P	-11.3 ± 1.2 (9)	-1.8 ± 0.3 (9)	27 ± 1 (9)	-19.4 ± 0.5 (5)	0.46 ± 0.02 (9)

TABLE I. Biophysical parameters of Ca_v1.2 wild-type and mutant channels expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of Ca_vα2bδ and Ca_vβ3 subunits. The background channel used for the mutations was the Ca_v1.2 (*Xhol*) with a unique *Xhol* site at G511R. Whole-cell currents were

measured in 10 mM Ba^{2+} throughout. Activation data ($E_{0.5,act}$, « Time to peak », and R800) were estimated from the mean I-V relationships and fitted to Boltzmann equation 2. R800 values could not be determined for mutants with « Time to peak » values > 500 ms. Peak I_{Ba} was determined from the peak I-V relationships for the corresponding experiments. The voltage-dependence of inactivation was determined from the peak currents measured at 0 mV after 5 s pulses from -100 to +30 mV. Relative currents were fitted to Boltzmann equation 1. The fractional currents represent the fraction of whole-cell currents remaining at the end of a 5 s conditioning pulse to +10 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.d.: not determined. N/E: no functional expression.

Table II. CDI and VDI properties of G432S and G436R mutants

$Ca_v1.2/\alpha2\delta/\beta3$		Activation			Inactivation	
		$E_{0.5,act}$ (mV)	Peak I_{Ba} (μA)	" Time to peak" (ms)	$E_{0.5,inact}$ (mV)	R800 at 10 mV
10 mM Ba^{2+}	Ca _v 1.2 ctrl	-6.95 \pm 0.94 (33)	-3.2 \pm 0.5 (33)	49 \pm 3 (33)	-22.65 \pm 0.86 (33)	0.47 \pm 0.02 (33)
	G432S	-4.19 \pm 0.58 (22)	-1.2 \pm 0.1 (22)	711 \pm 43 (22)	n.d.	n.d.
	G436R	-13.94 \pm 0.74 (7)	-0.57 \pm 0.08 (7)	445 \pm 39 (7)	n.d.	0.92 \pm 0.01 (7)
10 mM Ca^{2+}	Ca _v 1.2 ctrl	-7.10 \pm 0.92 (11)	-5.3 \pm 0.7 (11)	24 \pm 1 (11)	-25.24 \pm 0.28 (5)	0.02 \pm 0.01 (11)
	G432S	3.98 \pm 0.49 (17)	-0.7 \pm 0.1 (17)	28 \pm 1 (17)	n.d.	0.37 \pm 0.02 (17)
	G436R	-1.34 \pm 1.33 (13)	-1.1 \pm 0.1 (13)	39 \pm 2 (13)	n.d.	0.71 \pm 0.02 (13)

TABLE II. Gating properties of G432S and G436R mutants in Ba^{2+} (VDI) and Ca^{2+} (CDI) solutions. Control and mutant channels were expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of $Ca_v\alpha2\delta$ and $Ca_v\beta3$ subunits. Whole-cell currents were measured either in the 10 mM Ba^{2+} or the 10 mM Ca^{2+} solution. The voltage-dependence of inactivation was determined from the peak currents measured at 0 mV after 5 s pulses from -100 to +30 mV. Relative currents were fitted to Boltzmann equation 1. Activation data were estimated from the mean I-V relationships and fitted to Boltzmann equation 2. The data are shown with the mean \pm S.E.M. and the number of experiments appears in parentheses. The abbreviation "n.d." stands for "not determined".

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Primary sequences of S6/TM2 segments from crystallized K⁺ channels: Kv1.2, KvAP, KcsA, MthK, KirBac obtained by aligning the conserved Gly residue (27) proposed to serve as the gating hinge in MthK channels (G83). The bottom alignment shows the primary sequence of the IS6 and IIS6 segments of the L-type Cav1.2 channel. The mid-glycine residues in IS6 (G422) and IIS6 (G770) are aligned with the glycine hinge of K⁺ channels shown highlighted. IS6 of Cav1.2 contains 2 additional glycine residues G432 and G436 that are also highlighted. The PVP gating hinge of Kv channels is underlined. Numbering corresponds to the primary sequence of the rabbit Cav1.2 channel (Genbank X15539).

