

2m11.2890.5

**Université de Montréal**

**Études pharmacologiques des canaux calciques de type T Ca<sub>v</sub> 3.1**

**par**

**Valeri AGUEEV**

**Département de Physiologie**

**Groupe de Recherche en Transport Membranaire**

**Faculté de Médecine**

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

**Janvier 2001**

**© Valeri Agueev, 2001**



W

4

W58

2001

N. 095

**Université de Montréal**  
**Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé :**

**Études pharmacologiques des canaux calciques de type T  $Ca_v$  3.1**

**présenté par**  
**Valeri Agueev**

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

**Dr Rémy SAUVÉ**

**Dr Lucie PARENT**

**Dr Jean-Yves LAPOINTE**

**Mémoire accepté le :**

## SOMMAIRE

**Introduction :** La gabapentine (GBP) est un nouveau médicament utilisé pour le traitement de l'épilepsie, de pathologies neuro-dégénératives et de névralgies chroniques. GBP a été conçu par analogie avec le  $\gamma$  - aminobutyrate mais on ne lui reconnaît aucun effet sur les récepteurs de GABA. **But des travaux :** Nos études ont donc cherché à déterminer la cible moléculaire de la gabapentine. En sachant que les canaux calciques de type T sont possiblement impliqués dans la genèse de maladies épileptiques, nous nous sommes d'abord intéressés à ces canaux. De plus, nous avons testé les canaux calciques de type L et R pour déterminer la spécificité moléculaire, s'il y a lieu, de la gabapentine. Nous avons effectué l'étude d'un analogue structural de la gabapentine, l'acide cyclohexane acétique (CHAA), pour déterminer la spécificité du site de liaison de la gabapentine sur le canal. Nous avons essayé d'étudier le rôle de la sous-unité  $\alpha 2$ - $\delta$  dans ce processus. Finalement, nous avons caractérisé l'effet d'inhibiteurs inorganiques  $Ni^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  sur les canaux  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  et  $\alpha 1C$ . **Méthodes:** Les canaux  $\alpha 1C$ ,  $\alpha 1E$  et  $\alpha 1G$  ont été exprimés de façon permanente dans les cellules HEK-293. Les courants macroscopiques ont été enregistrés par la méthode du «patch-clamp» en configuration «cellule entière» en présence de 10 mM  $Ba^{2+}$  dans le bain. Les concentrations extracellulaires de GBP variaient de 1  $\mu M$  à 1mM. Dans une série d'expériences avec des inhibiteurs inorganiques, les canaux  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  et  $\alpha 1C$  ont été exprimés dans les ovocytes de *Xenopus*. Les courants macroscopiques ont été enregistrés par la méthode du «voltage imposé à deux électrodes» en configuration «cellule entière» en présence de 10 mM  $Ba^{2+}$  dans le bain. **Résultats :** L'addition de GBP (1  $\mu M$ -1mM) n'a eu aucun

effet sur les propriétés biophysiques des courants générés par les canaux de type-R  $\alpha 1E/\alpha 2b\delta/\beta 3$  ou de type-L  $\alpha 1C/\alpha 2a\delta/\beta 2a$ . Par contraste, l'addition de GBP produit une inhibition partielle (entre  $21 \pm 2\%$  et  $49 \pm 2\%$ ,  $n=3$ ) des courants macroscopiques générés par le canal de type-T  $\alpha 1G$  ( $Ca_v3.1$ ) exprimé de façon permanente dans les cellules HEK-293. En présence de  $10 \mu M$  GBP, on a observé un déplacement significatif des courbes d'inactivation à l'état stable vers des potentiels plus négatifs de  $V_{50} = -61 \pm 3$  mV ( $n=4$ ) (témoin) à  $V_{50} = -82 \pm 2$  mV ( $n=4$ ) (GBP). Dans tous les cas, l'inhibition par la GBP s'est développée rapidement et ne fut pas réversible après le rinçage avec la solution «témoin». CHAA en concentration  $10 \mu M$  diminue aussi le courant  $\alpha 1G$  ( $28 \pm 8\%$ ,  $n=3$ ). Nous avons échoué dans nos tentatives d'étudier le rôle de la sous-unité  $\alpha 2-\delta$  à cause de la diminution non spécifique du courant dans nos expériences sur les ovocytes de *Xenopus*. Le  $Cd^{2+}$  inhibe  $\alpha 1G$  ( $Ca_v3.1$ ),  $\alpha 1H$  ( $Ca_v3.2$ ) et  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) avec un  $IC_{50} = 45 \mu M$ ,  $IC_{50} = 20 \mu M$  et  $IC_{50} = 4 \mu M$  respectivement. Le  $Ni^{2+}$  inhibe  $\alpha 1G$  ( $Ca_v3.1$ ),  $\alpha 1H$  ( $Ca_v3.2$ ) et  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) avec un  $IC_{50} = 268 \mu M$ ,  $IC_{50} = 10 \mu M$  et  $IC_{50} = 162 \mu M$  respectivement. **Conclusion :** Nos résultats suggèrent que les concentrations circulantes de GBP peuvent exercer une inhibition partielle des canaux  $Ca^{2+}$  de type T ( $Ca_v3.1$ ) ce qui peut diminuer l'activité électrique cérébrale des patients épileptiques. Le  $Cd^{2+}$  possède l'affinité du même ordre de grandeur pour  $Ca_v3.1$  et  $Ca_v3.2$  ce qui suggère une possibilité que le site de liaison pour le  $Cd^{2+}$  est conservé entre ces canaux. Le  $Ni^{2+}$  possède une affinité plus faible pour  $Ca_v3.1$ .

**TABLE DES MATIÈRES**

<b>SOMMAIRE</b>	<b>iii</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>x</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>xiii</b>
<b>1.0 INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Importance du calcium dans la physiologie humaine</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Classification fonctionnelle des canaux calciques</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Structure moléculaire des canaux calciques</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1 Famille des gènes codant pour les sous-unités <math>\alpha 1</math></b>	<b>8</b>
<b>1.3.2 Relations structure-fonction des sous-unités <math>\alpha 1</math></b>	<b>9</b>
<b>1.4 Sous-unités auxiliaires</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Courants calciques de bas seuil des canaux «natifs»         dans le système nerveux central</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Caractérisation moléculaire des canaux LVA</b>	<b>15</b>
<b>1.7 Caractérisation fonctionnelle des sous-unités <math>\alpha 1G</math>, <math>\alpha 1H</math> et <math>\alpha 1I</math></b>	<b>18</b>
<b>1.8 Épilepsie et les courants calciques</b>	<b>20</b>

1.9 Gabapentine et les médicaments anti-épileptiques	21
1.11 But des travaux	23
<b>2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>25</b>
2.1 Expression fonctionnelle des canaux $\alpha 1C$ , $\alpha 1G$ et $\alpha 1H$ dans les ovocytes de <i>Xenopus</i>	25
2.2 Enregistrements électrophysiologiques sur les ovocytes	26
2.3 Lignées cellulaires stables dans les cellules HEK-293	27
2.4 Enregistrements électrophysiologiques dans les lignées cellulaires stables	28
2.5 Acquisition des données et l'analyse	29
2.6 Analyse de l'inhibition du courant	29
2.7 Solutions	30
<b>3.0 RÉSULTATS</b>	<b>31</b>
3.1 Est-ce que la gabapentine affecte les canaux $Ca_v1.2$ et $Ca_v2.3$ ?)	31
3.2 Gabapentine inhibe les canaux calciques de type T $\alpha 1G$ ( $Ca_v3.1$ )	33

3.3 Inhibition des canaux $Ca_v3.1$ par la gabapentine est proportionnelle à la concentration	36
3.4 La gabapentine déplace les courbes d'inactivation dans un état stable vers les potentiels plus négatifs	37
3.5 Les courants $Ca_v3.1$ sont inhibés par un analogue de la gabapentine l'acide cyclohexane acétique	40
3.6 Est-ce que la sous-unité $\alpha2\delta$ influence l'inhibition de $Ca_v3.1$ ?	42
3.7 Inhibition des canaux calciques de type T $\alpha1G$ ( $Ca_v3.1$ ), $\alpha1H$ ( $Ca_v3.2$ ) et $\alpha1C$ ( $Ca_v1.2$ ) par les agents inorganiques	46
4.0 DISCUSSION	52
4.1 Comparaison avec d'autres études fonctionnelles	52
4.2 Cible moléculaire de la gabapentine	53
4.3 L'hypothèse du récepteur modulé pourrait expliquer l'effet de la gabapentine	55
4.4 Spécificité structurale de la gabapentine	56
4.5 Inhibition partielle des canaux $\alpha1G$ et prévention de crises épileptiques	56
4.6 Inhibition des canaux $\alpha1G$ , $\alpha1H$ et $\alpha1C$ par les inhibiteurs inorganiques	57
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62



## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1.1</i>	<b>Propriétés fonctionnelles des gènes codant pour les canaux calciques voltage dépendant</b>	<b>2</b>
<i>Tableau 1.2</i>	<b>Homologie entre les sous-unités <math>\alpha 1</math> des canaux calciques</b>	<b>16</b>
<i>Tableau 1.3</i>	<b>Propriétés des courants calciques induits par l'expression stable de <math>\alpha 1G</math>, <math>\alpha 1H</math> et <math>\alpha 1I</math> dans les cellules HEK-293</b>	<b>18</b>
<i>Tableau 4.1</i>	<b>Données comparatives des <math>IC_{50}</math> (en <math>\mu M</math>) obtenues par les différents groupes des chercheurs qui utilisaient comme inhibiteurs les ions divalents en travaillant soit sur les cellules HEK-293 soit sur les ovocytes de <i>Xenopus</i></b>	<b>59</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1 Exemples d'enregistrement des courants calciques avec une cinétique d'inactivation rapide (<math>\alpha 1G</math> et <math>\alpha 1E</math>) et lente (<math>\alpha 1C</math>)</b>	<b>3</b>
<b>Figure 1.2 Structure primaire du canal calcique voltage dépendant de type T <math>\alpha 1G</math></b>	<b>6</b>
<b>Figure 1.3 Structure secondaire du canal calcique voltage dépendant</b>	<b>7</b>
<b>Figure 3.1 L'absence d'inhibition des courants calciques <math>\alpha 1E</math> (<math>Ca_v2.3</math>) par la gabapentine</b>	<b>32</b>
<b>Figure 3.2 L'inhibition des canaux calciques de type T <math>\alpha 1G</math> (<math>Ca_v3.1</math>) par la gabapentine</b>	<b>34</b>
<b>Figure 3.3 L'inhibition des canaux calciques de type T <math>\alpha 1G</math> par 10 <math>\mu M</math> gabapentine</b>	<b>35</b>
<b>Figure 3.4 L'inhibition par la gabapentine est « dose - dépendante » jusqu'à 10 <math>\mu M</math></b>	<b>36</b>
<b>Figure 3.5 La gabapentine déplace les courbes d'inactivation vers des potentiels plus négatifs</b>	<b>39</b>
<b>Figure 3.6-a Structure chimique des agents pharmacologiques</b>	<b>40</b>
<b>Figure 3.6-b L'inhibition des courants calciques de type T <math>\alpha 1G</math> (<math>Ca_v3.1</math>) par l'acide cyclohexane acétique</b>	<b>41</b>
<b>Figure 3.7 Diminution non-spécifique du courant en fonction du temps ou « rundown » dans les ovocytes de <i>Xenopus</i> exprimant les canaux <math>\alpha 1G</math> (<math>Ca_v3.1</math>)</b>	<b>44</b>
<b>Figure 3.8 Diminution non-spécifique du courant en fonction du temps ou « rundown » dans les ovocytes de <i>Xenopus</i> exprimant les canaux <math>\alpha 1H</math> (<math>Ca_v3.2</math>)</b>	<b>45</b>
<b>Figure 3.9 L'inhibition des canaux calciques de type T <math>\alpha 1G</math> par Cadmium et Nickel</b>	<b>47</b>
<b>Figure 3.10 L'inhibition des canaux calciques de type T <math>\alpha 1H</math> par Cadmium et Nickel</b>	<b>48</b>

