

Université de Montréal

**Identifications des interactions des inhibiteurs connus des canaux HCNs.**

par  
Jérémy Tanguay

Département de Physique  
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Biophysique

Août, 2018

© Jérémy Tanguay, 2018.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

**Identifications des interactions des inhibiteurs connus des canaux HCNs.**

présenté par:

Jérémie Tanguay

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Richard Leonelli,	président-rapporteur
Nazzareno D'Avanzo,	directeur de recherche
Normand Mousseau,	membre du jury
Rafael Najmanovich,	examineur externe

Mémoire accepté le: 19 mars 2020

## RÉSUMÉ

Les canaux activés par l'hyperpolarisation et sensibles aux nucléotides cycliques (hyperpolarization cyclic nucleotide-gated channel; HCN) ont un rôle dans la régulation du rythme cardiaque ainsi que dans la transmission des influx nerveux. De nombreuses pathologies sont causées par un dysfonctionnement de ces canaux. A ce jour, Ivabradine représente la seule molécule utilisée comme médicament, mais malgré sa spécificité envers les canaux HCNs, elle n'est pas sélective entre les isoformes de la famille HCN. Dans le but d'identifier une molécule plus adéquate pour le traitement qu'Ivabradine, nous avons analysé l'interaction entre les canaux HCNs et 9 bloqueurs connus grâce à l'arrimage moléculaire. Cette analyse nous a permis d'identifier les résidus nécessaires pour la liaison des ligands. On observe aussi qu'Ivabradine ne forme aucune liaison solide avec les canaux HCNs mais ne fait que bloquer le passage par sa présence tout comme ses dérivées Zatebradine et Cilobradine. Les ligands de plus petites tailles quant à eux, se logent dans une cavité hydrophobe et forment des liaisons stables avec les protéines. Nos résultats semblent suggérer que le blocage par Ivabradine est plus efficace, mais que les liaisons stables des petits ligands possèdent un potentiel plus grand vers une meilleure affinité. Par contre, les interactions observées suggèrent que la spécificité envers les isoformes proviendrait des cinétiques des canaux et des dépendances d'états des ligands plutôt que des interactions identifiées. Pour finir, l'arrimage des ligands sur la conformation fermée du canal HCN1 suggère qu'il existerait une conformation fermée-liée non connue puisque aucun ligand n'a pu accéder au pore.

**Mots clés:** HCN, canaux ioniques, médicament, arythmie, stimulus, douleur.

## ABSTRACT

HCN channels have a role in regulating heart rate as well as in the transmission of nerve impulses. Many pathologies are caused by a malfunction of these channels. To date, Ivabradine is the only molecule used as a drug, but despite its specificity for HCN channels, it is not selective between the isoforms of the HCN family. In order to identify a molecule more suitable for the treatment than ivabradine, we analyzed the interaction between HCN family and 9 known blockers using docking. This analysis allowed us to identify the necessary residuals for ligand binding. It is also observed that ivabradine forms no solid bond with the HCN channels but only blocks the passage by its presence, the same was observed for its derivatives Zatebradine and Cilobradine. Ligands of smaller size, for their part, are lodged in a hydrophobic cavity and form stable bonds with the proteins. Our results seem to suggest that blocking with Ivabradine is more efficient but that the stable bonds of small ligands have a greater potential for better affinity. However, the observed interactions suggest that the specificity towards isoforms would come from the kinetics of the channels and state dependencies of ligands rather than identified interactions. Finally, the binding of the ligands to the closed conformation of the HCN1 channel suggests that there would be a closed-bound conformation that is not known since no ligand has been able to access the pore.

**Keywords:** HCN channel, ion channel, drug binding, docking, bradycardia, arrhythmia, epilepsy, pain.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> . . . . .	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> . . . . .	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> . . . . .	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> . . . . .	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> . . . . .	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> . . . . .	<b>xiii</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> . . . . .	<b>xv</b>
<b>INTRODUCTION</b> . . . . .	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : CANAUX HCNS</b> . . . . .	<b>2</b>
1.1 Structure . . . . .	2
1.2 Activation . . . . .	3
1.3 Comparaison entre les canaux HCNS et kV . . . . .	3
1.4 Modulation . . . . .	4
1.5 Différences entre les isomères des canaux HCNS . . . . .	5
1.5.1 ACTIVATION . . . . .	5
1.5.2 MODULATION PAR NUCLÉOTIDES CYCLIQUES . . . . .	7
1.5.3 PROTÉINES RÉGULATRICES . . . . .	8
1.6 Rôles des canaux HCNS . . . . .	8
1.6.1 HCNS dans le coeur . . . . .	9
1.6.2 HCNS dans les neurones . . . . .	15
<b>CHAPITRE 2 : CRÉATION DE MÉDICAMENTS GUIDÉ PAR ORDINA- TEUR</b> . . . . .	<b>23</b>

---

2.1	Types de CADD . . . . .	23
2.1.1	Conception de médicaments à partir d'une structure (SBDD) . . .	24
2.1.2	Conception de médicaments à partir de ligands (LBDD) . . . . .	25
2.2	Amarrage moléculaire . . . . .	25
2.2.1	Algorithme d'amarrage . . . . .	26
2.2.2	Partitionnement de données . . . . .	30
2.2.3	K-means . . . . .	31
2.2.4	Partitionnement par silhouette . . . . .	33
<b>CHAPITRE 3 : LIGANDS . . . . .</b>		<b>35</b>
3.1	Classe de médicament pour l'arrhythmie . . . . .	35
3.1.1	Classe 1-Bloqueurs de canaux sodium . . . . .	35
3.1.2	Classe 2 - Bêtabloquantes . . . . .	35
3.1.3	Classe 3 - Bloqueurs de canaux potassiques . . . . .	36
3.1.4	Classe 4 – Bloqueurs de canaux calciques . . . . .	36
3.2	Traitement neuronal . . . . .	37
3.3	Ligands utilisés . . . . .	38
3.3.1	Clonidine et Alinidine . . . . .	38
3.3.2	ZD7288 . . . . .	40
3.3.3	La famille « -bradine » . . . . .	40
3.3.4	La famille « -caïnes » . . . . .	40
<b>CHAPITRE 4 : ARTICLE SUR LES INTERACTIONS DES LIGANDS AVEC HCN1 . . . . .</b>		<b>41</b>
<b>CHAPITRE 5 : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES . . . . .</b>		<b>74</b>
5.1	HCN1 en conformation fermée . . . . .	74
5.2	Isoformes HCN1, HCN2 et HCN4 . . . . .	75
5.2.1	Clonidine et son dérivé alinidine . . . . .	76
5.2.2	Lidocaïne et ses dérivées . . . . .	77
5.2.3	ZD7288 . . . . .	80

---

5.2.4	Ivabradine et ses dérivées . . . . .	82
<b>CHAPITRE 6 :</b>	<b>DISCUSSIONS . . . . .</b>	<b>87</b>
6.1	Comparaisons entre inhibiteurs . . . . .	87
6.1.1	HCN1 fermé . . . . .	87
6.1.2	HCN1 : l'état ouvert . . . . .	88
6.2	Molécules futures . . . . .	89
6.3	Validation . . . . .	90
6.3.1	Zone d'arrimage . . . . .	90
6.3.2	Partitionnement des données . . . . .	90
6.4	Limitations . . . . .	90
6.4.1	Flexibilité . . . . .	90
6.4.2	Partitionnement des données . . . . .	91
6.5	Utilisation de notre algorithme . . . . .	92
6.5.1	HCNs plus en détails . . . . .	92
6.5.2	Dépistage en général . . . . .	92
6.6	Projets futurs . . . . .	93
6.6.1	In vivo . . . . .	93
6.6.2	Hétéromères des canaux HCNs . . . . .	93
6.6.3	Dynamique moléculaire . . . . .	94
6.6.4	Mutations des canaux . . . . .	94
<b>CONCLUSION . . . . .</b>	<b>95</b>	
<b>BIBLIOGRAPHIE . . . . .</b>	<b>97</b>	

## LISTE DES TABLEAUX

1.I	Concentration des nucléotides cycliques nécessaire pour produire une déviation du voltage de demi-activation ( $EC_{50}$ ). . . . .	7
5.I	Table répertoriant les états intermédiaires qui permettent l'entrée de chacun des ligands dans le pore. . . . .	75
5.II	Table de références d'équivalence des résidus entre les isoformes HCN1, HCN2 et HCN4. . . . .	76



## LISTE DES FIGURES

1.1	Modèle du canal HCN. Adaptée de "Hyperpolarization-activated cation channels : from genes to function." [7] . . . . .	2
1.2	Comparaison de la séquence protéique de quelques membres de la famille des canaux HCNs et Kv. Adaptée de "Separable Gating Mechanisms in a Mammalian Pacemaker Channel" [16] . . . . .	4
1.3	(A) Courant de la cellule entière provenant de l'expression des isoformes mHCN1, mHCN2 et mHCN4 obtenu avec un protocole pas à pas de -40mV à -140mV avec un potentiel de maintien à -30mV. Les courbes d'activation obtenues de la conductance normalisé en fonction du potentiels analysées avec une fonction de Boltzmann démontre un seuil d'activation et un voltage de demi-activation plus négatifs pour les isoformes HCN1 et HCN2 respectivement. (B) L'addition de cAMP du côté cytoplasmique de la membrane produit une déviation plus importante sur l'isoforme HCN2 que HCN1. (C) Représentation schématique de la structure des 4 isoformes des canaux HCNs. [30] . . . . .	6
1.4	Topologie des canaux HCNs et protéines d'interactions associées [30]. . . . .	9
1.5	(A) Conductance des cations en fonction du voltage membranaire lors du potentiel d'action cardiaque dans des cellules non-nodales du cœur. (B) Conductance des cations en fonction du voltage membranaire lors du potentiel d'action cardiaque dans des cellules nodales du cœur. [37] . . . . .	11
1.6	Représentation des différentes composantes du système cardiaque.[38]	11
1.7	Activité physiologique du canal HCN2 comparé à l'activité dû à la douleur pathologique et l'effet de l'ajout d'un bloqueur du canal sur l'activité[59]. . . . .	17

---

1.8	Implications pathologies du dysfonctionnement des canaux HCNs dans le CNS et le PNS répertorié par des études précliniques et cliniques [30]. . . . .	19
2.1	Le processus itératif menant à la création de médicaments assistée par ordinateur [86]. . . . .	24
2.2	Illustration du contraste entre l'évolution lamarckienne et darwinienne et qui illustre l'évolution d'un individu en utilisant la génétique lamarckienne. [89] . . . . .	29
2.3	Comparaison du partitionnement de données réalisé par plusieurs algorithmes différents. [90] . . . . .	30
2.4	Somme du carrée de la distance entre les individus d'un groupe en fonction du nombre de groupes formé suite au partitionnement de données utilisé à titre d'exemple [91]. . . . .	32
3.1	Phases du potentiel d'action cardiaque ainsi que l'identification des canaux qui leurs sont associés [93]. . . . .	36
3.2	Site d'interactions des bêtabloquantes au niveau des tissus nerveux [94]. . . . .	37
3.3	Phases du potentiel d'action cardiaque ainsi que l'identification des canaux qui leurs sont associés [93]. . . . .	38
3.4	Ligands utilisés pour la recherche présentée [96]. . . . .	39
5.1	Comparaison des interactions de clonidine avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l'amarrage de 500 poses de clonidine sur HCN2. (B) Résultat de l'amarrage de 500 poses de clonidine sur HCN4. (C) Histogramme du taux d'interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs. [96]. . . . .	77

---

5.2	Comparaison des interactions d'alinidine avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l'amarrage de 500 poses d'alinidine sur HCN2. (B) Résultat de l'amarrage de 500 poses d'alinidine sur HCN4. (C) Histogramme du taux d'interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l'amarrage d'alinidine sur les canaux HCNs. [96]. . . . .	78
5.3	Comparaison des interactions de lidocaïne avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l'amarrage de 500 poses de lidocaïne sur HCN2. (B) Résultat de l'amarrage de 500 poses de lidocaïne sur HCN4. (C) Histogramme du taux d'interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l'amarrage de lidocaïne sur les canaux HCNs. [96]. . . . .	79
5.4	Comparaison des interactions de bupivacaïne avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l'amarrage de 500 poses de bupivacaïne sur HCN2. (B) Résultat de l'amarrage de 500 poses de bupivacaïne sur HCN4. (C) Histogramme du taux d'interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l'amarrage de bupivacaïne sur les canaux HCNs. [96]. . . . .	80
5.5	Comparaison des interactions de mépivacaïne avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l'amarrage de 500 poses de mépivacaïne sur HCN2. (B) Résultat de l'amarrage de 500 poses de mépivacaïne sur HCN4. (C) Histogramme du taux d'interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l'amarrage de mépivacaïne sur les canaux HCNs. [96]. . . . .	81
5.6	Comparaison des interactions de ZD7288 avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l'amarrage de 500 poses de ZD7288 sur HCN2. (B) Résultat de l'amarrage de 500 poses de ZD7288 sur HCN4. (C) Histogramme du taux d'interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l'amarrage de ZD7288 sur les canaux HCNs. [96]. . . . .	82

---

5.7	Comparaison des interactions d'ivabradine avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l'amarrage de 500 poses d'ivabradine sur HCN2. (B) Résultat de l'amarrage de 500 poses d'ivabradine sur HCN4. (C) Histogramme du taux d'interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l'amarrage d'ivabradine sur les canaux HCNs. [96]. . . . .	83
5.8	Comparaison des interactions de zatebradine avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l'amarrage de 500 poses de zatebradine sur HCN2. (B) Résultat de l'amarrage de 500 poses zatebradine sur HCN4. (C) Histogramme du taux d'interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l'amarrage de zatebradine sur les canaux HCNs. [96]. . . . .	84
5.9	Comparaison des interactions de cilobradine avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l'amarrage de 500 poses de cilobradine sur HCN2. (B) Résultat de l'amarrage de 500 poses de cilobradine sur HCN4. (C) Histogramme du taux d'interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l'amarrage de cilobradine sur les canaux HCNs. [96]. . . . .	85

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

HCN	canal activé par l'hyperpolarisation, modulé par les nucléotides cycliques
CNBD	Domaine de liaison aux nucléotides cycliques
CNG	Canaux modulés par les nucléotides cycliques
Kv	Canaux potassique activé par le voltage
TRIP8b	Tetratricopeptide repeat-containing Rab8b-interacting protein
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
cCMP	Cytosine monophosphate cyclique
cIMP	Inosine monophosphate cyclique
cUMP	Uridine monophosphate cyclique
cPMP	Pyranoptérine monophosphate cyclique
C-linker	Région reliant le canal HCN au CNBD
EC50	Concentration nécessaire pour diminuer le courant maximale de moitié
SAN	Nœud Sino auriculaire
AVN	Nœud Auriculo ventriculaire
KCNE2	Sous-unité 2 de la famille E de canaux potassiques dépendants du voltage
KCR1	Régulateur 1 de canaux potassiques dépendants du voltage
Nedd4-2	Ligase de la E3-ubiquitine
If	Courant cationique entrant activé par hyperpolarisation
GOF	Gain de fonction

---

LOF	Perte de fonction
CNS	Système nerveux central
DRG	Ganglions de l'épine dorsale
EPSP	Potentiel post synaptique excitateur
Cav	Canaux calcique activé par le potentiel
PFC	Cortex préfrontal
CADD	Création de médicaments guidés par ordinateur
SBDD	Conception de médicaments à partir d'une structure
LBDD	Conception de médicaments à partir de ligands
Cryo-EM	Cryo-microscopie électronique
SSE	Somme du carrée des erreurs
PNS	Système nerveux périphérique

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier les gens de mon laboratoire pour m'avoir guidé tout au long de ma maîtrise, merci Dr. Nazzareno D'avanzon, Dr. Karen Callahan et Yoann Lussier M.Sc. de m'avoir enduré pendant ces deux années.

J'aimerais aussi remercier ma mère Julie Desorcy de toujours m'avoir encouragé à poursuivre mes études et à ne pas abandonner, merci maman je t'aime très fort ! Merci aussi à mon beau père Alain Lalonde pour son soutien culinaire, particulièrement en toute fin de maîtrise. Merci beaucoup à vous deux d'être toujours là pour moi.

En dernier j'aimerais remercier ma copine Daline Tho sans qui je n'aurais sûrement pas eu la motivation de terminer. Merci mon amour de toujours croire en moi et de m'avoir attendu jusqu'au bout, je t'aime sweeti !

## INTRODUCTION

Les canaux activés par l'hyperpolarisation et sensible aux nucléotides cycliques (hyperpolarization cyclic nucleotide-gated channel; HCN) sont une famille de canaux ioniques composé de 4 isomères (HCN1-4) présents chez les humains et diverses espèces eucaryotes. Ces canaux cationiques sont impliqués dans la stimulation cardiaque (pace-making), un courant débutant l'action potentielle cardiaque, ainsi que dans la génération et la transmission de signaux neuronaux (voir : HCNs dans le cœur et HCNs dans les neurones)[1–4]. Leur nom provenant de leur condition d'ouverture, ils ont la propriété de s'activer en condition hyperpolarisante (-70mV) en plus d'être modulés par la présence de nucléotides cycliques. Leur ouverture permet aux ions sodiques et potassiques de traverser la membrane, mais une faible concentration de césium est suffisante pour bloquer complètement ce passage.

Leurs rôles physiologiques en font une excellente cible pharmaceutique. Inopportunément, il n'y a qu'une seule molécule acceptée sur le marché, Ivabradine, pour le traitement des problèmes liés au mal fonctionnement des canaux HCNs. Pourtant, Ivabradine n'est pas très spécifique envers les différents isoformes de la famille des HCNs

Nous avons donc examiné les interactions de 9 différents bloqueurs connus avec HCN1 dans le but de construire une molécule qui serait plus efficace, mais surtout plus spécifique pour traiter les pathologies liées au mal fonctionnement de ces canaux. Les informations recueillies par notre recherche permettent de se guider vers une molécule plus adéquate pour le traitement.



## CHAPITRE 1

### CANAUX HCNS

#### 1.1 Structure

Les canaux HCNs sont formés d'un domaine N terminal intracellulaire, de 6 domaines transmembranaires, d'une hélice formant le pore et d'une section intracellulaire nommée C-terminale formée du C-linker et du domaine de liaison aux nucléotides cycliques (cyclic nucleotide binding domain; CNBD); conférant une modulation (Figure 2.2).[5, 6]. Le segment S4 des HCNs est particulièrement long et est responsable de la dépendance au voltage unique aux HCNs. Chaque structure est formée de 4 sous-unités, identiques ou non pour former soit des homotétramères ou hétérotétramères.

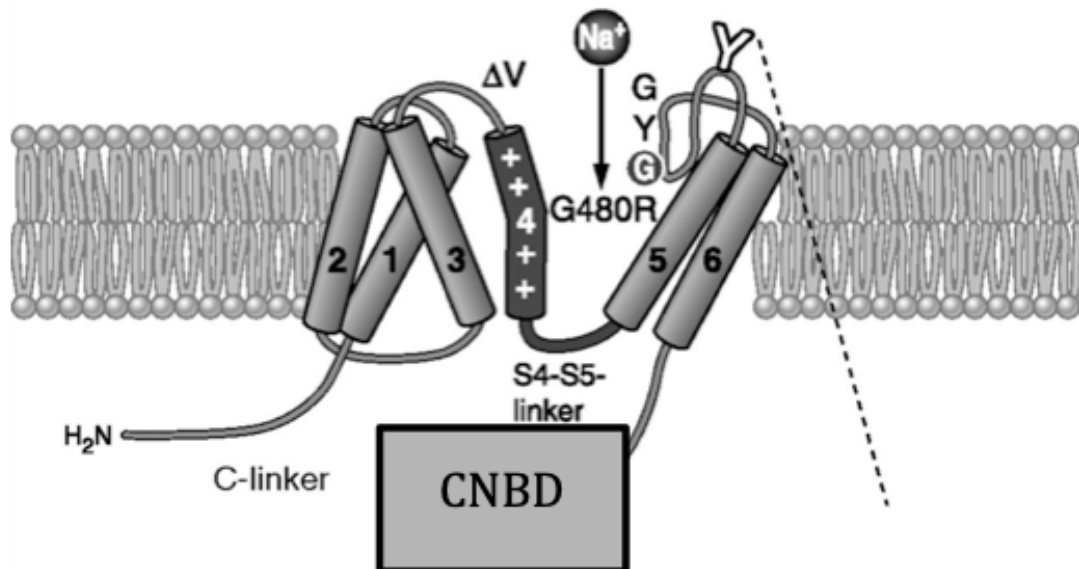


FIGURE 1.1 – Modèle du canal HCN. Adaptée de "Hyperpolarization-activated cation channels : from genes to function." [7]

---

## 1.2 Activation

Les canaux HCNs possèdent un segment transmembranaire S4 similaire aux canaux activés par dépolarisation présentant 10 charges positives, un mélange de lysines et d'arginines[8]. La cause de la dépendance inversée vis-à-vis la polarisation provient de la longueur de ce segment[9]. Ce dernier est beaucoup plus long et rapproché des segments S5 et S6. En 2 situation dépolarisante, S4, S5 et S6 sont comprimés et forment la conformation fermée du canal. En état d'hyperpolarisation, S4 migre vers l'intérieur ce qui provoque un relâchement des liens S4-S5, qui amène S5 à tirer S6 provoquant l'ouverture du canal telle une fermeture éclair.

## 1.3 Comparaison entre les canaux HCNs et kV

La région du pore des canaux HCNs est très conservée et possède une séquence d'acide aminé similaire aux canaux potassiques sélectifs dépendant du voltage (kV). Contrairement aux canaux Kv, les HCNs permettent le passage préférentiel des ions sodiums ( $Na^+$ ) sur les potassiums ( $K^+$ ) dans un rapport 1 :4[10]. De plus, les canaux HCNs ne sont pas bloqués par les ions bromures ( $Br^+$ ) ou le tétraéthylammonium (TEA)[11]. Ceci provient des différences subtiles au niveau du filtre de sélectivité. Les canaux kV ayant une séquence d'acides aminés (TVGYG) conservées dans la plupart des canaux potassiques, mais seul GYG se retrouve chez les HCNs (Figure 2)[12]. Cette différence au niveau du filtre de sélectivité provoque un changement conformationnel d'acides aminés voisins ce qui altère les caractéristiques du filtre. En particulier, on observe seulement 2 ions coordonnés le filtre de sélectivité des canaux HCNs alors qu'il en existe 4 dans les canaux Kv. Une substitution thréonine pour cystéine typique des canaux HCNs n'affecte pas la sélectivité des canaux Kv[13, 14], toutefois la perméabilité des HCNs provient entre autres de la distance plus grande entre les hélices de ce filtre[15].

### Filtre de sélectivité

\*

mHCN1	340	KAMSHMLCIGYGAQAPVS	357
mHCN2	394	KAMSHMLCIGYGRQAPES	410
HCN4	472	KAMSHMLCIGYGRQAPVG	488
SpHCN	423	KALSHMLCIGYGFPPQS	438
Shaker	436	WAVVTMTTVGYGDMTPVG	452
Kv2.1	368	WAVVSMTTVGYGDMVPTT	384
KCSA	69	WSVETATTVGYGDLYPVT	85

FIGURE 1.2 – Comparaison de la séquence protéique de quelques membres de la famille des canaux HCNs et Kv. Adaptée de "Separable Gating Mechanisms in a Mammalian Pacemaker Channel" [16]

#### 1.4 Modulation

Les canaux HCNs font partie de la famille des canaux modulés par les nucléotides cycliques (cyclic nucleotide-gated channels ; CNG), c'est-à-dire qu'ils sont aussi modulés par les nucléotides via le domaine à liaison aux nucléotides cycliques (cyclic nucleotide binding domain ; CNBD). Cependant, contrairement aux autres membres des CNGs, la présence de nucléotide cyclique n'est pas nécessaire à l'activation[17, 18]. Le nucléotide ayant le plus d'effet est l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) qui agit en se liant au CNBD. Ce dernier agit selon un mécanisme d'auto-inhibition[19–22] qui est supprimé à l'arrivée du cAMP. Cette liaison provoque une augmentation de la probabilité d'ouverture, accélère l'activation et décélère la désactivation du canal. Le CNBD peut aussi nuire à l'activation dépendamment de la molécule qui s'y lie et du site de liaison. Par exemple, la molécule TRIP8b, en se liant au CNBD, provoque une réponse opposée menant à une inhibition.

---

## 1.5 Différences entre les isomères des canaux HCNs

### 1.5.1 ACTIVATION

Les canaux HCNs partagent une séquence d'acides aminés très similaire (conservés à environ 80%) mais ont chacun leurs propres cinétiques d'activation. Leur ouverture génère un courant cationique net entrant qui évolue dans le temps. Cette évolution peut être modélisée par une simple ou double exponentielle, moyen que nous utilisons pour distinguer les isomères d'HCN[23, 24].

La figure 1.3 démontre que HCN1 s'active plus rapidement et que HCN4 est l'isomère le plus lent[3, 4, 25, 26]. La dépendance au voltage varie aussi entre isomères avec HCN1 qui s'active à des voltages moins négatifs et qui possède le  $V_{1/2}$  le moins négatif, c'est-à-dire que HCN1 atteint la moitié de son courant maximum à un voltage plus faible que les autres isomères[3, 4, 25, 26]. La figure 1.3 démontre aussi une variation dans la modulation produite par la liaison du cAMP au CNBD. HCN2 et HCN4 sont très dépendant du cAMP alors que HCN1 n'est pas fortement modulé[27? ]. À partir d'expériences sur des cellules natives et sur des systèmes recombinants, il fut déterminé que les courants des canaux HCNs possèdent deux composantes[28]. Le courant exponentiel est précédé d'un courant instantané dont l'origine est toujours inconnue. Le modèle proposé à ce jour est celui de Männikkö qui suppose que ces 2 composantes proviennent de la transition entre 2 modes suivant un modèle à 4 états de transition[29]. Celui-ci prend aussi en compte l'hystérésis observée dans le comportement des canaux HCNs. On observe aussi une dépendance d'utilisation; le courant net produit est dévié positivement lors de longue période en situation hyperpolarisante caractérisé par une longue période d'ouverture. Inversement, le courant net sera dévié négativement après de longue période en état dépolarisant. Le modèle de Männikkö propose aussi que l'hystérésis permet aux canaux de rester fermé après un potentiel d'action cardiaque et de maintenir un battement de cœur régulier. (Voir HCN dans le cœur.)

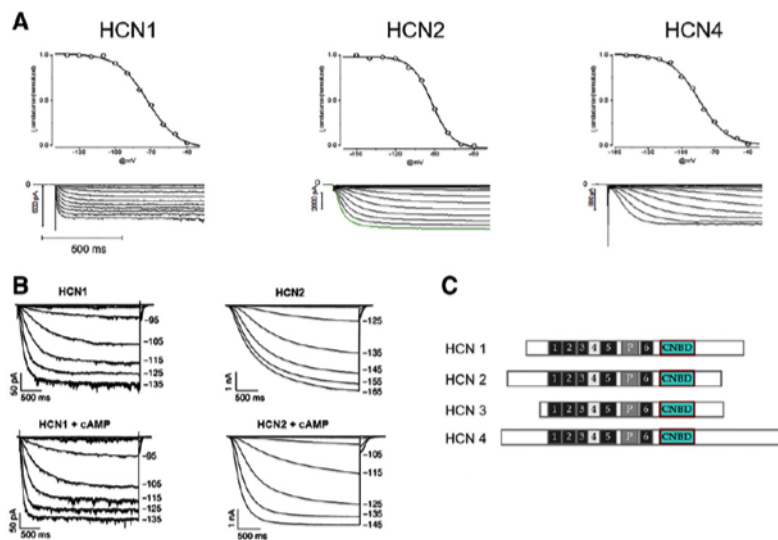


FIGURE 1.3 – (A) Courant de la cellule entière provenant de l’expression des isoformes mHCN1, mHCN2 et mHCN4 obtenu avec un protocole pas à pas de  $-40\text{mV}$  à  $-140\text{mV}$  avec un potentiel de maintien à  $-30\text{mV}$ . Les courbes d’activation obtenues de la conductance normalisé en fonction du potentiels analysées avec une fonction de Boltzmann démontre un seuil d’activation et un voltage de demi-activation plus négatifs pour les isoformes HCN1 et HCN2 respectivement. (B) L’addition de cAMP du côté cytoplasmique de la membrane produit une déviation plus importante sur l’isoforme HCN2 que HCN1. (C) Représentation schématique de la structure des 4 isoformes des canaux HCNs. [30]

## 1.5.2 MODULATION PAR NUCLÉOTIDES CYCLIQUES

TABLE 1.I – Concentration des nucléotides cycliques nécessaire pour produire une déviation du voltage de demi-activation ( $EC_{50}$ ).

Nucléotides Cycliques	$EC_{50}$ ( $\mu M$ )	Isoforme/Tissu	Référence
cAMP	0.06	mHCN1 (Xenopus Laevis)	Wang et al. (2001)
cAMP	0.10	mHCN2 (Xenopus Laevis)	Wang et al. (2001)
cAMP	0.50	mHCN2 (HEK293 cells)	Ludwig et al. (1998)
cAMP	0.80	mHCN2 (Xenopus Laevis)	Zagotta et al. (2003)
cAMP	1.00	mHCN2 (HEK293 cells)	Zong et al. (2012)
cAMP	0.08	mHCN2 (Xenopus Laevis)	Xu et al. (2010)
cAMP	0.24	mHCN2-h4 chimera (X. L.)	Xu et al. (2010)
cAMP	1.53	hHCN4 (HEK293 cells)	Milanesi et al. (2006)
cAMP	0.21	Rabbit SAN myocyte	DiFrancesco and Tortora (1991)
cAMP	0.72	SpHHCN (sea urchin sperm)	Kaupp and Seifert (2001)
cGMP	6 <sup>1</sup>	mHCN2 (HEK293 cells)	Ludwig et al. (1998)
cGMP	8.3 <sup>1</sup>	mHCN2 (Xenopus Laevis)	Zagotta et al. (2003)
cGMP	13.2 <sup>1</sup>	hHCN4 (HEK293 cells)	Lolicato et al. (2006)
cGMP	7.85 <sup>2</sup>	Rabbit SAN myocyte	DiFrancesco and Tortora (1991)
cGMP	479 <sup>2</sup>	SpHHCN (sea urchin sperm)	Kaupp and Seifert (2001)
cCMP	29.0 <sup>2</sup>	mHCN2 (HEK293 cells)	Zong et al. (2012)
cCMP	11.85 <sup>2</sup>	Rabbit SAN myocyte	DiFrancesco and Tortora (1991)

<sup>1</sup> Full activation

<sup>2</sup> Partial activation

Tel que brièvement mentionné, la modulation des nucléotides cycliques varie en fonction de l'isomère et du nucléotide cyclique impliqué, voir Tableau 1.I. On observe par exemple une variation dans le  $V_{1/2}$  de HCN2 et HCN4 de l'ordre de 10-25 mV alors qu'une variation de seulement 2-6 mV est observée chez le canal HCN1[21, 22].

La variabilité de sensibilité se situe au niveau du tronçon reliant le C-linker au CNBD et à sa composition en acide aminés. Des études portées sur l'application du cAMP sur la queue C- terminal de HCN2 démontre une augmentation de la tétramérisations du canal[31]. HCN1 possèdent par défaut une grande capacité à se tétramériser, expliquant la cause du faible effet dû au cAMP sur cet isomère.

---

La modulation provenant du CNBD se traduit par un changement de conformation partant du CNBD qui au travers du C-linker le transmet au segment S6[32]. Cet effet n'est pas observé sur le canal HCN3 en raison de la courte queue C-terminale qui suit le CNBD empêchant l'effet 1.I, cAMP n'est pas l'unique modulateur des HCNs. cGMP peut produire une déviation maximale similaire toutefois l'effet est 10 fois moins efficace que le cAMP[11]. Seule l'orientation de l'anneau purine différencie la liaison de ces nucléotides cycliques au niveau du CNBD[31]. cCMP quant à lui agit seulement sur HCN2 et HCN4 et confère le même effet : augmentation du taux d'activation, accélération de l'activation et décélération de la désactivation, mais de façon moins prononcée et est défini comme un agoniste partiel[10]. D'autres nucléotides ont aussi un effet agoniste moins puissant que le cAMP, notamment le cIMP, cUMP, cPMP, etc. Les dinucléotides peuvent aussi provoquer une modulation puisque certaines recherches ont observé un effet antagoniste dans des cellules du nœud sino-auriculaire (SAN) des myocytes de souris[33].

### **1.5.3 PROTÉINES RÉGULATRICES**

De nombreuses autres protéines régulatrices forment un complexe avec HCN et contribuent au courant modulé des HCNs *in vivo*, à la localisation des HCNs et à leur sensibilité au signal modulateur. La figure 1.4 présente le site d'interaction des protéines modulatrices les plus importantes : Caveolin, KCNE2, KCR1, Filamin A, Nedd4-2 et TRIP8b déjà mentionné plus tôt [34, 35].

### **1.6 Rôles des canaux HCNs**

Comme la recherche présentée dans ce mémoire concerne les canaux HCNs, il est important de définir leur importance dans les divers mécanismes dont ils font partis pour comprendre pourquoi il est pertinent d'étudier leur modulation.

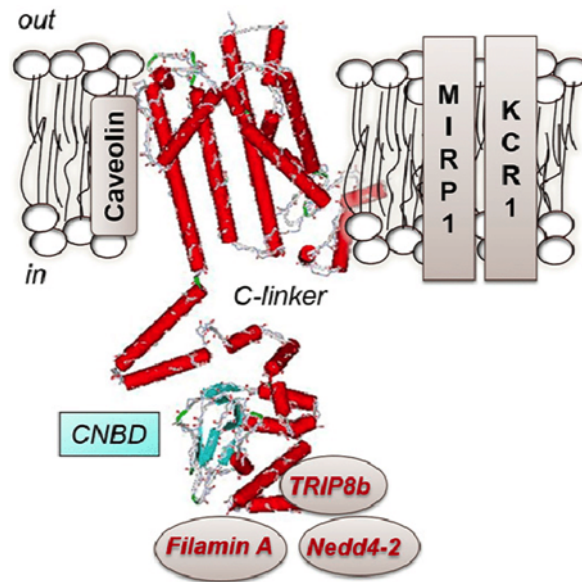


FIGURE 1.4 – Topologie des canaux HCNs et protéines d’interactions associées [30].