FIGURE 2. Alanine Scan for G(X)₉G(X)₃G motif. Whole-cell current traces are shown from left to right for Cav1.2 ctrl, G422A, G432A, G436A, G422A + G436A, and G432A + G436A mutants in 10 mM Ba²⁺. Unless specified otherwise, mutants were expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of Cav α 2b δ and Cav β 3 subunits and currents were recorded using the two-electrode voltage-clamp technique after 30 minutes injection of a solution containing 50 mM EGTA. Functional expression peaked 2-6 days after cRNA injection. Holding potential was -80 mV throughout. Oocytes were pulsed from -40 mV to +50 mV using 5 mV steps for 900 ms. Capacitive transients were erased for the first ms after the voltage step. Scale bars are 0.1 μ A and 100 ms for G432A and G422A + G436A and as shown for the other traces. Activation and inactivation properties are shown in Table I.

FIGURE 3. Activation potentials for the GA mutants in IS6. Activation potentials were slightly shifted to the right (positive voltages) for G422A, G432A, and the triple G422A+G432A+G436A mutant whereas activation potentials of G436A, G422A+ G436A, and G432A + G436A were not significantly different ($p > 0.05$) from the control channel. $\Delta E_{0.5,act} = E_{0.5,act}(\text{mutant}) - E_{0.5,act}(\text{control channel})$ using the values reported in Table I.

FIGURE 4. Western blot of non expressing proline and double mutants. Membrane expression of non-functional mutants G422P, G432P, and G422A+G432A was assessed from Western blots. Total (Lanes 1-5) and enriched plasma membranes (Lanes 6-10) isolated from *Xenopus* oocytes were separated on a 7.5% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) as described in Material and Methods. Following transfer onto a nitrocellulose membrane, proteins were revealed using the primary antibody against Cav1.2 (Alomone; dilution 1:200) and the secondary anti-rabbit-HRP antibody (Jackson Immunoresearch; 1:10000). Lanes 1 and 6: non-injected oocytes; Lanes 2 and 7: Cav1.2 control; Lanes 3 and 8: G422P; Lanes 4 and 9: G432P; Lanes 5 and 10: G422A+G432A. Membrane preparations were isolated 3-4 days after cRNA injection to mimic the experimental conditions used for electrophysiological measurements.

FIGURE 5. Gating properties of the GA mutants. **A.** Time to peak values for the single Gly to Ala mutants and the control channel were comparable between 0 and 20 mV. From left to right on the bar graph: Cav1.2 control channel (33), G422A (26), G432A (21), G436A (21), and G770A (17) with the number of experiments shown in the parentheses. **B.** Time to peak values for the double and triple Gly to Ala mutants in IS6 are shown with the control channel between 0 and +30 mV. Mutating more than 1 glycine residue increased by 4- to 10-fold the time to peak values. The double G432A+G436A mutant was significantly slower than the G422A+ G436A mutant ($p < 10^{-3}$). From left to right on the bar graph: Cav1.2 control channel (33), G422A+G436A (12), G432A+G436A (8),

GGG-AAA or G422A+G432A+G436A (11) with the number of experiments shown in the parentheses. The scale is logarithmic between 1 and 155 and then linear after the break. **C.** The r_{800} values (the fraction of whole-cell currents remaining at the end of a 800 ms pulse) are shown \pm S.E.M. for the single GA mutants from 0 to +30 mV for $\text{Ca}_v1.2$ control channel (33), G422A (26), G432A (21), G436A (21), and G770A (17) (from left to right on the bar graph). At +10 mV, inactivation was slower for $\text{G432A} < \text{G422A} < \text{G436A} < \text{G770A} \approx \text{control channel}$. R_{800} values for the IS6 mutants were all statistically different from the control channel ($p < 10^{-4}$). **D.** Time to peak values for the G432 mutants and the control channel are shown between 0 and +30 mV. The G432S mutant was significantly slower than the G432A and the G436E mutants ($p < 10^{-3}$) and its time to peak values were similar for the G432A+G436A mutant. From left to right on the bar graph: $\text{Ca}_v1.2$ control channel (33), G432A (21), G432S (22), and G432E (6) with the number of experiments shown in the parentheses. The scale is logarithmic between 1 and 35 and then linear after the break.