**Figure 3.11 L'inhibition des canaux calciques de type L  $\alpha$ 1C par Cadmium et Nickel**

50

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>AID</b>	(pour « <i><math>\alpha</math>1-interaction domain</i> »)
<b>AKAP</b>	(pour «A-kinase <i>anchoring protein</i> »)
<b>al.</b>	alliance
<b>Ala (A)</b>	alanine
<b>Arg (R)</b>	arginine
<b>Asn (N)</b>	asparagine
<b>Asp (D)</b>	acide aspartique
<b>Ba<sup>2+</sup></b>	barium
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	calcium
<b>Cd<sup>2+</sup></b>	cadmium
<b>Cys (C)</b>	cystéine
<b>DHP</b>	dihydropyridine
<b>DRG</b>	(pour « <i>dorsal root ganglion</i> »)
<b>EEG</b>	l'électroencéphalogramme
<b>EST</b>	(pour « <i>expressed sequence tag</i> »)
<b>GABA</b>	l'acide gamma-aminobutyrique
<b>GAERS</b>	(pour « <i>Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg</i> »)
<b>GBP</b>	gabapentine
<b>Gln (Q)</b>	glutamine
<b>Glu (E)</b>	acide glutamique

<b>Gly (G)</b>	glycine
<b>HEK</b>	(pour «human embryonic kidney»)
<b>His (H)</b>	histidine
<b>HVA</b>	(pour « <i>high voltage activated</i> »).
<b>IC<sub>50</sub></b>	(pour «inhibition concentration») concentration nécessaire pour inhiber 50% du courant
<b>Ile (I)</b>	isoleucine
<b>Leu (L)</b>	leucine
<b>LTCC</b>	(pour « <i>low-threshold calcium current</i> »)
<b>LVA</b>	(pour « <i>low voltage activated</i> »)
<b>Lys (K)</b>	lysine
<b>μM</b>	micromolaire
<b>Met (M)</b>	méthionine
<b>mM</b>	millimolaire
<b>ms</b>	millisecondes
<b>mV</b>	millivolt
<b>Ni<sup>2+</sup></b>	nickel
<b>Phe (F)</b>	phénylalanine
<b>PKA</b>	protéine kinase A
<b>PKC</b>	protéine kinase C
<b>Pro (P)</b>	proline
<b>pS</b>	picosiemens
<b>Ser (S)</b>	sérine
<b>SWD</b>	(pour « <i>spike and wave discharges</i> »).

$\tau_h$	constante du temps d'inactivation
<b>Thr (T)</b>	thréonine
<b>Trp (W)</b>	tryptophan
<b>Tyr (Y)</b>	tyrosine
$V_{50}$	le voltage, auquel la moitié des courants est activée ou inactivée
<b>Val (V)</b>	valine

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers mon directeur de recherche, Dr Lucie Parent. Les discussions fructueuses et les conseils éclairés dont elle m'a fait bénéficier tout au long de ma formation, ont constitué un support inestimable. Son enthousiasme pour la recherche, son ouverture d'esprit et son appui constant, m'ont créé un environnement idéal pour accomplir ce travail. Je suis très reconnaissant pour sa disponibilité illimitée ainsi que pour m'avoir vraiment appris la rédaction scientifique, une tâche non négligeable en recherche.

De plus, je tiens également à remercier G. Bernatchez pour sa contribution importante qui m'a permis de maîtriser les techniques d'électrophysiologie ainsi que pour sa rigueur scientifique.

Je remercie mes collègues au laboratoire Laurent Berrou et Jonathan Ducay. Leur support moral fut grandement apprécié.

Je remercie Dr. Ed Perez-Reyes dont la collaboration a permis d'obtenir les cellules  $\alpha 1G$ .

J'aimerais exprimer ma gratitude à V. Gregoire pour son aide technique.

Je remercie le GRTM et le CRM pour leur aide financière et Parke-Davis (maintenant Pfizer) pour la gabapentine.

Enfin, je tiens à remercier vivement mon épouse, Marina, dont la contribution m'a fourni le soutien psychologique et émotif nécessaire à la réalisation de ce travail.

## **1.0 INTRODUCTION**

### **1.1 Importance du calcium dans la physiologie humaine**

Les ions calcium sont impliqués dans le développement et le contrôle de nombreuses fonctions cellulaires allant du couplage excitation-contraction dans les cellules musculaires, à la libération d'hormones ou de neurotransmetteurs, en passant par l'activation d'enzymes et l'expression de certains gènes (Nargeot et Charnet, 1994). Toute altération de l'homéostasie calcique et en particulier toute augmentation soutenue du calcium intracellulaire peut engendrer des situations pathologiques pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire. La concentration intracellulaire de calcium libre au repos est de l'ordre de  $0.1 \mu\text{M}$ . La concentration de calcium peut s'élever de façon transitoire dans certaines cellules pendant le potentiel d'action membranaire au cours duquel s'ouvrent des pores très sélectifs nommés «canaux calciques». En effet, l'entrée de calcium dans les cellules excitables est déterminée en grande partie par ces pores, les canaux calciques dépendants du potentiel, qui constituent une classe hétérogène de protéines sensibles aux variations de potentiel membranaire. L'identification et la caractérisation de plusieurs types de canaux calciques ont démontré leur grande diversité. Ces travaux représentent une étape essentielle dans la compréhension des physiopathologies liées à des modifications de l'homéostasie calcique qui peut mener au développement de nouveaux agents pharmacologiques ayant une plus grande spécificité tissulaire. Dans ce contexte, la recherche d'antagonistes des canaux calciques paraît une voie très prometteuse pour la prévention ou le traitement d'affections de divers types.



## 1.2 Classification fonctionnelle des canaux calciques

La classification fonctionnelle des canaux calciques dépendants du potentiel reflète leurs différentes propriétés biophysiques et pharmacologiques (Tsien et al., 1991). On peut distinguer deux principales classes fonctionnelles de canaux calciques en fonction de leur seuil d'activation (*Tableau 1.1*).

*Tableau 1.1 Propriétés fonctionnelles des gènes codant pour les canaux calciques voltage dépendants*

Gène	$\alpha 1$	Type	Cinétiques d'activation et d'inactivation	Poids moléculaire	Inhibiteurs	Distribution
Ca <sub>v</sub> 1.1	$\alpha 1S$	L	HVA-lente	212 kDa	DHP ++	Muscle squelettique
Ca <sub>v</sub> 1.2	$\alpha 1C$	L	HVA-lente	240 kDa	DHP ++	Cœur, cerveau
Ca <sub>v</sub> 1.3	$\alpha 1D$	L	HVA-lente	245 kDa	DHP ++	Cœur, cerveau
Ca <sub>v</sub> 2.1	$\alpha 1A$	P/Q	HVA-intermédiaire	250 kDa	$\omega$ -Aga-IVA +/- $\omega$ -CmT-MVHC ++	Cœur, cerveau
Ca <sub>v</sub> 2.2	$\alpha 1B$	N	HVA-intermédiaire	260 kDa	$\omega$ -CgT-GVIA	Cerveau
Ca <sub>v</sub> 2.3	$\alpha 1E$	R	HVA-rapide	252 kDa		Cerveau
Ca <sub>v</sub> 3.1	$\alpha 1G$	T	LVA- plus rapide	249 kDa	Mibefradil	Cerveau
Ca <sub>v</sub> 3.2	$\alpha 1H$	T	LVA-plus rapide	243 kDa	Mibefradil	Cœur
Ca <sub>v</sub> 3.3	$\alpha 1I$	T	LVA-plus rapide	220 kDa	Mibefradil	Cerveau