## 1.6.1 HCNS dans le coeur

### 1.6.1.1 Le potentiel d’action cardiaque

Les canaux HCNs forment une partie des canaux responsables de l’horloge cardiaque et ont un rôle dans la stimulation du potentiel d’action cardiaque. Le potentiel d’action cardiaque se divise en deux grandes catégories : les cellules non-nodales et les cellules nodales. Pour les non-nodales, ce processus comporte 5 étapes. Tout d’abord, la phase 0, correspond à la dépolarisation rapide de la membrane via une augmentation de la conductance sodique ( $Na^+$ ) entrante et une diminution de la conductance potassique ( $K^+$ ). Suite à cette dépolarisation arrive la phase 1, durant laquelle on observe l’ouverture des canaux potassiques et la fermeture des canaux calciques. Il s’ensuit de la phase plateau, la phase 2, qui s’observe par un état d’équilibre entre le courant entrant et sortant dû à l’accélération de l’ouverture des canaux calciques ( $Ca^{++}$ ). La phase 3 se produit lorsque la conductance en calcium s’estompe et que la repolarisation débute. Cette phase est aussi marquée par une augmentation de la conductance des canaux potassiques. En dernier, la phase 4, correspond au maintien du potentiel de repos via l’activation des canaux potassiques responsable de la régulation du potentiel dans lesquels on retrouve les



---

canaux HCNs. La régulation de ce potentiel implique beaucoup de canaux ioniques qui peuvent être sujet à des modulations. Ces modifications peuvent engendrer un déséquilibre qui se traduit par l'arythmie. Il est cependant possible de contrer ces modifications en modulant ces canaux à l'aide de molécules externes, voir section 3[36].

En ce qui attrait aux cellules nodales, le potentiel d'action s'effectue sans les phases 1 et 2. Ce mécanisme existe dans le nœud sino-auriculaire (sino-atrial node ; SAN) et le nœud auriculo-ventriculaire (atrioventricular node ; AVN) et donne naissance à l'activité stimulatrice des cellules cardiaques. La phase 0 constitue la dépolarisation et correspond à l'ouverture des canaux  $Ca^{++}$  et la diminution de la conductance pour les canaux  $K^+$ . La phase 3 suit et correspond au renversement des conductances, on observe l'ouverture des canaux potassiques et la fermeture des canaux calciques, ce qui provoque une repolarisation de la cellule. Une fois la cellule repolarisée, on se retrouve en condition hyperpolarisante ce qui active les canaux HCNs qui provoque le courant  $I_f$  à l'aide d'un courant sodique entrant. Ce produit ensuite une réouverture des canaux calciques et une fermeture des canaux potassiques. Le potentiel d'action cardiaque est donc un système à deux horloges, l'horloge associé au voltage et l'horloge de  $Ca^{++}$ , se traduisant en une relâche de  $Ca^{++}$  en provenance du réticulum sarcoplasmique et qui active les courants calciques de type T et L. La figure 1.5 montre en détail la variation du potentiel membranaire ainsi que les variations de conductances qui ont lieu et qui produisent les changements de potentiel menant à la stimulation de la cellule.

### 1.6.1.2 Courant $I_f$ dans le coeur

Les canaux HCNs sont donc responsables d'une des phases du potentiel d'action cardiaque. Des études ont été réalisées pour connaître l'étendue de leur implication. Il est à noter que l'isomère le plus présent dans les cellules cardiaques est HCN4. L'absence de HCN4 chez les souris (knock-out) ainsi que chez les humains (mutations) causent une bradycardie, malgré l'emploi de bloqueurs sélectifs de HCN4. À ce jour, Ivabradine est la seule drogue assez sélective sur les canaux HCNs pour être un bloqueur approuvé comme médication rajustant la bradycardie chez l'être humain. Les canaux calciques du

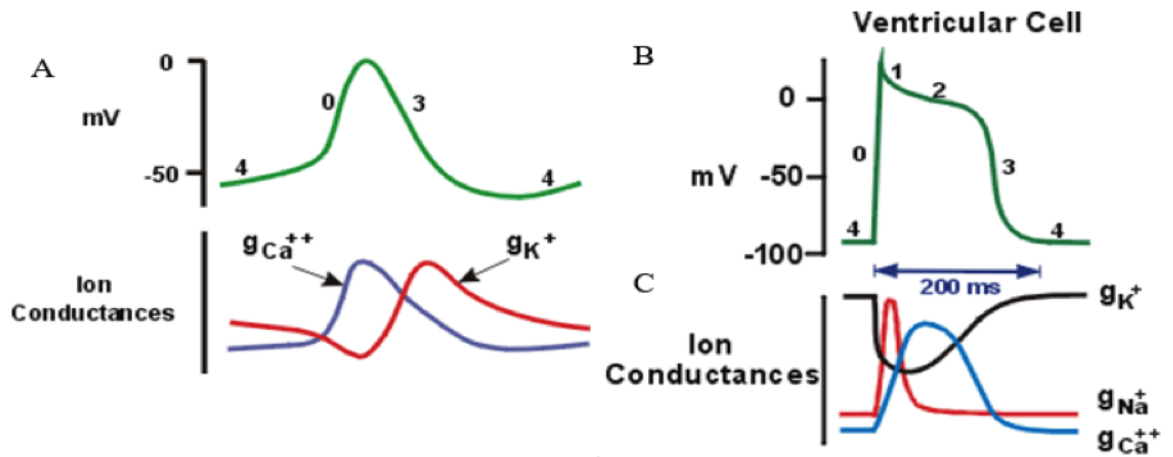


FIGURE 1.5 – (A) Conductance des cations en fonction du voltage membranaire lors du potentiel d'action cardiaque dans des cellules non-nodales du cœur. (B) Conductance des cations en fonction du voltage membranaire lors du potentiel d'action cardiaque dans des cellules nodales du cœur. [37]

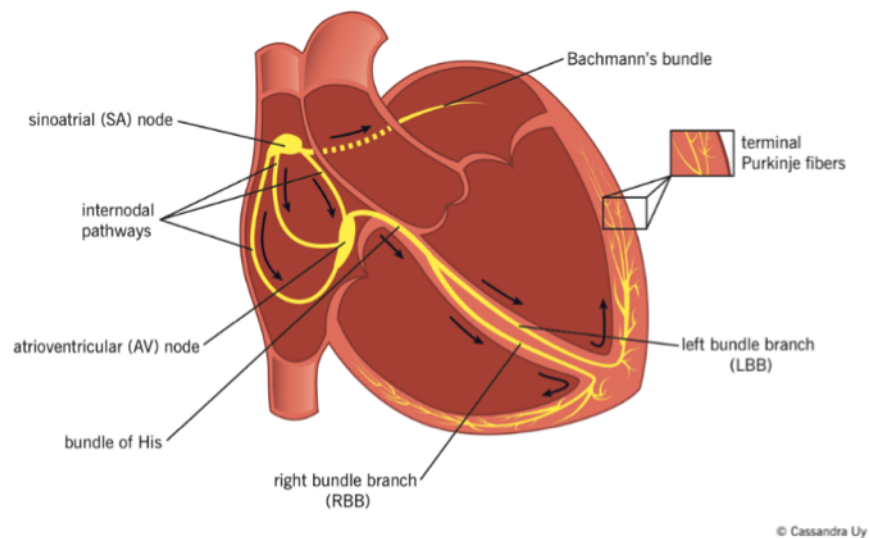


FIGURE 1.6 – Représentation des différentes composantes du système cardiaque.[38]

---

SAN ne possèdent pas de bloqueurs spécifiques ce qui les rends inaccessibles au niveau pharmacologique.

Des recherches sur l'impact de la délétion de HCN4 ont mené à des degrés de bradycardie différents, soutenant la contribution de plusieurs isoformes dans le système. Cependant, une élimination complète d'If par l'expression d'un dominant négatif des canaux HCNs dans SAN a permis de constater l'influence de ces canaux sur les deux horloges cardiaques.

Les canaux HCN contribue de 2 façons au potentiel d'action cardiaque. D'une part, leur activation en période hyperpolarisante pour provoquer la dépolarisation diastolique, menant à la phase 0 du potentiel d'action cardiaque, mais aussi en modulant la période nécessaire pour que la dépolarisation soit complétée.

La modulation du courant s'effectue par des facteurs cellulaires endogènes énumérés précédemment tel : Caveolin, KCNE2, KCR1, qui génèrent des gains ou pertes de fonctions (GOF ou LOF) ou par des facteurs externes tel le cAMP.

Le courant des canaux HCN, If, diffère d'espèce en espèce et d'un organe à l'autre, l'importance de certains isoformes varie selon le type cellulaire observé. Dans le cœur, on observe majoritairement HCN4 alors que HCN3 n'est pratiquement pas présent. Dans le SAN humain on retrouve surtout HCN4 par rapport aux isoformes HCN1 et HCN2[39]. Vu le peu d'influence d'HCN3 sur le courant If, il ne sera pas mentionné ou étudié. Différemment, chez les rats, les isoformes HCN2 et HCN4, seront présent à proportions égales et exprimé dans les mêmes tissus. Dans les cellules AVN humaines, la présence d'HCN4 est plus prononcée que HCN1. Toutefois, chez les souris c'est le contraire puisque HCN1 et HCN4 sont exprimés uniformément dans presque toutes les cellules alors que HCN2 est bien moins présent[40].

---

### **1.6.1.3 HCNs dans le SAN**

Tel que mentionné dans la section sur le potentiel d'action cardiaque, les canaux HCN constituent une des horloges cardiaques au même titre que les canaux calciques. Cette régulation s'organise dans le SAN où le courant If permet aux cellules hyperpolarisées de se dépolariser et d'atteindre le potentiel d'action cardiaque de la phase diastolique. On observe donc un déclenchement du potentiel d'action cardiaque suite au relâchement de calcium dans la cellule ou dû à l'évolution du potentiel membranaire orchestré par les canaux ioniques, majoritairement If.

### **1.6.1.4 HCNs dans le AVN**

Leur importance au niveau du AVN correspond aussi à la formation du potentiel d'action cardiaque au niveau des cellules mais propagent aussi le potentiel d'action de cellule en cellule. Cette relation fut observée à la suite de la suppression des canaux HCN4 dans le AVN provoquant la disparition d'activité spontanée dans cette région. Cependant, cette dernière n'a pas permis d'éliminer la réponse dû à la stimulation bêta-adrénergique de ces cellules. If serait donc à l'origine de l'activité basale du AVN mais n'est pas nécessaire pour la régulation beta- adrénergique[41].

### **1.6.1.5 HCNs dans les cellules du myocarde**

Le courant If observé dans les myocytes auriculaires possède des caractéristiques similaires au courant If dans le SAN. Ces dernières possèdent plutôt un potentiel de repos stable ce qui mène à supposer que les canaux HCN dans les myocytes n'ont pas le même rôle que dans le SAN. Les myocytes ne produisant pas de courant spontané périodiquement au contraire des cellules dans le SAN, mais peuvent toutefois, selon les conditions, engendrer une phase de dépolarisation diastolique[42]. Chez les souris, une étude récente a permis de découvrir l'effet des canaux HCN sur la prolongation de la repolarisation suite au potentiel d'action des cellules ventriculaires, effet qui n'est pas observé chez les humains[43].

---

### 1.6.1.6 Problèmes cardiaques liés au canaux HCNs

Des analyses menées sur des patients atteints de bradycardie ont permis de découvrir des mutations menant à la perte de fonction des canaux HCN4[44]. Des cas de bradycardie ont aussi été observés chez les souris ayant subi une ablation des canaux HCN4 ainsi qu'un blocage au niveau de l'AVN[45]. Des mutations menant à la perte de fonction des canaux HCN4 ont aussi été associés au syndrome de Brugada. Le nombre de complications cardiaques lié à ces canaux complique l'identification précise du rôle de HCN4 dans le cœur[46].

Il fut aussi démontré que des effets sur la modulation du courant If par le cAMP peuvent mener à l'apparition de la bradycardie basale, à la réduction du rythme cardiaque ainsi qu'à une diminution de la sensibilité via une stimulation adrénergique[47]. Pourtant, l'adaptation du rythme cardiaque à l'activité physique est conservé lorsque le CNBD est retiré des canaux HCN ou presque conservé lors du blocage des canaux HCNs. Cette conservation s'effectue par une combinaison de mécanisme, dont fait partie le courant If[47, 48].

Outre le cAMP, des études ont aussi montrées la relation entre les mutations des protéines régulatrices des canaux HCNs et le développement de la bradycardie. Une simple mutation dans la protéine régulatrice KCNE2 serait suffisante pour nuire à leur interaction avec les canaux HCNs et donc provoquer les symptômes d'une bradycardie[49].

Les problèmes cardiaques peuvent provenir de causes non génétiques comme l'entraînement ou le vieillissement de la personne. Malgré tout, ces conditions restent associées à une modification du fonctionnement du SAN[40, 50, 51].

Des recherches ont aussi noté une augmentation de l'expression des canaux HCN4 dans le tissu auriculaire chez des personnes frappées de défaillance cardiaque. D'autres recherches sur les défaillances cardiaques démontrent aussi une augmentation de la trans-

---

cription de HCN2. On observe également une relation entre le dysfonctionnement du ventricule gauche et son effet sur le fonctionnement au niveau auriculaire chez des patients ayant une surexpression de HCN2 dans le ventricule gauche. Ceci se traduit par une augmentation de la pression de remplissage auriculaire gauche[52, 53].

Des taux élevés de courants If ont aussi été rapporté dans des cardiomyocytes auriculaires de patients décédé de fibrillation auriculaire. À titre de comparaison, au potentiel de repos (-70mV), une augmentation de 10% du taux d'activation des canaux HCN est observé en raison d'une déviation d'activation vers des potentiel plus positif[54].

On observe aussi des problèmes liés au dysfonctionnement des canaux HCN dans les cellules non-stimulantes du cœur. Une étude portée sur des souris hypertendues développant l'hypertrophie cardiaque ainsi que des altérations électrophysiologiques au niveau ventriculaire montre une corrélation entre la variation du courant If et la sévérité de l'hypertrophie[55]. Ces effets peuvent, toutefois, être compensés en utilisant des bloqueurs de canaux HCNs, démontrant directement l'influence de ces derniers.

Les canaux HCNs sont donc une cible très importante dans le domaine de la régulation du rythme cardiaque. À ce jour, seulement un médicament est accepté pour le traitement en raison de sa sélectivité aux canaux HCNs, l'ivabradine. Pourtant, ce médicament reste peu sélectif envers les différents isoformes HCNs. Les recherches effectuées dans ce laboratoire porteront sur la recherche d'un meilleur candidat à l'aide de techniques computationnels qui seront décrites dans la section Développement de médicament à l'aide de l'ordinateur.

### **1.6.2 HCNs dans les neurones**

Les canaux HCN ont aussi un rôle dans la transmission des influx nerveux ce qui augmente significativement l'importance d'un médicament sélectif non seulement envers la famille HCN mais plus précisément entre les différents isoformes présents chez les humains.

---

Les 4 isoformes HCNs sont présents dans le cerveau à différentes proportions selon la région. Dans le système nerveux central (CNS), on retrouve l'isoforme HCN1 majoritairement dans le néocortex, l'hippocampe, le tronc cérébral, le cortex cérébral et la moelle épinière. HCN2 est plus dispersé à travers le CNS, mais tout de même plus concentré au niveau du tronc cérébral et du thalamus. Tout comme dans le cœur, l'isoforme 3 reste le moins présent, mais demeure uniformément exprimé dans tous les tissus du cerveau. On retrouve aussi HCN4 dans les mêmes régions que HCN1, mais à moindre quantité[56].

Dans le système nerveux périphérique on retrouve majoritairement HCN1, surtout dans la région des ganglions de la racine dorsale (DRG)[57]. Une étude a aussi établi que les HCN2 y sont présents à titre de facilitateur de transmission de la stimulation de la douleur[58].

#### **1.6.2.1 Rôles des canaux HCNs dans les neurones**

La présence des canaux HCNs dans les neurones joue un rôle crucial dans la transmission des signaux ainsi que dans l'excitation des cellules nerveuses. Les propriétés du courant If générée par ces canaux sont directement reliées au besoin des cellules nerveuses[60, 61]. D'une part, les canaux HCNs sont sélectifs pour les ions  $Na^+$  et  $K^+$  et génèrent un courant net dépolarisant qui amène la cellule vers le seuil d'activation de la cellule. Ce processus entre en action à des potentiels voisinant  $-65mV$ . À ce potentiel, on n'observe qu'une fraction des canaux HCNs ouverts et permettant un faible courant entrant de  $Na^+$  ce qui dépolarise la cellule empêchant l'hyperpolarisation. Cette dépolarisation provoque la fermeture des canaux HCNs ce qui remet en marche le processus d'hyperpolarisation. Ce cycle permet à la cellule de maintenir un potentiel membranaire près de son potentiel d'activation. La perte de fonction des canaux se traduit en une cellule hyperpolarisée ce qui réduit sa capacité d'excitabilité. Par contre, dans cette situation, la cellule devient plus sensible aux stimuli synaptiques ce qui permet de conserver un état d'excitation constant.

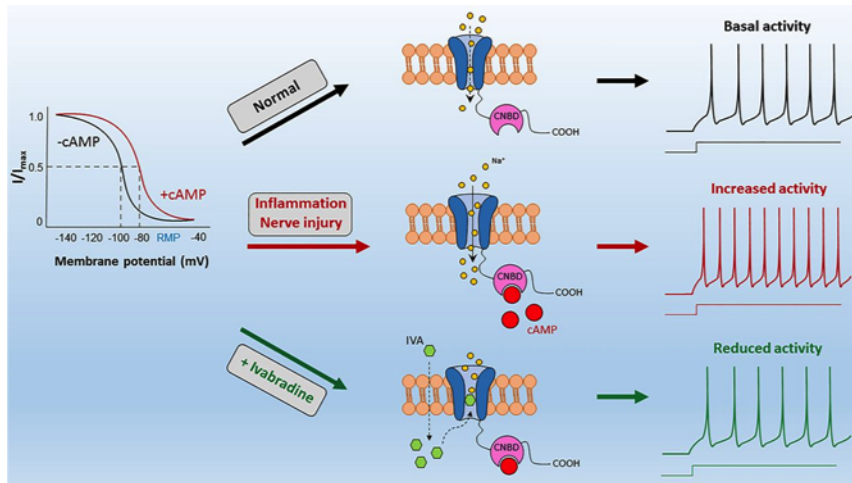


FIGURE 1.7 – Activité physiologique du canal HCN2 comparé à l’activité dû à la douleur pathologique et l’effet de l’ajout d’un bloqueur du canal sur l’activité[59].

Les canaux HCNs possèdent aussi un potentiel d’activation près du seuil d’activation de la cellule ce qui leur permet de réduire l’effet des perturbations électriques puisque ces perturbations seront aussi nuisibles à leur activation[62]. Ce faisant, les HCNs permettent de mettre en place le rythme d’oscillation entre les états hyperpolarisés et dépolarisés de la membrane et menant à l’atteinte systématique du potentiel d’activation de la cellule. Ce rythme est modulé par les mêmes sources externes que discutées dans le cœur.

On observe aussi un courant net inverse en état dépolarisé (-35mV) ainsi qu’une cinétique d’ouverture lente des canaux HCNs ce qui permet d’éliminer les signaux de basses fréquences des neurones. Au sein du système nerveux central, les sous-unités auxiliaires ainsi que les nucléotides cycliques confèrent aussi une diversité d’effets sur les canaux HCNs.

Les canaux HCN ont aussi un rôle dans la transmission des influx post-synaptique. Ils permettent d’accélérer la vitesse de conduction et de diminuer le temps de la phase de dissipation des potentiels excitatoires post-synaptiques (EPSP). Ce faisant, ces canaux permettent de réduire la somme temporelle des EPSPs. Cette accélération se fait dans les 2 directions ce qui permet d’augmenter la précision au niveau de la détection d’évè-



---

nements précis par la cellule. Par exemple, la cellule sera en mesure de distinguer plus adéquatement les influx nerveux provenant d'un potentiel d'action post-synaptique et d'un EPSP[63–66].

Le courant If agit aussi indirectement sur l'excitabilité de la cellule. Dans les neurones pyramidaux, les canaux HCNs diminuent l'entrée cellulaire de calcium dépendant au voltage. Les canaux HCNs contribuent aussi à produire un effet d'indépendance spatiale. C'est-à-dire, que la vitesse de dissipation des EPSPs locaux sera similaire aux EPSPs éloignés[66].

Tel que mentionné, les canaux HCNs possèdent une cinétique d'ouverture lente ce qui permet de filtrer les signaux de haute fréquence. Cette propriété est couplée à un filtre naturel contre les signaux de basse fréquence de la membrane et permet aux neurones une réaction ciblée à des fréquences spécifiques[67, 68]. Cette propriété de résonance fut aussi rapportée dans d'autres régions, mais sa signification reste inconnue à ce jour.

Des études portées sur la terminaison des synapses ont aussi établi un lien entre l'efficacité du déploiement des vésicules post-synaptiques et le courant If. Effectivement, les canaux HCNs maintiennent un potentiel membranaire auquel les canaux Cav3.2 de type N sont moins actifs. D'autres études ont aussi permis d'observer que la présence de courant If diminue la fréquence d'exocytose de neurotransmetteurs. L'effet combiné sur les canaux Cav et l'exocytose produit un effet inhibitoire sur la libération synaptique médiée par les canaux HCNs[69].

### **1.6.2.2 Pathologies neuronales causées par les HCNs**

Comme observé dans le cœur, une modification des canaux HCNs dans les neurones peut provoquer un grand nombre de pathologie. Figure 8.

**1.6.2.2.1 Épilepsie** La relation entre les canaux HCNs et l'épilepsie a été établie il y a longtemps à l'aide d'une molécule nommée lamotrigine, un anti-convulsant, qui a un

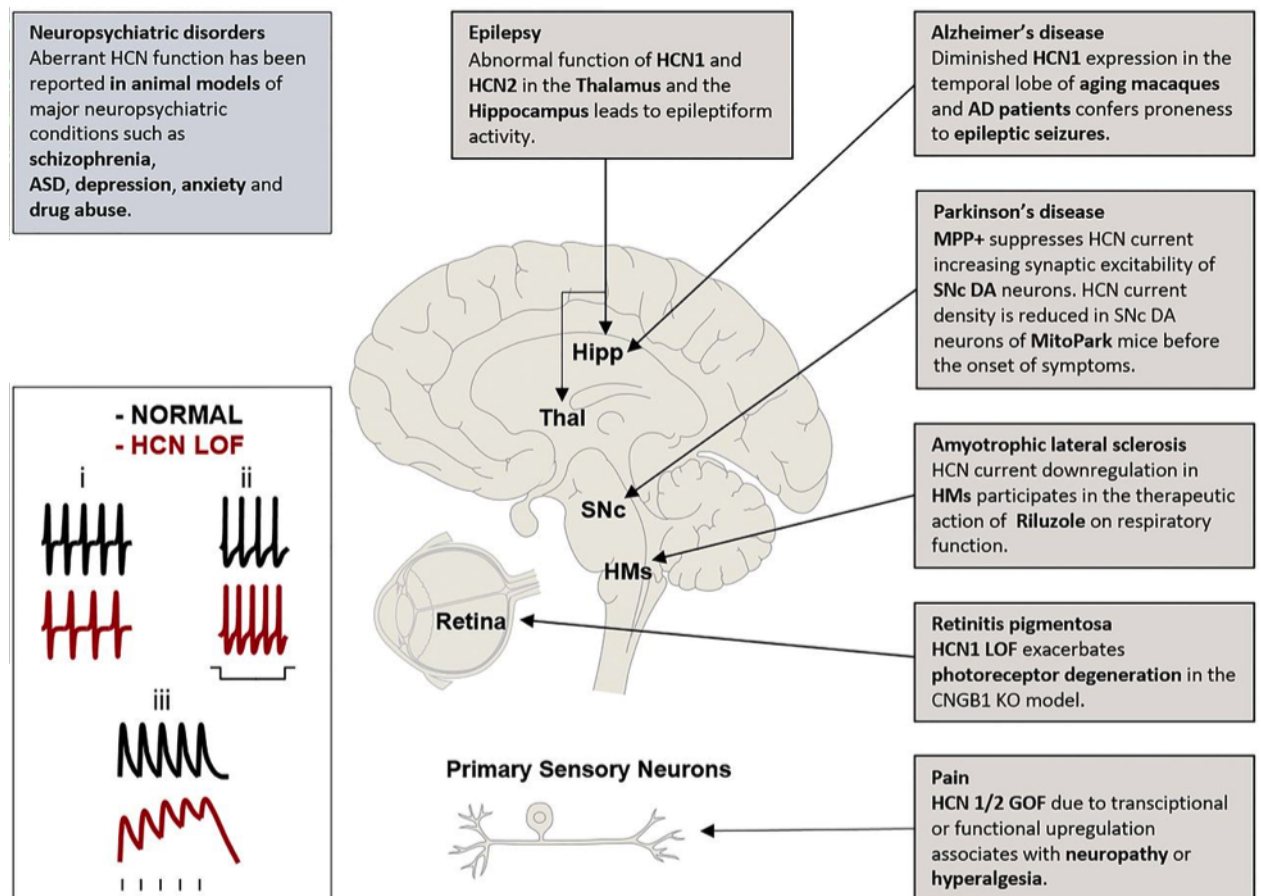


FIGURE 1.8 – Implications pathologies du dysfonctionnement des canaux HCNs dans le CNS et le PNS répertorié par des études précliniques et cliniques [30].

---

effet sur les canaux HCNs[70]. Des études portées sur des souris ont établi un rapport entre la perte de fonction des canaux HCN1 et HCN2 et une augmentation de l'activité neuronal menant à des crises d'épilepsies[71, 72]. L'effacement de l'isoforme HCN2 permet toutefois d'éliminer ces dites crises alors que l'absence de la composante If de l'isoforme HCN1 maintient une forte activité neuronale au niveau de l'hippocampe et des neurones corticales. Chez les humains, on note qu'une simple mutation de l'isoforme HCN2 peut provoquer une perte de fonction qui engendre une épilepsie générale chez le patient. D'autres études portées sur les humains ont montré l'apparition de diverses mutations simples qui engendreraient un gain de fonction menant à l'apparition de crise[73].

**1.6.2.2.2 Autisme** La modulation des canaux HCNs comporte aussi des conséquences indirectes menant à l'apparition de l'autisme. Des études ont démontré la relation entre la diminution du courant If et l'haploinsuffisance Shank3, une protéine située dans les synapses associées avec les troubles du spectre autistique. Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris portant une mutation similaire sur le gène Shank3. Une réduction du courant produit par une molécule nommée ZD7288 mène aussi à des conséquences qui fait intervenir Shank3 et donc mène alors à des conséquences morphologiques similaires[74].

**1.6.2.2.3 Schizophrénie** L'interaction entre le cAMP et les canaux HCNs est nécessaire pour une régulation constante des ions à travers la membrane. Un déséquilibre dans cette interaction risque de provoquer une déconnexion du réseau de signalisation au niveau du cortex préfrontal (PFC), responsable de l'exécution de la mémoire de travail, le système qui permet de gérer l'information nécessaire à l'apprentissage, le raisonnement et la compréhension, et menant à l'apparition de la schizophrénie[75]. Un réajustement du niveau de cAMP dans la cellule permet toutefois de réduire ces effets[76].

**1.6.2.2.4 Dépendances** Suivant l'exposition prolongée des canaux HCNs à plusieurs substances développant une dépendance chez l'individu (éthanol, cocaïne et métamphé-

---

tamine) on observe une modulation du courant If dans la zone de système hédonique, ce qui laisse supposer que les canaux HCNs ont un rôle dans le développement des dépendances[77, 78].

**1.6.2.2.5 Humeurs** Des souris ayant le gène TRIP8b supprimé ont démontré un déficit d'apprentissage moteur ainsi qu'une résistance aux tâches ayant comme conséquence que l'animal sombre dans le désespoir. Des comportements similaires ont été observé chez des souris dont les gènes HCN1 et HCN2 étaient manquant. Ces courant provoquant un effet dépressif ont été observé majoritairement dans l'hippocampes dorsale. On observe aussi que le traitement par ZD7288, une molécule bloquant les canaux HCNs permet de provoquer des effets similaires à un anti-dépressant, tel la fluoxetine[79, 80].

**1.6.2.2.6 La peur et l'anxiété** Des recherches menées sur des souris ont montré que la présence des canaux HCNs dans l'amygdale baso-latérale était nécessaire pour une réaction naturelle de peur chez l'animal. Ceci laisse à croire qu'une inhibition du courant If dans certaines zones du cerveau serait bénéfique sur le niveau de stress, d'anxiété et de peur chez un individu[81].

**1.6.2.2.7 Parkinson** La maladie de Parkinson est causée par la dégénération des neurones dopaminergiques et une chute du niveau de dopamine. Dans cette région, les isoformes HCN2 et HCN4 sont présents et produisent un courant réduit chez des souris ayant un phénotype similaire aux effets de la maladie de Parkinson. Ces canaux ont aussi été reliés à la régulation de l'activité des neurones dopaminergiques. Par contre, des études ont démontré que l'ajustement du nombre de canaux HCNs permet de renverser les effets même si ceux-ci ne sont pas renversés dans les neurones dopaminergiques[77, 82, 83].

**1.6.2.2.8 Alzheimer** Des études ont rapporté que l'âge où la maladie d'Alzheimer se caractérise par une diminution de canaux HCN1 chez les macaques[84].

---

Bref, vu le nombre de conditions affectées par le dysfonctionnement des canaux HCNs, il serait pertinent d'approfondir nos connaissances sur leur modulations et modulateurs, particulièrement aux niveaux cardiaques pour lequel l'impact de ces canaux est le plus important. C'est cet aspect que ce mémoire cible en observant les interactions qu'ont les canaux de la famille HCNs avec divers ligands.

Par contre, il est à noter que l'importance des canaux HCNs dans chacune des pathologies est différente et n'est pas toujours majeure ou critique. Néanmoins, le nombre d'impact et la diversité des sites en fait une cible pharmaceutique importante.

## CHAPITRE 2

### CRÉATION DE MÉDICAMENTS GUIDÉ PAR ORDINATEUR

La recherche sur les médicaments peut se faire à l'aide de plusieurs techniques. Dans notre laboratoire, on utilise la conception de médicaments assistée par ordinateur (CADD, computer- aided drug design)[85]. Le CADD utilise des techniques computationnelles pour le développement ainsi que l'analyse de nouvelles molécules dans le but de produire un médicament plus efficace ou adapté au besoin. Un avantage indéniable sur une technique de criblage à haut débit en tissu cellulaire ou en modèle animal. L'utilisation des ordinateurs permet de limiter le coût des recherches ainsi que d'accélérer grandement ce processus. Effectivement, de plus en plus de molécules sont résolues, que ce soit à l'aide de la Cryo-microscopie électronique (cryo-EM) ou de la cristallographie à rayon X, puis mise à la disposition d'études computationnelles. Grâce à ces modèles et divers programmes, il est possible d'évaluer l'interaction moléculaire entre plusieurs molécules. Ce faisant, arriver à sélectionner les propriétés nécessaires à un composé spécifique pour la cible protéique d'intérêt. Cette technique ne nécessite donc qu'un ordinateur et demande beaucoup moins de temps. Bien entendu, le CADD a ses limitations ainsi que ses incertitudes (voir Limitations), toutefois celle-ci devient de plus en plus performante avec l'avancé des ordinateurs et l'enrichissement constant de banque de molécules disponibles pour l'analyse.

#### 2.1 Types de CADD

La recherche moléculaire computationnelle se divise en 2 grandes catégories, soit à l'aide de la structure protéique à laquelle on y arrime un ligand ou vice versa, où le ligand sera l'élément qui constitue la base de l'amarrage en y greffant la protéine.

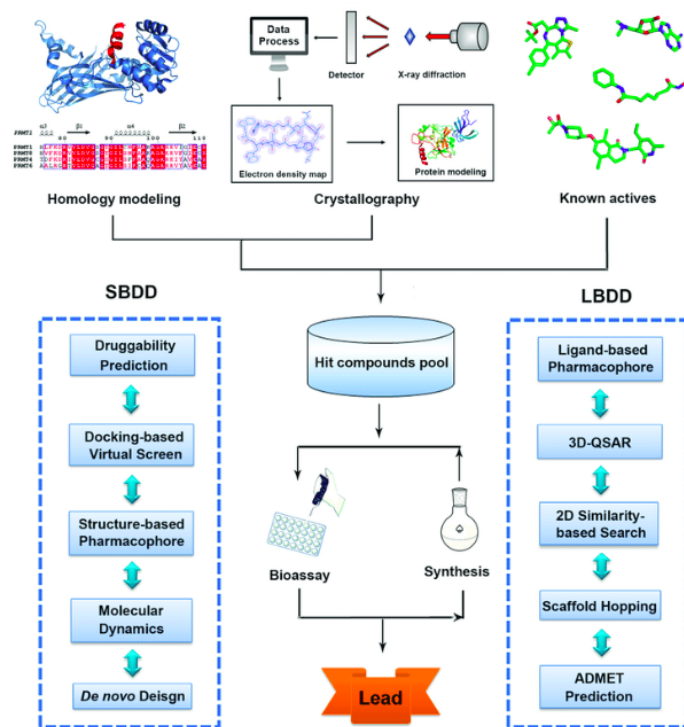


FIGURE 2.1 – Le processus itératif menant à la création de médicaments assistée par ordinateur [86].