FIGURE 6. Mutational analysis of the G436 position. A-D. Whole-cell current traces are shown from left to right and from top to bottom for G436P, G436Y, G436E, and G436H mutants in 10 mM Ba^{2+} . Whole-cell recordings were obtained 2-6 days after cRNA injection and peak currents were noticeably smaller than for the GA mutants. Of all the mutants tested, the macroscopic kinetics G436A came closer to the control channel (See Fig 2). Activation and inactivation properties are shown in Table I. Scale bars are 0.5 μA and 100 ms for G436Y and as shown for the other traces. **E.** Time to peak values for the single G436 mutants and the control channel were computed between 0 and 30 mV. From left to right on the bar graph: $\text{Ca}_v1.2$ control channel (33), G436A (21), G436P (8), G436Y (14), G436R (7), G436K (7), G436H (9), G436D (9), and G436E (9) with the number of experiments shown in the parentheses. The mutations to hydrophilic residues had the strongest effect.

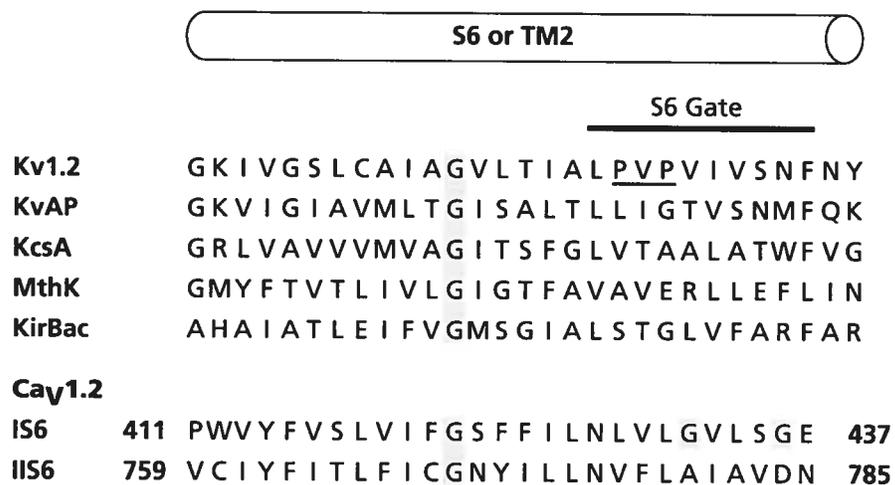
FIGURE 7. Top panel. Whole-cell current traces are shown from left to right for the $\text{Ca}_v1.2$ control channel, G432S, and G436R in 10 mM Ba^{2+} . Both mutations identified in the Timothy Syndrome wiped out voltage-dependent inactivation. **Bottom panel.** Whole-cell current traces are shown from left to right for the $\text{Ca}_v1.2$ control channel, G432S, and G436R in 10 mM Ca^{2+} . Mutations retarded but did not eliminate calcium-dependent inactivation. Activation and inactivation properties are shown in Table II. Scale bars are 0.1 μA and 100 ms for G432S and G436R in Ba^{2+} (top panel) and as shown for the other traces.

FIGURE 8. Time to peak values from left to right in 10 mM Ba^{2+} and in 10 mM Ca^{2+} between 0 and +30 mV. From left to right on the bar graph: $\text{Ca}_v1.2$ control channel (33); G432S (22); G436R (7) in Ba^{2+} and $\text{Ca}_v1.2$ control channel (11); G432S (17); G436R (13) in Ca^{2+} with the number of experiments shown in the parentheses. The scale is logarithmic between 1 and 35 and then linear after the break. The mutations showed delayed activation in Ba^{2+} but their macroscopic activation kinetics were similar to the control channel when measured in Ca^{2+} .