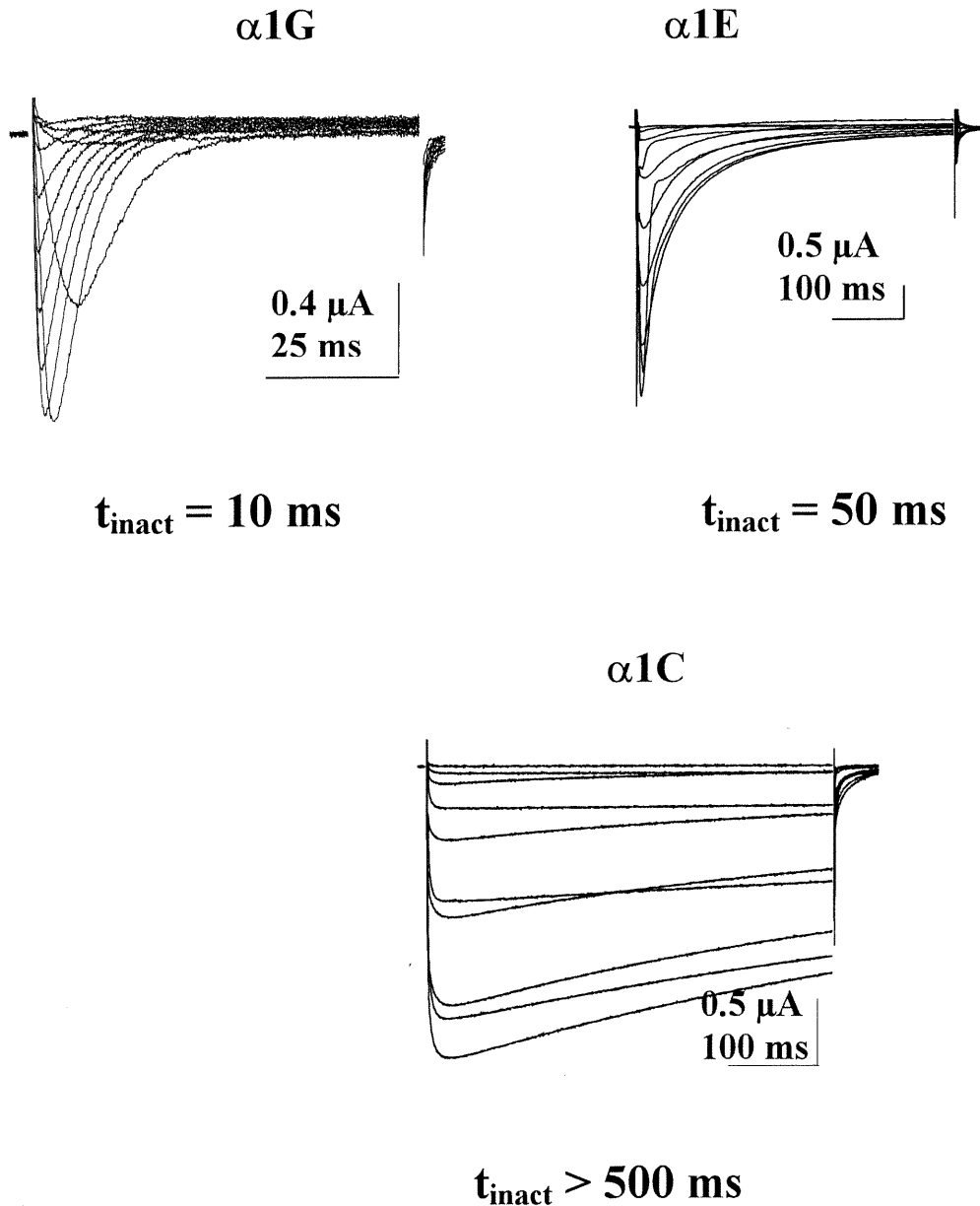
Les courants calciques des divers types cellulaires possèdent des propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes. L'activation des courants calciques de type L exigent une forte dépolarisation. De plus, ces canaux possèdent des cinétiques d'activation et d'inactivation lentes et sont inhibés par des antagonistes organiques incluant les dihydropyridines, les phénylalkylamines et les benzothiazépines.

Une forte dépolarisation est aussi nécessaire pour activer les courants calciques de type N, P/Q et R. Ils ne sont pas affectés par les antagonistes organiques spécifiques aux canaux de type L mais ils sont inhibés par des toxines spécifiques.

Les courants calciques de type T sont activés par une faible dépolarisation et possèdent une cinétique d'activation et d'inactivation rapides. Ils sont résistants aux antagonistes organiques et aux toxines extraites à partir de venin animal.

(Bezprozvanny et Tsien, 1995; Cribbs et al., 1998; Ertel et al., 2000; Klöckner et al., 1999; Lee et al., 1999; Mishra et Hermsmeyer, 1994; Nargeot et Charnet, 1994; Niidome et al., 1992; Perez-Reyes et al., 1998; Snutch et Reiner, 1992; Tsien et al., 1991; Williams et al., 1999)

Figure 1.1 Exemples d'enregistrement des courants calciques avec une cinétique d'inactivation rapide ( $\alpha 1G$  et  $\alpha 1E$ ) et lente ( $\alpha 1C$ ), ( $t_{inact}$  – constante du temps d'inactivation)



La première classe de canaux calciques s'active aux dépolarisations élevées ( $> -30$  mV) et engendre des courants avec des cinétiques qui vont de lentes ( $\tau_h > 500$  ms) à intermédiaires ( $\tau_h \approx 50-80$  ms). Ce sont des canaux calciques de haut seuil ou HVA (pour «*high voltage activated*»). L'existence de plusieurs types de HVA a été démontrée. Il faut mentionner d'abord le type L (pour «*long lasting*») qui a une inactivation plutôt lente ( $\tau_h > 500$  ms en  $Ba^{2+}$ ), une conductance élémentaire deux à trois fois plus grande en présence des ions  $Ba^{2+}$  qu'en présence d'ions  $Ca^{2+}$ . La caractéristique pharmacologique essentielle du canal de type L est sa grande sensibilité aux antagonistes de la classe des dihydropyridines (DHP) tels que la nifédipine. En ce qui concerne les autres types de canaux HVA, on les distingue aussi par des critères pharmacologiques mais ils diffèrent de plus par leurs propriétés biophysiques, entre autres leurs cinétiques plus rapides d'activation et d'inactivation. Le type N est spécifiquement inhibé par une toxine peptidique isolée à partir d'un escargot marin (*Comus geographicus*) :  $\omega$ -conotoxine GVIA ( $\omega$ -CgT - GVIA). Le type P est inhibé par le venin d'une araignée (*Agelenopsis aperta*) et plus précisément par une fraction peptidique ( $\omega$ -Aga-IVA) contenue dans ce venin. Le type Q, qui est apparenté au type P, montre une certaine sensibilité à l' $\omega$ -Aga-IVA mais est inhibé beaucoup plus spécifiquement par une autre toxine extraite de l'escargot *Comus magus* :  $\omega$ -conotoxine MVIIC ( $\omega$ -CmT-MVIIC) (Wheeler et al., 1994). On ne connaît pas d'inhibiteur spécifique pour le canal de type R, d'où son nom : R pour résistant.

La seconde classe de canaux calciques est activée par des dépolarisations très faibles à un seuil d'environ  $-70$  mV, s'inactive rapidement de façon dépendante du

voltage, possède une petite conductance élémentaire et une perméabilité en canal unitaire équivalente pour le calcium et le baryum. Ce sont les canaux LVA (pour «*low voltage activated*»). Le seul type de LVA connu jusqu'à maintenant est le type T (*transient*) pour lequel on ne connaît pas, à l'heure actuelle, de ligand vraiment spécifique. La kurtoxine, une toxine provenant du venin de scorpion *Parabuthus Transvaalicus*, pourrait être un outil précieux dans la distinction entre les canaux calciques de type T  $\alpha 1G$  et les autres canaux calciques incluant  $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ ,  $\alpha 1C$  et  $\alpha 1E$  (Chuang et al., 1998). La kurtoxine inhibe 95% des courants à travers le canal calcique de type T  $\alpha 1G$  à une concentration de 200 nM et n'affecte pas les autres canaux calciques ci-haut décrits. Mais cette toxine interagit aussi avec les canaux sodiques dépendants du voltage en ralentissant leur cinétique d'inactivation. Le mibefradil (Ro 40-5967) a parfois été suggéré comme un inhibiteur sélectif des canaux calciques de type T (Mishra et Hermsmeyer, 1994). Cependant, en concentration micromolaire, cet agent exerce un effet inhibiteur sur plusieurs types des canaux calciques (Bezprozvanny et Tsien, 1995) et son inhibition est fortement sensible au potentiel membranaire (Bernatchez et Parent, en révision).

### 1.3 Structure moléculaire des canaux calciques

Le canal calcique qui dépend du potentiel membranaire est un complexe multiprotéique composé de quatre sous-unités ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ - $\delta$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) dont trois ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ - $\delta$  et  $\gamma$ ) sont transmembranaires, la sous-unité  $\beta$  étant cytoplasmique (*Figures 1.1 et 1.2*).

**Figure 1.2 Structure primaire du canal calcique voltage dépendant de type T  $\alpha$ 1G (Homo sapiens ref NP\_061496.1)**