### 2.1.1 Conception de médicaments à partir d'une structure (SBDD)

Dans la recherche basée sur la structure (SBDD, structure-based drug design), le but consiste à trouver une molécule qui interagit le plus avec le modèle de base que nous connaissons déjà, par exemple, trouver le meilleur bloqueur d'une protéine dont nous connaissons la structure. Pour ce faire, on utilise une multitude de molécules provenant d'une banque de données appropriées pour les recherches qu'on veut effectuer. L'interaction de chacune de ces molécules est testée grâce à la technique de l'amarrage moléculaire (voir Amarrage Moléculaire), afin d'identifier les meilleurs candidats, que ce soit au niveau de l'énergie de liaison, du site d'interaction ou du taux de liaison. Les propriétés spécifiques aux candidats permettent ensuite de guider la recherche vers des ligands plus susceptibles d'interagir avec la cible protéique ou vers la conception de molécules à haute affinité en tirant les meilleures propriétés des candidats. Les molécules

---

qui sont les plus spécifiques peuvent alors être produites et testées in vivo.

### **2.1.2 Conception de médicaments à partir de ligands (LBDD)**

La conception de médicament à partir de ligands (LBDD) permet de reconstruire une protéine cible en fonction des molécules qui s'y lient. En examinant les molécules qui interagissent avec la protéine cible étudiée, il est possible de concevoir des structures qui permettraient les mêmes interactions. On se sert alors de ces structures pour former ce qui serait le plus susceptible d'être la protéine cible.

## **2.2 Amarrage moléculaire**

Les recherches effectuées dans ce laboratoire sont du type SBDD, c'est-à-dire qu'on fait la projection de plusieurs petits ligands sur la protéine cible, dans ce cas-ci, HCN. Ceci va nous guider vers une molécule plus spécifique. Cette technique de recherche est nommé amarrage moléculaire.

L'amarrage moléculaire peut être réalisé de plusieurs façons selon l'algorithme utilisé. Tel que mentionné, il s'agit de projeter une molécule sur un autre et d'évaluer l'interaction qui en résulte, toutefois, aucun positionnement non réalisable ne sera pris en compte. C'est-à-dire, que l'encombrement stérique des atomes doit toujours être respecté. À partir de cette étape, on tentera de modifier légèrement la position d'une ou des deux molécules en vue de trouver un maximum local d'interaction protéine-ligand. Un échantillon de pose protéine-ligand sera généré afin d'avoir un ensemble représentatif et de tendre vers une conformation représentant un maximum local. On répète ces étapes autant de fois que nécessaire pour obtenir une multitude de poses satisfaisant ce dernier critère. L'étape de projection moléculaire est uniforme sans égard au programme utilisé, ce qui diverge est l'étape qui correspond au changement conformationnel et à l'algorithme employé par ces programmes. Pour les recherches présentes Autodock servira à faire l'amarrage (voir Méthode) qui permet l'emploi de 4 différents algorithmes.



---

## 2.2.1 Algorithme d'amarrage

Chaque algorithme d'amarrage fonctionne selon des principes assez similaires et ont, en général, pour but d'identifier la conformation la plus favorable entre 2 molécules. La différence se trouve dans la direction du changement positionnel. Certains algorithmes permettent d'aller vers des conformations moins favorables alors que d'autres ne le permettent pas. Par contre, pour identifier si une conformation est plus favorable qu'une autre, il faut établir une méthode de classement, ce que l'on appelle méthode de pointage (Scoring function).

### 2.2.1.1 Méthode de pointage

Pour ce qui est des interactions intermoléculaires, la méthode de pointage est directement basée sur l'énergie de liaison entre les 2 molécules. Une énergie de liaison très négative indique une forte affinité entre les 2 molécules pour la conformation observée. Par contre, une énergie positive indiquera une faible affinité et donc une liaison défavorable. À chaque itération, l'interaction des deux molécules sera évaluée et une comparaison sera effectuée avec la position subséquente suggérée. Selon le nouveau pointage et l'algorithme utilisé, la conformation la meilleure sera acceptée ou non et sera comparée à la prochaine pose obtenue par amarrage. Avec Autodock, le programme utilisé pour l'amarrage des résultats présentés dans ce laboratoire, le calcul de l'énergie de liaison se fait selon la somme de l'énergie Van der Waals, celle de liaison hydrogène, l'électrostatique ainsi que celle de désolvatation. Chacune des composantes de l'énergie totale est obtenue selon les formules énergétiques suivantes [87] :

Van der Waals :

$$\Delta G_{vdW} = W_{vdW} \sum_{i,j} \frac{A_{i,j}}{r_{i,j}^{12}} - \frac{B_{i,j}}{r_{i,j}^6} \quad (2.1)$$

Liaison Hydrogène :

$$\Delta G_{H-bond} = W_{H-bond} \sum_{i,j} E(t) * \left( \frac{C_{i,j}}{r_{i,j}^{12}} - \frac{D_{i,j}}{r_{i,j}^1} + E_{H-bond} \right) \quad (2.2)$$

---

Électrostatique :

$$\Delta G_{elec} = W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i * q_j}{\epsilon(r_{i,j}) * r_{i,j}} \quad (2.3)$$

Désolvation :

$$\Delta G_{desolv} = W_{desolv} \sum_{i,j} S_i * V_j * \exp\left(\frac{-r_{i,j}^2}{2 * \sigma^2}\right) \quad (2.4)$$

Avec les W correspondant au poids de chaque équation dans le calcul de l'énergie de liaison. A, B, C et D représentent des constantes qui correspondent à la profondeur du puits d'énergie et à la séparation à l'équilibre des noyaux des deux atomes en jeux. On retrouve r comme étant la distance entre les atomes observés avec 12 et 6 comme exposant correspondants aux paramètres de Leonard Jones pour représenter la force van der Waals et la pair 12-10 pour représenter les liaisons hydrogènes.  $E_{E-bond}$  correspond à l'énergie d'une liaison hydrogène, q à une charge élémentaire soit  $1.602 * 10^{-19}$  Coulomb et  $\epsilon$  à la permittivité du milieu. Pour l'énergie de désolvation, on retrouve S comme le terme de solvation, V le volume fragmentaire de l'atome et  $\sigma$  la constante de distance gaussienne : 3.5Å [88].

### 2.2.1.2 Recherche locale

La recherche locale est l'algorithme le plus simple proposé par Autodock. À chaque itération, Autodock propose une nouvelle position aléatoire et calcul l'énergie de liaison et la compare avec la position précédente. Si l'énergie de liaison est plus négative, le changement sera accepté. Cette méthode est très efficace pour trouver les minima locaux vu son unique directionalité. Par contre, si aucune conformation ne débute dans la zone d'un des maxima locaux, il ne sera pas identifié. Comme la première conformation est déterminée par une position aléatoire dans une région de la protéine cible sélectionnée par l'utilisateur il est possible que ça soit le cas. Un grand nombre d'itération est donc inutile puisque les maxima locaux seront atteints assez rapidement. Par contre, pour être certain de trouver le maximum global, il peut être utile d'employer un grand nombre de poses pour augmenter ses chances.

---

### **2.2.1.3 Recuit simulé**

Similairement, l'algorithme de recuit simulé est très pratique lorsqu'il s'agit d'identifier un maximum local en peu de temps. Tout comme la recherche locale, la technique du recuit calculera le score de la nouvelle conformation à chaque itération avant de décider si cette nouvelle conformation est acceptée ou non. Le processus de sélection est influencé par ces pointages, c'est-à-dire qu'une conformation dont l'énergie de liaison sera plus grande sera privilégié par rapport à une conformation de plus faible affinité. Cette méthode probabiliste permet, selon le cas, d'échapper à un maximum local et d'explorer plus adéquatement l'ensemble du système. Plus le changement de conformation sera favorable au niveau du pointage, plus la probabilité d'acceptation du changement sera élevée.

### **2.2.1.4 Algorithme génétique**

Selon cette technique, on décrit chaque conformation selon une suite de ses caractéristiques propres qu'on établit comme étant son bagage génétique. Dans une situation d'amarrage, par exemple, chaque degré de rotation sera identifié ainsi que la position globale du ligand dans le système. Chaque pose est alors évaluée selon un indice de performance choisi et, telle la survie du plus apte, on conserve le bagage génétique des meilleures conformations qu'on utilise pour bâtir la prochaine génération de pose. Cette génération possèdera donc un mélange des meilleurs gènes et sera soumis aux mêmes étapes de sélection pour les générations futures. Dans certains cas, les nouvelles conformations seront moins optimales mais seront vite éliminées par la survie du plus apte alors que dans d'autres cas, les nouvelles conformations permettront d'atteindre de nouveaux maxima.

### **2.2.1.5 L'algorithme génétique lamarkien**

La pensée lamarkienne est une pensée qui va à l'encontre du darwinisme. Selon cette doctrine, les générations futures obtiennent les compétences que leur parents ont acquis durant leur vécu. Un algorithme basé sur la génétique lamarkienne permet donc d'assurer

la survie du plus apte, mais seulement après avoir pris en considération les progrès réalisés au cours de l'existence. Pour ce faire, on utilise toujours les propriétés de chaque conformation comme baguage génétique, mais, avant de sélectionner les plus aptes et donc les poses ayant le meilleur pointage, on effectue une recherche locale. Chaque pose aura donc la possibilité d'atteindre une meilleure conformation avant d'être soumis au test du plus apte. Ceci permet donc d'accéder plus rapidement aux maxima locaux, sans pour autant réduire les chances d'identifier un grand nombre de conformations possibles. Peu importe la technique d'amarrage utilisée, on obtient une multitude de poses qui correspondent à la conformation obtenue au terme de l'amarrage. Il s'agit ensuite d'utiliser des algorithmes de partitionnement de données pour regrouper les résultats obtenus et réduire le temps d'analyse. Le partitionnement de données est nécessaire puisqu'il arrive souvent qu'un grand nombre de pose tendent vers la même conformation.

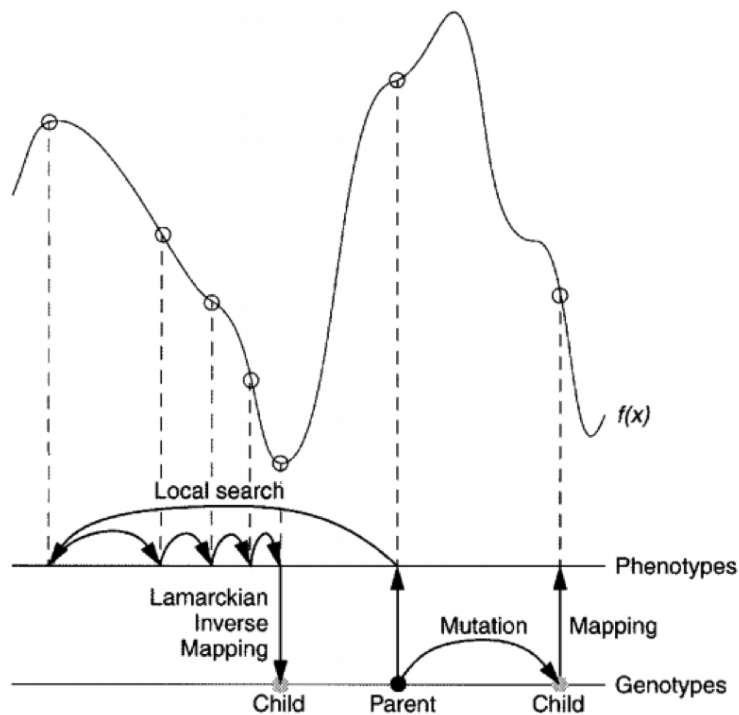


FIGURE 2.2 – Illustration du contraste entre l'évolution lamarckienne et darwinienne et qui illustre l'évolution d'un individu en utilisant la génétique lamarckienne. [89]

---

### 2.2.2 Partitionnement de données

Malgré une méthode de pointage efficace, il sera toujours nécessaire de partitionner les résultats. Pour certains cas, plusieurs lieux d'amarrage seront possible, mais avec différentes énergies de liaison. Pour ces cas, une simple organisation par énergie de liaison risquerait de cacher un site moins propice, mais non-négligeable. Partitionné est donc nécessaire, mais laborieux puisque la position et l'orientation doivent être pris en compte sans être trop sévère pour ne pas considérer chaque site final comme indépendant. Il s'agit d'être en mesure de rassembler les ligands et d'identifier le nombre de site propice qui découle de son interaction avec la protéine pour une analyse complète.

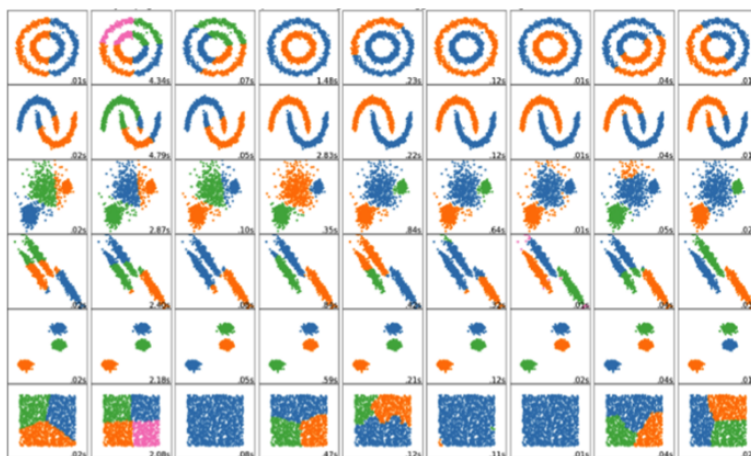


FIGURE 2.3 – Comparaison du partitionnement de données réalisé par plusieurs algorithmes différents. [90]

Comme on peut le voir à la figure 2.3, dépendamment des méthodes de partitionnement, les groupes sont divisés différemment. Certains algorithmes seront axés sur la distance entre deux voisins alors que d'autres sur leur position dans l'environnement ce qui peut être bien ou non, dépendamment des cas.

Dépendamment des cas, on obtient plusieurs résultats qui représentent les mêmes interactions. Avec une bonne technique de partition, il est possible d'identifier combien de conformations différentes l'analyse a produite et d'associer chaque pose au groupe qu'elle appartient. Il existe plusieurs méthodes de partitions de données. La méthode

---

choisie dépend du style de résultat escompté. Certaines méthodes obligent à déterminer un nombre de regroupement total alors que d'autres fonctionnent à partir d'un seuil limite permettant d'établir ce nombre de regroupement. Dans certains cas, on exige un nombre équivalent de résultats dans chaque regroupement alors que parfois on fonctionne par comparaison de volume. Dans tous les cas, on obtient une partition propre à chaque méthode.

Pour les interactions moléculaires, les algorithmes qui se basent sur une égalité de nombre ou de volume entre les regroupements ne sont pas adéquats. Dans la majorité des cas, la répartition des poses obtenues constitue une multitude de regroupements de diverses densités. Les poses ont aussi des tendances à être étalées sur un volume plus ou moins grand, il est donc difficile d'employer un algorithme qui se base sur la présence de poses voisines pour agrandir le regroupement ou en produire un nouveau comme le partitionnement par densité spatiale (Density-Based Spatial Clustering). Ce type d'algorithme ajoute des individus dans un groupe selon une distance seuil à partir d'un individu du groupe ce qui pose des problèmes si les poses ont tendance à s'affaler comme c'est le cas dans l'amarrage moléculaire. Étant souvent assez rapproché, plusieurs regroupements se retrouvent fusionnés en utilisant ce type d'algorithme. Pour les recherches sur l'amarrage des canaux HCNs, 2 méthodes ont été envisagées. La méthode K-means et la méthode Silhouette.

### **2.2.3 K-means**

La méthode K-means débute par la sélection d'un nombre de regroupement qu'on dénote  $k$ . On choisit ensuite  $k$  membres de la population comme point de départ que l'on nomme centroïde. Chaque membre de la population à regrouper sera ensuite assigné au centroïde le plus près, on formera donc  $k$  groupes. Une fois tous les membres assignés, chaque centroïde sera modifié pour correspondre au centre de masse de l'ensemble des membres qui lui est assigné. Une fois les nouveaux centroïdes calculés, l'étape d'assignation des membres au centroïde le plus près est réévaluée. On recommence ces étapes jusqu'à ce que le centre de masse des centroïdes reste inchangé, c'est-à-dire qu'aucun membre de la population n'a changé de groupe suite au changement du centre de masse.

---

L'assignation se termine lorsqu'aucun changement n'est effectué sur les coordonnées du centre de masse des centroïdes.

$$SSE = \sum_{i=1}^k \sum_{x \in c_i} dist(x, c_i)^2 \quad (2.5)$$

La difficulté de cette méthode correspond à la sélection d'un nombre de  $k$  adéquat. Afin d'y arriver, on utilise la méthode du coude. Cette technique consiste à mesurer la somme du carré des erreurs (SSE) qui correspond ici à la somme du carré des distance entre chaque membre d'un groupe et son centroïde :

On obtient donc une tendance entre le nombre de groupe et SSE comme représenté par la figure 2.4.

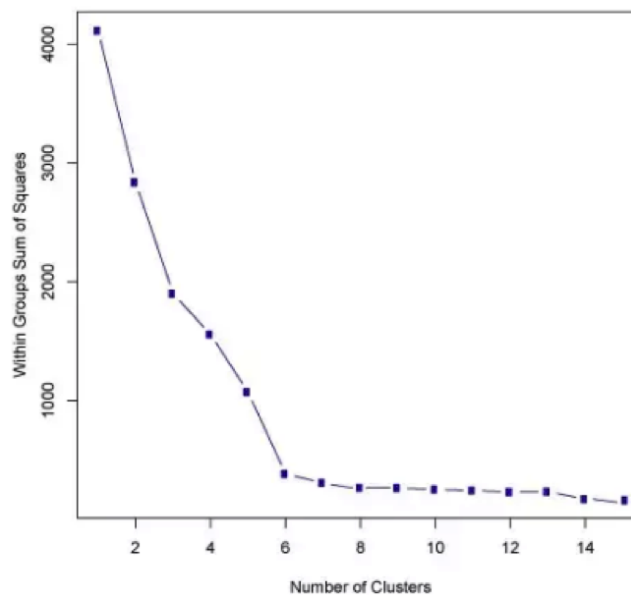


FIGURE 2.4 – Somme du carré de la distance entre les individus d'un groupe en fonction du nombre de groupes formé suite au partitionnement de données utilisé à titre d'exemple [91].

Le meilleur choix pour le nombre  $k$  correspond à la valeur qui voit les gains en SSE tendre vers un plateau lors de l'ajout d'un groupe. C'est-à-dire, que peu importe la situation, l'ajout d'un groupe réduira le SSE malgré que cette réduction ne soit pas toujours optimale. En figure 2.4, on le voit ici par l'apparition d'un coude lorsque les

---

gains en SSE diminuent drastiquement entre le passage de 5 à 6 groupes et le passage de 6 à 7 groupes. Six groupes seraient donc plus adéquatement représentatifs.

#### 2.2.4 Partitionnement par silhouette

La méthode de partitionnement par silhouette est un indice de qualité du partitionnement réalisé. On peut l'utiliser avec k-means par exemple si la méthode du coude n'est pas assez précise pour les résultats. Contrairement à la mesure du SSE, la méthode de silhouette fait intervenir la distance entre les regroupements offrant une meilleure indication sur la nécessité d'y ajouter un groupe[92]. Pour établir l'indice de performance du partitionnement on détermine un pointage  $s$  à chaque individu  $i$  :

$$s(i) = \frac{b(i) - a(i)}{\max[a(i), b(i)]} \quad (2.6)$$

Avec  $a(i)$  qui correspond à la moyenne des distances entre l'individu  $i$  et les autres membres de son groupe. La valeur de  $b$  est obtenue en 2 étapes. Premièrement, on calcule une valeur  $d$  pour chaque groupe dont  $i$  n'appartient pas. Cette valeur correspond à la moyenne des distances entre l'individu  $i$  et chaque individu du groupe testé. Deuxièmement, on détermine  $b$  comme étant la valeur minimale de  $d$ .  $b$  correspond donc à la moyenne des distances entre l'individu  $i$  et les individus du groupe le plus près.

On obtient donc trois cas de figure :

$$s(i) = \begin{cases} 1 - a(i)/b(i), & \text{si } a(i) \leq b(i) \\ 0, & \text{si } a(i) = b(i) \\ b(i)/a(i), & \text{si } a(i) \geq b(i) \end{cases} \quad (2.7)$$

Dans tous les cas, la valeur de  $s$  pour chaque individu est entre -1 et 1. Si  $s$  est plus près de -1, l'individu n'est pas dans le bon groupe alors qu'une valeur de 1 indique un très bon classement. En établissant  $s$  pour chaque individu, il est plus facile de déterminer si le nombre de groupe est adéquat, la majorité possèdera donc des individus avec un  $s$  positif. Dans les 2 cas, le choix du nombre de groupe peut être difficile et arbitraire, ce qui laisse place à l'erreur.



---

Puisque la recherche présente est basée sur la comparaison entre ligands, il est nécessaire d'utiliser une méthode de partitionnement objective. Nous nous sommes donc basés sur ces deux techniques pour former notre propre algorithme de partitionnement qui convient parfaitement à la comparaison et qui se base strictement sur un pointage pour décider si l'ajout d'un nouveau groupe est justifiable ou non. Cette méthode sera expliquée en détails dans l'article présenté. Il faut toutefois comprendre qu'elle est utilisée pour juger le partitionnement fait et non partitionner les données.

## **CHAPITRE 3**

### **LIGANDS**

Une fois les techniques d'amarrage et les méthodes de partitionnements choisies, il faut déterminer les candidats à utiliser. Comme les canaux HCNs sont reliés au potentiel d'action cardiaque et aux influx nerveux, on choisit des candidats parmi des classes de ligands ayant déjà démontrés une efficacité quelconque. Connaissant les classes de médicaments à utiliser, il sera possible de cibler plus précisément la zone de la protéine à analyser. Aussi, en prenant des ligands de plusieurs classes, il nous sera possible de baser notre analyse sur une comparaison de leur provenance. Ainsi, il sera peut-être possible d'identifier les classes clés qui permettront une meilleure spécificité, soit selon l'allure du ligand, soit son mode d'action sur la protéine.

#### **3.1 Classe de médicament pour l'arrhythmie**

Tel que mentionné préalablement, plusieurs canaux sont impliqués dans le potentiel d'action cardiaque. La figure 3.1 résume brièvement le rôle de chacun des canaux.

##### **3.1.1 Classe 1-Bloqueurs de canaux sodium**

Tel que leur nom l'indique, ces molécules ont pour effet de bloquer les canaux sodiques ce qui affecte l'étape de dépolarisation. Il existe trois sous-classes de bloqueur : 1A, 1B et 1C qui affectent différemment la phase réfractaire effective. Leurs effets respectifs sont décrits à la figure 14. Lidocaïne, une molécule de classe 1B a été retenue comme candidat pour les tests sur les canaux HCNs.

##### **3.1.2 Classe 2 - Bêtabloquantes**

Les bêtabloqueurs agissent directement sur les récepteurs bêta-adrénergiques et empêchent la liaison de la norépinephrine et de l'épinéphrine sur ces récepteurs. Ce faisant, les bêtabloqueurs inhibent tout impact sympathique qui proviendrait normalement de

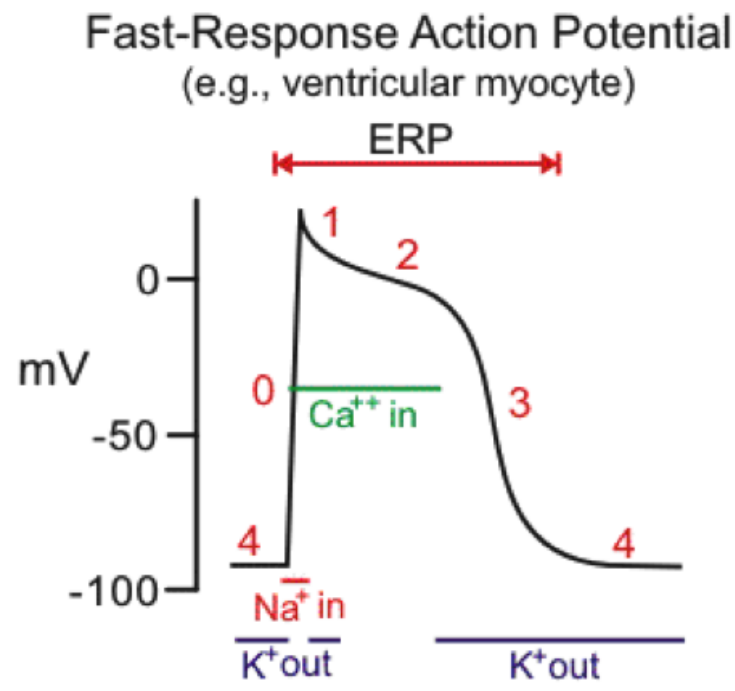


FIGURE 3.1 – Phases du potentiel d'action cardiaque ainsi que l'identification des canaux qui leurs sont associés [93].

ces récepteurs. Parmi ces candidats, on retrouve la clonidine, un ligand utilisé pour nos recherches.

### 3.1.3 Classe 3 - Bloqueurs de canaux potassiques

Ces molécules provoquent la fermeture des canaux potassiques et interrompent la phase 3 du potentiel d'action cardiaque, la phase de repolarisation. Leur effet provoque donc un ralentissement de la repolarisation ce qui entraîne un allongement de la phase réfractaire effective (Voir figure 3.3).

### 3.1.4 Classe 4 – Bloqueurs de canaux calciques

L'horloge cardiaque est formée par les canaux HCNs et les canaux calciques. Ces canaux représentent donc la cible de la dernière classe de médicament antiarythmique. Ils ont pour but de bloquer l'entrée de calcium dans la cellule qui provoque la contraction

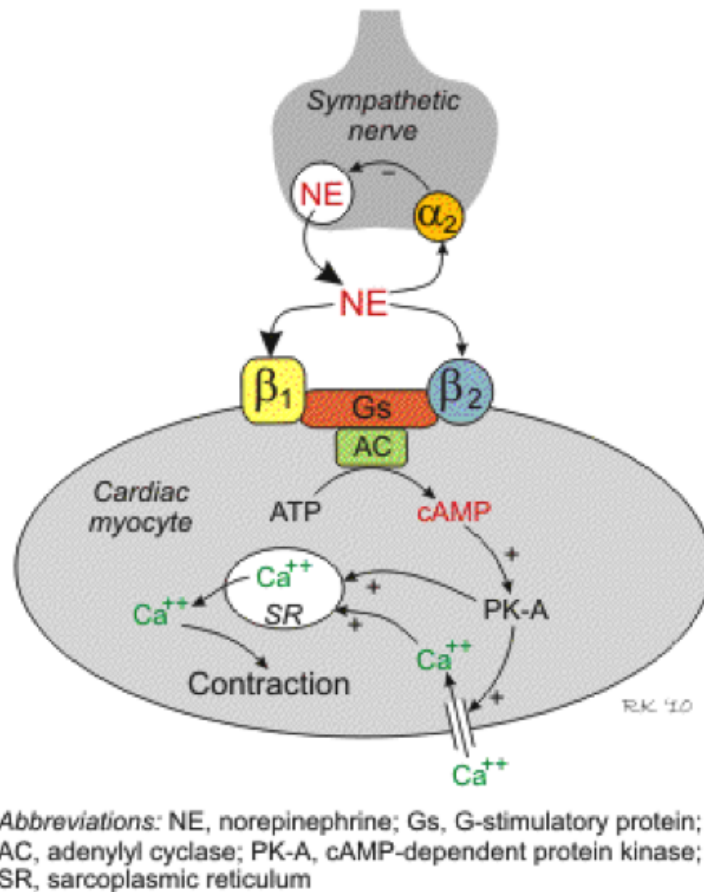


FIGURE 3.2 – Site d’interactions des bêtabloquants au niveau des tissus nerveux [94].

du muscle cardiaque, ayant pour conséquence que les médicaments de classe 4 vont ralentir le battement cardiaque. Les canaux HCNs ne sont pas impliqués dans les 4 classes de médicaments antiarythmiques, mais sont tout de même affectés par de nombreuses molécules qui en font partie.

### 3.2 Traitement neuronal

Il n’existe pas de classe de médicaments pour le traitement neuronal. De nombreuses recherches portées sur la régulation de l’activité neuronale par la modulation des canaux HCN ont parues [95] démontrant une multitude de nouveaux candidats : ZD7288, zatebradine, ivabradine, cilobradine, etc. On observe aussi une interaction entre les canaux

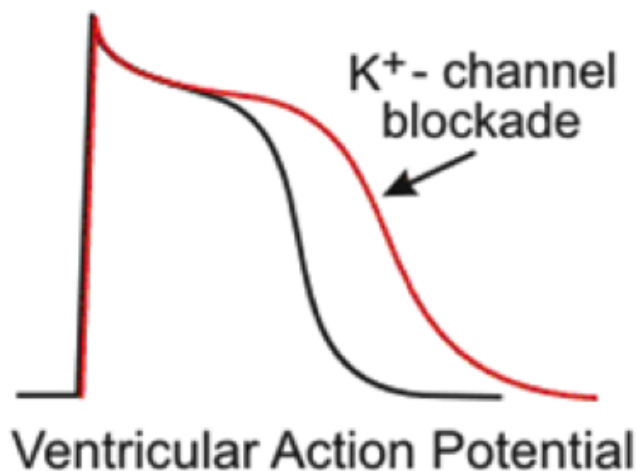


FIGURE 3.3 – Phases du potentiel d'action cardiaque ainsi que l'identification des canaux qui leur sont associés [93].

HCNs et les membres de la famille des « -caïnes ».

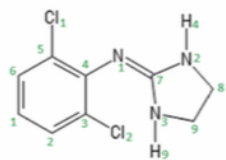
### 3.3 Ligands utilisés

Chaque candidat choisi pour la comparaison a déjà été étudié précédemment. On reprend ces candidats dans le but de comparé leurs interactions avec les canaux HCNs et de bâtir une molécule plus spécifique, non seulement envers ces canaux, mais spécifique à chaque isoforme. Chaque ligand est présenté à la figure 5.9.

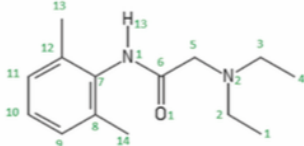
#### 3.3.1 Clonidine et Alinidine

La clonidine est une molécule qui interagit avec les récepteur alpha-adrénergique et qui bloque les canaux HCNs. De même, l'alinidine, dérivé de clonidine, confère une modulation de l'activité des canaux HCNs, produit des effets sur la bradycardie ainsi que des effets analgésiques. Notamment, des études ont montré que clonidine inhibe HCN2 et HCN4 avec une concentration qui réduit le courant maximal de moitié (IC<sub>50</sub>) de 3-10uM en déviant le potentiel d'activation de 10-20mV vers des potentiels plus négatifs

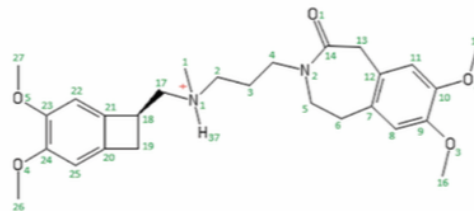
Clonidine



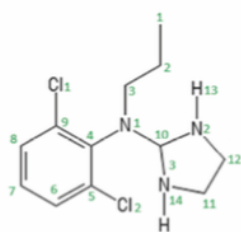
Lidocaine



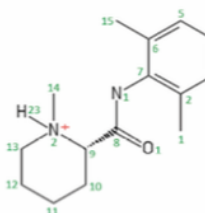
Ivabradine



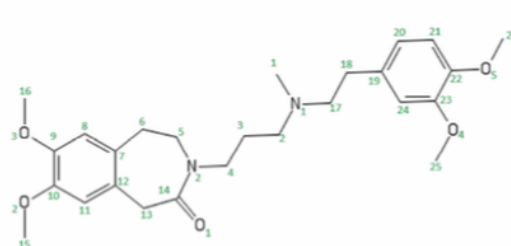
Alinidine



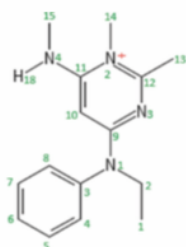
Mepivacaine



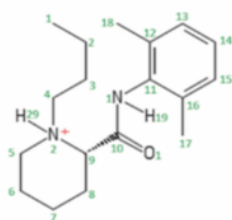
Zatebradine



ZD7288



Bupivacaine



Cilobradine

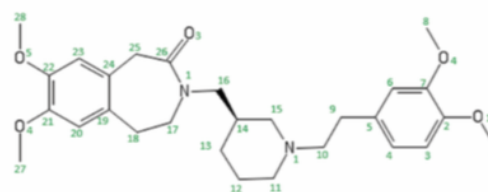


FIGURE 3.4 – Ligands utilisés pour la recherche présentée [96].

et est 4-10 fois moins efficace sur l'isoforme HCN1. Alinidine provoque aussi une déviation du potentiel d'activation vers des potentiels plus polarisé en plus de réduire la conductance maximale du courant de 27% sans aucune dépendance. L'inconvénient de ses deux molécules provient du manque de sélectivité qui les empêchent d'être des candidats idéaux pour les traitements neuronaux ou bradycardique. Néanmoins, leurs interactions avec les récepteurs alpha-adrénergique apporte des informations qui permettent la genèse de molécules qui n'interagissent pas avec ces récepteurs.

---

### 3.3.2 ZD7288

ZD7288 est une molécule dont l'effet bloquant sur les canaux HCNs a bien été établi auparavant tout comme son effet neuronal. Par contre, on observe une grande différence entre l'affinité dans ces 2 régions, 1M dans le SAN versus 400 nM dans les neurones ce qui l'élimine des candidats potentiels pour la régulation neuronale. ZD7288 reste néanmoins un bon candidat pour les tests de comparaison dû à sa portée sur HCN1 et HCN2. En effet, on observe un effet cinq fois plus efficace sur HCN2 que sur HCN1 ce qui peut guider les recherches vers un bloqueur sélectif entre les isoformes de HCN.