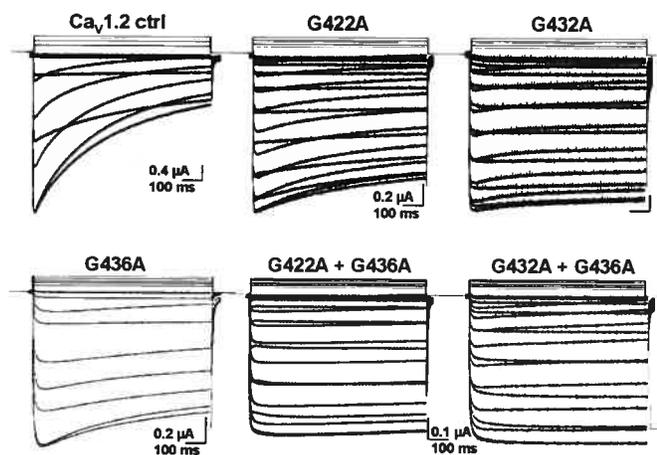
FIGURE 9. A. The time course of whole-cell current traces for the control and the G436R channel in the presence of 10 mM Ba^{2+} simulated using the analytical solution to the kinetic model (3) with the following time constants: $k_1 = 85 \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 15 \text{ s}^{-1}$; $k_3 = 2 \text{ s}^{-1}$ for the control channel and $k_1 = 97 \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 3 \text{ s}^{-1}$; $k_3 = 0.05 \text{ s}^{-1}$ for G436R with $P(\text{closed}) = 1$ at time $t = 0$ at $V_m = 0 \text{ mV}$. The current traces were computed with I_{max} (total currents) normalized to 1. **B.** The time course of whole-cell current traces for the control and the G436R channel in the presence of 10 mM Ca^{2+} simulated using the analytical solution to the kinetic model (4) with the following time constants: $k_1 = 85 \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 15$

s^{-1} ; $k_3 = 2 s^{-1}$; $k_4 = 40 s^{-1}$; $k_5 = 0.0001 s^{-1}$; $k_1' = 1 s^{-1}$; $k_2' = 0.01 s^{-1}$; $k_3' = 10 s^{-1}$ for the control channel and $k_1 = 97 s^{-1}$; $k_2 = 3 s^{-1}$; $k_3 = 0.05 s^{-1}$; $k_4 = 40 s^{-1}$; $k_5 = 0.0001 s^{-1}$; $k_1' = 1 s^{-1}$; $k_2' = 0.1 s^{-1}$; $k_3' = 0.1 s^{-1}$ for G436R with $P(\text{closed}) = 1$ at time $t = 0$ at $V_m = 0$ mV. Peak currents are expected to be smaller in Ca^{2+} than in Ba^{2+} .

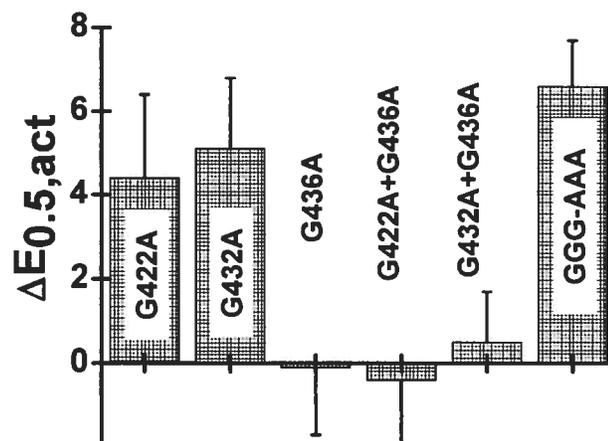
FIGURE 10. Activation and inactivation gating model for the L-type Ca^{2+} channel highlighting the key role of the glycine residues in the $G(X)_9G(X)_3G$ motif of IS6. The three glycine residues are predicted to lie on the same side of the IS6 helix in the main pore-forming $\alpha 1$ subunit and thus could work in a concerted fashion. **A.** In the closed state, the upper G422 and G432 glycine residues are positioned such that IS6 is bent inwardly to prevent ion conduction. The pore narrowest site in the channel permeation pathway could be located either at G422 or G432. The model sets G432 at this location to fit with current models of voltage-dependent gating in Kv channels. **B.** Upon depolarization, the bi-glycine residues $G(X)_9G$ move away from the pore conduction axis leading resulting in a significant widening of the pore region. **C.** With prolonged depolarization, the channel moves into the inactivated state where the flexibility of the distal G436 residue is critical in the folding of the I-II linker underneath the permeation pathway. G432 appears to be critical which could account for the fact that most mutations at this position produced non-functional channels. The model also includes elements discussed in previous papers (33;36) with the guanylate kinase domain of the $Ca_v\beta$ subunit bound to the hydrophobic face of the alpha-interaction domain (AID) helix whereas the hydrophilic residues are facing the channel cavity. Cross-talk between the I-II, II-III, and III-IV cytoplasmic linkers and the C- and N- termini (73) is not represented for clarity.