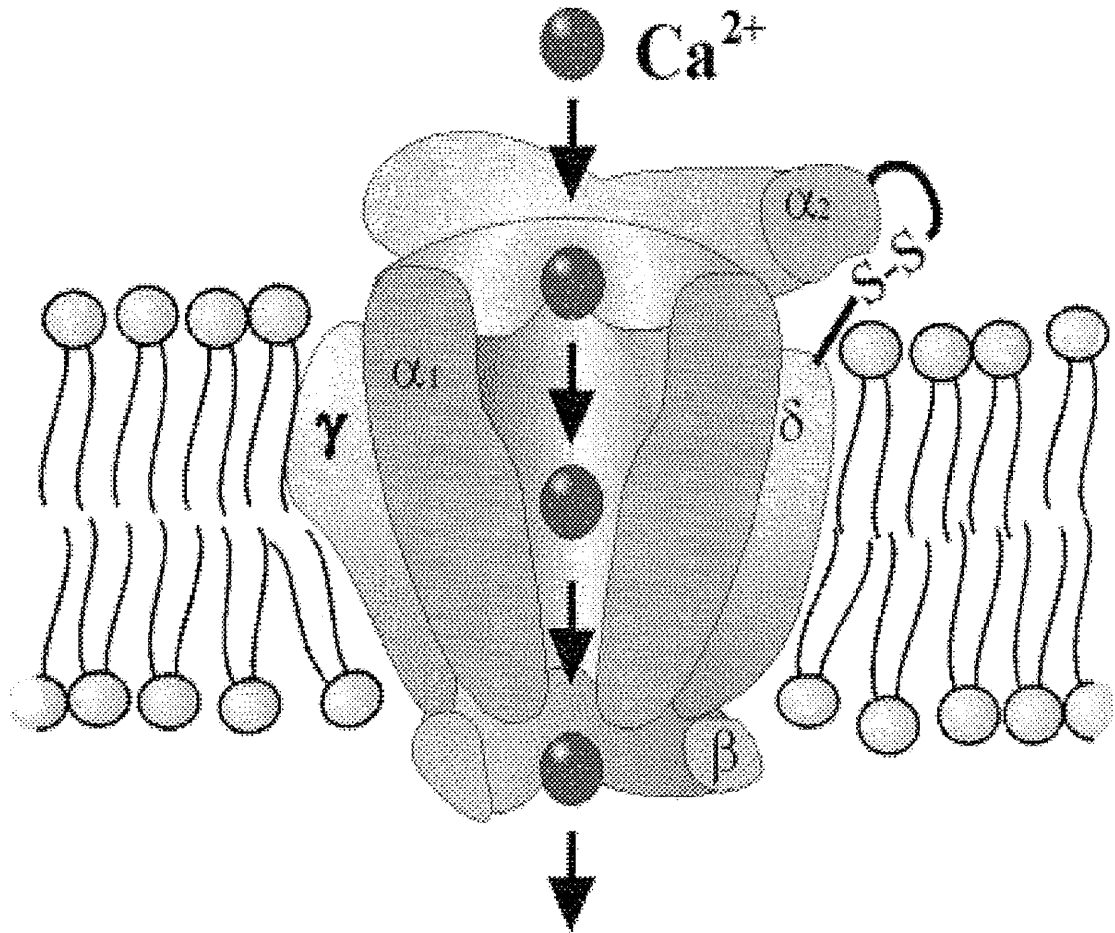
```

1 mdeeedgaga eesgqprsfm rlnldsgagg rpgpgsaekd pgsadseaeg lpypalapvv
61 ffylsqdsrp rswclrtvcn pwferismlv illncvtlgm frpcediacd sqrcrilqaf
121 ddfifaffav emvkvmlval ifgkkcylgd twnrldffiv iagmleysld lqnvfsfavr
181 tvrvlrplra inrvpsmril vtllldtlpm lgnvlllcff vffifgivgv qlwagllmr
241 cflpenfslp lsvdleryyq tenedesphi csqprengmr scrsvptlrg dggggppcgl
301 dyeaynsssn ttcvnwnqyy tncsagehnp fkgainfdni gyawiaifqv itlegwvdim
361 yfvmdahsfy nfiyfillii vgsffminlc lvviatqfse tkqresqlmr eqrvrflsna
421 stlasfsepg scyeellkyl vyilrkaarr laqvsraagv rvglsspap lgggetqpss
481 scsrshrrls vhhlvhhhhh hhhhyhlgng tlrpraspe iqdrdangsr rlmlpppstp
541 alsgappgga esvhsfyhad chlepvrcqa ppprspseas grtvsgskvy ptvhtspppe
601 tlkekalvev aassgpptlt slnippgyps smhklletqs tgacqsscki sspclkadsg
661 acgpdsccyc aragagevel adrempdsds eavyeftqda qhsdlrdphs rrqrsldgpa
721 epssvlafwr licdtfrkiv dskyfgrgim iailvntlsm gieyheqpee ltnaleisni
781 vftslfalem llkllvygpf gyiknypnif dgviivvisvw eivgqggggl svlrtfrlrm
841 vlklvrflpa lqrqlvvlmk tmdnvatfcm llmlfififs ilgmhlfqck faserdgtl
901 pdrknfdsl1 waivtvfqil tqedwnkvly ngmastsswa alyfialmtf gnyvlfnl1v
961 ailvegfqae gdanksesep dffspslgdg gdrkkclalv slgehpelrk sllppliht
1021 aatpmslpks tstglgealg pasrrtsssg saepgaahem ksppsarssp hspwsaassw
1081 tsrrsrnsl grapslkrrs psgerrsls gegqesqdee esseeerasp agsdhrhrgs
1141 lereakssfd lpd1lqvpgl hrtasgrgsa sehqdcngks asgrlaralr pddppldgd
1201 addegnlsg ervrawirar lpacclerds wsayifppqs rfllchrii thkmfdhvl
1261 viiflnciti amerpkidph saeriflts nyiftavfla emtvkvvalg wcfgeqaylr
1321 sswnvldgll vlisvidilv smvsdsgtki lgmlrvlrl1 rtlrplrvis raqgklk1ve
1381 tlmsslkpig nivviccaff iifgilgvql fkgkffvcqg edtrnitnks dcaeasyrwv
1441 rhkynfdnlg qalmslfvla skdgwvdimy dgl1davgvdq qpimnhpwm llyfisfl1i
1501 vaffvlmfv gvvenfhkc rqhqeear rreekrlr1l ekkrrskeq maeaackp1y
1561 sdysrfrllv hhlctshyld lfitgvigln vvtmamehyq qpqildealk icnyiftv1f
1621 vlesvklva fgfrffqdr wnqldlaivl lsimgitlee ievnaslpin ptiirimrv1
1681 riarvklk1k mavgmralld tvmqalpv1g nlgllfml1f fifaalgvel fgdlecdeth
1741 pceglgrhat frnfgmaflt lfrvstgdnw ngimkdtlrd cdqestcynt vispiyfvsf
1801 v1taqfv1vn vviavlmkhl eesnkeakee ae1eae1e mktlspqphs plgspflwpg
1861 vegpdspsd kpgalhp1ah arsashfsle hptmqphpte lpgpd1ltvr ksgvsrth1s
1921 pndsymcrhg staegplghr gwglpkaqsg svlsvhsqpa dtsyilqlpk daphllqphs
1981 aptwgtipkl pppgrsplaq rplrrqaair tdsldvqglg sredlaeee ppsprdlk1c
2041 ysveaqscqr rptswldeqr rhsiavscl1d sgsqphlgt1d psnlggqplg gpgsrpk1k
2101 sppsitidpp esqgprtpps pgic1lrrrap ssdskd1las gppdsmaasp spkkdv1sls
2161 glssdpad1d p

```

(Perez-Reyes et al., 1998; Mittman et al., 1999; Cribbs et al., 2000)

Figure 1.3 Structure quaternaire prédite du canal calcique voltage dépendant



Le canal calcique voltage dépendant est un complexe hétérooligomérique qui comporte au moins quatre sous-unités.  $\alpha_1$ , la sous-unité principale possède des sites de liaison pour tous les inhibiteurs des canaux calciques connus ainsi que le filtre de sélectivité et le segment impliqué dans la détection des changements de voltage («*voltage sensor*»). L'analyse du profil d'hydrophobicité prédit une topologie transmembranaire avec quatre domaines homologues. Chacun de ces domaines contient six hélices  $\alpha$  hydrophobiques. Le canal HVA contient aussi les sous-unités auxiliaires telles que  $\beta$  (intracellulaire),  $\alpha_2\delta$  (dimère lié par les ponts disulfides) et  $\gamma$  (transmembranaire) (Klugbauer et al., 1995).

<http://www.ipt.med.tu-muenchen.de/forschun/Klugbauer.htm>

Jusqu'à très récemment, la sous-unité  $\gamma$  n'avait été décrite que pour le muscle squelettique (Bosse et al., 1990). En 1998, Verity A. Letts et al. ont noté une similarité fonctionnelle et structurale entre la sous-unité  $\gamma$  et la protéine «stargazin» qui se retrouve uniquement dans le cerveau. Récemment, deux isoformes de la sous-unité  $\gamma$  ( $\gamma$ -2 et  $\gamma$ -3) ont été identifiées, clonées et séquencées (Black et Lennon, 1999). Des études de co-expression ont révélé une fonction modulatrice de la sous-unité  $\gamma$  du muscle squelettique sur le canal de type L incluant le changement de l'amplitude du courant maximum et des cinétiques d'activation et d'inactivation (Singer et al., 1991; Wei et al., 1991; Eberst et al., 1997). Aucun effet fonctionnel n'a été à ce jour rapporté pour les sous-unités  $\gamma$  du cerveau.

### 1.3.1 Famille des gènes codant pour les sous-unités $\alpha$ 1

Les sous-unités  $\alpha$ 1 de type HVA sont codées par des gènes nommés S ( $Ca_v1.1$ ), A ( $Ca_v2.1$ ), B ( $Ca_v2.2$ ), C ( $Ca_v1.2$ ), D ( $Ca_v1.3$ ), E ( $Ca_v2.3$ ) (Snutch et Reiner, 1992) correspondant probablement sur le plan fonctionnel aux canaux de type P (classe A), N (classe B), L (classes S, C et D) et R (classe E). La variété des sous-unités  $\alpha$ 1 est accrue par l'existence d'isoformes reflétant la spécificité tissulaire des sous-unités  $\alpha$ 1. Le gène de classe C, par exemple, produit trois isoformes codant pour des sous-unités  $\alpha$ 1 de type L (cardiaque  $\alpha$ 1C, vasculaire  $\alpha$ 1C-a et neuronale  $\alpha$ 1C-b). Quant aux canaux calciques de type T, il existe au moins trois classes des gènes codant pour ces canaux G ( $Ca_v3.1$ ), H ( $Ca_v3.2$ ) et I ( $Ca_v3.3$ ) (voir *Tableau 1.1*).

### 1.3.2 Relations structure-fonction des sous-unités $\alpha 1$

La sous-unité  $\alpha 1$ , qui forme le canal proprement dit, comporte quatre domaines ayant chacun six segments transmembranaires riches en hélices  $\alpha$ , nommés S1 à S6. Le quatrième segment transmembranaire de chaque domaine est chargé positivement (S4) et impliqué dans la détection des changements de voltage («*voltage sensor*»). D'autre part, la boucle peptidique qui relie les segments transmembranaires 5 et 6 (S5-S6) dans chaque domaine est formée de deux feuilletts  $\beta$  intramembranaires (Nargeot et Charnet, 1994) dénommés SS1-SS2, impliqués dans la formation du pore et la sélectivité du canal. Les acides aminés impliqués dans la perméabilité et la sélectivité pour les ions calcium ont été identifiés en comparant les séquences primaires des canaux sodiques et calciques dont la structure secondaire prédite est similaire mais dont la sélectivité ionique est entièrement différente. Une des plus importantes variations de structure entre les canaux sodiques et calciques se trouve au niveau SS1-SS2 dans les domaines *III* et *IV* où des acides aminés chargés négativement (Glu) des canaux calciques sont remplacés par des acides aminés chargés positivement (Lys) et neutres (Ala) dans les canaux sodiques. Les mutations Lys<sup>1422</sup>  $\rightarrow$  Glu et Ala<sup>1714</sup>  $\rightarrow$  Glu dans le canal sodique augmentent significativement la perméabilité de ce canal aux ions calcium (Heinemann et al., 1992). Inversement, la substitution dans les canaux calciques d'un ou plusieurs de ces Glu par Gln dans la partie SS1-SS2 des domaines *I* (E393Q), *III* (E1145Q) ou *IV* (E1446Q) altère fortement la perméabilité des ions divalents dans le canal  $\alpha 1C$  exprimé dans l'ovocyte de *Xenopus* (Parent et Gopalakrishnan, 1995). La neutralisation des résidus glutamate (Glu) dans le domaine *II* n'affecte pas significativement l'affinité du canal  $\alpha 1C$  aux ions calcium. Fait à noter, les mutations



dans les résidus avoisinants (E1149K et D1450N) ne produisent aucun effet sur l'affinité du canal ce qui confirme le rôle unique des résidus glutamate dans la sélectivité aux ions calcium (Parent et Gopalakrishnan, 1995).

Le domaine (AID) d'interaction avec la sous-unité  $\beta$  (pour « $\alpha 1$ -interaction domain») est situé sur la boucle intracellulaire de la sous-unité  $\alpha 1$  entre les domaines *I* et *II* (voir aussi la section 2.3) et comporte une séquence minimale de 18 acides aminés dont neuf (-QQ-E--L-GY--WI---E) sont totalement conservés entre toutes les  $\alpha 1$  à l'exclusion des canaux LVA ( $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$ ,  $\alpha 1I$ ). Cette séquence est localisée en 3' du domaine *I* dans les canaux HVA. Certaines mutations à l'intérieur du motif AID non seulement abolissent l'interaction  $\alpha 1$ - $\beta$  mais aussi provoquent une perte de la régulation de la sous-unité  $\beta$  ce qui démontre que AID est responsable, en partie, des effets fonctionnels de  $\beta$  (Pragnell et al. 1994). De plus, le complexe  $\beta\gamma$  de la protéine G est capable de se lier à deux sites dans la boucle *I* – *II*. Un de ces sites chevauche le AID (De Waard et al., 1997), ce qui suggère un antagonisme fonctionnel entre le complexe  $\beta\gamma$  des protéines G et la sous-unité  $\beta$  régulatrice des canaux calciques (Page et al., 1997).