### 3.3.3 La famille « -bradine »

Ivabradine est à ce jour le seul médicament qui a passé les tests cliniques et qui est utilisé dans le traitement de la défaillance cardiaque. Selon les recherches, ivabradine agirait sur HCN4 en passant uniquement par la voie intracellulaire et n'agirait que lorsque HCN4 serait ouvert. En contraste, des études ont prouvé l'effet d'ivabradine sur HCN1 en conformation fermée. L'étude d'ivabradine pourrait donc aussi apporter son lot d'information quant à la spécificité entre isoforme ainsi que pour vérifier si ivabradine représente bel et bien le meilleur candidat pour le traitement. On inclut aussi dans nos recherches zatébradine, un dérivé d'ivabradine reconnu aussi pour agir sur les canaux HCNs, mais de façon distincte. Zatébradine ne semble pas affecter la dépendance en voltage de l'activation des canaux HCN pointant vers une interaction différente avec les canaux HCNs.

### 3.3.4 La famille « -caïnes »

Des recherches sur les membres de la famille « -caïne » : bupivacaïne, mépivacaïne et Lidocaïne ont rapportés leurs effets sur les canaux HCNs dans les neurones DRG. L'ajout de cette famille dans la comparaison pourrait donc permettre l'observation de nouveaux liens dû à la variabilité de structure avec les autres candidats.

## CHAPITRE 4

### ARTICLE SUR LES INTERACTIONS DES LIGANDS AVEC HCN1

Dans le but de développer une molécule plus spécifique envers les canaux HCNs, mais aussi spécifique entre les différents isoformes de ces canaux, nous avons étudié les interactions entre 9 différents ligands et différents isoformes HCNs. Notre étude a permis d'écrire un article qui sera présenté ici. L'article fut soumis, accepté et publié dans Scientific report [96].

Dans cet article, nous avons étudié en détail les interactions de 9 ligands avec la protéine HCN1 du au récent développement de sa structure via la Cryo-em. Cette analyse nous permet ensuite de se guider vers la confection d'un médicament plus adapté pour les besoins de spécificité.

Dans l'ensemble des résultats qui seront présentés, j'ai été responsable de la mise en place de l'algorithme de partitionnement des ligands ainsi que dans l'identifications des interactions susceptibles de former une liaison entre les ligands et la protéine. J'ai aussi recueilli l'information de contact des résidus à l'aide d'un script python que j'ai mis en place.

J'ai effectué l'amarrage de chacun des ligands grâce au programme Autodock employé majoritairement sur Briaree, un ordinateur de Calcul Québec.

Suivra après cet article, le début de l'analyse des interactions avec d'autres isoformes de la famille HCN.



## Characterization of drug binding within the HCN1 channel pore.

**Authors:** Jérémie Tanguay<sup>1</sup>, Karen M. Callahan<sup>2</sup>, Nazzareno D'Avanzo<sup>2</sup>

### **Affiliations:**

<sup>1</sup> Department of Physics, Université de Montréal, Montréal, Canada.

<sup>2</sup> Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montréal, Canada.

### **Abstract**

Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated gated (HCN) channels mediate rhythmic electrical activity of cardiac pacemaker cells and in neurons play important roles in setting resting membrane potentials, dendritic integration, neuronal pacemaking, and establishing action potential threshold. Block of HCN channels slows the heart rate and is currently used to treat angina. However, HCN block also provides a promising approach to the treatment of neuronal disorders including epilepsy and neuropathic pain. While several molecules that block HCN channels have been identified, including clonidine and its derivative alinidine, lidocaine, mepivacaine, bupivacaine, ZD7288, ivabradine, zatebradine, and cilobradine, their low affinity and lack of specificity prevents wide-spread use. Different studies suggest that the binding sites of these inhibitors are located in the inner vestibule of HCN channels, but the molecular details of their binding remain unknown. We used computational docking experiments to assess the binding sites and mode of these inhibitors against the recently solved atomic structure of human HCN1 channels, and a homology model of the open pore derived from a closely related CNG channel. We identify a possible hydrophobic groove in the pore cavity that plays an important role in conformationally restricting the location and orientation of drugs bound to the inner vestibule. Our results also help explain the molecular basis of the low-affinity binding of these inhibitors, paving the way for the development of higher affinity molecules.

### **Keywords:**

HCN channel, ion channel, drug binding, docking, bradycardia, arrhythmia, epilepsy, pain,

## Introduction

Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels are the molecular correlate of the currents  $I_f$  or  $I_h$  in sinoatrial node (SAN) cells and neurons. Four mammalian isoforms have been identified (HCN1-4) with 60% sequence identity among them. Topologically, HCN channels resemble voltage-gated potassium (Kv) channels, however, functionally they are spectacularly different; slowly activating at very negative (hyperpolarized) membrane potentials in which other voltage-gated cation channels close, and being sensitive to cyclic-nucleotides. HCN channels are formed by homo- or hetero-tetrameric assembly of subunits<sup>1</sup> that contain 6 transmembrane  $\alpha$ -helices (S1–S6), a re-entrant loop between the S5 and S6 helices that forms the selectivity filter and a C-terminal cyclic-nucleotide binding domain (CNBD) attached to the S6 via an 80 amino acid C-linker. Like other voltage-gated channels, HCN channels contain a positively charged S4 helix that functions as a voltage sensor that moves with the same directionality as voltage sensors of other channels<sup>2,3</sup>. Electrophysiological recordings have characteristic properties, including activation upon membrane hyperpolarization, a lack of voltage-dependent inactivation, conduction of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ , a shift in the activation curve due to direct interaction with cAMP and cGMP, and inhibition by external  $\text{Cs}^+$ <sup>4</sup>. The rates of opening and closing differ significantly for each mammalian HCN isoform, with HCN1 activating in less than 300 ms, while HCN4 requires seconds to open. Moreover, the half-maximal voltage for activation ( $V_{1/2}$ ) for HCN1 and HCN3 are significantly depolarized compared to HCN2 and HCN4. They also differ from one another in their response to cyclic nucleotides, with cAMP shifting the voltage-dependence of activation in HCN2 and HCN4 by +15 mV, while HCN1 and HCN3 are only weakly modulated<sup>5-8</sup>.

HCN1 and HCN2 channels are widely expressed in the central and peripheral nervous systems where they are open at sub-threshold potentials and play roles in setting resting membrane potentials, dendritic integration, neuronal pacemaking, and establishing action potential threshold. HCN1 knockout mice have impaired motor learning<sup>9,10</sup> and enhance susceptibility to seizures<sup>11</sup>. HCN2 knockout mice present symptoms of absence epilepsy and tremoring<sup>12</sup>, and do not demonstrate neuropathic pain in response to mechanical or thermal stimuli<sup>13</sup>. Gain of function and loss of function mutations in HCN1 and 2 are linked to various genetic epilepsies in humans<sup>14-18</sup>. Altered HCN-cAMP signaling in prefrontal cortex networks also appears to contribute to the working memory deficits in schizophrenia and stress<sup>19-21</sup>. Mutations

in the scaffolding protein SHANK3 may predispose people to autism by inducing an  $I_h$  channelopathy with increased neuronal input resistance, enhanced neuronal excitability and reduced synaptic transmission <sup>22</sup>. Additionally, HCN4 is the principal component of  $I_h$  in all mammalian sinoatrial node (SAN) and other cardiac conduction tissue <sup>5,23-26</sup>. HCN4<sup>-/-</sup> resulted in embryonic death in mice due to a failure to generate mature pacemaking cells <sup>12,27</sup> while HCN4 conditionally deficient mice have a 70–80% reduction in SAN  $I_h$  <sup>28</sup>. Genetic variants in HCN channels have been linked to cardiac disorders including sinus node dysfunction, atrial fibrillation <sup>29-39</sup>, ventricular tachycardia <sup>40-42</sup>, atrio-ventricular block <sup>43</sup>, Brugada syndrome <sup>38,44</sup>, sudden infant death syndrome <sup>45,46</sup>, and sudden unexpected death in epilepsy <sup>47</sup>.

Neuronal HCN channels are open when neurons are not firing action-potentials (sub-threshold potentials), and reduce the input resistance of the cell membrane making it less responsive to incoming inputs. These combined properties make them excellent targets for fine-tuning of intrinsic neuronal excitability. Inhibition of cardiac  $I_h$  by bradycardic agents such as Ivabradine have been found useful in reducing the incidence of cardiovascular mortality and hospitalisation for some subclasses of heart failure <sup>48</sup>. Moreover, since HCN channel expression is largely limited to the heart and nervous system, and they are not found in vascular tissue, targeted inhibition of HCN channels has strong therapeutic potential as anti-convulsants, analgesics, anti-depressants, anti-psychotics, and bradycardic agents without adverse effects on pulmonary and vascular smooth muscle tone. While several molecules that target HCN channels have been identified, including ZD7288 <sup>49-54</sup>, zatebradine <sup>55,56</sup>, cilobradine <sup>55-57</sup>, and ivabradine <sup>57-60</sup>, their low affinity and lack of isoform specificity prevents wide-spread use of these current HCN inhibitors. Additionally, HCN channels have been shown to interact with molecules such as well as clonidine <sup>61</sup> and its derivative alinidine <sup>62</sup>, bupivacaine, lidocaine, and mepivacaine <sup>63</sup> though less specifically.

In light of the recent high-resolution structures of human HCN1 <sup>64</sup> and the related CNG channel <sup>65</sup> we set out to characterize the interactions of 9 known HCN inhibitors within the pore using a computational docking approach. Our data provide insights into the drug binding modes and potentially explain the molecular bases for their low affinities.

## Results

### Docking to the closed HCN1 pore

500 docking attempts were made for each ligand to the closed human HCN1 pore extracted from the cryo-EM structure<sup>64</sup>. For all ligands, 0 of the 500 docking conformations resided in the central cavity (Fig. 1). We estimate the diameter of the central cavity measured at Y386 of opposite subunits to be 7.7 Å, enabling little more than 2-5 waters to occupy this space. Given that ligands such as ivabradine and ZD7288 are much larger and have been suggested to be trapped in the closed state<sup>57-60,66</sup>, our data suggests that the ligand-trapped closed state must differ from the apo-closed state that was observed in the cryo-EM structure. We therefore generated an open state model of human HCN1, based on the structure of the closely related CNG channel TAX-4<sup>65</sup>.

### Clonidine and alinidine binding to the open HCN1 pore

Clonidine, a well-known  $\alpha_2$ -adrenergic receptor agonist, also inhibits HCN2 and HCN4 with  $IC_{50}$ 's of ~3-10 $\mu$ M, shifting their voltage dependence to more hyperpolarized potentials by 10-20 mV, and is 4-10 fold less potent in HCN1<sup>61</sup>. Docking of clonidine to the open HCN1 pore lead to the identification of two putative clusters within the pore cavity that cannot be distinguished based on binding energy alone. The autodock algorithm estimates a binding energy per non-hydrogen atom of -0.357 +/- 0.01 kcal/mol. Both of these clusters are well defined by position and orientation, with RMSDs of 0.02Å and 0.17Å from the reference pose within each clusters. The first cluster (Fig. 2A blue) contained 95% of the docked poses, and fit like a "lock and key" into a groove in the internal cavity formed by residues C358, Y386, and A387. In this conformation, a persistent hydrogen bond could be observed between the imidazole hydrogen of clonidine, and the hydroxyl oxygen of Y386. Another stabilizing hydrogen bond is observed between the N1 nitrogen and the hydroxyl hydrogen of the same Y386. In the second cluster, containing only 5% of the poses (Fig. 2B red), the clonidine is stabilized a single hydrogen bond between the imidazole hydrogen and the backbone carbonyl oxygen of A383 and reciprocating anion- $\pi$  interactions between clonidine and the Y386 aromatic rings.

Alinidine (*N*-allyl-clonidine) is a clonidine derivative with differing pharmacological effects, including its bradycardic<sup>67-69</sup> and analgesic properties<sup>70</sup>. Alinidine induces the slowing of spontaneous activity of rabbit SAN accompanied by a 10% prolongation of the action potential

duration<sup>62</sup> and by reducing the steepness of diastolic depolarization of Purkinje fibres with limited side effects on action potential duration and inotropic state<sup>71</sup>. Alinidine shifts the voltage-dependence of  $I_h$  activation to more negative voltages and reduced maximal conductance by 27% with no use or frequency dependence, indicating that alinidine binds equally well to HCN open and closed channel states. Alinidine docking to the hHCN1 open pore resulted in 3 clusters (Fig. 3A), however, the third cluster (red) was populated by only 4 poses and bound with higher energy. Common to each of the two highest occupied and lowest energy clusters, the  $\alpha$ -butylene group of alinidine extends into the S4 ion binding site of the selectivity filter, and would be expected to displace an ion in this site (Fig. 3C). Similar to clonidine, in these two clusters, alinidine fit like a “lock and key” into a groove in the internal cavity formed by residues C358, Y386, and A387. The binding energy per non-hydrogen atom was estimated to be  $-0.320 \pm 0.001$  kcal/mol,  $-0.332 \pm 0.001$  kcal/mol for clusters 1 and 2 respectively, which are indistinguishable according to Autodock. 319 docks (64%) reside in cluster 1, whereby a persistent hydrogen bond between the imidazole hydrogen of clonidine, and the hydroxyl oxygen of Y386 is observed. In addition, in this cluster, alinidine is stabilized by an anion- $\pi$  or parallel-displaced  $\pi$ -stacking interaction between its aromatic group and the Y386 aromatic ring of another subunit. Poses in cluster 2 (177 of 500 docks) bind in the similar region with a different orientation, such that hydrogen bonding between the imidazole ring and the Y386 hydroxyl groups can still occur, but only parallel-displaced  $\pi$ -stacking between the alinidine and neighbouring Y386 aromatic rings can occur, and not an anion- $\pi$  interaction.

The overall examination of clonidine and alinidine binding to the HCN1 pore indicate that a hydrophobic groove generated by residues C358, Y386, and A387 can assist in conformationally restraining the ligand. Moreover, Y386 of neighbouring subunits co-ordinate these ligands through a combination of hydrogen bonding and  $\pi$ -bonding interactions.

### **Binding of lidocaine to the open HCN1 pore**

Lidocaine, mepivacaine and bupivacaine are local anesthetics known to inhibit voltage-gated sodium (Nav) channels<sup>72</sup>. Recently, these molecules have been shown to also inhibit HCN currents in DRG neurons with similar potencies<sup>63</sup>, suggesting clinical relevance. Since HCN blockade by lidocaine appears to occur from the inside of the cell<sup>73</sup>, we performed docking experiments of lidocaine to our model of the open hHCN1 pore. 5 clusters of docking poses were

identified, with the binding sites lined by residues L357, C358, A383, Y386, A387, and V390 (Fig. 4). Similar to what we observed for clonidine and alinidine, the most occupied cluster and with low energy (cluster 2; occupied by 306 poses), is stabilized by  $\pi$ -stacking interactions of the aromatic rings of the ligand and Y386. This enables the ligand to sit deeper in the hydrophobic groove than clonidine and alinidine (Fig. 4D) and close enough to interact with V390. A hydrogen bond network is also formed between the amide hydrogen of lidocaine and the hydroxyl oxygen of the same Y386 that  $\pi$ -stacks with the ligand, as well as the sulfhydryl sulfur atom of C358. Cluster 1 (occupied by 136 poses) is rotated such that the aromatic ring can no longer  $\pi$ -stack, and the amide bond is rotated such that the hydrogen bond network is now formed by the oxygen of the amide bond in lidocaine, and the hydrogen atoms of the Y386 and C358 sidechains. In general, the aromatic ring of most lidocaine poses are constrained in the hydrophobic groove, independent of whether or not  $\pi$ -stacking can occur, while the amine portion points toward the central pore axis. Notably, the binding energies per non-hydrogen atom are comparable to clonidine and alinidine, with a mean of -0.307 kcal/mol and a maximum of -0.333 kcal/mol. The highest energy poses occupied a cluster (cluster 4; orange) with only 4 out of 500 poses with the ligand displaced against one of the S6 pore helices and may represent a local minimum, and not the physiologically relevant binding pose.

Bupivacaine and mepivacaine are lidocaine derivatives with ringed R-groups replacing the ethylamine. Bupivacaine and mepivacaine had comparable binding energies per non-hydrogen atom to lidocaine (-0.320 kcal/mol and -0.332 kcal/mol respectively). However, we found mepivacaine to dock with greater complementarity into the pore groove than lidocaine and docks can be arranged into 2 clusters (Supp. Fig. 3) with the ligands simply rotated by approximately 180° around the center of the molecule. Notably, while the aromatic ring of lidocaine resides in the hydrophobic groove, its amine does not arrange itself into the portion of the hydrophobic groove formed by the neighboring subunit, but rather points toward the central pore axis (Fig. 4E). On the other hand, both ring structures of mepivacaine can arrange themselves into both portions of the hydrophobic groove formed by neighbouring subunits. Interestingly, bupivacaine largely appears to dock into the same positions as mepivacaine, with the butyl group extended toward the central axis of the pore cavity (Fig. 4F), similar to the amine group of lidocaine. Considering that lidocaine, bupivacaine and mepivacaine have increasing IC<sub>50</sub>'s<sup>74</sup>, our results suggest that while the nitrogen containing ring is entropically favourable to help orient the “caines” into the hydrophobic groove, there may be an important role in occluding

permeant ions by having a greater portion of the ligand occupying the central axis of the pore cavity.

### **ZD7288 binding to the open HCN1 pore**

ZD7288 is an open-state blocker of HCN channels<sup>52,54,66,75</sup> with bradycardic and antianginal activity in animal models<sup>51,76</sup>. ZD7288 induces at ~15 mV hyperpolarizing shift in voltage-dependent  $I_h$  activation and reduces maximal activity by more than 50%<sup>51</sup>. This drug also reduces the generation of hippocampal epileptic discharges in rabbits<sup>77</sup> and reverse pain behavior and spontaneous discharges in injured rat nerve fibers<sup>78-80</sup>. The 500 docking attempts for ZD7288 against the hHCN1 open pore resulted in 24 clusters (Fig. 5A), with 271 poses (54%) in one cluster, interacting with residues L357, C358, A383, Y386, A387, V390 and G381 of 3 subunits within the tetramer (Fig. 5B and C). Poses in this cluster are largely stabilized by hydrogen bonds between the ligand's nitrogen atoms and the hydroxyl groups of Y386. The remaining clusters reside on the same plane, and interact with the same residues, however, are not rotationally constrained, thereby reducing the number of hydrogen bonds formed. However, the binding energies per non-hydrogen atom between the best occupied cluster (cluster 1; -0.305 +/- 0.003 kcal/mol) and the other clusters (all ranging between -0.29 and -0.31) are indistinguishable. This suggests that binding of ZD7288 in HCN channels does not likely occur with a preferred orientation, and that the ligand is relatively free to rotate within the pore cavity. Moreover, unlike the binding of clonidine, alinidine and lidocaine,  $\pi$ -stacking interactions between the aromatic portions of the ligand, and the aromatic sidechain of Y386 do not appear to contribute to the mechanism of binding of ZD7288.

### **Ivabradine binding to the open HCN1 pore**

Ivabradine was the first clinically approved molecule that specifically targeted HCN channels for the treatment of heart failure<sup>81-83</sup>. Ivabradine block of HCN4 can occur only from the intracellular side<sup>58</sup> when the channels are opened by hyperpolarization with enhanced binding upon frequent changes in the direction of ion flow<sup>57-60</sup>. In contrast, HCN1 channels can also be inhibited from the closed state<sup>60</sup>. Intriguingly, the 500 docking attempts of ivabradine to the hHCN1 open pore could not be clustered using our algorithm. The ligand binds in the pore cavity in a U-shaped

configuration (Fig. 6B), without positional or orientational restriction (Fig. 6A). Consequently, ivabradine can interact with residues C358, A383, Y386, A387, V390, G391, and T394 of all 4 subunits. The binding energy per non-hydrogen atom is  $-0.185 \pm 0.018$  kcal/mol with a maximum binding energy for the lowest energy pose of  $-0.258$  kcal/mol. Binding of ivabradine to the hHCN1 open pore appears largely driven by van der Waals and hydrophobic interactions, with no consistent hydrogen bonding, anion- $\pi$  or  $\pi$ -stacking interactions observed. Notably, no part of the ivabradine molecule fits into the hydrophobic groove generated by residues C358, Y386, and A387. Consistent with this observation, it was previously shown that the equivalent mutation to A387V in HCN4 channels (A507V) did not affect ivabradine block of HCN channels<sup>59</sup>. Interactions with these residues are weaker and less specific than for ligands such as clonidine, alinidine and lidocaine. Similar results were observed for zatebradine and cilobradine (Supp. Fig. 5 and 6). Our findings are consistent with the model that ivabradine requires an open channel to access the binding site, and that outward current favours blocker binding. Our data also indicates that the “ligand trapped” closed conformation is not the same as the apo-closed conformation observed in the cryo-EM structure, since the apo-closed pore cavity lacks the volume necessary to accommodate any of the inhibitors we examined.



## Discussion

Targeted inhibition of HCN channels has strong therapeutic potential as anti-convulsants, analgesics, anti-depressants, anti-psychotics, and bradycardic agents without adverse effects on pulmonary and vascular smooth muscle tone. However, the lack of channel or isoform specificity and low affinity for most currently available inhibitors hinders their use. Thus, to aid in the development of higher affinity molecules, a detailed understanding of drug-channel interactions are required. We therefore sought to investigate molecular details of block of 9 known inhibitors of HCN channels (with differing scaffolds) and identify residues involved in their binding.

### Drug binding in the central cavity

The first intriguing result obtained from our docking experiments is that for each of the ligands examined, 0 of 500 docks to the closed human HCN1 pore contained ligands bound in the cavity. Our estimates using the charmm-gui webserver suggest that the cavity can accommodate only 2-5 waters in this space with a diameter measured at Y386 of opposite subunits of 7.7 Å. Given that ligands such as ivabradine and ZD7288 are much larger and have been suggested to bind in the open state and be trapped in the closed state<sup>57,66</sup>, our data suggests that the ligand-trapped closed state differs from the apo-closed state that was observed in the cryo-EM structure.

Docking of these ligands to the open pore model of human HCN1 was more successful, with 100% of docking poses for each drug residing in the pore cavity. The residues that appear to be most critical for ligand binding of these pore blockers are C358, A383, Y386, A387, V390. Residues C358, Y386, and A387 appear to generate a hydrophobic groove that helps to conformationally restrict the ligands such as clonidine and alinidine, whose rings can fit. Binding of these ligands appears to be driven by a hydrogen bonds, anion- $\pi$  and  $\pi$ -stacking interactions within this hydrophobic groove. On the other hand, “bradine” inhibitors appear to bind to the HCN1 open pore in a geometrically unconstrained manner via primarily van der Waals and hydrophobic interactions, and are sterically hindered from similar coordinated binding to the hydrophobic groove used for clonidine and alinidine binding. This lack of strong interactions and high rotational freedom within the pore cavity may provide a molecular basis for the low (2-10 $\mu$ M) affinity of “bradines” to HCN channels. This may present a region that may be exploited for the development of higher affinity pore-blocking ligands. This idea is supported by the

examination of binding of ZD7288 and “caine” inhibitors (such as lidocaine). The “caine” inhibitors can form parallel displaced pi interactions with Y386 and fit sterically into the pore groove, and thus dock in a relatively small number of clusters ( $\leq 5$ ; Fig. 4). ZD7288 can form H-bond interactions, however, does not have a portion that can fit within this pore groove and form  $\pi$ -stacking interactions, and thus is relatively unconstrained in its binding (Fig. 5). Unfortunately, this lack of conformational restriction in the pore for ligands such as ZD7288 and ivabradine may present serious challenges for solving ligand bound structures using x-ray crystallography or cryo-EM approaches.

### Comparison with Previous Studies

Previous studies have attempted to examine the binding of ivabradine and ZD7288 to HCN channels using computational docking approaches<sup>54,59</sup>. Unfortunately, these studies required the use of homology model generated using prokaryotic KcsA<sup>54,59</sup> and MthK<sup>84</sup> channel as templates for the closed and open conformations, as an atomic resolution structure of HCNs or more closely related channels were not yet available at the time. Our study extracted the closed pore-domain from the the high-resolution structure of human HCN1 generated by cryo-EM experiments (PDB: 5U6O) to dock against. Structural alignment of the closed model derived from KcsA (Fig. 1A; red) and the closed pore extracted from the cryo-EM structure (Fig. 1A; cyan) indicate that there is a large difference between the structures. Firstly, the pore cavity in our models are lined by S6 residues C358, A383, Y386, A387, V390, G391, T394, A395, and Q398 in the closed and open states. This is largely in agreement with previous reports<sup>53,54,59</sup>, however differs for 2 key residues. L357 and F389 do not line the pore cavity. In the cryo-EM structure, the sidechain of F389 is faces S5 residues I298, I302, and M304 of the same chain and T384 of the neighbouring S6. This seems more reasonable than previously suggested, since the energetic cost of hydrating a phenylalanine group within the pore would be greater than if the residue was buried amongst non-polar residues. Similarly, in the cryo-EM structure, L357 packs as part of the interface between the pore-helix of one subunit and the N-terminal region of the neighbouring S6. These differences may play an important role in drug binding models, since many of the HCN inhibitors (such as bradines and ZD7288) largely interact with the channel through hydrophobic interactions and van der Waals forces, rather than through electrostatic interactions and hydrogen bonds. Most notably, the cryo-EM structure differs from previous models in the position of residue Y386 relative to the pore helix (Supp. Fig. 1A). The distance between C358 and Y386 is 9.2Å in the KcsA derived model, versus only 4.8Å in the high-

resolution structure. It is this difference that enables ivabradine to bind above residue Y386 in previous studies<sup>59</sup>, while it is sterically restricted from this space in our study. This difference also has a carry-over effect on the generation of an open model. Our open pore model was derived using the open pore observed in the cryo-EM structure of the closely related CNG channel TAX-4<sup>65</sup>. In the KcsA-based model of HCN4, I510 (equivalent to residue 390 in hHCN1) does not interact with ivabradine directly, but was proposed to stabilize the conformation of Y506 (equivalent to Y386 in HCN1) which does interact with the ligand<sup>59</sup>. However, our model, derived from the atomic resolution structures of HCN1 and TAX-4 CNG channels, indicates that ivabradine and ZD7288 bind below Y386 and can interact directly with V390 of HCN1 channels (Figs. 5 and 6).

## **Conclusions**

Overall, our study provide novel insights into the mode of binding for 9 known inhibitors of HCN channels, and indicate that the inhibitor bound-closed pore state of HCN1 must differ from the apo-closed pore state observed in the high resolution structure. We also identify a hydrophobic groove within the pore cavity lined by residues C358, Y386, and A387 that appears to conformationally restrict ligands and has the potential to be exploited for the development of higher affinity molecules. Our results also help explain the molecular basis of the low-affinity binding of these inhibitors.

## Methods

### Model Building and Docking Calculations

The closed pore domain (S5-P-loop-S6) of hHCN1 (residues 296 – 402) was extracted from the PDB (5U6O)<sup>64</sup> and processed through the CHARMM-GUI pdbreader<sup>85</sup> which enabled the corrections of any missing atoms and/or side-chains. In the absence of the crystal structure of an hHCN1 channel with an open pore domain, we turned to homology modelling using the template of the prokaryotic CNG channel, TAX-4 (PDB 5H30)<sup>65</sup>. Sequences of the S5-pore-S6 residues were aligned using ClustalΩ<sup>86</sup> (Supp. Fig. 1) and used to generate a homology model using ICM-Pro<sup>87</sup> (Molsoft LLC, LaJolla). The model was processed through CHARMM-GUI PDBreader<sup>85</sup> to assist with repairing any missing atoms, repair any improper bond lengths or angles, and provide the appropriate PDB format for used for docking.

Preparation of the ligands and HCN1 channel pore domains in the open or closed states for docking experiments was performed using AutodockTools4 (ADT4)<sup>88</sup>. Grid parameter files and grid maps were generated by AutoGrid 4.2 within ADT with a grid spacing of 0.375Å and positioned to exclude extracellular binding of the ligands. Each ligand was independently docked 500 times using Lamarckian GA docking algorithm<sup>89</sup> with the maximum number of energy evaluations set to 2 500 000. Docking was performed on single processors of the supercomputer cluster Briaree (Compute Canada / CalculQuébec). Prior knowledge that these ligands are pore blockers enabled us to remove any docked poses outside of the pore cavity.

### Clustering Analysis

To account for the four-fold symmetry of the HCN pore, docked ligand poses were rotated into the same quadrant. Following this, ligands were clustered by (i) position in the pore and (ii) the orientation of functional groups. This was achieved by simplifying each ligand to a vector generated from the centroid of atoms selected in different regions of the molecule, as demonstrated for Ivabradine (Supp. Fig. 1A). Table 1 lists the atoms used to determine each of the 3 centroids determined for each ligand.

To cluster, using our simplified molecules, we generated a variant of Silhouette clustering<sup>90</sup> to which we added a scoring function in order to find a suitable number of clusters without user bias. A reference dock is selected at random dock to generate the first cluster. The distance of

every other dock is then compared to this reference position via the sum of linear distance between each of the centroids from our selections in Table 1 according to:

$$D = \sum_{i=1}^n a_i - b_i$$

Where D is the sum of the distances between each centroid, n the number of centroids we selected as best representative of the whole molecule, and a and b represent the docks being are compared.

If D lies within a defined threshold distance it is merged to the cluster, otherwise a new cluster is created. 4Å (equivalent to a weak hydrogen bond) was selected as the starting threshold.

Since the number of clusters calculated is dependent on the threshold set, we added a scoring function (S) to each cluster to choose the optimal number.

$$S = \frac{\textit{Inside Distance}}{\textit{Outside Distance}}$$

with Inside Distance defined as:

$$I = \textit{Max} \left( \sum_{i=1}^n x_i - c_i \right)$$

With c being the cluster's global centroid and x the centroid for each individual dock inside the cluster.

The Outside Distance is defined as:

$$O = \textit{Max} \left( \sum_{i=1}^n y_i - c_i \right)$$

with y being the centroid for every dock from the nearest cluster.

Ideally, S should be <1 for all clusters calculated, which indicates every cluster is justified and the number of clusters is well determined. If the S determined for any cluster > 1, the threshold is automatically lowered by 0.1Å for each iteration until every S falls below 1. If S remains > 1 for every iteration until 0, the algorithm selects for the threshold yielding the lowest maximum S and the number of clusters is determined accordingly.

## **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council to ND (DG-435649-2013). ND was a junior research fellows of the Fonds de recherche du Québec – Santé.

## **Author contributions**

ND designed the study and contributed to data analysis. JT performed the docking experiments. KMC and JT performed data analysis. ND and JT wrote the manuscript.

## **Statement of competing interests**

The authors declare no competing interests.

## **Data availability**

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## References

- 1 Ulens, C. & Tytgat, J. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem* **276**, 6069-6072, doi:10.1074/jbc.C000738200 (2001).
- 2 Mannikko, R., Elinder, F. & Larsson, H. P. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature* **419**, 837-841, doi:10.1038/nature01038 (2002).
- 3 Vemana, S., Pandey, S. & Larsson, H. P. S4 movement in a mammalian HCN channel. *J Gen Physiol* **123**, 21-32, doi:10.1085/jgp.200308916 (2004).
- 4 Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S. & Zong, X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* **89**, 847-885, doi:10.1152/physrev.00029.2008 (2009).
- 5 Ishii, T. M., Takano, M., Xie, L. H., Noma, A. & Ohmori, H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* **274**, 12835-12839 (1999).
- 6 Ludwig, A. *et al.* Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J* **18**, 2323-2329, doi:10.1093/emboj/18.9.2323 (1999).
- 7 Mistrik, P. *et al.* The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* **280**, 27056-27061, doi:10.1074/jbc.M502696200 (2005).
- 8 Seifert, R. *et al.* Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9391-9396 (1999).
- 9 Nolan, M. F. *et al.* A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell* **119**, 719-732, doi:10.1016/j.cell.2004.11.020 (2004).
- 10 Nolan, M. F. *et al.* The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* **115**, 551-564 (2003).
- 11 Huang, Z., Walker, M. C. & Shah, M. M. Loss of dendritic HCN1 subunits enhances cortical excitability and epileptogenesis. *J Neurosci* **29**, 10979-10988, doi:10.1523/JNEUROSCI.1531-09.2009 (2009).
- 12 Ludwig, A. *et al.* Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J* **22**, 216-224, doi:10.1093/emboj/cdg032 (2003).
- 13 Emery, E. C., Young, G. T., Berrocoso, E. M., Chen, L. & McNaughton, P. A. HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. *Science* **333**, 1462-1466, doi:10.1126/science.1206243 (2011).
- 14 Dibbens, L. M. *et al.* Augmented currents of an HCN2 variant in patients with febrile seizure syndromes. *Ann Neurol* **67**, 542-546, doi:10.1002/ana.21909 (2010).
- 15 Tang, B., Sander, T., Craven, K. B., Hempelmann, A. & Escayg, A. Mutation analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCN1 and HCN2 in idiopathic generalized epilepsy. *Neurobiol Dis* **29**, 59-70, doi:10.1016/j.nbd.2007.08.006 (2008).
- 16 Nava, C. *et al.* De novo mutations in HCN1 cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* **46**, 640-645, doi:10.1038/ng.2952 (2014).
- 17 DiFrancesco, J. C. *et al.* Recessive loss-of-function mutation in the pacemaker HCN2 channel causing increased neuronal excitability in a patient with idiopathic generalized epilepsy. *J Neurosci* **31**, 17327-17337, doi:10.1523/JNEUROSCI.3727-11.2011 (2011).
- 18 Nakamura, Y. *et al.* Novel HCN2 mutation contributes to febrile seizures by shifting the channel's kinetics in a temperature-dependent manner. *PLoS One* **8**, e80376, doi:10.1371/journal.pone.0080376 (2013).
- 19 Paspalas, C. D., Wang, M. & Arnsten, A. F. Constellation of HCN channels and cAMP regulating proteins in dendritic spines of the primate prefrontal cortex: potential substrate for working memory deficits in schizophrenia. *Cereb Cortex* **23**, 1643-1654, doi:10.1093/cercor/bhs152 (2013).