Raybaud_Figure 1



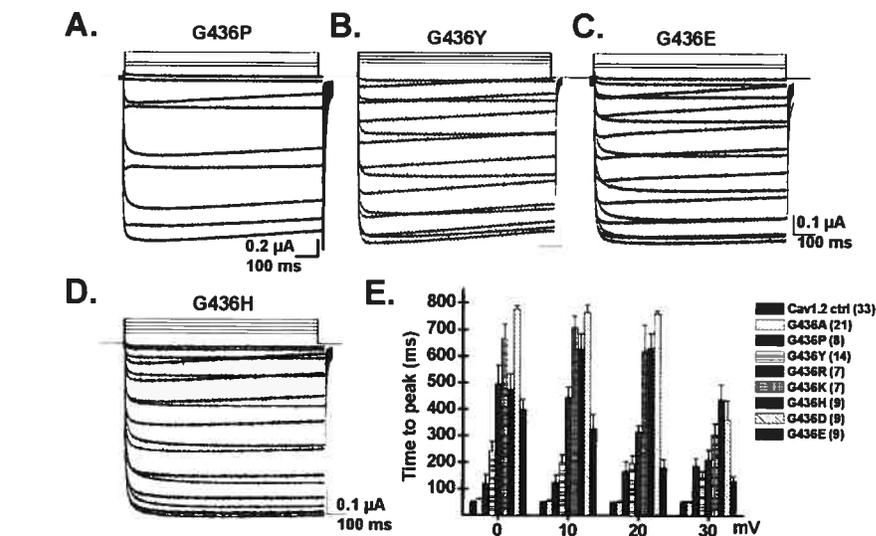
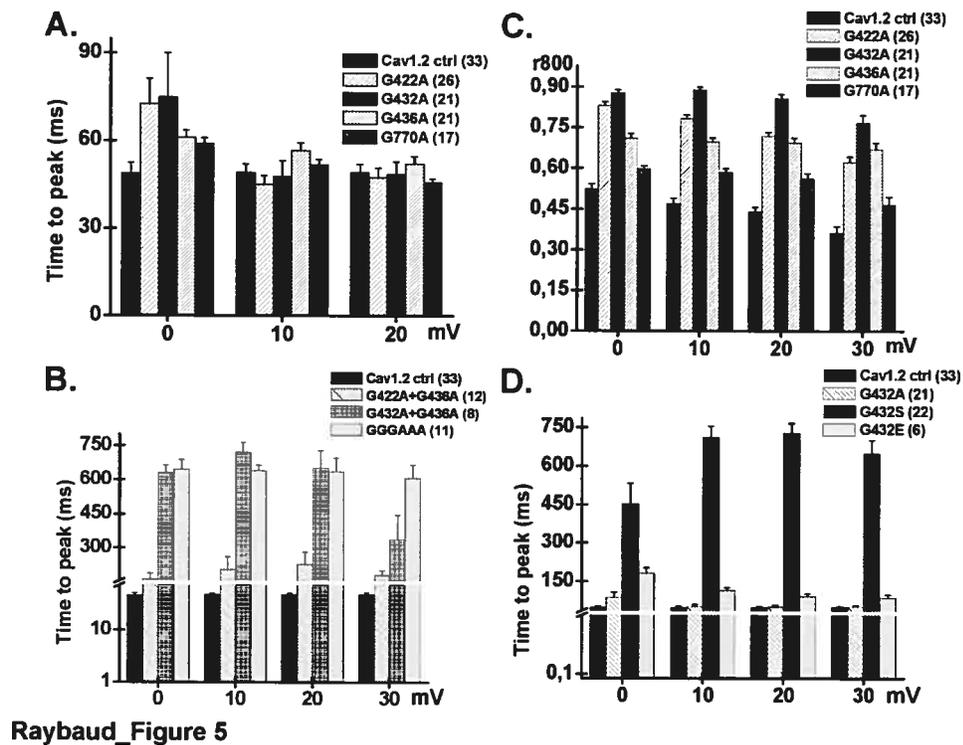
Raybaud_Figure 2