La structure responsable du couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique via le récepteur de ryanodine qui mobilise le calcium du réticulum sarcoplasmique est située au niveau de la boucle qui relie les domaines *II* et *III* de  $\alpha 1S$  (Slavik et al., 1997).

L'analyse de la structure primaire du canal de type L  $\alpha 1C$  indique que les sites responsables de la phosphorylation dépendante de la protéine kinase A (PKA) qui stimule l'activité du canal sont situés sur la partie carboxyterminale de la protéine. Gao et collègues ont démontré d'abord, que la régulation du canal  $\alpha 1C$  par la PKA exige la liaison de la PKA avec une AKAP79 (pour «A-kinase *anchoring protein*») et ont déterminé ensuite, que la phosphorylation en Ser 1928 est critique pour la régulation médiée par PKA (Gao et al., 1997). En ce qui concerne la protéine kinase C (PKC), ces mêmes chercheurs suggèrent que les cinq premiers résidus de la partie N-terminale du canal  $\alpha 1C$  sont responsables de la modulation par la PKC. Le mécanisme d'action de la PKC sur le canal reste encore inconnu car les cinq premiers résidus ne sont ni des sérines ni des thréonines et ils ne peuvent pas être directement phosphorylés. La PKC pourrait agir sur le canal soit par l'intermédiaire d'une protéine auxiliaire, soit par la phosphorylation d'un autre site du canal qui agirait de façon allostérique avec la partie N-terminale. Quoiqu'il en soit, une corrélation entre la localisation des résidus responsables de ces deux fonctions importantes supporte l'hypothèse que la PKC exerce son action stimulatrice en atténuant l'inhibition imposée par le N-terminal (Shistik et al., 1999)

#### **1.4 Sous-unités auxiliaires**

Les sous-unités  $\alpha 2$ - $\delta$  et  $\beta$  sont probablement associées à la plupart des diverses sous-unités  $\alpha 1$  des canaux HVA (Nargeot et Charnet, 1994; Walker et De Waard, 1998). Sur le plan fonctionnel, c'est la sous-unité  $\beta$  qui exerce la plus grande influence et qui contribue probablement le plus à la diversité fonctionnelle des canaux calciques. On peut

mentionner que la sous-unité  $\alpha 2\text{-}\delta$  est la plus conservée et que jusqu'à présent, on n'a caractérisé qu'un seul gène codant pour cette sous-unité produisant cependant cinq isoformes par épissage alternatif (Ellis et al., 1988 ; Brust et al., 1993). La co-expression de  $\alpha 2\text{-}\delta$  en combinaison avec  $\beta$  augmente l'intensité du courant calcique à travers les canaux  $\alpha 1\text{B}$  (Brust et al., 1993),  $\alpha 1\text{A}$  (De Waard et Campbell, 1995) et  $\alpha 1\text{E}$  (Parent et al., 1997), module les cinétiques d'activation et d'inactivation et probablement stabilise la sous-unité  $\alpha 1$  dans la membrane. En absence de  $\beta$ ,  $\alpha 2\text{-}\delta$  a peu d'effet sur les propriétés biophysiques de ces canaux (Parent et al., 1997) ce qui suggère un effet synergique des sous-unités auxiliaires sur l'expression fonctionnelle de la sous-unité  $\alpha 1$ .

Platano et collaborateurs rapportent que la co-expression de  $\alpha 2\text{-}\delta$  avec  $\alpha 1\text{C}+\beta 3$  produit un effet semblable au prépulse positif en augmentant l'amplitude du courant et en déplaçant la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs. Ce phénomène est connu sous le nom de facilitation dépendante du voltage. Donc, en présence de la sous-unité  $\alpha 2\text{-}\delta$  le canal se stabiliserait dans un état conformationnel qui lui permettrait d'atteindre l'état ouvert plus facilement (Singer et al., 1991, Platano et al., 2000).

La sous-unité  $\beta$  est une protéine cytoplasmique associée à  $\alpha 1$ . La première sous-unité  $\beta$  clonée fut désignée  $\beta 1$ . Les ADNc correspondant à trois autres gènes ont été clonés ( $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ). Les sous-unités  $\beta$  ne possèdent pas de patron précis de distribution tissulaire contrairement aux sous-unités  $\alpha 1$ . Les sous-unités  $\beta$  jouent un rôle particulièrement important dans la modulation de l'activité du canal calcique. Il a été

montré que la majorité des sous-unités  $\beta$  augmentent fortement l'amplitude des courants calciques exprimés à partir des diverses familles de  $\alpha 1$  dans l'ovocyte de *Xenopus* ou les cellules de mammifères (Wei et al., 1991; Shistik et al., 1995; Castellano et al., 1993a,b) et modifient les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des canaux calciques. Parent et al. (1997) démontrent que le taux d'inactivation du canal  $\alpha 1E$  est généralement augmenté en présence des sous-unités  $\beta$  dans l'ordre  $\beta 3 > \beta 1 > \beta 4 \gg \beta 2a$  (de plus rapide à plus lent). La sous-unité  $\beta 2a$  peut même ralentir l'inactivation de  $\alpha 1E$ . Cette séquence de modulation est comparable avec celle obtenue pour les canaux  $\alpha 1C$  (Hullin et al., 1992) et  $\alpha 1A$  (De Waard et Campbell, 1995). De plus, les sous-unités  $\beta$  déplacent généralement la courbe d'inactivation à l'état stable vers des potentiels plus négatifs.

### **1.5 Courants calciques de bas seuil des canaux «natifs» dans le système nerveux central**

Les courants calciques de bas seuil LTCC (pour «*low-threshold calcium current*») ont été étudiés chez des neurones du système nerveux central à l'aide de techniques électrophysiologiques. Ces courants sont particulièrement abondants dans le soma et les dendrites des neurones du thalamus et dans les cellules Purkinje où on observe une forte activité de type «burst» dépendante du calcium extracellulaire (Huguenard, 1996).

Les courants LTCC sont générés par les canaux calciques LVA. Les canaux LVA ont été identifiés dans le milieu des années 1980 grâce aux études sur les neurones du ganglion dorsal (Carbon et Lux, 1984, Fedulova et al., 1985, Nowycky et al., 1985), sur

les myocytes cardiaques (Nilius et al., 1985; Bean, 1985) et sur les cellules pituitaires (Matteson et Armstrong, 1986). Ces études ont déterminé les propriétés selon lesquelles on peut distinguer les canaux LVA des canaux HVA. Ce sont : 1) l'ouverture aux potentiels membranaires plus négatifs (autour du potentiel membranaire), 2) l'inactivation plus rapide, 3) l'inactivation à des potentiels plus négatifs, 4) la désactivation plus lente, 5) une plus faible conductance unitaire du canal LVA en présence de baryum, 6) une persistance plus soutenue des courants en fonction du temps de mesure, c'est-à-dire une quasi-absence de « rundown » (le « rundown » étant une diminution non spécifique du courant en fonction du temps de mesure), 7) une absence de sensibilité aux inhibiteurs classiques des canaux calciques de type L.

En conditions physiologiques, le seuil d'activation des courants LVA est très proche du potentiel membranaire de repos (de  $-50$  à  $-60$  mV) et le canal est normalement complètement activé à des potentiels de  $-30$  à  $-20$  mV. L'activation est relativement graduelle dans la plupart des cas et exige une dépolarisation de 6-7 mV pour augmenter la conductance par un facteur exponentiel. Le voltage, auquel la moitié des courants est activée ( $V_{50}$ ), est comparable dans les différents types cellulaires et varie entre  $-60$  et  $-45$  mV. Le taux d'activation est fortement dépendant du voltage. Il y a un délai significatif dans l'apparition du courant ce qui suggère que le canal doit passer à travers plusieurs états fermés avant de s'ouvrir (Herrington et Lingle, 1992).

En conditions normales les canaux LVA sont perméables aux ions calcium ainsi qu'aux ions baryum et strontium. La perméabilité du canal au calcium est comparable à celle du baryum (Fedulova et al., 1985). Les courants LVA ont une conductance unitaire

assez faible (5-9 pS) (Fox et al., 1987) par rapport aux canaux de type L dans les mêmes conditions expérimentales. Dès que la concentration externe de calcium devient inférieure à 100  $\mu\text{M}$ , les canaux LVA, tout comme l'ensemble des canaux calciques, deviennent perméables aux cations monovalents incluant les ions sodium et lithium. En absence complète de cations divalents, la conductance du canal unitaire est plus grande (12-20 pS).

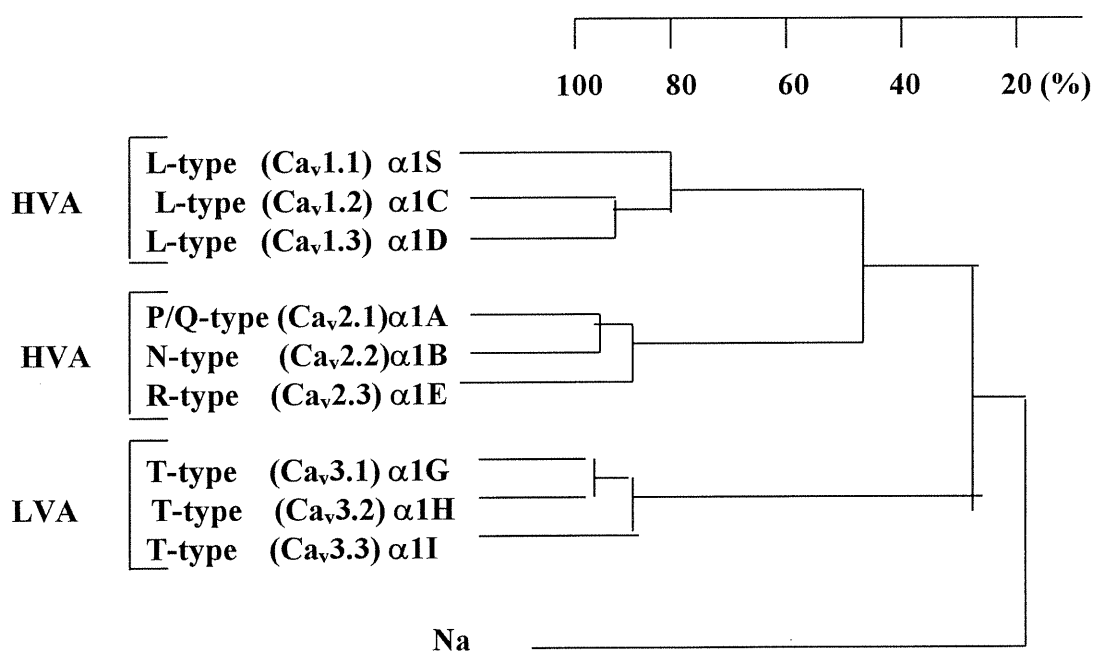
### 1.6 Caractérisation moléculaire des canaux LVA