- 20 Arnsten, A. F. Prefrontal cortical network connections: key site of vulnerability in stress and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci* **29**, 215-223, doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.02.006 (2011).
- 21 Gamo, N. J. *et al.* Stress Impairs Prefrontal Cortical Function via D1 Dopamine Receptor Interactions With Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels. *Biol Psychiatry* **78**, 860-870, doi:10.1016/j.biopsych.2015.01.009 (2015).
- 22 Yi, F. *et al.* Autism-associated SHANK3 haploinsufficiency causes Ih channelopathy in human neurons. *Science* **352**, aaf2669, doi:10.1126/science.aaf2669 (2016).
- 23 Brioschi, C. *et al.* Distribution of the pacemaker HCN4 channel mRNA and protein in the rabbit sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol* **47**, 221-227, doi:10.1016/j.yjmcc.2009.04.009 (2009).
- 24 Moosmang, S. *et al.* Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* **268**, 1646-1652 (2001).
- 25 Shi, W. *et al.* Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res* **85**, e1-6 (1999).
- 26 Tellez, J. O. *et al.* Differential expression of ion channel transcripts in atrial muscle and sinoatrial node in rabbit. *Circ Res* **99**, 1384-1393, doi:10.1161/01.RES.0000251717.98379.69 (2006).
- 27 Harzheim, D. *et al.* Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP. *EMBO J* **27**, 692-703, doi:10.1038/emboj.2008.3 (2008).
- 28 Herrmann, S., Stieber, J., Stockl, G., Hofmann, F. & Ludwig, A. HCN4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice. *EMBO J* **26**, 4423-4432, doi:10.1038/sj.emboj.7601868 (2007).
- 29 Duhme, N. *et al.* Altered HCN4 channel C-linker interaction is associated with familial tachycardia-bradycardia syndrome and atrial fibrillation. *Eur Heart J* **34**, 2768-2775, doi:10.1093/eurheartj/ehs391 (2013).
- 30 Laish-Farkash, A. *et al.* A novel mutation in the HCN4 gene causes symptomatic sinus bradycardia in Moroccan Jews. *J Cardiovasc Electrophysiol* **21**, 1365-1372, doi:10.1111/j.1540-8167.2010.01844.x (2010).
- 31 Macri, V. *et al.* A novel trafficking-defective HCN4 mutation is associated with early-onset atrial fibrillation. *Heart Rhythm* **11**, 1055-1062, doi:10.1016/j.hrthm.2014.03.002 (2014).
- 32 Milanesi, R., Baruscotti, M., Gneccchi-Ruscione, T. & DiFrancesco, D. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med* **354**, 151-157, doi:10.1056/NEJMoa052475 (2006).
- 33 Milano, A. *et al.* HCN4 mutations in multiple families with bradycardia and left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **64**, 745-756, doi:10.1016/j.jacc.2014.05.045 (2014).
- 34 Nof, E. *et al.* Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation* **116**, 463-470, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.706887 (2007).
- 35 Schulze-Bahr, E. *et al.* Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest* **111**, 1537-1545, doi:10.1172/JCI16387 (2003).
- 36 Schweizer, P. A. *et al.* cAMP sensitivity of HCN pacemaker channels determines basal heart rate but is not critical for autonomic rate control. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **3**, 542-552, doi:10.1161/CIRCEP.110.949768 (2010).
- 37 Schweizer, P. A. *et al.* The symptom complex of familial sinus node dysfunction and myocardial noncompaction is associated with mutations in the HCN4 channel. *J Am Coll Cardiol* **64**, 757-767, doi:10.1016/j.jacc.2014.06.1155 (2014).
- 38 Ueda, K. *et al.* Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem* **279**, 27194-27198, doi:10.1074/jbc.M311953200 (2004).
- 39 Zhou, J. *et al.* A novel HCN4 mutation, G1097W, is associated with atrioventricular block. *Circ J* **78**, 938-942 (2014).



- 40 Kuwabara, Y. *et al.* Increased expression of HCN channels in the ventricular myocardium contributes to enhanced arrhythmicity in mouse failing hearts. *J Am Heart Assoc* **2**, e000150, doi:10.1161/JAHA.113.000150 (2013).
- 41 Oshita, K. *et al.* Ectopic automaticity induced in ventricular myocytes by transgenic overexpression of HCN2. *J Mol Cell Cardiol* **80C**, 81-89, doi:10.1016/j.yjmcc.2014.12.019 (2015).
- 42 Ueda, K. *et al.* Role of HCN4 channel in preventing ventricular arrhythmia. *J Hum Genet* **54**, 115-121, doi:10.1038/jhg.2008.16 (2009).
- 43 Baruscotti, M. *et al.* Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene Hcn4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1705-1710, doi:10.1073/pnas.1010122108 (2011).
- 44 Crotti, L. *et al.* Spectrum and prevalence of mutations involving BrS1- through BrS12-susceptibility genes in a cohort of unrelated patients referred for Brugada syndrome genetic testing: implications for genetic testing. *J Am Coll Cardiol* **60**, 1410-1418, doi:10.1016/j.jacc.2012.04.037 (2012).
- 45 Evans, A., Bagnall, R. D., Duflo, J. & Semsarian, C. Postmortem review and genetic analysis in sudden infant death syndrome: an 11-year review. *Hum Pathol* **44**, 1730-1736, doi:10.1016/j.humpath.2013.01.024 (2013).
- 46 Tester, D. J. & Ackerman, M. J. Sudden infant death syndrome: how significant are the cardiac channelopathies? *Cardiovasc Res* **67**, 388-396, doi:10.1016/j.cardiores.2005.02.013 (2005).
- 47 Tu, E., Waterhouse, L., Duflo, J., Bagnall, R. D. & Semsarian, C. Genetic analysis of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels in sudden unexpected death in epilepsy cases. *Brain Pathol* **21**, 692-698, doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00500.x (2011).
- 48 Swedberg, K. *et al.* Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *Lancet* **376**, 875-885, doi:10.1016/S0140-6736(10)61198-1 (2010).
- 49 Gasparini, S. & DiFrancesco, D. Action of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflugers Arch* **435**, 99-106 (1997).
- 50 Harris, N. C. & Constanti, A. Mechanism of block by ZD 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro. *J Neurophysiol* **74**, 2366-2378 (1995).
- 51 BoSmith, R. E., Briggs, I. & Sturgess, N. C. Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (I<sub>f</sub>) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* **110**, 343-349 (1993).
- 52 Wu, S. *et al.* Inner activation gate in S6 contributes to the state-dependent binding of cAMP in full-length HCN2 channel. *J Gen Physiol* **140**, 29-39, doi:10.1085/jgp.201110749 (2012).
- 53 Chan, Y. C. *et al.* Probing the bradycardic drug binding receptor of HCN-encoded pacemaker channels. *Pflugers Arch* **459**, 25-38, doi:10.1007/s00424-009-0719-2 (2009).
- 54 Cheng, L., Kinard, K., Rajamani, R. & Sanguinetti, M. C. Molecular mapping of the binding site for a blocker of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated pacemaker channels. *J Pharmacol Exp Ther* **322**, 931-939, doi:10.1124/jpet.107.121467 (2007).
- 55 DiFrancesco, D. Some properties of the UL-FS 49 block of the hyperpolarization-activated current (i(f)) in sino-atrial node myocytes. *Pflugers Arch* **427**, 64-70 (1994).
- 56 Goethals, M., Raes, A. & van Bogaert, P. P. Use-dependent block of the pacemaker current I(f) in rabbit sinoatrial node cells by zatebradine (UL-FS 49). On the mode of action of sinus node inhibitors. *Circulation* **88**, 2389-2401 (1993).
- 57 Bucchi, A., Baruscotti, M. & DiFrancesco, D. Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I(f) channels by ivabradine. *J Gen Physiol* **120**, 1-13 (2002).
- 58 Bois, P., Bescond, J., Renaudon, B. & Lenfant, J. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* **118**, 1051-1057 (1996).
- 59 Bucchi, A. *et al.* Identification of the molecular site of ivabradine binding to HCN4 channels. *PLoS One* **8**, e53132, doi:10.1371/journal.pone.0053132 (2013).

- 60 Bucchi, A., Tognati, A., Milanesi, R., Baruscotti, M. & DiFrancesco, D. Properties of ivabradine-induced block of HCN1 and HCN4 pacemaker channels. *J Physiol* **572**, 335-346, doi:10.1113/jphysiol.2005.100776 (2006).
- 61 Knaus, A. *et al.* Direct inhibition of cardiac hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated pacemaker channels by clonidine. *Circulation* **115**, 872-880, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.667675 (2007).
- 62 Satoh, H. & Hashimoto, K. Electrophysiological study of alinidine in voltage clamped rabbit sino-atrial node cells. *Eur J Pharmacol* **121**, 211-219 (1986).
- 63 Bischoff, U., Brau, M. E., Vogel, W., Hempelmann, G. & Olschewski, A. Local anaesthetics block hyperpolarization-activated inward current in rat small dorsal root ganglion neurones. *Br J Pharmacol* **139**, 1273-1280, doi:10.1038/sj.bjp.0705363 (2003).
- 64 Lee, C. H. & MacKinnon, R. Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel. *Cell* **168**, 111-120 e111, doi:10.1016/j.cell.2016.12.023 (2017).
- 65 Li, M. *et al.* Structure of a eukaryotic cyclic-nucleotide-gated channel. *Nature* **542**, 60-65, doi:10.1038/nature20819 (2017).
- 66 Shin, K. S., Rothberg, B. S. & Yellen, G. Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J Gen Physiol* **117**, 91-101 (2001).
- 67 Kobinger, W., Lillie, C. & Pichler, L. Cardiovascular actions of N-allyl-clonidine (ST 567), a substance with specific bradycardic action. *Eur J Pharmacol* **58**, 141-150 (1979).
- 68 Lillie, C. & Kobinger, W. Comparison of the bradycardic effects of alinidine (St 567), AQ-A 39 and verapamil on guinea-pig sinoatrial node superfused with different Ca<sup>2+</sup> and NaCl solutions. *Eur J Pharmacol* **87**, 25-33 (1983).
- 69 Traunecker, W. & Walland, A. Haemodynamic and electrophysiologic actions of alinidine in the dog. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **244**, 58-72 (1980).
- 70 Stockhaus, K. in *Problems of Drug Dependence* 355-366 (Cambridge: National Academy of Sciences, 1977).
- 71 Snyders, D. J. & Van Bogaert, P. P. Alinidine modifies the pacemaker current in sheep Purkinje fibers. *Pflugers Arch* **410**, 83-91 (1987).
- 72 Brau, M. E., Vogel, W. & Hempelmann, G. Fundamental properties of local anesthetics: half-maximal blocking concentrations for tonic block of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in peripheral nerve. *Anesth Analg* **87**, 885-889 (1998).
- 73 Putrenko, I., Yip, R., Schwarz, S. K. W. & Accili, E. A. Cation and voltage dependence of lidocaine inhibition of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated HCN1 channel. *Sci Rep* **7**, 1281, doi:10.1038/s41598-017-01253-x (2017).
- 74 Romanelli, M. N. *et al.* HCN Channels Modulators: The Need for Selectivity. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **16**, 1764-1791 (2016).
- 75 Benetos, A., Rudnichi, A., Thomas, F., Safar, M. & Guize, L. Influence of heart rate on mortality in a French population: role of age, gender, and blood pressure. *Hypertension* **33**, 44-52 (1999).
- 76 Briggs, I., BoSmith, R. E. & Heapy, C. G. Effects of Zeneca ZD7288 in comparison with alinidine and UL-FS 49 on guinea pig sinoatrial node and ventricular action potentials. *J Cardiovasc Pharmacol* **24**, 380-387 (1994).
- 77 Kitayama, M. *et al.* Ih blockers have a potential of antiepileptic effects. *Epilepsia* **44**, 20-24 (2003).
- 78 Chaplan, S. R. *et al.* Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J Neurosci* **23**, 1169-1178 (2003).
- 79 Lee, D. H., Chang, L., Sorkin, L. S. & Chaplan, S. R. Hyperpolarization-activated, cation-nonselective, cyclic nucleotide-modulated channel blockade alleviates mechanical allodynia and suppresses ectopic discharge in spinal nerve ligated rats. *J Pain* **6**, 417-424, doi:10.1016/j.jpain.2005.02.002 (2005).

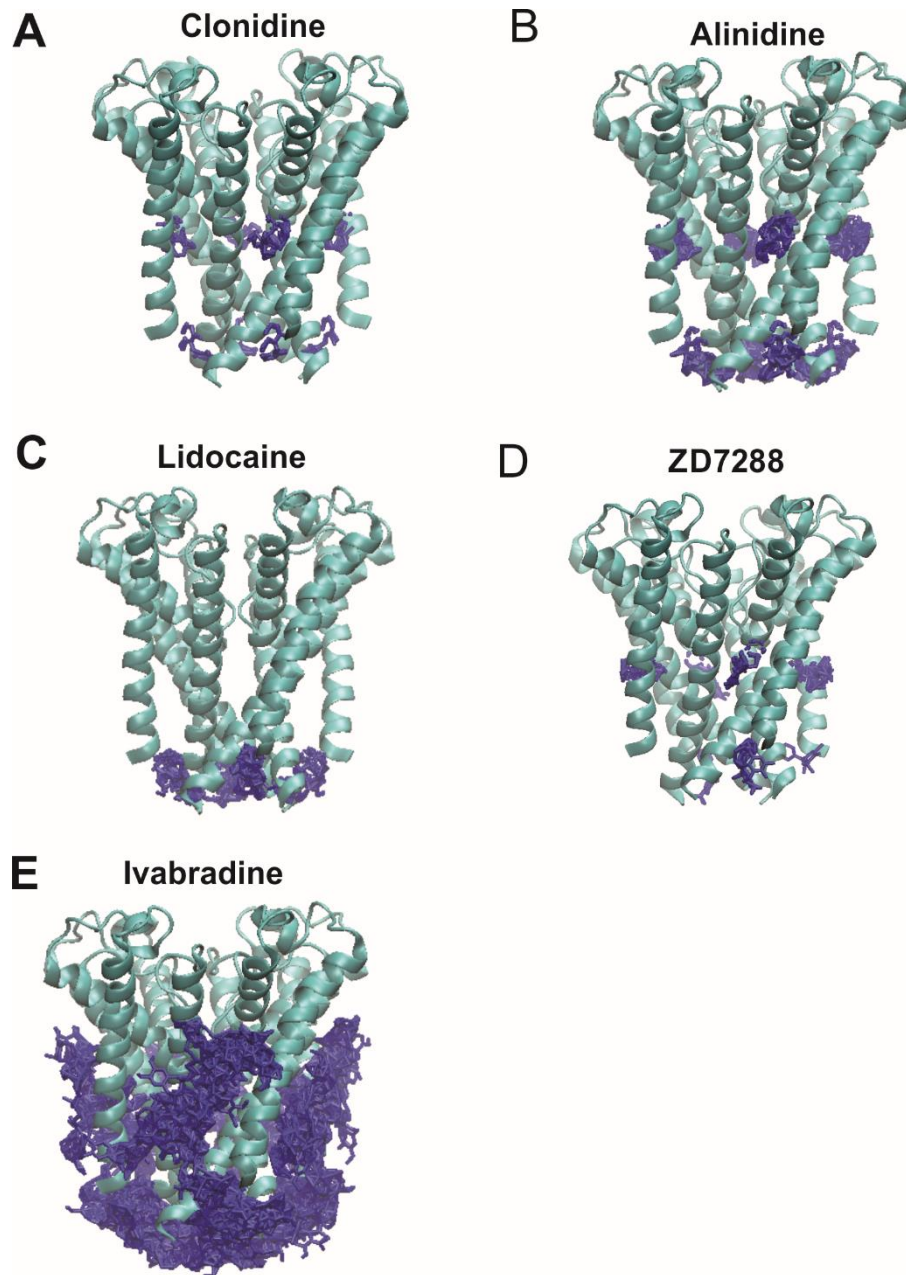
- 80 Sun, Q., Xing, G. G., Tu, H. Y., Han, J. S. & Wan, Y. Inhibition of hyperpolarization-activated current by ZD7288 suppresses ectopic discharges of injured dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain. *Brain Res* **1032**, 63-69, doi:10.1016/j.brainres.2004.10.033 (2005).
- 81 Bohm, M. *et al.* Heart rate as a risk factor in chronic heart failure (SHIFT): the association between heart rate and outcomes in a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **376**, 886-894, doi:10.1016/S0140-6736(10)61259-7 (2010).
- 82 Fox, K. *et al.* Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **372**, 807-816, doi:10.1016/S0140-6736(08)61170-8 (2008).
- 83 Fox, K. *et al.* Heart rate as a prognostic risk factor in patients with coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* **372**, 817-821, doi:10.1016/S0140-6736(08)61171-X (2008).
- 84 Giorgetti, A., Carloni, P., Mistrik, P. & Torre, V. A homology model of the pore region of HCN channels. *Biophys J* **89**, 932-944, doi:10.1529/biophysj.104.045286 (2005).
- 85 Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. & Im, W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem* **29**, 1859-1865, doi:10.1002/jcc.20945 (2008).
- 86 Sievers, F. & Higgins, D. G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci* **27**, 135-145, doi:10.1002/pro.3290 (2018).
- 87 Cardozo, T., Totrov, M. & Abagyan, R. Homology modeling by the ICM method. *Proteins* **23**, 403-414, doi:10.1002/prot.340230314 (1995).
- 88 Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **30**, 2785-2791, doi:10.1002/jcc.21256 (2009).
- 89 Morris, G. M. *et al.* Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *Journal of Computational Chemistry* **19**, 1639-1662 (1998).
- 90 Rousseeuw, P. J. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics* **20**, 53-65 (1987).

## Tables

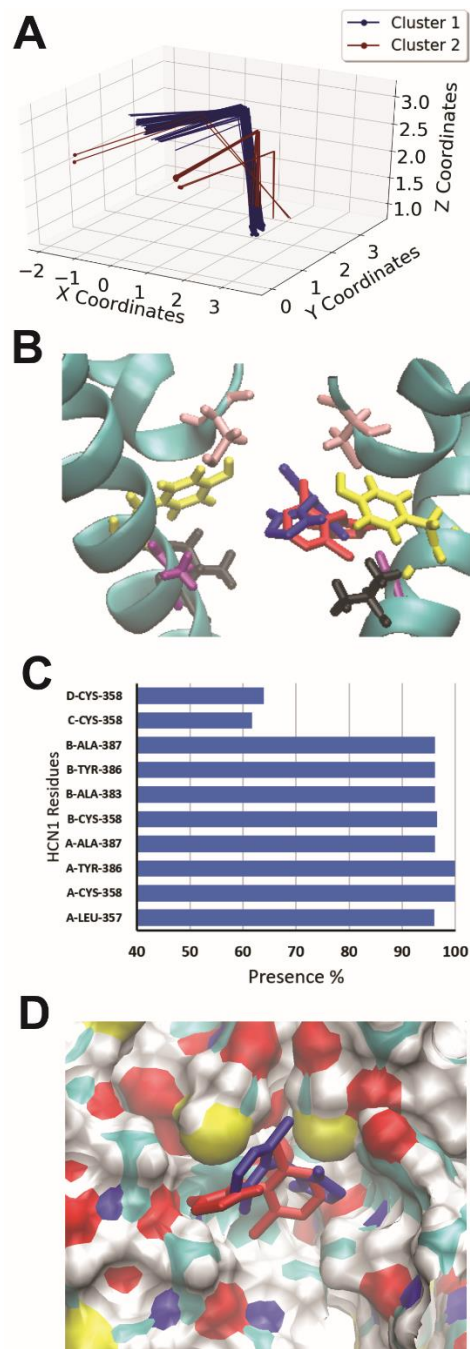
**Table 1.** Simplified ligand vectors used for clustering were generated by calculating 3-4 centroids within each ligand. The atoms used to calculate each centroid is listed.

<b>Ligands</b>	<b>Centroid 1</b>	<b>Centroid 2</b>	<b>Centroid 3</b>	<b>Centroid 4</b>
<b>Clonidine</b>	C7, C8 & C9	N1	C1 & C4	
<b>Alinidine</b>	C4 & C7	N1	C10, C11 & C12	
<b>Lidocaine</b>	C8 & C11	C6	N2	
<b>Mepivacaine</b>	N2	C13 & C10	N1	C6 & C3
<b>Bupivacaine</b>	N2	C5 & C8	N1	C12 & C15
<b>ZD7288</b>	C3 & C6	C9 & N2	N4	
<b>Ivabradine</b>	C20 & C21	C2	C7 & C12	
<b>Zatebradine</b>	C19 & C22	C2	C7 & C12	
<b>Cilobradine</b>	C3 & C6	C11 & C14	C19 & C24	

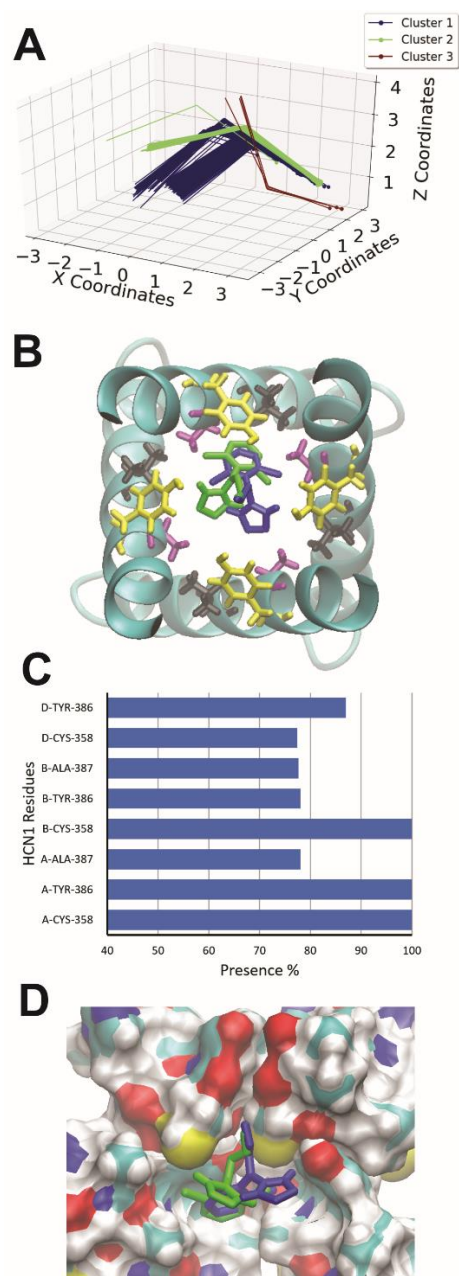
## Figures and Legends



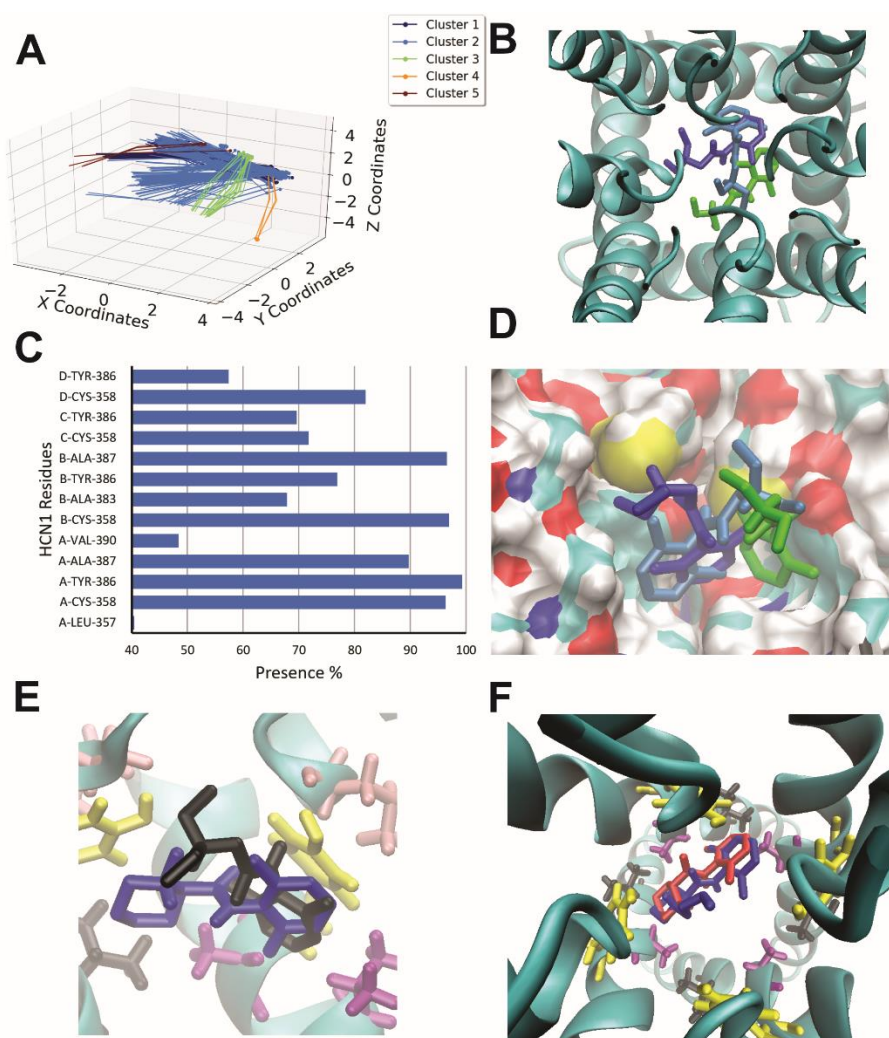
**Fig. 1. Docking of HCN blockers to the closed HCN1 pore.** The results from 500 attempts to dock clonidine (**A**) alinidine (**B**) lidocaine (**C**) ZD7288 (**D**) and ivabradine (**E**) to the closed pore of the cryo-EM structure (PDB: 5U6O). Despite these ligands being known to block or be “trapped” in the closed state, none of the 500 docked poses for any of these inhibitors were observed in the pore cavity. These data indicate that the apo-closed pore conformation must differ from the ligand-trapped closed pore.



**Fig. 2. Docking of clonidine to the open HCN1 pore.** (A) Clustering analysis of the 500 docking attempts. Docks can be placed into 2 clusters according to our automated algorithm. (B) Representative poses from cluster 1 (95% of poses; blue) and cluster 2 (5% of poses; red) are shown. Residues C358 (pink), Y386 (yellow), A387 (purple) and V390 (black) are highlighted. (C) The frequency of residues within 4Å of the ligand for each pose was assessed and is indicated as a percentage. (D) A comparison of clonidine poses in cluster 1 (blue) and cluster 2 (red). The ligand fits into a hydrophobic groove lined by residues C358, Y386, and A387.

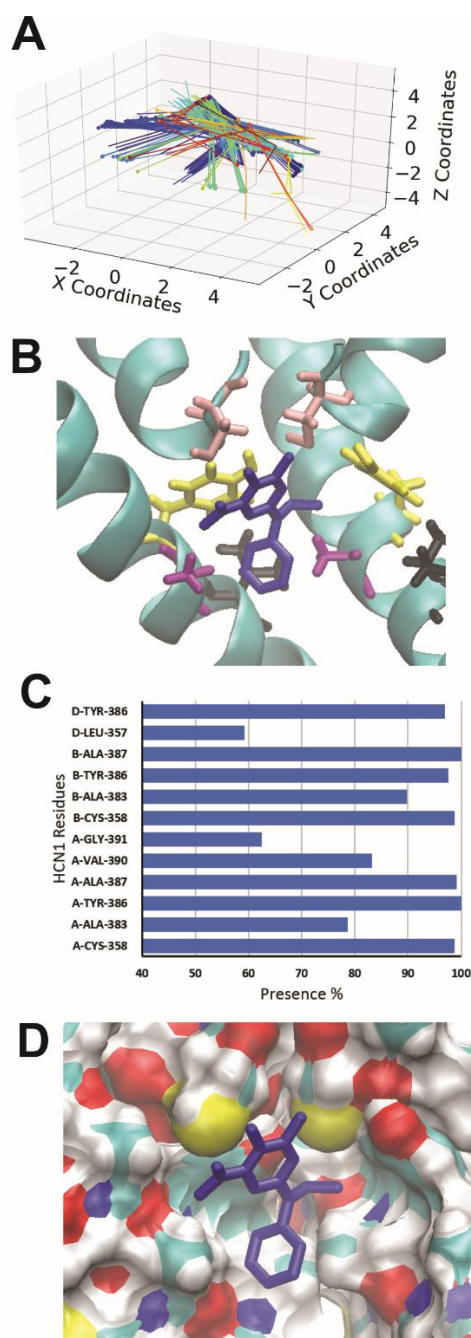


**Fig. 3. Docking of alinidine to the open HCN1 pore.** **(A)** Clustering analysis of the 500 docking attempts. Docks can be placed into 3 clusters according to our automated algorithm. Cluster 1 (blue), cluster 2 (green) and cluster 3 (red) contained 319, 177 and 4 poses respectively. **(B)** Top view of the HCN1 pore with representative poses from cluster 1 (blue) and cluster 2 (green) are shown with residues C358 (pink), Y386 (yellow), A387 (purple) and V390 (black) highlighted **(C)** The frequency of residues within 4Å of the ligand for each pose was assessed and is indicated as a percentage. **(D)** A comparison of clonidine poses in cluster 1 (blue) and cluster 2 (green). The ligand fits into a hydrophobic groove lined by residues C358, Y386, and A387.

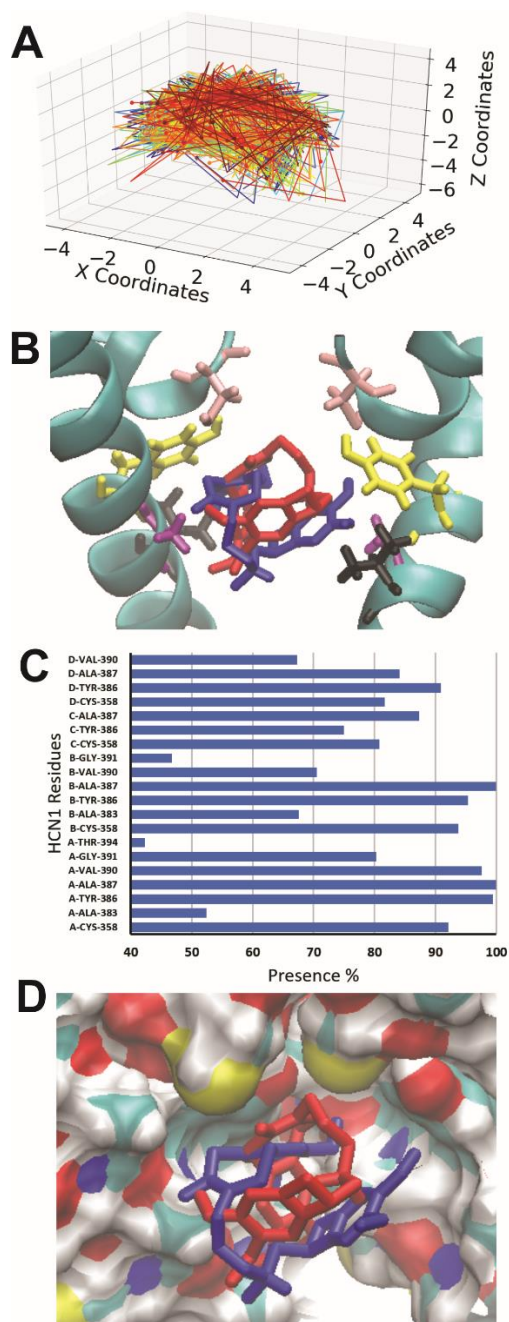


**Fig. 4. Docking of lidocaine and derivatives to the open HCN1 pore.** (A) Clustering analysis of the 500 docking attempts. Docks can be placed into 5 clusters according to our automated algorithm. (B) Top view of the HCN1 pore with representative poses from cluster 1 (blue) cluster 2 (cyan) and cluster 3 (green) are shown (C) The frequency of residues within 4Å of the ligand for each pose was assessed and is indicated as a percentage. (D) Side view of representative poses from cluster 1 (blue) cluster 2 (cyan) and cluster 3 (green) are shown. The ligand aromatic ring of lidocaine fits into a hydrophobic groove lined by residues C358, Y386, and A387, while the amine portion of the ligand points toward the central pore axis. (E) Overlay of lidocaine (black) and mepivacaine (blue) docked in the pore of HCN1 channels. Mepivacaine docks with both rings in hydrophobic groove formed by neighbouring subunits, while lidocaine's amine points toward the pore axis. (F) Mepivacaine (red) and bupivacaine (blue) dock similarly, however, the butyl group on the aromatic ring extends toward the central axis of the pore cavity likely enhancing the occlusion of ions.