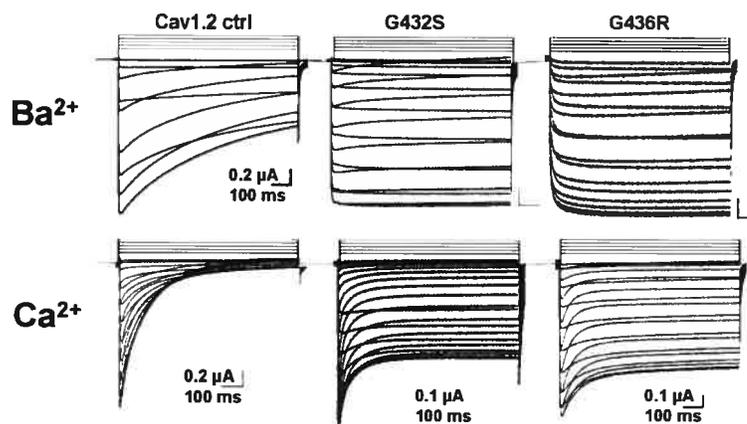


Raybaud_Figure 3

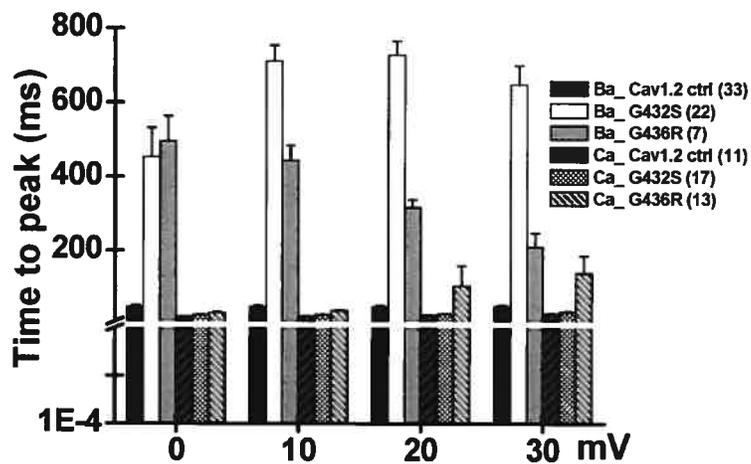


Raybaud_Figure 4

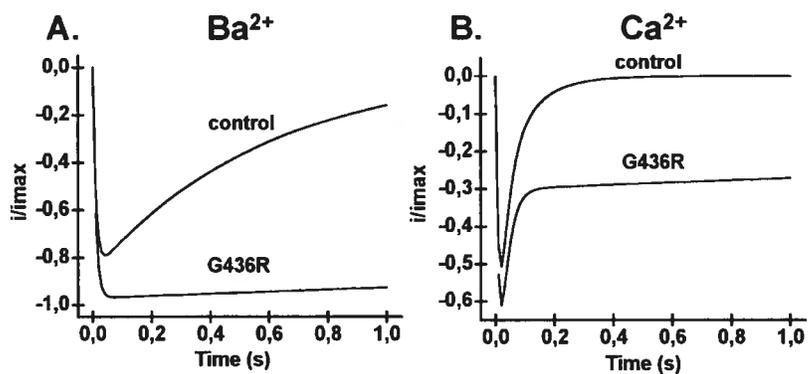




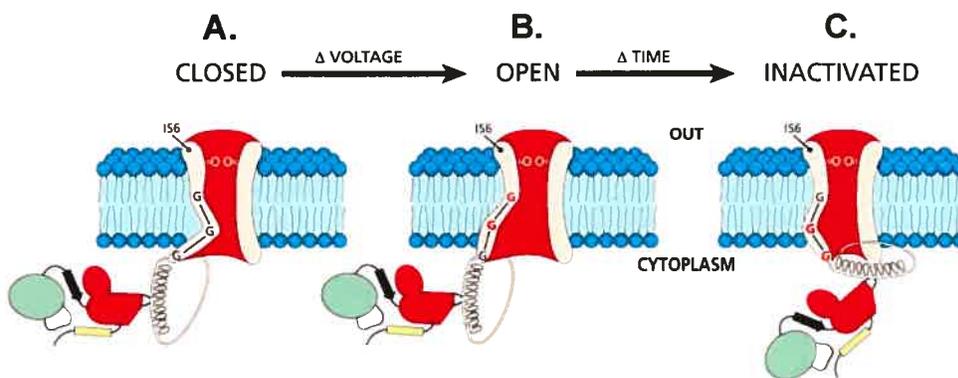
Raybaud_Figure 7



Raybaud_Figure 8



Raybaud_Figure 9



Raybaud_Figure 10

8. PUBLICATIONS

ARTICLES

Raybaud A, Dodier Y, Bissonnette P, Bichet DG, Sauvé R, Parent L. The role of the G(X)₉ G(X)₃G motif in the voltage-dependent gating of the Ca_v1.2 channel. *Article en soumission*

Berrou L, Dodier Y, Raybaud A, Tousignant A, Dafi O, Pelletier JN, Parent L. The C-terminal residues in the alpha-interacting domain (AID) helix anchor Ca_v beta subunit interaction and modulation of Ca_v2.3 channels. *J Biol Chem.* 2005 Jan 7;280(1):494-505.

Dafi O, Berrou L, Dodier Y, Raybaud A, Sauvé R, Parent L. Negatively charged residues in the N-terminal of the AID helix confer slow voltage dependent inactivation gating to Ca_v1.2. *Biophys J.* 2004 Nov;87(5):3181-92. Page-couverture du journal avec la figure 1A montrant la représentation 3D du complexe Ca_vβ2a/Ca_v1.2-AID, générée avec *Insight II*