La recherche sur les gènes qui codent pour les canaux LVA a commencé par l'analyse des séquences EST (pour « *expressed sequence tag* ») dans GenBank qui a permis de cloner trois membres différents de la famille des canaux LVA:  $\alpha\text{1G}$  (Perez-Reyes et al., 1998),  $\alpha\text{1H}$  (Cribbs et al., 1998) et  $\alpha\text{1I}$  (Lee et al., 1999). Des études plus récentes démontrent une distribution spécifique des ARNm de chacun de ces canaux dans le système nerveux central de rat. Le niveau d'expression de ces transcrits était très fort dans les régions qui manifestent de façon spectaculaire les courants natifs de type T incluant la région de l'olive interne et les neurones du relais thalamique ( $\alpha\text{1G}$ ), les ganglions sensoriels, l'hypophyse et les neurones de *gyrus dentatus* ( $\alpha\text{1H}$ ) et les noyaux réticulaires du thalamus ( $\alpha\text{1I}$  et  $\alpha\text{1H}$ ). Ces observations indiquent une forte corrélation entre la localisation des transcrits de ces gènes et les courants natifs décrits précédemment à la section 1.5. Les autres régions qui démontrent un haut niveau d'expression des canaux LVA ( $\text{Ca}_v3.1-3.3$ ) sont les cellules Purkinje du *cerebellum*, le *claustrum* ( $\alpha\text{1G}$ ), les tubercules olfactifs ( $\alpha\text{1I}$  et  $\alpha\text{1H}$ ) et les noyaux subthalamiques

( $\alpha 1I$  et  $\alpha 1G$ ). Certains neurones expriment les trois gènes, mais plusieurs neurones expriment préférentiellement  $\alpha 1G$  (Talley et al., 1999).

Au niveau structural les sous-unités  $\alpha 1G$  ont moins de 30 % d'homologie avec les sous-unités  $\alpha 1$  des canaux HVA (*Tableau 1.2*).

*Tableau 1.2* Homologie entre les sous-unités  $\alpha 1$  des canaux calciques



La nomenclature alphabétique ne reflète pas les relations structurales entre les sous-unités  $\alpha 1$  selon lesquelles nous pourrions les regrouper en trois familles. La séquence complète des acides aminés de sous-unités  $\alpha 1$  de même famille est à 80 % identique mais diffère considérablement entre les membres des familles différentes.

(Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hoffman, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., Catterall, W.A. 2000)

La différence structurale la plus remarquable consiste en l'absence du domaine d'interaction avec la sous-unité  $\beta$  (AID) (Walker et De Waard, 1998). Cette observation suggère que les canaux  $Ca_v3.1-3.3$  pourraient être insensibles à la modulation par la sous-unité  $\beta$ .

En ce qui concerne des canaux  $Ca_v3.1-3.3$ , Dolphin et collègues ont rapporté dans les cellules COS-7 une augmentation du transport de  $\alpha1G$  vers la membrane plasmique ainsi qu'une augmentation de l'amplitude des courants en présence de la sous-unité  $\alpha2b-\delta$  (Dolphin et al., 1999). Récemment, toutefois, cette conclusion a été rejetée par Lacinova et collaborateurs qui n'ont jamais observé de différence significative entre l'amplitude du courant et les paramètres cinétiques du canal  $\alpha1G$  exprimé seul ou en combinaison avec la sous-unité  $\alpha2-\delta-1$  ou  $\alpha2-\delta-3$  (Lacinova et al, 1999). L'absence de régulation de  $\alpha1G$  par la sous-unité  $\alpha2b-\delta$  lorsqu'exprimée dans les ovocytes de Xénope a été maintes fois confirmée dans notre laboratoire (Agueev et al., observations non publiées). On doit mentionner ici que Lacinova travaillait avec les sous-unités  $\alpha2-\delta-1$  et  $\alpha2-\delta-3$  alors que le groupe de Dolphin a utilisé  $\alpha2b-\delta$  ou  $\alpha2-\delta-2$ , la même isoforme avec laquelle nous travaillons. La co-expression de  $\alpha1G$  avec la sous-unité  $\alpha2-\delta-2$  déplace la courbe d'inactivation à l'état stable vers les potentiels plus négatifs ce qui suggère une interaction fonctionnelle entre les deux sous-unités (Hobom et al., 2000). Ces chercheurs ont observé une co-localisation de ARNm codant pour  $\alpha2-\delta-2$  et  $\alpha1G$  dans les cellules Purkinje de *cerebellum* de souris. Donc, la possibilité de la formation d'un complexe fonctionnel entre les sous-unités  $\alpha1G$  et  $\alpha2-\delta-2$  ne peut pas être exclue. Cette



observation suggère que certaines isoformes d'une même sous-unité auxiliaire peuvent conférer des effets fonctionnels différents à la sous-unité principale.

### 1.7 Caractérisation fonctionnelle des sous-unités $\alpha 1G$ , $\alpha 1H$ et $\alpha 1I$

L'expression de  $\alpha 1H$ ,  $\alpha 1G$  et  $\alpha 1I$  de rat dans les cellules HEK-293 (HEK pour «human embryonic kidney») entraîne l'apparition de courants calciques entrants en présence de 1,25 mM de calcium (Klöckner et al., 1999). Il existe des différences et des similitudes entre les propriétés biophysiques de ces trois canaux. Dans tous les cas, le courant commence à s'activer à un potentiel  $\approx -60$  mV en atteignant son maximum à  $\approx -30$  mV (*Tableau 1.3*). Aux potentiels plus positifs (jusqu'à +50 mV) le courant diminue et s'approche de zéro. Les propriétés biophysiques d'activation sont similaires pour  $\alpha 1G$  et  $\alpha 1H$ , mais légèrement différentes pour les courants induits par  $\alpha 1I$  (*Tableau 1.3*).

*Tableau 1.3 Propriétés des courants calciques induits par l'expression stable de  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  et  $\alpha 1I$  dans les cellules HEK-293*

	$\alpha 1G$	(n)	$\alpha 1H$	(n)	$\alpha 1I$	(n)
$V_{50}$ (mV)	$-45.5 \pm 0.6$	11	$-45.8 \pm 0.7$	11	$-43.8 \pm 0.5$	11
$V_{pk}$ (mV)	$-29.2 \pm 0.8$	11	$-29.4 \pm 0.6$	11	$-27.6 \pm 0.7$	11
$V_h$ (mV)	$-72.8 \pm 1.3$	8	$-72.0 \pm 1.2$	8	$-72.5 \pm 1.0$	8

$V_{50}$  (potentiel auquel la moitié des courants est activée)

$V_{pk}$  (potentiel qui produit le maximum du courant entrant)

$V_h$  (potentiel auquel la moitié des courants est inactivée)

Le tableau démontre les similitudes entre les propriétés biophysiques de ces trois canaux. Les potentiels auxquels la moitié des canaux est activée ( $V_{50}$ ) et les potentiels du courant

maximum (« *peak current* ») sont similaires pour  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$  et  $\alpha 1I$ . Il n'y a pas de différence dans les potentiels auxquels la moitié des canaux est inactivée (Klöckner et al., 1999).

Le courant  $\alpha 1G$  démontre une cinétique d'activation et d'inactivation plus rapide par rapport aux courants  $\alpha 1H$  et  $\alpha 1I$ . Quant à l'inactivation à l'état stable mesurée après un prépulse de 15 sec, aucune différence significative n'a été observée dans les potentiels auxquels la moitié des canaux est inactivée. Les courants induits par  $\alpha 1G$  et  $\alpha 1H$  sont deactivés avec une constante de temps de 6 ms à un potentiel test de  $-80$  mV. Par contre, le courant  $\alpha 1I$  se déactive trois fois plus rapidement. Le recouvrement de l'inactivation est plus lent pour les courants  $\alpha 1H$  ( $\tau_h = 395$  ms) et  $\alpha 1I$  ( $\tau_h = 352$  ms) comparativement au courant  $\alpha 1G$  ( $\tau_h = 117$  ms). Le courant calcique entrant à travers le canal  $\alpha 1I$  est stimulé par l'application des prépulses positifs. Par contre, les canaux  $\alpha 1H$  et  $\alpha 1G$  démontrent peu ou aucune facilitation. Ces résultats permettent de distinguer chacun des canaux de type T de façon assez précise. Contrairement aux expériences effectuées sur les tissus natifs, les canaux recombinants de type T  $\alpha 1G$  exprimés de façon stable dans les cellules HEK-293 sont beaucoup moins sensibles à la plupart des inhibiteurs organiques (l'éthosuximide, le valporate). Lacinova et collaborateurs ont montré que le canal  $\alpha 1G$  était modérément inhibé (environ 55 % d'inhibition) par le phénytoïne ( $IC_{50} = 73.9 \pm 1.9$   $\mu M$ ) et était résistant à l'inhibition par le valporate. L'éthosuximide (3 mM) inhibe le canal  $\alpha 1G$  à 20-35% (Lacinova et al., 2000).

Selon Lacinova, la différence dans ces résultats suggère une contribution des autres membres de la famille des canaux LVA ( $Ca_v3.1-3.3$ ) dans l'inhibition du courant

natif et la contribution de facteurs de régulation non identifiés à ce jour. Donc, à ce jour on ne connaît pas d'inhibiteur organique spécifique pour les canaux  $Ca_v3.1-3.3$ .

## 1.8 Épilepsie et les courants calciques

L'épilepsie est une maladie caractérisée par une activité électrique excessive soit partielle soit généralisée du cerveau. Au niveau de l'électroencéphalogramme (EEG) l'épilepsie généralisée chez les humains se manifeste par l'apparition brusque de bouffées synchronisées bilatérales appelées SWD (pour «*spike and wave discharges*»). Cette brusque apparition ainsi que la cessation de décharges électroencéphalographiques pendant la crise épileptique suggèrent l'existence d'un générateur («*pacemaker*»). Ce «*pacemaker*» serait situé au centre du cerveau avec projections diffuses dans le cortex et serait responsable des SWD bilatérales et synchronisées (Jasper et Kershman, 1941). En 1950, Spiegel et Wycis et en 1953, Williams ont démontré que les SWD chez les humains prennent leur origine dans le thalamus qui est reconnu pour son implication dans la génération de la rythmicité spontanée du cortex. Les noyaux thalamiques sont capables de générer des oscillations qui entraînent l'apparition d'une activité rythmique synchrone («*spindling*») dans tout le système thalamocortical (Jansen et Llinás, 1984; Steriade et Deschenes 1984; McCormic 1992; Steriade et al., 1993). Le rôle potentiel des neurones thalamiques dans la génération de la synchronisation pathologique et la maintenance des SWD a été étudié chez un modèle animal GAERS (pour «*Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg*») dont le génome a été modifié pour mimer les caractéristiques électroencéphalographiques de l'épilepsie humaine (Marescaux et al.,

1992). Les travaux de Tsakiridou et collaborateurs (1995) indiquent une augmentation sélective des courants de type T dans les neurones réticulaires de thalamus chez les rats GAERS comparativement aux animaux du groupe témoin nonépileptique.