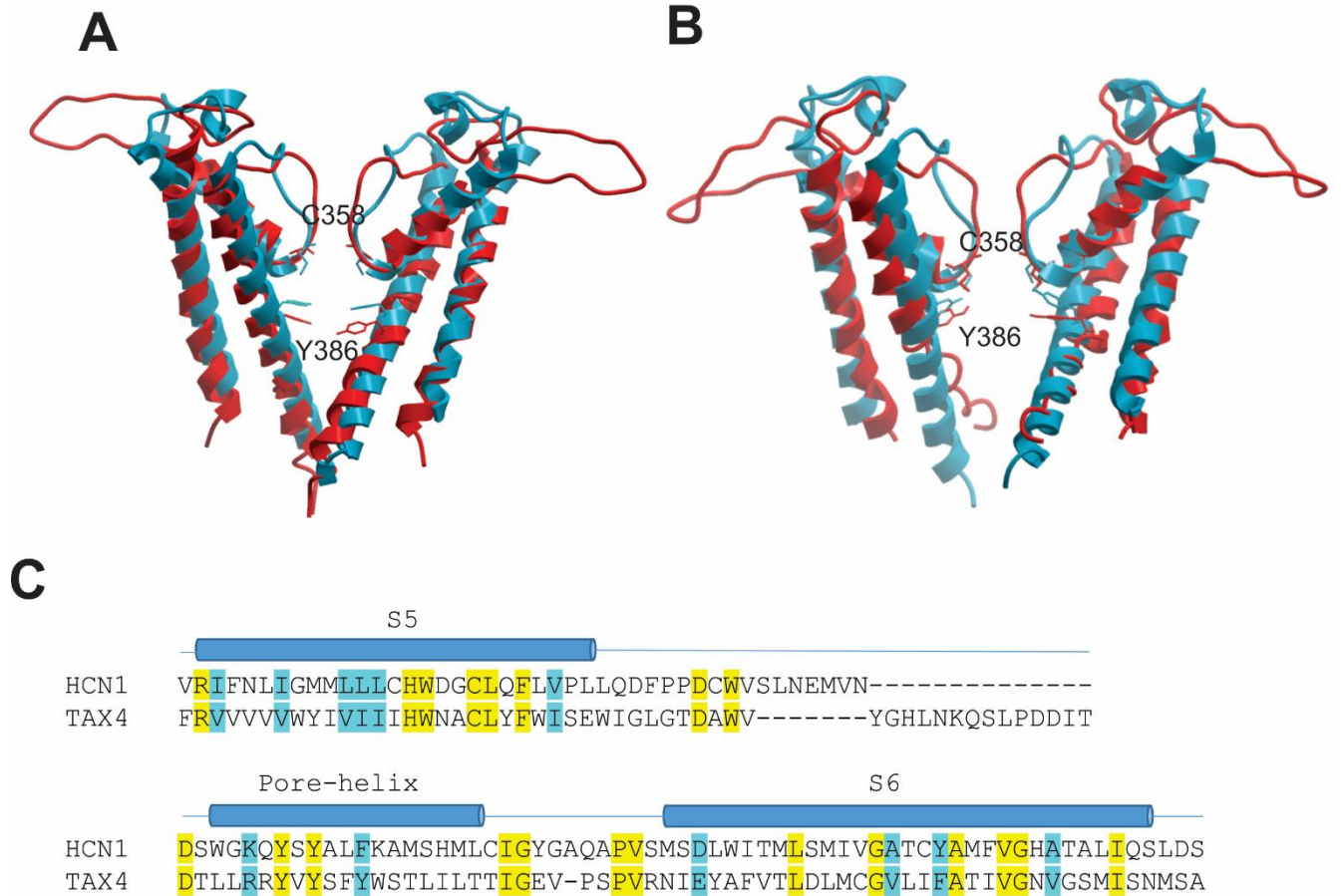


**Fig. 5. Docking of ZD7288 to the open HCN1 pore.** (A) Clustering analysis of the 500 docking attempts. Docks can be placed into 24 clusters according to our automated algorithm, indicating that ZD7288 does not bind in a preferred orientation. (B) A representative pose of ZD7288 with residues C358 (pink), Y386 (yellow), A387 (purple) and V390 (black) highlighted. (C) The frequency of residues within 4Å of the ligand for each pose was assessed and is indicated as a percentage. (D) ZD7288 does not fit nicely into the hydrophobic groove and the aromatic sidechain of Y386 does not appear to contribute to the mechanism of binding as it does for other ligands.

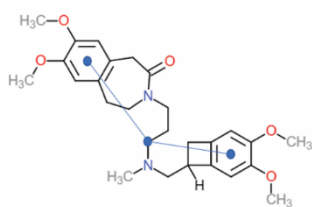


**Fig. 6. Docking of Ivabradine to the open HCN1 pore. (A)** Clustering analysis of the 500 docking attempts. Docks cannot be clustered according to our automated algorithm, indicating that ivabradine does not bind in a preferred orientation. **(B)** Two poses of ivabradine are shown with residues C358 (pink), Y386 (yellow), A387 (purple) and V390 (black) highlighted. Ivabradine in all poses folds into a U-shape, however, is free to rotate 360° in the pore cavity. **(C)** The frequency of residues within 4Å of the ligand for each pose was assessed and is indicated as a percentage. **(D)** None of the Ivabradine fit nicely into the hydrophobic groove which is largely prevented by the presence of the methoxy groups on the aromatic ring.

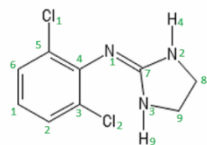
## Supporting information



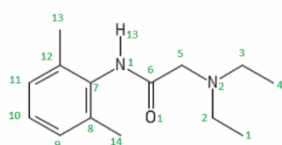
**Supp. Fig. 1. HCN Homology Modeling.** **(A)** Closed state pore models either derived from KcsA (red) or taken from the high resolution cryo-EM structure (blue) (PDB: 5U6O). **(B)** Open state pore models either derived from KcsA (red) or using the more closely related prokaryotic CNG channel, TAX-4 (PDB 5H30) as a template (blue). Notably, the distance between C358 and Y386 is greater in the KcsA based model in both the open and closed states, compared to the model derived from the cryo-EM structures. **(C)** Sequence alignment of the pore domains of human HCN1 and the prokaryotic TAX-4 used for generating the open state homology model.

**A****B**

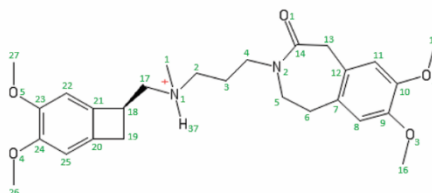
Clonidine



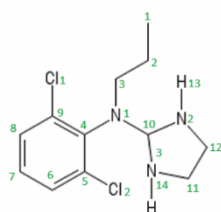
Lidocaine



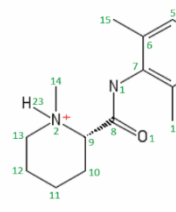
Ivabradine



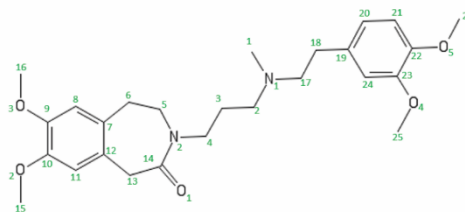
Alinidine



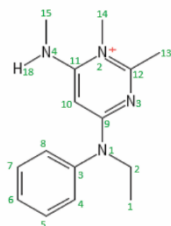
Mepivacaine



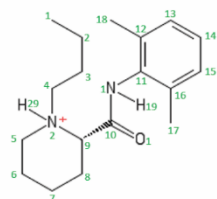
Zatebradine



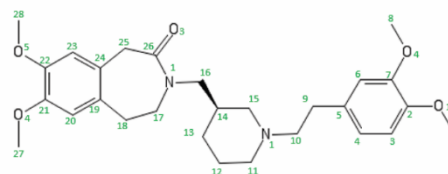
ZD7288



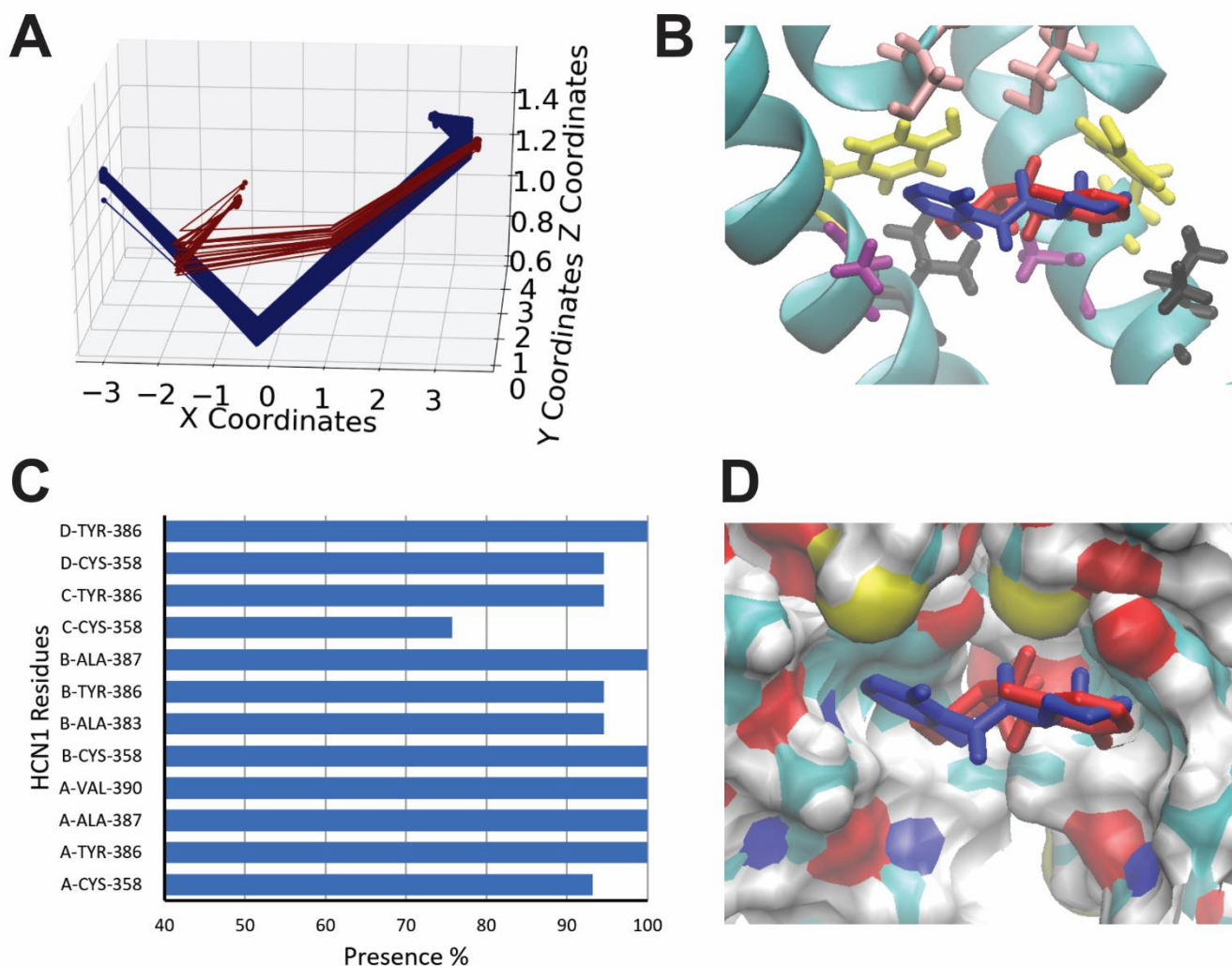
Bupivacaine



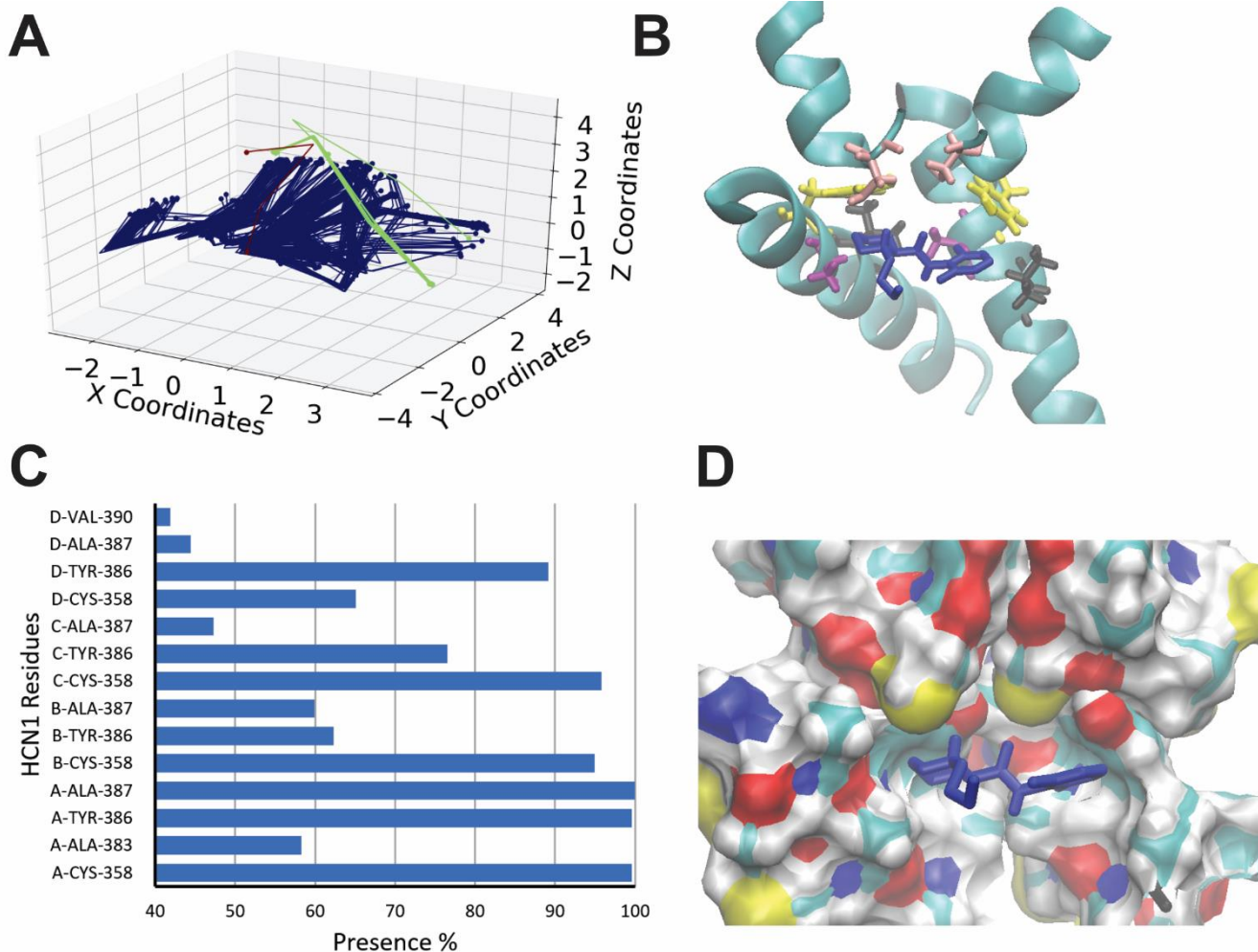
Cilobradine



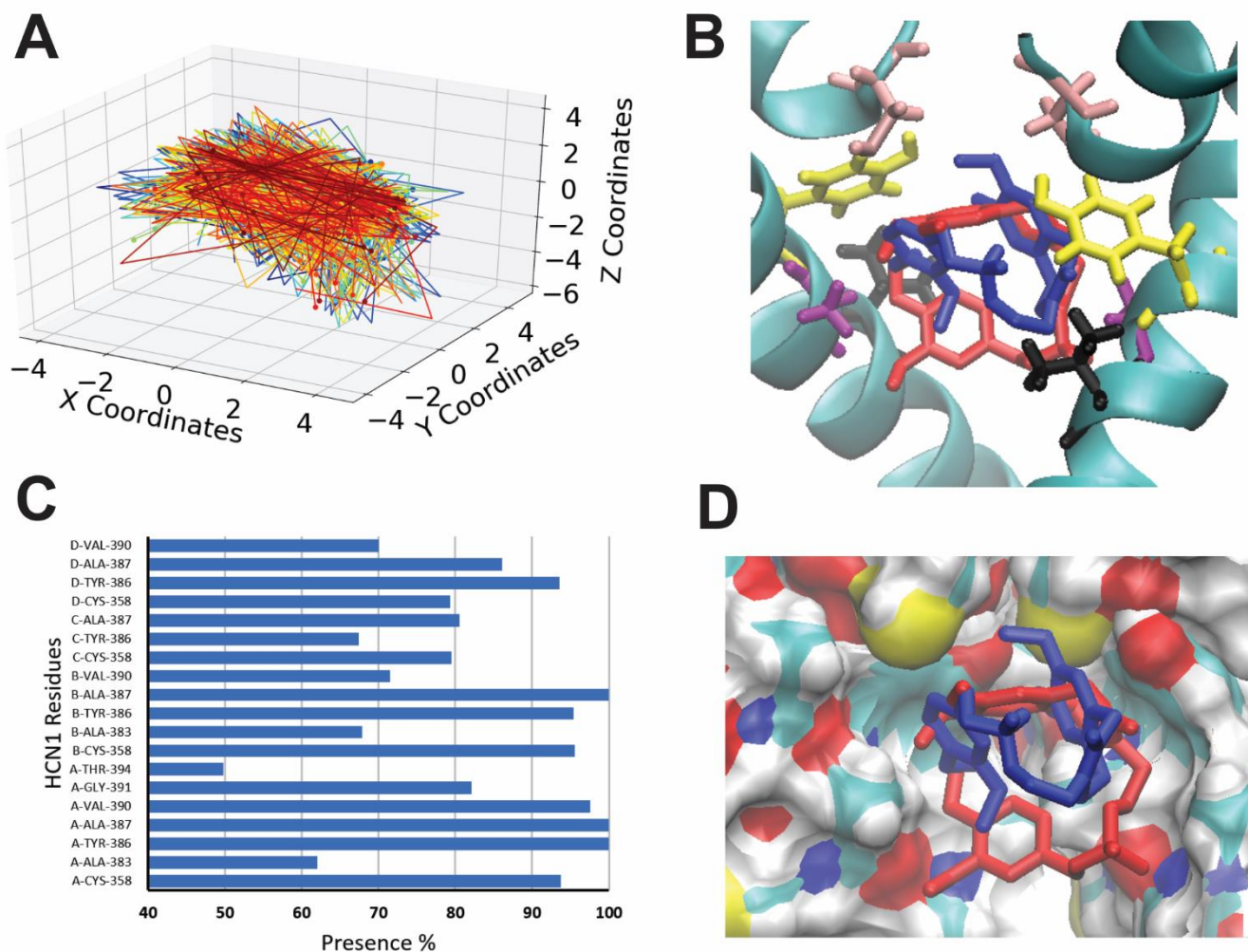
**Supp. Fig. 2. HCN inhibitors used for docking.** (A) Docking poses were clustered using a simplified vector model, whereby, calculated from the the centroids (dots) of 3 – 4 functional groups on the ligand were calculated for each ligand. Atoms used to calculate centroids are shown in Table 1. (B) Chemical structures of the inhibitors used. Atom numbers are labelled in light green.



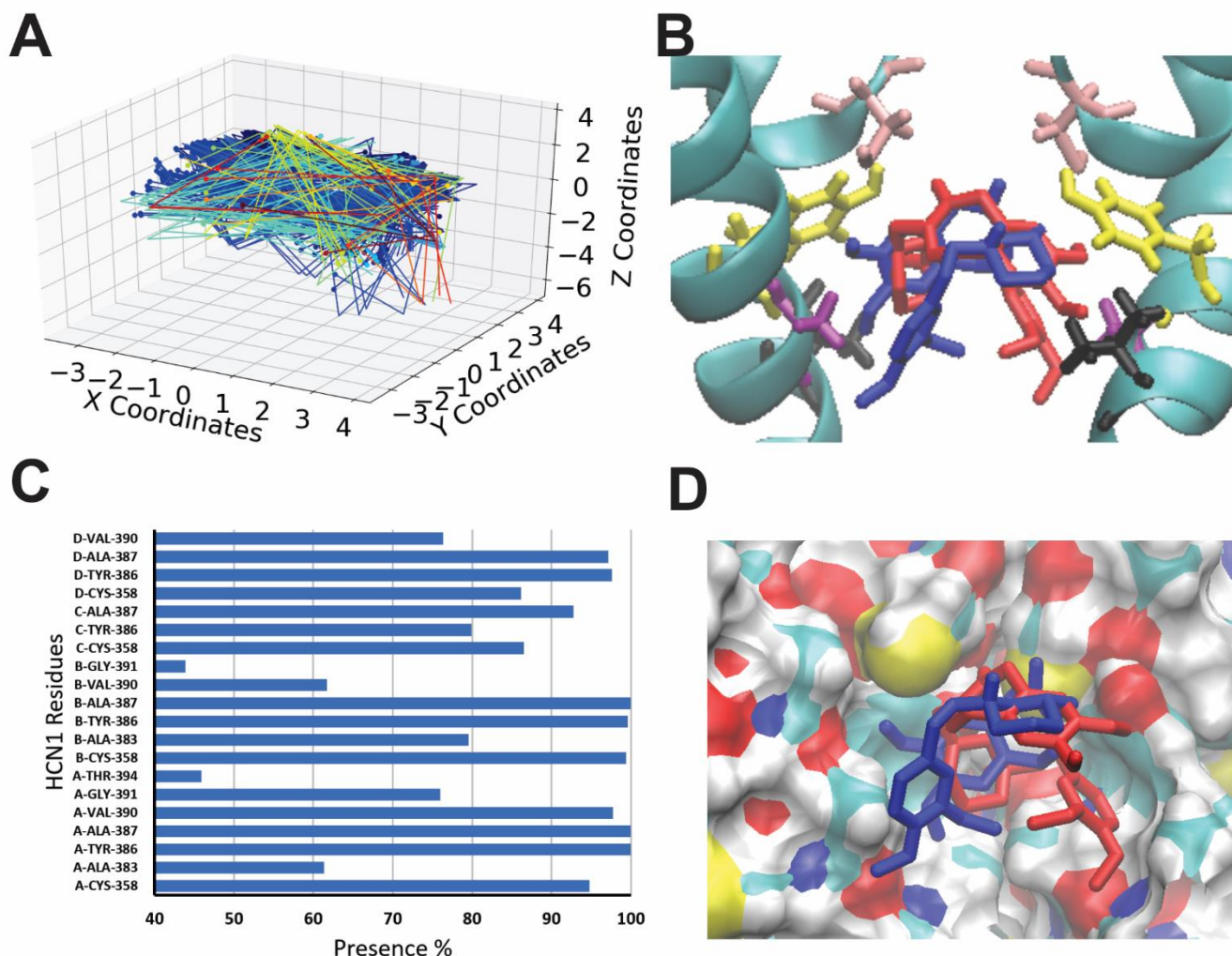
**Supp. Fig. 3. Docking of mepivacaine to the open HCN1 pore.** (A) Clustering analysis of the 500 docking attempts. Docks can be placed into 2 clusters according to our automated algorithm. (B) The representative poses from cluster 1 (blue) and cluster 2 (red) are shown. C358 (pink), Y386 (yellow), A387 (purple) and V390 (black) are also highlighted (C) The frequency of residues within 4Å of the ligand for each pose was assessed and is indicated as a percentage. (D) Both docking conformations allow for the the mepivacaine rings to be oriented into the hydrophobic groove in the pore cavity.



**Supp. Fig. 4. Docking of bupivacaine to the open HCN1 pore. (A)** Clustering analysis of the 500 docking attempts. Docks can be placed into 3 clusters according to our automated algorithm. **(B)** The representative poses from cluster 1 (blue) which contains the majority of docks is shown with residues C358 (pink), Y386 (yellow), A387 (purple) and V390 (black) highlighted **(C)** The frequency of residues within 4Å of the ligand for each pose was assessed and is indicated as a percentage. **(D)** Bupivacaine docks similarly to mepivacaine, with both rings to be oriented into the hydrophobic groove in the pore cavity lined by residues C358, Y386, and A387, however, the extended butyl group on the aromatic ring points toward the pore axis, which we predict would better occlude permeating ions.



**Supp. Fig. 5. Docking of zatebradine to the open HCN1 pore. (A)** Clustering analysis of the 500 docking attempts. Docks cannot be placed into clusters according to our algorithm with the ligand freely rotating 360° around the pore axis. **(B)** Similar to the two docking poses shown, zatebradine takes on a U-shape in the pore in all docking formations. Residues C358 (pink), Y386 (yellow), A387 (purple) and V390 (black) are highlighted. **(C)** The frequency of residues within 4Å of the ligand for each pose was assessed and is indicated as a percentage. **(D)** Similar to ivabradine, no portion of zatebradine can fit into the hydrophobic groove within the pore cavity.



**Supp. Fig. 6. Docking of cilobradine to the open HCN1 pore. (A)** Clustering analysis of the 500 docking attempts. Docks cannot be placed into clusters according to our algorithm with the ligand freely rotating 360° around the pore axis. **(B)** Similar to the two docking poses shown, cilobradine takes on a U-shape in the pore in all docking formations. Residues C358 (pink), Y386 (yellow), A387 (purple) and V390 (black) are highlighted. **(C)** The frequency of residues within 4Å of the ligand for each pose was assessed and is indicated as a percentage. **(D)** Similar to ivabradine and zatebradine, no portion of zatebradine can fit into the hydrophobic groove within the pore cavity.



## CHAPITRE 5

### RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

#### 5.1 HCN1 en conformation fermée

Nos résultats obtenus indiquent que la conformation fermée du canal HCN1 observée par la structure cryo-EM ne peut pas être la même conformation que l'état lié par un ligand, puisque la cavité est trop petite pour que le ligand y réside. Nous avons donc entrepris de prédire la structure de la conformation du pore lié par les ligands pour les divers inhibiteurs de HCN connus utilisés dans l'étude précédente. Nous avons généré 6 états intermédiaires putatifs entre les modèles à pore fermé et ouvert de l'étude précédente en utilisant le serveur Web Yale Morph2 (<http://morph2.molmovdb.org/submit.html>). Nous avons ensuite effectué des études d'arrimage similaires à chacune des 6 structures intermédiaires. Le tableau 5.I résume les résultats des états intermédiaires capables d'interagir avec chacun des bloqueurs de pores connus de HCN. Selon nos observations, la cavité du pore du premier état intermédiaire putatif est resté trop serrée pour permettre à l'un des ligands d'interagir. Des ligands plus petits tels que clonidine, alinidine et les « -caïnes » étaient capables d'interagir avec le second modèle intermédiaires, tandis que ZD7288 et les « -bradines » nécessitaient une ouverture supplémentaire fournie par le troisième état intermédiaire.

Bien que nous n'ayons pas encore procédé à une analyse approfondie de la liaison de ces modes d'interactions, ces résultats fournissent une base pour de futures études détaillées. L'analyse complète des résidus interagissant ainsi que des liaisons qui se forment entre les ligands et ces états intermédiaires est prévue. Notamment, nous allons concentrer notre recherche sur l'interaction entre les petits ligands et I2 et les gros ligands avec I3 pour avoir une meilleure idée des contraintes associées à la fermeture des canaux.

TABLE 5.I – Table répertoriant les états intermédiaires qui permettent l’entrée de chacun des ligands dans le pore.

	Iso 1	Iso 2	Iso 3	Iso 4	Iso 5	Iso 6
Clonidine		x	x	x	x	x
Alinidine		x	x	x	x	x
Lidocaïne		x	x	x	x	x
Mépipivacaïne		x	x	x	x	x
Bupivacaïne		x	x	x	x	x
ZD7288			x	x	x	x
Ivabradine			x	x	x	x
Zatebradine			x	x	x	x
Cilobradine			x	x	x	x

## 5.2 Isoformes HCN1, HCN2 et HCN4

Pour une comparaison complète, nous avons aussi amarré les ligands aux isoformes HCN2 et HCN4. Dans tous les cas, nous nous sommes basés sur l’index du résidu du canal HCN1 comme référence afin de comparer les autres canaux sur la même séquence d’acide aminés tel que rapportée dans le tableau ci-dessous. De plus, dans la majorité des cas, les ligands font contact avec les mêmes résidus de plusieurs chaînes. Afin d’évaluer l’importance des résidus individuellement, nous avons choisi de représenter uniquement la chaîne qui comporte le maximum d’interaction. Ivabradine par exemple entre en contact avec les 4 chaînes des canaux HCNs. Par contre, la chaîne qui comporte le plus haut taux d’interaction représentera mieux l’interaction la plus probable et donc l’importance des résidus dans l’interaction avec le ligand.

Aussi, nous avons établi un taux d’interaction seuil à 40% pour limiter l’analyse aux résultats les plus représentatifs et rejeter les résidus sans importance. Nous avons jugé qu’en dessous de cette valeur, le résidu n’est pas considéré comme crucial dans la liaison.

---

TABLE 5.II – Table de références d'équivalence des résidus entre les isoformes HCN1, HCN2 et HCN4.

HCN1	HCN2	HCN4
L357	L426	L477
C358	C427	C478
A383	A452	A503
Y386	Y455	Y506
A387	A456	A507
V390	I459	I510
G391	G460	G511
T394	T463	T514

### 5.2.1 Clonidine et son dérivé alinidine

Pour la clonidine, on observe des résultats qui sont assez similaires à ceux obtenus avec HCN1. Par contre, la variation importante au niveau du résidu Y386 et A387 est capitale. Les résultats obtenus avec HCN1 semblent indiquer que la cavité formée par les résidus 386 et 387 est le site d'interaction le plus favorable. Pourtant, une diminution du contact avec Y386 pour HCN2 et A387 pour HCN4 semble indiquer que les interactions sont spécifiques aux isoformes. Les résultats obtenus avec HCN2 sont inattendus vu l'importance qu'avait le résidu Y386 dans l'interaction du ligand avec HCN1.

En ce qui a trait à alinidine, il entre en contact avec les résidus A383 et L357 lorsqu'amarré avec les isoformes HCN2 et HCN4, mais pas avec HCN1. Ceci indique que le ligand se lie à une position légèrement supérieure dans le pore. Encore une fois, dû au nombre réduit de groupes de poses, cette interaction est très précise entre les résidus mentionnés ci-haut et le ligand. Les interactions obtenues avec les nouveaux résidus sont donc aussi stabilisantes que celles obtenues avec HCN1. Il est important de noter qu'il est possible qu'alindine interagisse aussi avec A383 dans le canal HCN1, mais que cette interaction se situe sous le seuil établi à 40%.

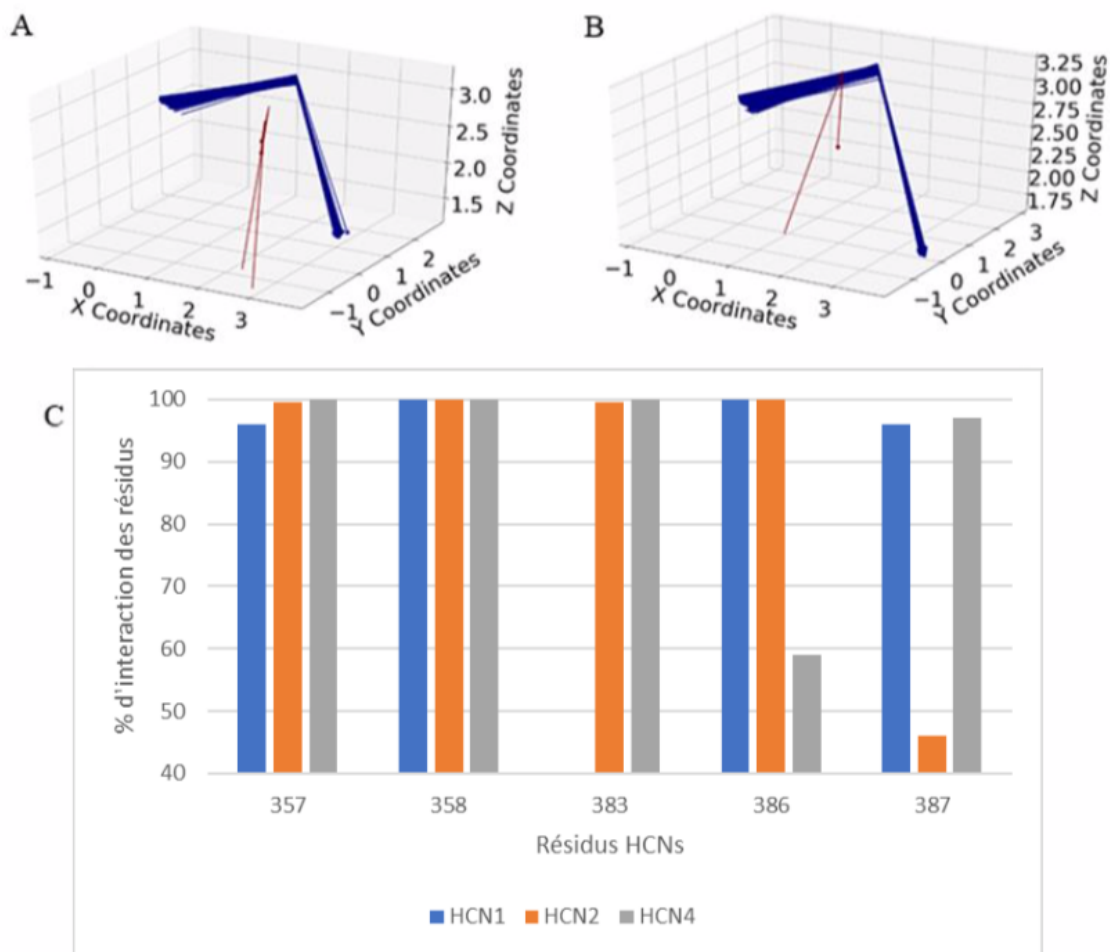


FIGURE 5.1 – Comparaison des interactions de clonidine avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l'amarrage de 500 poses de clonidine sur HCN2. (B) Résultat de l'amarrage de 500 poses de clonidine sur HCN4. (C) Histogramme du taux d'interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs. [96].

### 5.2.2 Lidocaïne et ses dérivées

L'interaction de la lidocaïne avec HCN1, HCN2 et HCN4 diffère majoritairement aux extrémités du pore. D'une part, le résidu L357 interagit seulement avec HCN1 puisque le taux d'interactions avec les autres isoformes est inférieur à 40%. D'un autre côté, on observe que l'interaction avec la valine chez HCN1 est moins commune que celle observée lorsque le résidu est l'isoleucine tel qu'observé chez HCN2 et HCN4.