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Raybaud A, Dodier Y, Bissonnette P, Bichet D, Sauvé R, Parent L. *Cardiac arrhythmias associated with the long QT syndrome 8 (LQT8) : role of conserved glycine residues in the L-type Ca²⁺ channel.* 2^{ième} Prix d'excellence. XXIV^{ième} Symposium Annuel du GEPRON. Montréal. 24-25 mai 2006.

Raybaud A, Dodier Y, Baspinar E, Parent L. *Voltage-dependant gating of calcium channels : a key role for G436 in IS6 of Ca_v1.2 ?* Program No.35.6 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC : Society for Neuroscience

Raybaud A, Dodier Y, Parent L. *Arythmies ventriculaires associées au syndrome de Timothy : rôle des résidus glycines dans le canal Ca_v1.2.* Club de Recherche Clinique. Bromont. 23-24 septembre 2005.

Raybaud A, Dodier Y, Parent L. *Cardiac arrhythmias associated with the Timothy syndrome : role of conserved glycine residues in the L-type Ca²⁺ channel.* XXIII^{ième} Symposium Annuel du GEPRON. Montréal. 24-25 mai 2005.

Berrou L, Dodier Y, Dafi O, Isaac A, Raybaud A, Parent L. *Structural determinant of α-subunit binding and modulation in the I-II linker of Ca_v2.3 calcium channels.* XXII^{ième} Symposium Annuel du GEPRON. Montréal. 15-16 juin 2004.