### **1.9 Gabapentine et les médicaments anti-épileptiques**

Les médicaments anti-épileptiques classiques peuvent réduire l'excitabilité neuronale d'abord, par une diminution du recouvrement de l'inactivation des canaux sodiques dépendants du potentiel, ou encore par une augmentation de la neurotransmission médiée par l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) ou finalement, par la réduction des courants calciques de type T (Macdonald, 1994). Dans la plupart des cas le mécanisme responsable de l'activité anticonvulsante reste mal compris. Il est aussi possible qu'un médicament donné agisse à la fois sur plusieurs types de récepteurs ou de canaux ioniques.

La gabapentine (Neurontin<sup>TM</sup>) est un médicament breveté par la compagnie Parke-Davis (maintenant Pfizer) qui est très efficace dans le traitement des crises épileptiques chez les humains (Rowen et al., 1989). De plus, ce médicament est également utilisé dans le traitement de pathologies neurodégénératives et de neuralgies chroniques (Welty et al., 1995; Cochran, 1996; Mellick et Mellick, 1996; Patel et Naritoku, 1996; Segal et Rordorf, 1996). Il s'agit d'un analogue cyclique du GABA, l'acide 1-aminométhylcyclohexane acétique qui possède une grande liposolubilité pour en faciliter le passage à travers la barrière haemato-encéphalique. Conçu pour mimer

l'effet du GABA (Schmidt, 1989), aucun effet spécifique sur la neurotransmission GABAergique n'a jamais été démontré de façon convaincante (Bartoszyk et Reinmann, 1985). La gabapentine n'affecte pas le site de liaison du [ $^3\text{H}$ ]-muscimol, du [ $^3\text{H}$ ]-diazepam ou du [ $^3\text{H}$ ]-baclofen dans le cerveau de rat. Cette absence de compétition au site de liaison suggère que la gabapentine ne se lie pas de façon spécifique aux récepteurs GABA $\alpha$  et GABA $\beta$  (Bartoszyk et al., 1986). Par contre, la gabapentine contribue à l'accélération du recyclage («*turnover*») de GABA dans plusieurs régions du cerveau de rat (Loscher et al., 1991) ainsi qu'à l'augmentation du niveau de GABA chez les patients épileptiques (Petroff et al., 1996). Wamil et collègues (1994) rapportent que la gabapentine limite le déclenchement des potentiels d'action à haute fréquence dans les cellules neuronales des souris. Toutefois, la gabapentine n'affecte pas l'activité des sous-unités  $\alpha$  des canaux sodiques exprimés dans les cellules CHO (pour «*Chinese Hamster Ovary*») (Taylor, 1993).

Les expériences de Todorovic ont établi les propriétés pharmacologiques principales des courants calciques de type T isolés à partir des cellules de DRG (pour «*dorsal root ganglion*») de souris. Une attention particulière a été portée aux agents anesthésiques et anticonvulsants qui inhibent pour la plupart les courants de type T. Les agents antiépileptiques, éthosuximide ( $\text{IC}_{50} = 23.7\text{mM}$ ), phénytoïn ( $\text{IC}_{50} = 7.3\ \mu\text{M}$ ),  $\alpha$ -méthyl- $\alpha$ -phénylsuccinimide ( $\text{IC}_{50} = 170\ \mu\text{M}$ ) et l'acide valproïque ( $\text{IC}_{50} = 330\ \mu\text{M}$ ) inhibent le courant de type T à 100, 60, 26 et 17% respectivement (Todorovic et Lingle, 1998). L'inhibition est réversible après le rinçage. Par contre, un autre antiépileptique, la carbamazépine, ne produit aucun effet sur les courants de type T des cellules de DRG.

Les barbiturates (thiopental, pentobarbital, méthohexital, phénobarbital) ainsi que les anesthésiques généraux (propofol, octanol, étomidate, isoflurane, halothane, kétamine) inhibent toutefois complètement les courants natifs de type T.

Récemment, la possibilité que les canaux calciques représentent une cible potentielle pour la gabapentine a été examinée. La gabapentine inhibe partiellement (inhibition maximale était de l'ordre 34%,  $IC_{50} = 3.65 \mu\text{M}$ ) les courants calciques de type L dans des neurones isolés du cerveau de rat (A.Stefani et al., 1998). De plus, une protéine qui est capable de se lier à la gabapentine a été isolée à partir du cortex cérébral de cochon. La séquence N-terminale de cette protéine est identique à la sous-unité  $\alpha 2\text{-}\delta$  du canal calcique de type L du muscle squelettique du lapin (Gee et al., 1996). Toutes ces observations suggèrent un rôle possible des canaux calciques comme cible moléculaire de la gabapentine sans, toutefois, préciser la nature moléculaire du site de liaison.

### **1.10 But des travaux**

Dans nos expériences nous avons utilisé des canaux recombinants. Cette approche nous a permis de travailler avec une population dominante des canaux exprimés soit dans les cellules HEK soit dans les ovocytes de *Xenopus*. Les travaux précédents sur les cellules neuronales natives ont été limités par le fait de co-existence des différents types des canaux calciques sur une même cellule. Dans notre cas, nous avons eu la possibilité

de travailler avec un type particulier de canaux ce qui nous a permis d'observer l'effet de différents agents pharmacologiques sur le canal de notre intérêt.

À l'heure actuelle les conclusions concernant le mécanisme d'action de la gabapentine restent controversées. D'une part, la gabapentine pourrait exercer son effet inhibiteur au niveau présynaptique en diminuant l'influx du calcium à travers les canaux calciques dépendants du voltage réduisant ainsi la libération de neurotransmetteurs liés à excitation cellulaire (Fink et al, 2000). D'autre part, les travaux de Calabresi démontrent l'effet de cette drogue au niveau postsynaptique où la gabapentine réduit la sensibilité des cellules au glutamate (Calabresi et al., 1999). Ces données suggèrent que la gabapentine est une drogue avec des sites d'action multiples qui pourrait agir sur différents types des canaux calciques..

Le but ultime de nos études serait d'identifier la cible moléculaire de la gabapentine. En sachant que les canaux calciques de type T sont peut-être impliqués dans la genèse de maladies épileptiques, nous avons étudié l'inhibition de ces canaux par la gabapentine. De plus, nous avons testé les canaux calciques de type L et R comme cibles additionnelles de la gabapentine. La spécificité des effets de la gabapentine a aussi été étudiée. L'étude des analogues de la gabapentine a été effectuée afin de nous renseigner quant à la spécificité du site de liaison de la gabapentine sur le canal. Nous avons essayé d'évaluer l'importance de la sous-unité auxiliaire  $\alpha 2\text{-}\delta$  dans ce processus. Finalement, nous avons caractérisé l'effet d'inhibiteurs inorganiques  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  sur les canaux  $\alpha 1\text{G}$  et  $\alpha 1\text{H}$ .

## 2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Expression fonctionnelle des canaux $\alpha 1C$ , $\alpha 1G$ et $\alpha 1H$ dans les ovocytes de *Xenopus*

La femelle de la grenouille *Xenopus laevis* (Nasco, Fort Atkinson, WI) a été anesthésiée par l'immersion dans une solution 0.1 % de tricaine ou MS-222 (3-aminobenzoic acid ethyl ester) (Sigma) pour une période minimale de 15 minutes avant la chirurgie (Parent et al., 1995). Le tissu ovarien a été extrait via une petite incision au niveau de l'abdomen. Des ovocytes individuels libres de cellules folliculaires ont été obtenus après une incubation de 60 minutes dans une solution Barth, 0  $Ca^{2+}$  (en mM) : 88 NaCl ; 3 KCl ; 0,82  $MgCl_2$  ; 5 Hepes ; pH 7,6 contenant 1,6 mg/ml de collagénase (Gibco). Des ovocytes du stade V et VI soigneusement sélectionnés ont été injectés avec 47 nl d'ARN codant soit pour  $\alpha 1H$  (GenBank AF051946), soit pour  $\alpha 1G$  (GenBank AF027984), soit pour  $\alpha 1C$  (GenBank X15539) à une concentration de 100 ng/ml en utilisant un injecteur automatique d'ovocytes Drummond. Dans certaines expériences, la sous-unité  $\alpha 1G$  a été co-injectée avec la sous-unité  $\alpha 2b\delta$  en concentrations égales (Dolphin et al., 1999). Après l'injection d'ARN, les ovocytes sont incubés entre 3 et 7 jours à une température de 18°C dans une solution de Barth normale (en mM) : 88 NaCl ; 3 KCl ; 0,41  $CaCl_2$  ; 0,33  $Ca(NO_3)_2$  ; 5 Hepes ; pH 7,6 avec des suppléments de sérum de cheval 5%, 2,5 mM de pyruvate de sodium, 100 u/ml de pénicilline ; 0,1 mg/ml de streptomycine.



## 2.2 Enregistrements électrophysiologiques sur les ovocytes

Les courants macroscopiques ont été enregistrés en utilisant l'amplificateur à deux électrodes (OC-725C, Warner Instruments). L'électrode de voltage et l'électrode de courant (résistance 0.5-2 M $\Omega$ ) ont été remplies avec une solution contenant 3 M KCl ; 1 mM EGTA ; 10 mM Hepes (pH 7.4). Les électrodes du bain ont été remplies avec la même solution dans une suspension d'agar 3%. Avant d'enregistrer des courants, les ovocytes sont d'abord incubés dans une solution modifiée de Ringer (en mM) : 96 NaOH ; 2 KOH ; 1,8 CaCl<sub>2</sub> ; 1 MgCl<sub>2</sub> ; 10 Hepes titrée avec l'acide méthanesulfonique CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H (MeS) jusqu'au pH 7,4. Ensuite, le bain est perfusé avec une solution de 10 Ba<sup>2+</sup> (en mM) : 10 Ba(OH)<sub>2</sub>; 110 NaOH; 1 KOH; 0,5 l'acide niflumique; 10 Hepes titrée avec MeS jusqu'à un pH de 7,2. Pour minimiser l'apparition de courants endogènes Cl<sup>-</sup> activés par le Ca<sup>2+</sup>, les ovocytes sont préincubés pendant deux heures, juste avant les enregistrements, en présence de 100 $\mu$ M de Bapta-AM (Calbiochem, San Diego, CA), un analogue perméable du Bapta. Le bain dans lequel les ovocytes baignent est perfusé par gravité à un taux de 2 ml/min ce qui permet d'échanger complètement le bain en 30 secondes.