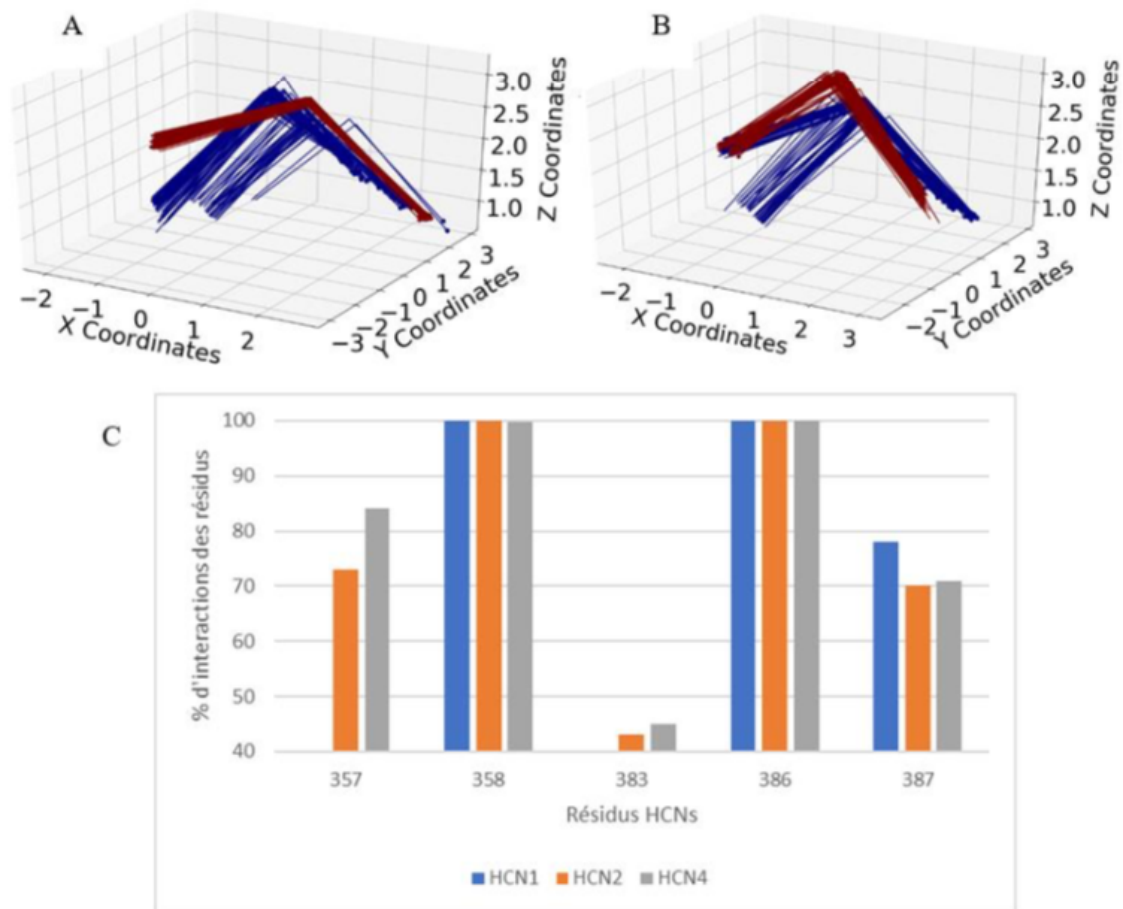


FIGURE 5.2 – Comparaison des interactions d’alinidine avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l’amarrage de 500 poses d’alinidine sur HCN2. (B) Résultat de l’amarrage de 500 poses d’alinidine sur HCN4. (C) Histogramme du taux d’interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l’amarrage d’alinidine sur les canaux HCNs. [96].

Les isoformes HCN2 et HCN4 conservent l’orientation générale des poses au même titre que les interactions dans la cavité observée sur HCN1.

Les résultats du ligand bupivacaïne indiquent que les interactions dans le centre du pore sont très similaires à celles obtenues avec HCN1. Par contre, on n’observe pas d’interaction avec le résidu V390 des autres isoformes se situant sous le seuil. Ce ligand atteint une zone inférieure du pore dans HCN1, plus accessible que ses homologues. Ce

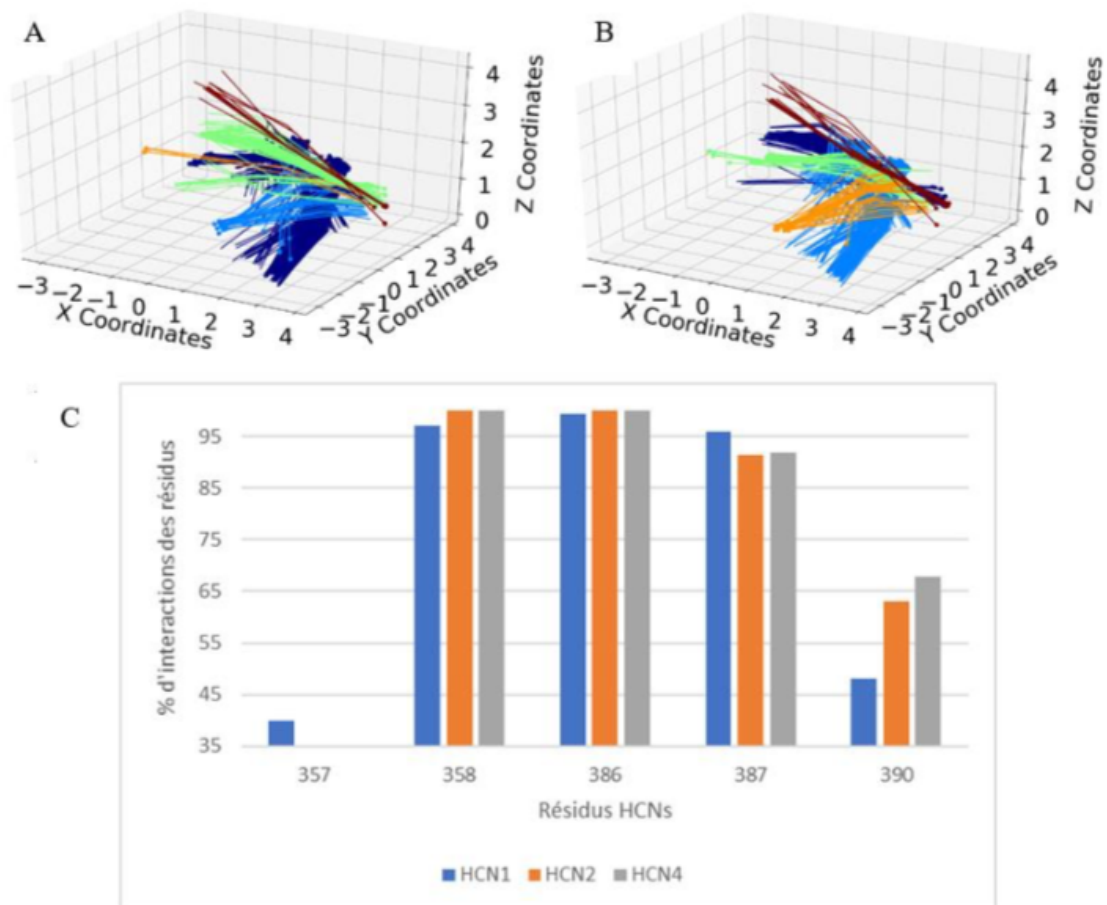


FIGURE 5.3 – Comparaison des interactions de lidocaïne avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l’amarrage de 500 poses de lidocaïne sur HCN2. (B) Résultat de l’amarrage de 500 poses de lidocaïne sur HCN4. (C) Histogramme du taux d’interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l’amarrage de lidocaïne sur les canaux HCNs. [96].

résidu constitue la seule différence dans la liaison du ligand avec les isoformes de HCNs.

Pour mépivacaïne, on observe l’opposé au niveau du résidu V390. Son équivalent dans les isoformes HCN2 et HCN4 est plus accessible par mépivacaïne que dans HCN1. Ceci pourrait être relié à la présence d’isoleucine au lieu de valine. Le changement de résidu semble donc causer une différence dans l’interaction de la protéine et des membres de la famille -caïnes. Il se pourrait aussi que les différences subtiles qui se situent sur la chaîne aliphatique de la pipéridine entre bupivacaïne et mépivacaïne soient responsables

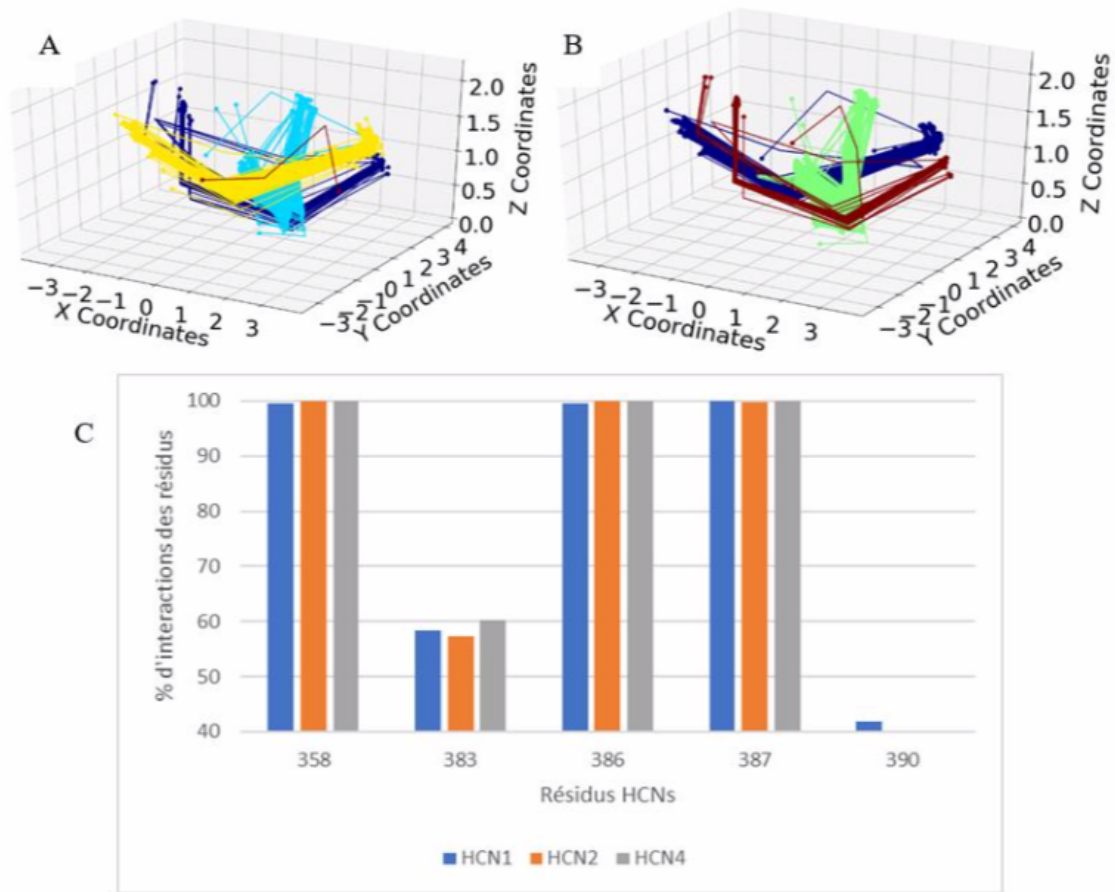


FIGURE 5.4 – Comparaison des interactions de bupivacaine avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l’amarrage de 500 poses de bupivacaine sur HCN2. (B) Résultat de l’amarrage de 500 poses de bupivacaine sur HCN4. (C) Histogramme du taux d’interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l’amarrage de bupivacaine sur les canaux HCNs. [96].

de ces résultats.

### 5.2.3 ZD7288

ZD7288 entre en contact avec un grand nombre de résidus différents sans toutefois offrir de différence entre les isoformes d’HCNs. Contrairement aux ligands de la famille des caïnes, ZD7288 interagit autant au niveau supérieur (A383) et inférieur (V390) du pore. Par contre, on observe une différence assez importante au niveau des résidus de

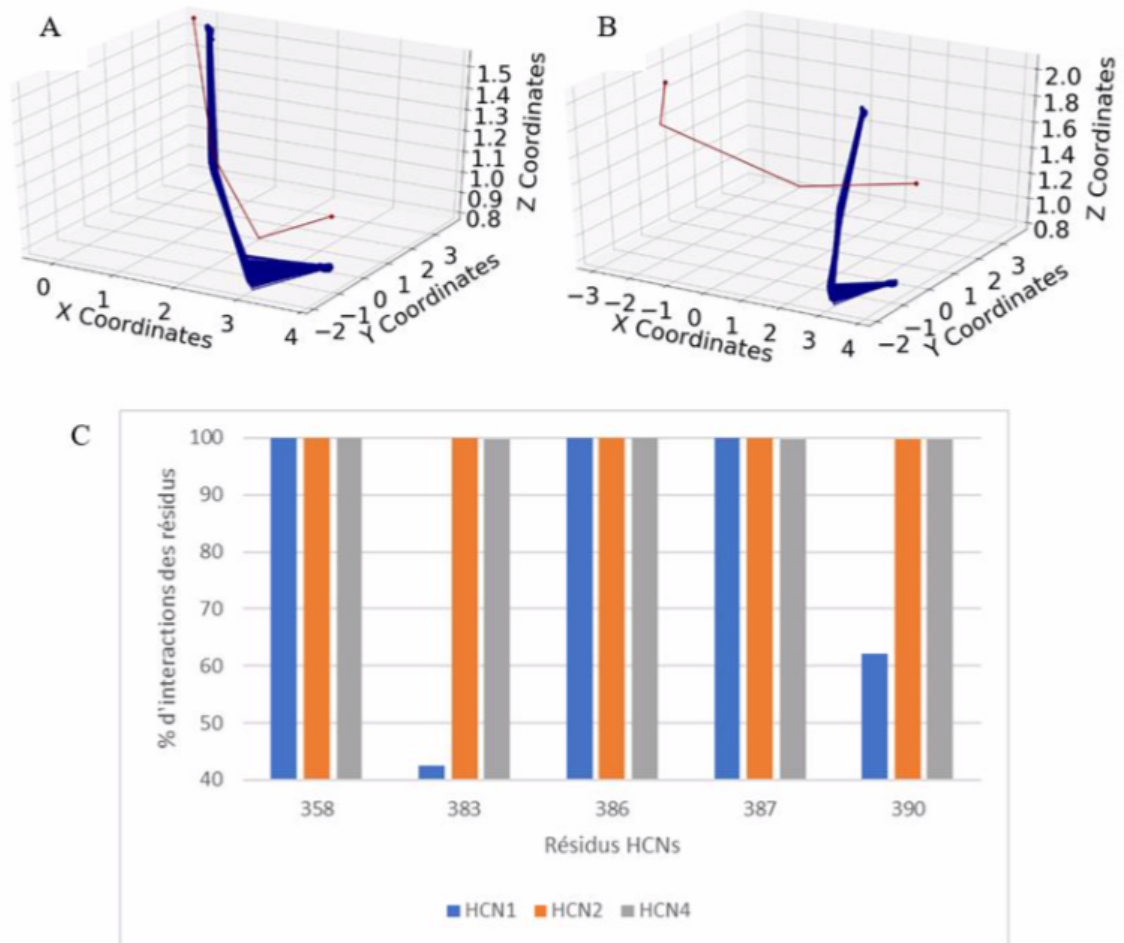


FIGURE 5.5 – Comparaison des interactions de mépivacaïne avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l’amarrage de 500 poses de mépivacaïne sur HCN2. (B) Résultat de l’amarrage de 500 poses de mépivacaïne sur HCN4. (C) Histogramme du taux d’interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l’amarrage de mépivacaïne sur les canaux HCNs. [96].

la zone supérieure du pore. L’interaction avec A383 semble plus favorable avec HCN1 alors que les autres isoformes semblent aligner le ligand vers le résidu L357 (Figure 21).



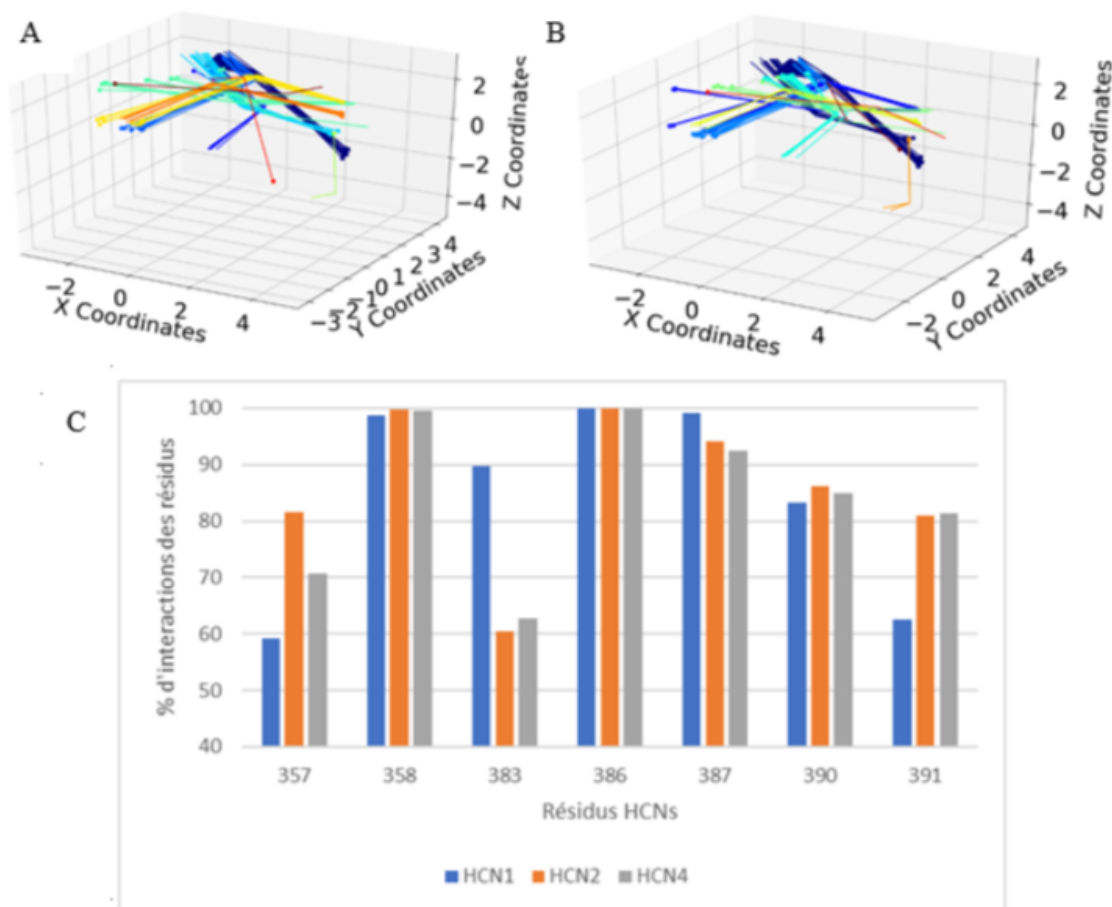


FIGURE 5.6 – Comparaison des interactions de ZD7288 avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l’amarrage de 500 poses de ZD7288 sur HCN2. (B) Résultat de l’amarrage de 500 poses de ZD7288 sur HCN4. (C) Histogramme du taux d’interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l’amarrage de ZD7288 sur les canaux HCNs. [96].

## 5.2.4 Ivabradine et ses dérivées

Les interactions d’ivabradine avec les différents isoformes des canaux HCNs sont indépendantes de l’isoforme utilisés comme démontré sur le tableau ci-dessus. Des différences subtiles se notent mais n’ont qu’une influence mineure. Les interactions ayant le plus de portées se situent sur les résidus A383, dans la zone supérieure du pore, et G391, dans la zone inférieure. Ces résultats concordent bien avec ce que l’article joint

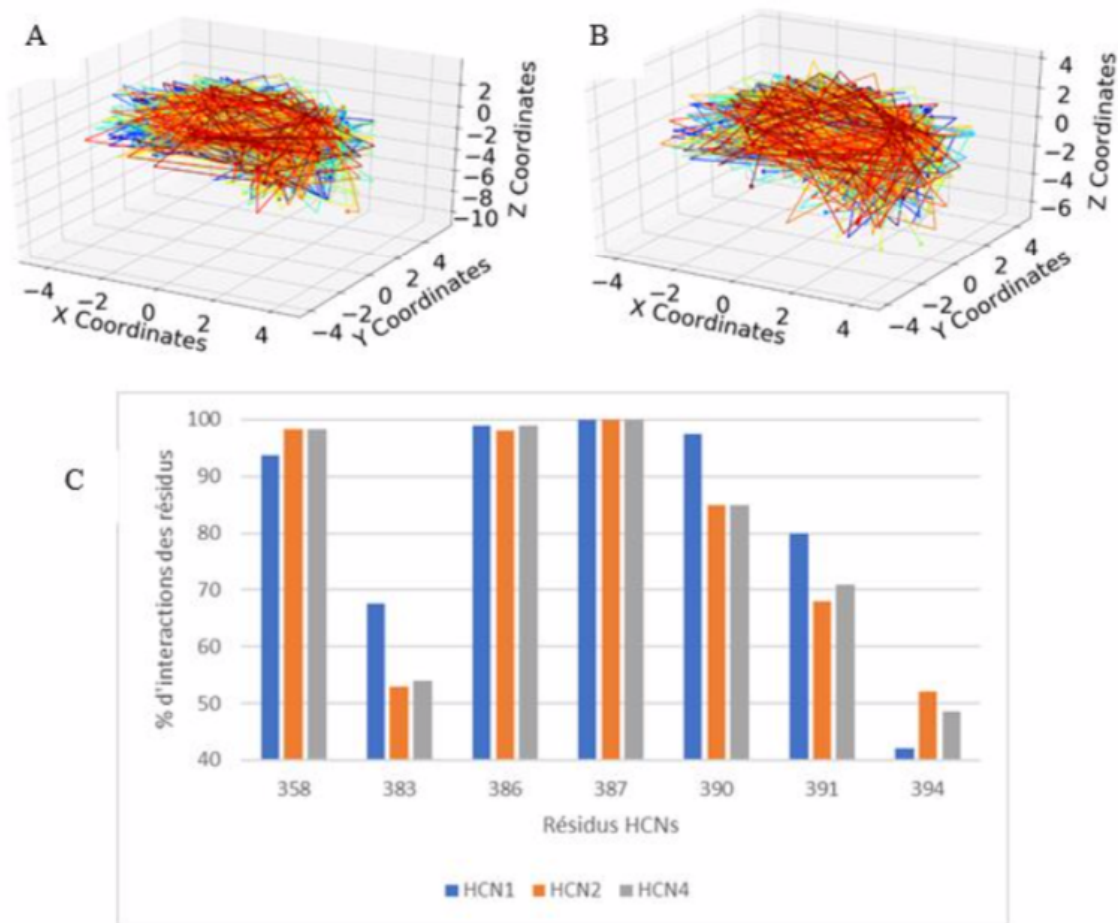


FIGURE 5.7 – Comparaison des interactions d’ivabradine avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l’amarrage de 500 poses d’ivabradine sur HCN2. (B) Résultat de l’amarrage de 500 poses d’ivabradine sur HCN4. (C) Histogramme du taux d’interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l’amarrage d’ivabradine sur les canaux HCNs. [96].

démontre avec HCN1, à savoir qu’ivabradine ne forme aucun lien solide avec la protéine cible, et que son blocage serait dû à son volume qui occupe une grande partie du pore.

Zatébradine est un dérivé d’ivabradine et s’amarre exactement comme ce dernier. Le composé interagit avec beaucoup de résidus sans pour autant formé de liens solides ce qui est observé par l’orientation aléatoire de poses finales obtenues peu importe l’isoforme d’HCN. Si différences il y a, il faut se pencher sur la zone supérieure du pore où

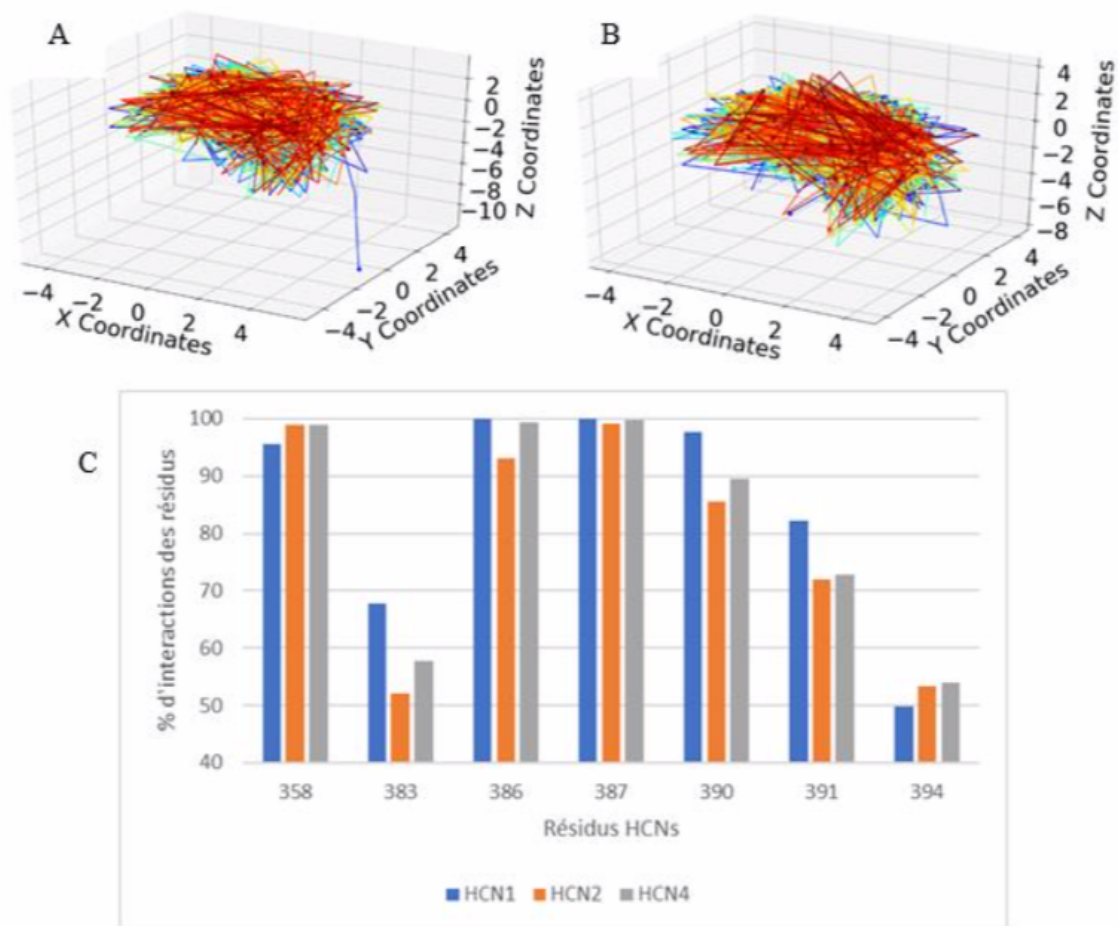


FIGURE 5.8 – Comparaison des interactions de zatebradine avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l’amarrage de 500 poses de zatebradine sur HCN2. (B) Résultat de l’amarrage de 500 poses zatebradine sur HCN4. (C) Histogramme du taux d’interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l’amarrage de zatebradine sur les canaux HCNs. [96].

la coordination du ligand diffère d’un isoforme à l’autre.

L’autre dérivé d’ivabradine a aussi le même comportement avec tous les isoformes des canaux HCNs. Par contre, pour les trois membres de la famille « -bradine » on observe une plus grande interaction avec le résidu A383 et un taux plus faible d’interaction avec T394.

D’après les résultats obtenus pour toutes les classes de bloqueurs des HCNs, le chan-

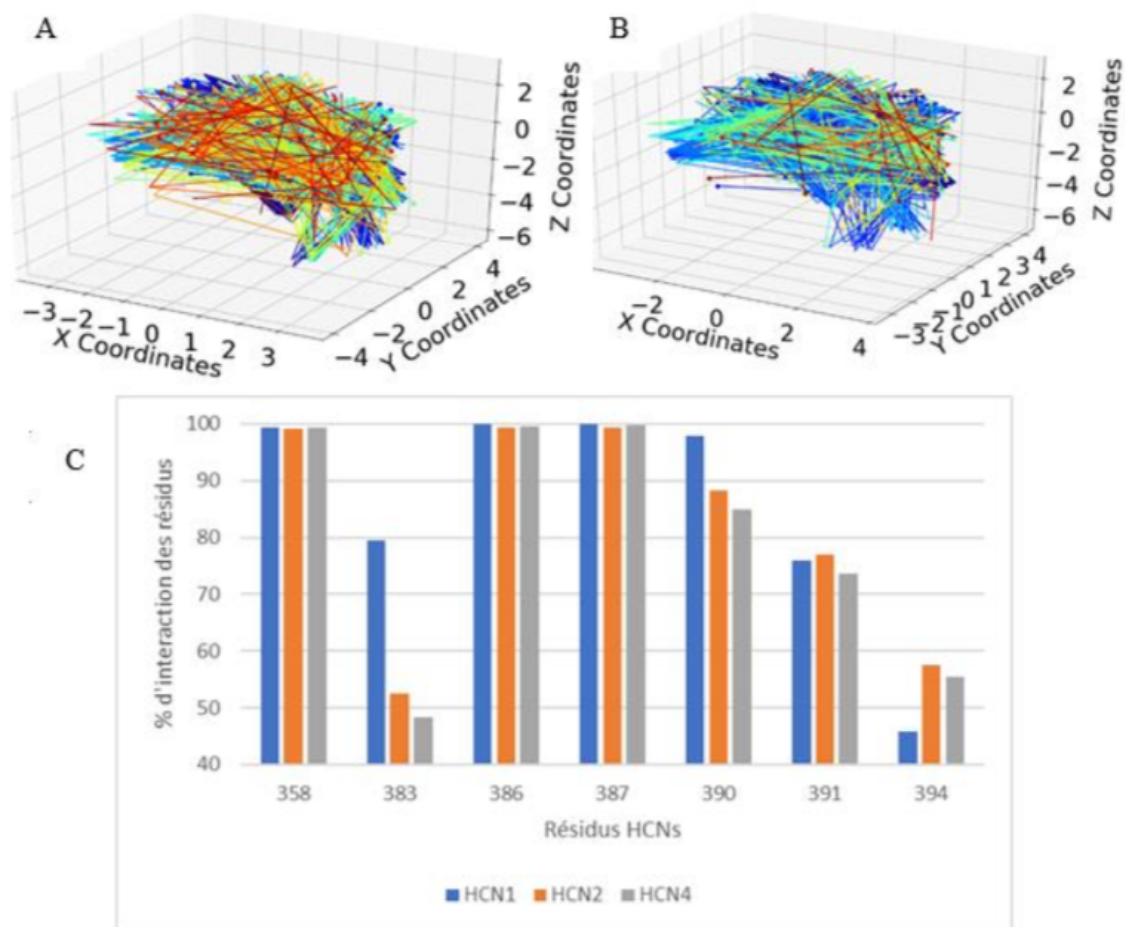


FIGURE 5.9 – Comparaison des interactions de cilobradine avec les isoformes HCNs. (A) Résultat de l’amarrage de 500 poses de cilobradine sur HCN2. (B) Résultat de l’amarrage de 500 poses de cilobradine sur HCN4. (C) Histogramme du taux d’interactions entre les résidus et les isoformes des canaux HCNs lors de l’amarrage de cilobradine sur les canaux HCNs. [96].

gement du résidu valine pour isoleucine dans les isoformes HCN2 et HCN4 aurait un effet sur l’accessibilité des ligands vers la zone inférieure du pore. De plus, les résultats obtenus pour l’amarrage de clonidine indique qu’il y aurait des interactions différentes dans la cavité découverte par nos résultats sur HCN1. On observe notamment que le résidu Y386 dans HCN2 et A387 dans HCN4 ont un taux d’interaction beaucoup plus faible qu’observé en HCN1. Pourtant, nos résultats présentés dans l’article

---

suggèrent que ces deux résidus forment des interactions clés avec clonidine. Le résidu A383 semble aussi être un élément clé dans les différences entre les isoformes des canaux HCNs. Pour clonidine, alinidine et mépivacaïne, on observe un taux d'interaction beaucoup plus faible chez HCN1 que les autres isoformes alors que pour ZD7288 et les membres de la famille « -bradine », on observe l'opposé.

## CHAPITRE 6

### DISCUSSIONS

Les canaux HCNs sont des cibles très importantes dans la recherche du traitement du système nerveux et de la régulation du rythme cardiaque. À ce jour, il n'existe aucune médication parfaitement spécifique envers les canaux HCNs et encore moins spécifique aux isoformes de ces canaux. Nous avons donc comparé l'interaction entre les canaux HCN1, HCN2, HCN4 et 9 de leurs inhibiteurs connus dans le but d'examiner les interactions clés qui pourraient nous guider vers une molécule plus spécifique envers les différents isoformes de ces canaux. Des études similaires avaient déjà été effectuées avec HCN1, mais se basaient sur un modèle homologue provenant de la structure du canal KcsA alors que le modèle employé pour ces résultats correspond à un modèle ouvert généré à partir de la structure du canal HCN1 fermé résolu par cryo-EM et qui comprend quelques différences aux niveaux du pore. Nous avons donc basé nos recherches sur cette section pour examiner directement l'impact de ses différences d'alignements.

#### 6.1 Comparaisons entre inhibiteurs

##### 6.1.1 HCN1 fermé

L'amarrage de chaque ligand fut effectué à 500 reprises face au modèle HCN1 fermé pour cibler les interactions critiques avec le pore. Parmi tous les candidats, aucun n'a pu accéder au pore. Ceci suggère l'existence d'une conformation fermée-liée pour le canal HCN1. Ceci serait en accord avec des études précédentes qui suggèrent qu'ivabradine et que ZD7288 serait enfermé dans la conformation fermée du canal alors que nous avons mesuré la largeur du pore à environ  $7.7\text{\AA}$  au niveau du résidu Y386, une largeur insuffisante pour la présence de ces 2 molécules.

---

### 6.1.2 HCN1 : l'état ouvert

Les résultats obtenus en comparant les interactions avec les différents isoformes des canaux HCNs ont permis d'établir quelques résidus clés qui permettent de se guider vers une meilleure sélectivité. Pour commencer, on observe 2 catégories d'interactions avec HCN1. Les ligands de plus petite taille interagissent en pénétrant une cavité du pore qui est inaccessible aux molécules plus volumineuses tel ivabradine. On se retrouve donc avec 2 méthodes de blocage complètement différentes, c'est-à-dire : pied dans la porte versus clé dans le verrou. D'après nos résultats, les énergies de liaisons sont du même ordre et sont largement élevées pour supposer que les interactions ont bien lieu entre les molécules. Par contre, les nombreuses recherches faites sur les canaux HCNs ont montré qu'ivabradine était la molécule la plus efficace pour un traitement envers les canaux HCNs ayant une meilleure capacité à bloquer ces canaux. Il semblerait donc que le mécanisme qu'utilise ivabradine serait plus efficace que celui des petites molécules.

Malgré tout, lorsqu'on compare l'énergie de liaison par atome non-hydrogéné, ce sont les ligands de petites tailles qui dominent laissant croire qu'une optimisation de cette méthode d'interaction pourrait surpasser les résultats d'Ivabradine. Nous avons aussi observé que lidocaïne ne pouvait atteindre la cavité hydrophobe que d'un côté obstruant donc le pore avec le reste de ses atomes. Comparant avec les résultats de ses dérivés, on observe que lidocaïne est beaucoup moins contraint dans le pore. Selon la théorie, lidocaïne serait aussi le meilleur bloqueur parmi ses dérivés indiquant que cette liberté de mouvement dans le pore pourrait être une nécessité pour avoir un blocage plus adéquat. Dans tous les cas, peu importe l'isoforme, la famille « Bradine » ne forme aucune liaison constante ce qui semble indiquer que leur méthode de blocage n'est pas très appropriée pour obtenir une spécificité entre isoformes. Aussi, les résultats semblent indiquer que certains ligands ont moins d'affinité pour A383 comme clonidine, alinidine et mépivacaïne lorsque amarré sur HCN1 alors que l'opposé est observé chez des ligands tels ZD7288, ivabradine, zatébradine et cilobradine. Ces résultats pourraient être une piste viable dans la confection d'un médicament spécifique aux isoformes des HCNs. De plus, la cavité hydrophobique identifiée dans HCN1 est un endroit qui diverge entre

---

les isoformes puisque nos résultats démontrent une affinité spécifique des ligands. Notamment, on observe que clonidine semble moins interagir avec le résidu Y386 dans HCN2 et A387 dans HCN4, les 2 résidus responsables de la formation de la cavité. Pour finir, le changement de leucine vers isoleucine offrent une modulation de l'accessibilité des ligands vers la zone inférieure du pore.

## 6.2 Molécules futures

Nos recherches sur les canaux HCNs permettent d'établir les interactions clés qui mènent vers la formation d'un ligand plus spécifique pour les canaux HCNs. Nous avons observé le taux d'interaction des résidus qui constituaient le pore et avons pu identifier les liaisons spécifiques à chaque ligand qui permet leur coordination. L'identification des liaisons hydrogène et de l'empilement pi qui permet aux ligands de se rassembler en groupes sera un départ clé dans le développement future. De plus, l'identification d'une cavité formée par les résidus Y386 et A387 nous a permis d'identifier 2 modes différents d'interactions entre les ligands et la protéine. Il y a la famille « -bradine » qui ne forment aucun lien solide vis-à-vis des ligands de petite taille puisqu'ils vont se loger dans la cavité et interagir aux moyens de liens stables.

En ce qui concerne la création de ligands spécifiques envers les isoformes des canaux HCNs, nous avons établis certains résidus : A383 et V390 pour lesquels les interactions différaient entre isoformes. Néanmoins, vu la ressemblance entre les différents isoformes, la spécificité entre HCNs serait plus facile à obtenir en se basant sur les différences de propriétés des canaux. Chaque isoforme de la famille HCN possède des cinétiques d'ouverture unique qui pourrait influencer l'interaction avec les ligands. Des recherches ont montré par exemple qu'ivabradine se retrouve enfermé dans la conformation occluse de HCN4, ce qui rend ce composé plus efficace lors d'une ouverture lente.

Chaque ligand possède donc sa propre dépendance envers l'état et la cinétique de la protéine en plus d'être différent au niveau de sa dépendance d'utilisation. Nous pensons donc que ces dépendances seront cruciales pour déterminer la molécule spécifique envers



---

les différents isoformes des canaux HCNs[97].

## **6.3 Validation**

### **6.3.1 Zone d'arrimage**

Le site sélectionné pour l'amarrage correspond au pore des canaux HCNs et fut choisi à partir des connaissances sur les ligands utilisés. Premièrement, notre but était d'obtenir des informations sur les interactions du pore. De plus, le but était entre autres de comparer les interactions d'amarrage observables pour ivabradine, agissant sur le pore, et d'autres ligands. Une boîte d'amarrage centré sur cette région était donc justifiable. Aussi, augmenter cette zone peut faire apparaitre des résultats non pertinents alors qu'une trop petite aurait comme conséquence de manquer des sites importants dû au trop grand nombre de poses aléatoires. Les énergies de liaison favorable pour les interactions suggèrent que la zone d'amarrage était appropriée pour les informations désirées.

### **6.3.2 Partitionnement des données**

La méthode de partitionnement utilisée avait pour but de comparer les résultats de différents ligands. Pour ce faire, nous avons opté pour un algorithme n'ayant recours à aucune contribution subjective. La fonction de pointage mise en place permet de noter chaque partition ainsi que de les comparer avec les partitions voisines pour obtenir un pointage S propre à chaque groupe. D'après les recherches, l'algorithme est très utile pour repérer les données non groupables comme on observe avec le faible regroupement effectué sur les résultats d'ivabradine et de ses dérivées.

## **6.4 Limitations**

### **6.4.1 Flexibilité**

Dans le programme Autodock utilisé dans cette recherche aucune flexibilité de la protéine n'est offerte durant l'amarrage. Cette simplification pourrait avoir un impact sur les résultats obtenus. D'une part, une plus grande flexibilité de la protéine pourrait

---

permettre aux petits ligands qui peuvent atteindre la cavité formée par les résidus Y386 et A387 de se rendre plus profondément dans la cavité et ainsi, obtenir une affinité plus représentative. De plus, rendre la protéine flexible pourrait permettre à ivabradine et ses dérivés de s'orienter et de se regrouper. Pour tester ces hypothèses, il faudrait employer la dynamique moléculaire. Cette technique permet de visualiser les interactions entre deux molécules flexibles mais demande beaucoup plus de temps computationnel que l'amarrage. L'emploi de la dynamique moléculaire pourrait aussi servir à tester la distinctivité des groupes. Avec le mouvement de la protéine, il est possible que 2 groupes distincts convergent pour se rassembler, modifiant les résultats obtenus.

#### **6.4.2 Partitionnement des données**

Autodock prend en compte l'encombrement stérique pour l'amarrage et nous fournit la position finale obtenue par chacune des poses. De cette position, on utilise notre algorithme pour partitionner les données. Par contre, il serait possible d'utiliser l'énergie de liaison pour mieux partitionner les données. Autodock calcul l'énergie de liaison à partir de 4 types d'énergie différente : les interactions de Van der Waals, les liaisons hydrogène, l'électrostatique et la désolvatation. En utilisant la valeur de chaque composante, il serait possible de vérifier si 2 poses près l'une de l'autre font vraiment partie du même groupe. Une légère fluctuation positionnelle pourrait permettre une liaison et donc un groupe entièrement différent. Par exemple, les résultats obtenus par clonidine constituent 2 groupes très rapprochés, mais pour lesquels les types d'interactions sont différents.

De plus, la première pose est toujours sélectionnée aléatoirement, ce qui pourrait affecter les résultats puisqu'on se base sur les poses déjà analysées pour attribuer un groupe à la prochaine pose à regrouper. Notamment, sur des résultats tel qu'ivabradine, on observe une grande variance dans le nombre total de groupes si l'on répète l'analyse, mais dans tous les cas, le nombre n'est jamais inférieur à 300.

---

## **6.5 Utilisation de notre algorithme**

Nous avons utilisé un nouvel algorithme de partitionnement afin de comparer l'interaction entre différents ligands et les protéines HCNs. Par contre, la méthode que nous avons employée peut être appliquée pour n'importe quelle protéine. Le grand avantage de notre méthode consiste en l'absence de sélection non appuyée. C'est-à-dire, que le nombre obtenu de regroupement pour chacun des ligands étudiés ici fut sélectionné selon les mêmes critères sans aucun biais humain. Ce faisant, la comparaison effectuée peut être appuyée mathématiquement, mais aussi reproduite sur un ensemble de protéine et ligands sans perdre de rigueur vis-à-vis des comparaisons désirées. Contrairement à la méthode K-moyenne, qui nécessite un choix du nombre K de partition qui peut être arbitraire selon les cas, notre algorithme prend en considération différents partitionnements effectués avant de choisir le plus adapté. Cette méthode rend le processus complètement automatique et à un faible coût de temps de calcul vu sa simplicité.

### **6.5.1 HCNs plus en détails**

Si on désire rester dans le domaine des HCNs, on peut étudier les interactions des sous-unités qui ont déjà été identifiées comme interagissant avec les canaux HCNs comme la cavéoline ou encore KCNE2. On pourrait aussi étudier les différences d'interactions entre cAMP et cGMP au niveau du CNBD pour identifier les différences clés de ces liaisons.

Des études ont aussi démontré que l'interaction des canaux HCNs avec des lipides est nécessaire pour effectuer leurs rôles physiologiques. L'analyse de ces différentes interactions avec les canaux HCNs pourrait mener vers de nouvelles molécules plus spécifiques et plus efficace.

### **6.5.2 Dépistage en général**

De plus, le dépistage de molécule avec objectif l'obtention d'un médicament devient de plus en plus courant dans le domaine de la pharmacologie. On voit de nombreuses recherches évoluées dans cette direction. Cette application n'est donc aucunement exclu-

---

sive au canaux HCNs. La recherche présentée ici comportait sur la spécificité des canaux HCNs vu leur importance pharmaceutique. Par contre, il existe une multitude d'autres canaux de transport aussi important au niveau clinique qui mériterait d'être étudié. Lors de nos recherches, nous avons pris soins de rendre nos méthodes le plus générales et absent de biais possible afin de permettre le pont vers d'autres cibles. Ce faisant, plusieurs autres liaisons pourront être observées très facilement.

## **6.6 Projets futurs**

### **6.6.1 In vivo**

Tel que mentionné, les résultats obtenus comportent des limites. Des tests in vivo seront nécessaire pour confirmer et approfondir les recherches présentés. Aussi, il serait pertinent de comparer l'efficacité de blocage des différents ligands sur le même organisme pour obtenir une valeur de comparaison plus appropriée. Ces résultats pourraient aussi nous aider à comprendre les liens entre les interactions et l'efficacité du blocage ainsi que de déterminer la réversibilité de chaque interactions.

Ces tests seront d'autant plus nécessaire pour tenter de comprendre les différents types de blocage dans les canaux HCNs puisqu'on observe différents liaisons qui produisent des blocages. Tel que mentionné, l'approche présentée ici représente une méthode de ciblage des sites importants d'interactions qui rendra plus efficace le développement de molécules spécifiques.

### **6.6.2 Hétéromères des canaux HCNs**

Les canaux HCNs sont homéomères ou hétéromères dans l'organisme. Il faudrait donc analyser les interactions des mêmes ligands sur des hétéromères des canaux HCNs afin d'obtenir une référence plus complète des interactions qui seraient possible et envisageable thérapeutiquement. Bien entendu, comme discuté précédemment, l'algorithme employé permettrait directement de comparer les canaux hétéromères avec les canaux homéomères suite à l'utilisation du logiciel Autodock.

---

### **6.6.3 Dynamique moléculaire**

Employé la dynamique moléculaire serait aussi envisageable dans le future pour confirmer nos résultats et aussi améliorer la précision de certains regroupements. Ceci provient du fait que les canaux étaient immobilisés lors des tests de liaisons. En employant la dynamique moléculaire, il serait possible de voir les déplacements de certains ligands à l'intérieur des canaux. Ces déplacements pourraient entre autres, joindre 2 partitions, dans les cas ou 2 sites sont très rapprochés ou similaire. Aussi, il serait pertinent d'observer l'entrée des ligands dans les canaux pour comprendre plus en profondeur le cheminement des ligands qui mène à l'obstruction des canaux.

### **6.6.4 Mutations des canaux**

Nous avons identifié les résidus les plus impliqués dans l'interactions entre les canaux et les ligands. Pour tester leur importance, il serait nécessaire d'effectuer des mutations et de recommencer l'amarrage sur les nouveaux modèles obtenus. De plus, il est possible de tester ces mutations in vivo pour déterminer si l'interaction est toujours favorable, mais aussi, si l'interaction engendre un blocage plus efficace ou non. Les résidus Y386 et A387 sont les résidus les plus susceptible d'engendrer de nouvelles interactions et devraient donc être prioritaire.

## CONCLUSION

Notre algorithme nous a permis de comparer les interactions entre divers ligands et les canaux HCNs dans le but d'évaluer la possibilité d'un meilleur inhibiteur que celui présent sur le marché, ivabradine. D'une part au niveau de la spécificité, mais aussi au niveau de l'efficacité du blocage.

Pour assurer une constance dans la comparaison des ligands, nous avons développé un algorithme efficace de comparaison qui est en mesure d'évaluer arbitrairement une distance seuil de partitionnement. En utilisant cet algorithme pour analyser plusieurs ligands connus comme étant bloqueurs des canaux HCNs, nous avons identifiés les interactions clés de ces liaisons. Nos résultats suggèrent qu'ivabradine et ses dérivés ne se lient pas avec les résidus du pore, mais plutôt se replie sur elle-même et agit comme un bouchon sur le courant If. D'un autre côté, nous avons obtenu des interactions bien précises pour les autres ligands qu'ivabradine suggérant qu'une meilleure affinité pour les HCNs serait possible. La famille de clonidine par exemple posséderait une bien meilleure affinité avec le pore des canaux HCNs, ne formant que 2 et 3 regroupements distincts dans la région d'intérêt respectivement pour clonidine et alinidine alors que ivabradine semble être aucunement partitionnable ce qui en fait une excellente candidate de départ pour débiter la recherche.

Des recherches expérimentales seront nécessaires pour confirmer nos résultats. Effectivement, tous calculs obtenus furent réalisés dans un état stable pour la protéine. Pour des résultats plus en profondeur, il serait pertinent d'employer la dynamique moléculaire et d'observer en détail le chemin que suit chaque ligand avant de se lier. Ceci pourrait aussi nous aider à identifier si 2 sites de liaison rapprochés se combineraient dans certaines circonstances. Expérimentalement, il serait intéressant d'observer si l'ajout d'une mutation sur les résidus clés obtenus par notre recherche aurait un impact significatif sur les sites de liaisons et s'il serait possible de surpasser la spécificité que possède ivabradine actuellement avec les canaux HCNs.

Néanmoins, cette étude a permis de nous informer des interactions clés permettant de diriger les efforts vers un ligand plus efficace et spécifique. Aussi, la méthode proposée

---

pour identifier les sites clés à l'aide d'un partitionnement efficace peut être utilisé sur d'autres interactions. En effet, en utilisant une méthode de calcul pour déterminer le seuil de distance idéal pour le partitionnement, nous assurons une comparaison équitable entre les divers ligands utilisés. Cette méthode reste donc utilisable pour toute autre analyse de comparaison d'interactions de molécules. Par exemple, nous avons discuté de la possibilité de tester avec des hétéromères de la famille HCNs ainsi qu'avec un plus grand nombre de ligands. Par contre, rien n'empêche d'utiliser la même méthode pour trouver les interactions clés dans des canaux de transport complètement différent, ce qui pourrait être d'une grande aide dans la recherche vers la spécificité de d'autres liaisons.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] DiFrancesco, Dario. "Pacemaker mechanisms in cardiac tissue." *Annual review of physiology* 55.1 (1993) : 455-472.
- [2] DiFrancesco, D., et al. "Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node." *The Journal of physiology* 377.1 (1986) : 61-88.
- [3] Ludwig, Andreas, et al. "Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics." *The EMBO journal* 18.9 (1999) : 2323-2329.
- [4] Seifert, Reinhard, et al. "Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96.16 (1999) : 9391-9396.
- [5] Biel, Martin, et al. "Hyperpolarization-activated cation channels : from genes to function." *Physiological reviews* 89.3 (2009) : 847-885.
- [6] Robinson, Richard B., and Steven A. Siegelbaum. "Hyperpolarization-activated cation currents : from molecules to physiological function." *Annual review of physiology* 65.1 (2003) : 453-480.
- [7] Biel, Martin, et al. "Hyperpolarization-activated cation channels : from genes to function." *Physiological reviews* 89.3 (2009) : 847-885.
- [8] Kaupp, U. Benjamin, and Reinhard Seifert. "Molecular diversity of pacemaker ion channels." *Annual review of physiology* 63.1 (2001) : 235-257.
- [9] Männikkö, Roope, Fredrik Elinder, and H. Peter Larsson. "Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages." *Nature* 419.6909 (2002) : 837.



- 
- [10] DiFrancesco, D. "A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres." *The Journal of physiology* 314.1 (1981) : 377-393.
- [11] Ludwig, Andreas, et al. "A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels." *nature* 393.6685 (1998) : 587.
- [12] Zhou, Ming, and Roderick MacKinnon. "A mutant KcsA K<sup>+</sup> channel with altered conduction properties and selectivity filter ion distribution." *Journal of molecular biology* 338.4 (2004) : 839-846.
- [13] Macri, Vincenzo, Damiano Angoli, and Eric A. Accili. "Architecture of the HCN selectivity filter and control of cation permeation." *Scientific reports* 2 (2012) : 894.
- [14] D'Avanzo, Nazzareno, Roman Pekhletski, and Peter H. Backx. "P-loop residues critical for selectivity in K<sup>+</sup> channels fail to confer selectivity to rabbit HCN4 channels." *PloS one* 4.11 (2009) : e7712.
- [15] Liu, Shian, et al. "Ion-binding properties of a K<sup>+</sup> channel selectivity filter in different conformations." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.49 (2015) : 15096-15100.
- [16] Macri, Vincenzo, et al. "Separable gating mechanisms in a Mammalian pacemaker channel." *Journal of Biological Chemistry* 277.39 (2002) : 35939-35946.
- [17] Craven, Kimberley B., and William N. Zagotta. "CNG and HCN channels : two peas, one pod." *Annu. Rev. Physiol.* 68 (2006) : 375-401.
- [18] Kaupp, U. Benjamin, and Reinhard Seifert. "Cyclic nucleotide-gated ion channels." *Physiological reviews* 82.3 (2002) : 769-824.
- [19] Akimoto, Madoka, et al. "A mechanism for the auto-inhibition of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel opening and its relief by cAMP." *Journal of Biological Chemistry* 289.32 (2014) : 22205-22220.

- 
- [20] Viscomi, Carlo, et al. "C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels." *Journal of Biological Chemistry* 276.32 (2001) : 29930-29934.
- [21] Wainger, Brian J., et al. "Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels." *Nature* 411.6839 (2001) : 805.
- [22] Wang, Jing, Shan Chen, and Steven A. Siegelbaum. "Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions." *The Journal of general physiology* 118.3 (2001) : 237-250.
- [23] Wicks, Nadine L., et al. "Cytoplasmic cAMP-sensing domain of hyperpolarization-activated cation (HCN) channels uses two structurally distinct mechanisms to regulate voltage gating." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.2 (2011) : 609-614.
- [24] Zong, Xiangang, et al. "Regulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel activity by cCMP." *Journal of Biological Chemistry* 287.32 (2012) : 26506-26512.
- [25] Stieber, Juliane, et al. "Molecular basis for the different activation kinetics of the pacemaker channels HCN2 and HCN4." *Journal of Biological Chemistry* 278.36 (2003) : 33672-33680.
- [26] Stieber, Juliane, et al. "Bradycardic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors." *Molecular pharmacology* 69.4 (2006) : 1328-1337.
- [27] Moroni, Anna, et al. "Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel." *Pflügers Archiv* 439.5 (2000) : 618-626.
- [28] Wemhöner, Konstantin, et al. "A leucine zipper motif essential for gating of hyperpolarization-activated channels." *Journal of Biological Chemistry* 287.48 (2012) : 40150-40160.

- 
- [29] Männikkö, Roope, et al. "Hysteresis in the voltage dependence of HCN channels : conversion between two modes affects pacemaker properties." *The Journal of general physiology* 125.3 (2005) : 305-326.
- [30] Sartiani, Laura, et al. "The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels : from biophysics to pharmacology of a unique family of ion channels." *Pharmacological reviews* 69.4 (2017) : 354-395.
- [31] Zagotta, William N., et al. "Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels." *Nature* 425.6954 (2003) : 200.
- [32] Lee, Chia-Hsueh, and Roderick MacKinnon. "Structures of the human HCN1 hyperpolarization-activated channel." *Cell* 168.1-2 (2017) : 111-120.
- [33] Lolicato, Marco, et al. "Cyclic dinucleotides bind the C-linker of HCN4 to control channel cAMP responsiveness." *Nature chemical biology* 10.6 (2014) : 457.
- [34] Kimura, Kouji, et al. "Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated HCN2 cation channel forms a protein assembly with multiple neuronal scaffold proteins in distinct modes of protein-protein interaction." *Genes to Cells* 9.7 (2004) : 631-640.
- [35] Yu, H., et al. "MinK-related peptide 1 : a  $\beta$  subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation." *Circulation research* 88.12 (2001) : e84-e87.
- [36] Klabunde, R.E. *Cardiovascular Pharmacology Concepts*. CV Pharmacology | Cardiac Action Potentials 7 September 2006 31 August 2018]; Available from : [https://www.cvpharmacology.com/antiarrhy/cardiac\\_action\\_potentials](https://www.cvpharmacology.com/antiarrhy/cardiac_action_potentials).
- [37] Richard E. Klabunde, PhD. *Cardiovascular Pharmacology Concepts* [Internet]. 2005 [2018; 2018]. Available from : [https://www.cvpharmacology.com/antiarrhy/cardiac\\_action\\_potentials](https://www.cvpharmacology.com/antiarrhy/cardiac_action_potentials).

- 
- [38] Greg Ikonnikov et Dominique Yelle. PHYSIOLOGY OF CARDIAC CONDUCTION AND CONTRACTILITY [Internet]. 2012 [2018; 2018]. Available from : <http://www.pathophys.org/physiology-of-cardiac-conduction-and-tractility/>
- [39] Herrmann, S., et al. "HCN channels in the heart : lessons from mouse mutants." *British journal of pharmacology* 166.2 (2012) : 501-509.
- [40] Dobrzynski, Halina, et al. "Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues." *Pharmacology therapeutics* 139.2 (2013) : 260-288.
- [41] Marger, Laurine, et al. "Functional roles of Cav1. 3, Cav3. 1 and HCN channels in automaticity of mouse atrioventricular cells : insights into the atrioventricular pacemaker mechanism." *Channels* 5.3 (2011) : 251-261.
- [42] Cerbai, Elisabetta, and Alessandro Mugelli. "If in non-pacemaker cells : role and pharmacological implications." *Pharmacological research* 53.5 (2006) : 416-423.
- [43] Fenske, Stefanie, et al. "HCN3 contributes to the ventricular action potential waveform in the murine heart." *Circulation research* 109.9 (2011) : 1015-1023.
- [44] Baruscotti, Mirko, et al. "Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene *Hcn4*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.4 (2011) : 1705-1710.
- [45] Milano, Annalisa, et al. "HCN4 mutations in multiple families with bradycardia and left ventricular noncompaction cardiomyopathy." *Journal of the American College of Cardiology* 64.8 (2014) : 745-756.
- [46] Biel, Stephanie, et al. "Mutation in S6 domain of HCN4 channel in patient with suspected Brugada syndrome modifies channel function." *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 468.10 (2016) : 1663-1671.

- 
- [47] Alig, Jacqueline, et al. "Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.29 (2009) : 12189-12194.
- [48] Rosen, Michael R., Joel Nargeot, and Guy Salama. "The case for the funny current and the calcium clock." *Heart Rhythm* 9.4 (2012) : 616-618.
- [49] Nawathe, Pooja A., et al. "An LQTS6 MiRP1 mutation suppresses pacemaker current and is associated with sinus bradycardia." *Journal of cardiovascular electrophysiology* 24.9 (2013) : 1021-1027.
- [50] D'Souza, Alicia, et al. "Exercise training reduces resting heart rate via downregulation of the funny channel HCN4." *Nature communications* 5 (2014) : 3775.
- [51] Monfredi, O., and M. R. Boyett. "Sick sinus syndrome and atrial fibrillation in older persons—a view from the sinoatrial nodal myocyte." *Journal of molecular and cellular cardiology* 83 (2015) : 88-100.
- [52] LAI, LING-PING, et al. "Measurement of funny current (I<sub>f</sub>) channel mRNA in human atrial tissue : correlation with left atrial filling pressure and atrial fibrillation." *Journal of cardiovascular electrophysiology* 10.7 (1999) : 947-953.
- [53] Stillitano, Francesca, et al. "Molecular basis of funny current (I<sub>f</sub>) in normal and failing human heart." *Journal of molecular and cellular cardiology* 45.2 (2008) : 289-299.
- [54] Stillitano, Francesca, et al. "Chronic atrial fibrillation alters the functional properties of I<sub>f</sub> in the human atrium." *Journal of cardiovascular electrophysiology* 24.12 (2013) : 1391-1400.
- [55] Cerbai, Elisabetta, Mario Barbieri, and Alessandro Mugelli. "Characterization of the hyperpolarization-activated current, I (f), in ventricular myocytes isolated from hypertensive rats." *The Journal of physiology* 481.3 (1994) : 585-591.

- 
- [56] Fyk-Kolodziej, Bozena, and Roberta G. Pourcho. "Differential distribution of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels in cone bipolar cells of the rat retina." *Journal of Comparative Neurology* 501.6 (2007) : 891-903.
- [57] Chaplan, Sandra R., et al. "Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain." *Journal of Neuroscience* 23.4 (2003) : 1169-1178.
- [58] Emery, Edward C., et al. "HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain." *Science* 333.6048 (2011) : 1462-1466.
- [59] Tsantoulas, C., E.R. Mooney, and P.A. McNaughton, HCN2 ion channels : basic science opens up possibilities for therapeutic intervention in neuropathic pain. *Biochemical Journal*, 2016. 473(18) : p. 2717-2736.
- [60] He, Chao, et al. "Neurophysiology of HCN channels : from cellular functions to multiple regulations." *Progress in neurobiology* 112 (2014) : 1-23.
- [61] Shah, Mala M. "Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel currents in neurons." *Cold Spring Harbor Protocols* 2016.7 (2016) : pdb-top087346.
- [62] Kase, Daisuke, and Keiji Imoto. "The role of HCN channels on membrane excitability in the nervous system." *Journal of signal transduction* 2012 (2012).
- [63] Berger, Thomas, Walter Senn, and Hans-R. Lüscher. "Hyperpolarization-activated current I<sub>h</sub> disconnects somatic and dendritic spike initiation zones in layer V pyramidal neurons." *Journal of neurophysiology* 90.4 (2003) : 2428-2437.
- [64] Magee, Jeffrey C. "Dendritic I<sub>h</sub> normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons." *Nature neuroscience* 2.6 (1999) : 508.
- [65] Magee, Jeffrey C., and Michael Carruth. "Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons." *Journal of neurophysiology* 82.4 (1999) : 1895-1901.

- 
- [66] Williams, Stephen R., and Greg J. Stuart. "Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I<sub>h</sub> in neocortical pyramidal neurons." *Journal of Neurophysiology* 83.5 (2000) : 3177-3182.
- [67] Bédard, Claude, Helmut Kröger, and Alain Destexhe. "Model of low-pass filtering of local field potentials in brain tissue." *Physical Review E* 73.5 (2006) : 051911.
- [68] Hutcheon, B. R. U. C. E., ROBERT M. Miura, and E. R. N. E. S. T. Pui. "Models of subthreshold membrane resonance in neocortical neurons." *Journal of neurophysiology* 76.2 (1996) : 698-714.
- [69] Huang, Zhuo, et al. "HCN1 channels reduce the rate of exocytosis from a subset of cortical synaptic terminals." *Scientific reports* 7 (2017) : 40257.
- [70] Poolos, Nicholas P., Michele Migliore, and Daniel Johnston. "Pharmacological upregulation of h-channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites." *Nature neuroscience* 5.8 (2002) : 767.
- [71] DiFrancesco, Jacopo C., et al. "Recessive loss-of-function mutation in the pacemaker HCN2 channel causing increased neuronal excitability in a patient with idiopathic generalized epilepsy." *Journal of Neuroscience* 31.48 (2011) : 17327-17337.
- [72] Tang, Bin, et al. "Mutation analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCN1 and HCN2 in idiopathic generalized epilepsy." *Neurobiology of disease* 29.1 (2008) : 59-70. APA
- [73] Dibbens, Leanne M., et al. "Augmented currents of an HCN2 variant in patients with febrile seizure syndromes." *Annals of neurology* 67.4 (2010) : 542-546.
- [74] Yi, Fei, et al. "Autism-associated SHANK3 haploinsufficiency causes I<sub>h</sub> channelopathy in human neurons." *Science* 352.6286 (2016) : aaf2669.
- [75] Arnsten, Amy FT. "Prefrontal cortical network connections : key site of vulnerability in stress and schizophrenia." *International Journal of Developmental Neuroscience* 29.3 (2011) : 215-223.

- 
- [76] Degiorgio, C., D. Van den Berge, and A. Watelet, *Comprendre - La mémoire de travail*. Hôpital Erasme - U.L.B.
- [77] Goertz, Richard Brandon, et al. "Cocaine increases dopaminergic neuron and motor activity via midbrain 1 adrenergic signaling." *Neuropsychopharmacology* 40.5 (2015) : 1151.
- [78] Okamoto, Takashi, Mark T. Harnett, and Hitoshi Morikawa. "Hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) is an ethanol target in midbrain dopamine neurons of mice." *Journal of neurophysiology* 95.2 (2006) : 619-626.
- [79] Cao, Jun-Li, et al. "Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action." *Journal of Neuroscience* 30.49 (2010) : 16453-16458.
- [80] Lewis, Alan S., et al. "Deletion of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel auxiliary subunit TRIP8b impairs hippocampal I<sub>h</sub> localization and function and promotes antidepressant behavior in mice." *Journal of Neuroscience* 31.20 (2011) : 7424-7440.
- [81] Knoll, Allison T., et al. "Quantitative trait loci and a novel genetic candidate for fear learning." *Journal of Neuroscience* 36.23 (2016) : 6258-6268.
- [82] Branch, Sarah Y., et al. "Dopaminergic neurons exhibit an age-dependent decline in electrophysiological parameters in the MitoPark mouse model of Parkinson's disease." *Journal of Neuroscience* 36.14 (2016) : 4026-4037.
- [83] DiFrancesco, Jacopo C., and Dario DiFrancesco. "Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases." *Frontiers in cellular neuroscience* 9 (2015) : 71.
- [84] Saito, Yuhki, et al. "Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels : a potential molecular link between epileptic seizures and A generation in Alzheimer's disease." *Molecular neurodegeneration* 7.1 (2012) : 50.
- [85] Kumar, Awanish. *Anticandidal Agents*. Academic Press, 2016.



- 
- [86] Lu, Wenchao, et al. "Computer-aided drug design in epigenetics." *Frontiers in chemistry* 6 (2018) : 57.
- [87] Morris, 2009-07-16, Equations. URL :  
<http://autodock.scripps.edu/resources/science/equations>.
- [88] Richards Center at Yale University. [Internet] 2014 [2015 ; 2018]. Available from :  
[http://www.csb.yale.edu/userguides/datamanip/autodock/html/Using\\_AutoDock\\_305.a.html](http://www.csb.yale.edu/userguides/datamanip/autodock/html/Using_AutoDock_305.a.html)
- [89] Morris, Garrett M., et al. "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function." *Journal of computational chemistry* 19.14 (1998) : 1639-1662.
- [90] George Seif. Towards Data Science. [Internet] 2018 [2018 ;2018]. Available from :  
<https://towardsdatascience.com/the-5-clustering-algorithms-data-scientists-need-to-know-a36d136ef68>
- [91] Trevino, A. Introduction to K-means Clustering. LEARN DATA SCIENCE, MACHINE LEARNING 2016 [2018 ; 2018]. Available from :  
<https://www.datascience.com/blog/k-means-clustering>.
- [92] Rousseeuw, Peter J. "Silhouettes : a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis." *Journal of computational and applied mathematics* 20 (1987) : 53-65.
- [93] Richard E. Klabunde, PhD. Cardiovascular Pharmacology Concepts [Internet]. 2011 [2011 ; 2018]. Available from :  
<https://www.cvpharmacology.com/antiarrhy/potassium-blockers>
- [94] Richard E. Klabunde, PhD. Cardiovascular Pharmacology Concepts [Internet]. 2016 [2016 ; 2018]. Available from :  
<https://www.cvpharmacology.com/cardioinhibitory/beta-blockers>
- [95] Wahl-Schott, C., and M. Biel. "HCN channels : structure, cellular regulation and physiological function." *Cellular and molecular life sciences* 66.3 (2009) : 470.

- 
- [96] Tanguay, Jeremie, and Nazzareno D'Avanzo. "Examining Drug Binding in HCN Channels." *Biophysical Journal* 114.3 (2018) : 120a.
- [97] Bucchi, Annalisa, et al. "Identification of the molecular site of ivabradine binding to HCN4 channels." *PloS one* 8.1 (2013) : e53132.