Pour les enregistrements de  $\alpha$ 1C, une série de pulses de - 40 à + 50 mV ( par sauts de 10 mV) d'une durée de 450 ms a été appliquée à partir d'un voltage de repos de - 80 mV à une fréquence de 0,2 Hz. Pour les enregistrements de  $\alpha$ 1G et  $\alpha$ 1H, une série de pulses de - 70 à + 40 mV (par sauts de 10 mV) d'une durée de 250 ms a été appliquée à partir d'un potentiel de repos de - 100 mV à une fréquence de 0,2 Hz. Toutes les expériences ont été effectuées à la température de la pièce (20-22°C).

### 2.3 Lignées cellulaires stables dans les cellules HEK-293

Certaines expériences ont été également effectuées avec les lignées cellulaires HEK-293 qui expriment de façon stable soit les canaux  $\alpha 1E$ , soit les canaux  $\alpha 1C$ , soit les canaux  $\alpha 1G$ . Pour la lignée  $\alpha 1E/\beta 3$ , les sous-unités  $\alpha 1E$  et  $\beta 3$  ont été transfectées dans les cellules HEK-293 modifiées tsA-21 en utilisant deux plasmides différents (Pereverzev et al., 1998). La sous-unité  $\alpha 1E$  (GenBank L27745) a été sous-clonée dans le vecteur pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La sous-unité  $\beta 3$  du cerveau humain (GenBank X76555) a été sous-clonée dans le vecteur pZeoSV (Invitrogen, Carlsbad, CA). La lignée stable qui exprime  $\alpha 1E$  et la lignée stable  $\alpha 1E/\beta 3$  ont été cultivées en présence de DMEM (Gibco), 25 mM glucose, 2,2 g/l  $\text{NaHCO}_3$  avec des suppléments de 10% sérum de calf nouveau-né (Gibco), 100 U/ml pénicilline, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycine, 0,4 mg/ml G-418 (Gibco Life Technologies), 0,25 mg/ml zeocine (Invitrogen) dans une atmosphère de 5% de  $\text{CO}_2$ .

Les lignées cellulaires qui expriment de façon stable les canaux de type L,  $\alpha 1C/\alpha 2a\delta/\beta 2a$  ont été obtenues du Dr Leanne Cribbs (Loyola Medical Center, Chicago). La sous-unité  $\alpha 1C$  (Wei et al., 1991) (GenBank X15539) a été sous-clonée dans le vecteur pRC-CMV. La sous-unité  $\beta 2a$  (GenBank M80545) (Perez-Reyes et al., 1992) a été sous-clonée dans le vecteur pZeoSV et la sous-unité  $\alpha 2a\delta$  squelettique du lapin (Tanabe et al., 1987) a été sous-clonée dans le vecteur pCEP. Les cellules  $\alpha 1C$  ont été cultivées dans les milieux DMEM (Gibco) ci-haut décrits. La sous-unité  $\alpha 1G$  (GenBank AF27984) a été sous-clonée dans le vecteur pRC-CMV (Lee et al., 1999). La lignée

cellulaire stable de  $\alpha 1G$  a été cultivée en présence de DMEM (Gibco) (voir plus haut) et 0,4 mg/ml G-418.

#### 2.4 Enregistrements électrophysiologiques dans les lignées cellulaires stables

Les expériences de « *patch-clamp* » ont été effectuées dans la configuration « cellule entière » en utilisant un amplificateur Axopatch 200-B (Axon Instruments). Les pipettes de « *patch* » ont été produites à partir de tubes capillaires de micro-hématocrite (Fisher) en utilisant une étireuse programmable Narishige. Les pipettes ont été remplies avec une solution contenant (en mM) : 80 acide glutamique; 15 EGTA; 5 BAPTA; 10 HEPES; 150 N-méthyl-D-glutamine (NMDG); 1,4  $MgCl_2$ ; 7,9  $Ca(OH)_2$ ; 1 glutamine; 4  $MgATP$ ; 1  $MgGTP$  titrée avec une solution 1M de NMDG-base jusqu'à un pH de 7,4. L'osmolarité de la solution était fixé à 290 mosm/kg. La résistance de mes pipettes variait entre 4 et 8  $M\Omega$ . Pour les enregistrements, les cellules étaient d'abord placées dans une solution « HEK-tyrode » contenant (en mM) : 143 NaCl; 5,4 KCl ; 1,8  $CaCl_2$  ; 1  $MgCl_2$ ; 0,25  $NaH_2PO_4$ ; 10 HEPES; 5 glucose titrée avec le TRIS jusqu'à un pH de 7,4. Après avoir obtenu la configuration « cellule entière », la solution du bain était remplacée par la solution 10  $Ba^{2+}$  contenant (en mM) : 10  $Ba(OH)_2$ ; 20 HEPES ; 15 tétraéthylammonium-chloride; 90 NMDG; 0,5 EGTA; 140 acide méthanesulfonique titrée avec une solution 1M de NMDG-base jusqu'à un pH de 7,4. Aucune compensation de la résistance en série n'a été effectuée. Les cellules étaient constamment perfusées par simple gravité à un taux de perfusion de 1 ml/min ce qui permet d'échanger complètement le bain en 20 secondes. Toutes les expériences ont été effectuées à la

température de la pièce (20-22°C). L'osmolarité de toutes les solutions a été maintenue à 290 mOsm/kg.

## 2.5 Acquisition des données et l'analyse

Les logiciels de *PClamp* Clampex 6.02 et Clampfit 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA) ont été utilisés pour l'acquisition des données en temps réel et leur analyse. Les données ont été capturées à la fréquence de 20 kHz et filtrées à 5 kHz à l'aide du filtre intégré à l'amplificateur. Les transients capacitifs ont été effacés pour les figures finales. L'analyse statistique et le test t de Student ont été exécutés en utilisant les routines incluses dans le logiciel Origin 5.0 (Microcal Software, Northampton, MA). Les moyennes étaient  $\pm$  S.E.M.

## 2.6 Analyse de l'inhibition du courant

Le pourcentage de réduction du courant maximum (« peak current ») à une concentration donnée de l'inhibiteur a été utilisé pour générer la courbe dose-réponse. Tous les points de chacune des courbes dose-réponse sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. des résultats obtenus à partir d'un minimum de deux cellules différentes. Sur tous les graphiques, les lignes verticales indiquent les S.E.M. Les valeurs moyennes des courbes dose-réponse ont été lissées en utilisant l'équation suivante :

$$PI = PI_{max} / (1 + (IC_{50} / [inhibiteur])^n)$$

ou  $PI_{max}$  est un pourcentage d'inhibition de maximum du courant,  $IC_{50}$  est la concentration de l'inhibiteur qui produit 50 % de l'inhibition maximale,  $n$  est le coefficient de couplage.

La dépendance du voltage de l'inactivation dans l'état stable a été décrit en utilisant une distribution de Boltzmann :

$$I(V) = I_{\max} / (1 + \exp[-(V-V_{50})/k])$$

ou  $I_{\max}$  représente le courant maximum activable et  $V_{50}$  est le voltage où la moitié du courant est inactivée.

## 2.7 Solutions

Les solutions « stock » de GBP (0,5 M), CHAA (0,5 M) (Figure 3.6-a), Cd (0,5 mM) et Ni (1mM) ont été préparées dans de l'eau deionisée. Par la suite, les solutions « stock » ont été diluées dans la solution de 10  $\text{Ba}^{2+}$  (voir la section 2.4) pour obtenir la concentration désirée. La solution « stock » et les dilutions de GBP et CHAA ont été préparées la journée même des expériences. Les solutions « stock » de  $\text{Ni}^{2+}$  ( $\text{NiCl}_2$ ) et  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{CdCl}_2$ ) ont été conservées à la température de la pièce, mais les dilutions étaient préparées la journée même des expériences. La gabapentine était un don de la compagnie Parke-Davis (maintenant Pfizer).

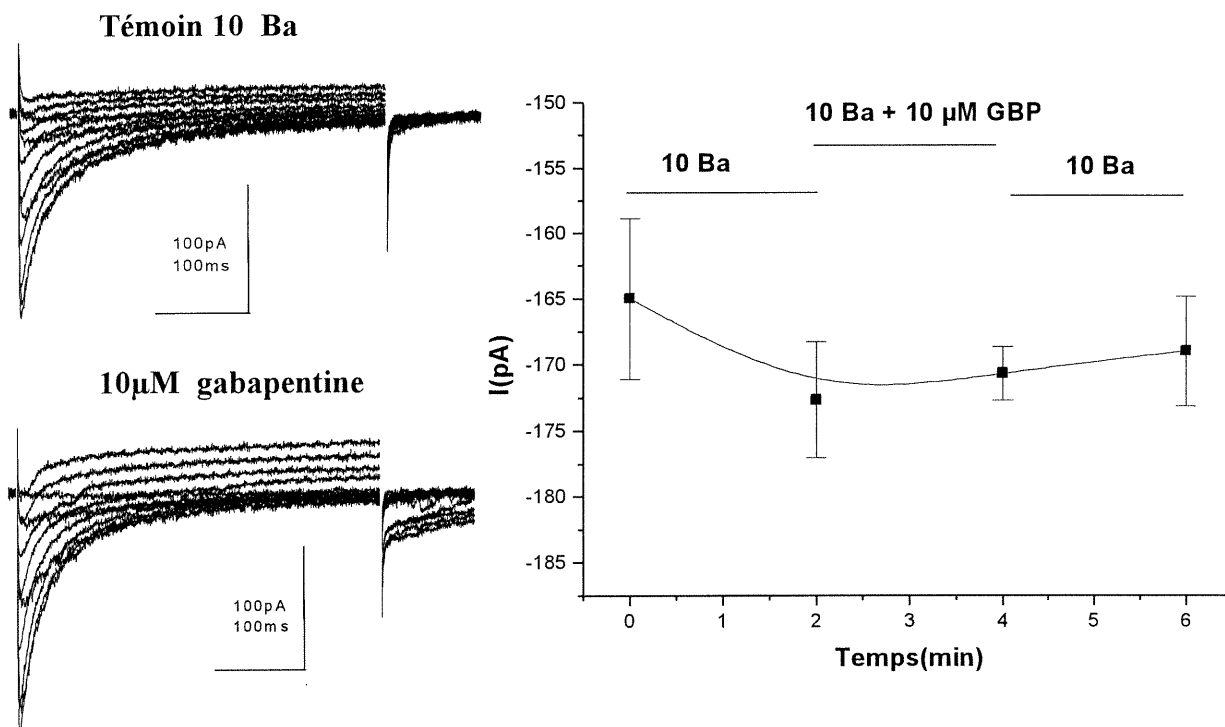
### 3.0 RÉSULTATS

Nous avons entrepris notre étude afin de caractériser la cible moléculaire de la gabapentine. Dans cette optique les canaux de type T constituent une cible de choix car ils sont responsables de la génération de la rythmicité spontanée dans le cortex qui à son tour pourrait contribuer à l'apparition de crises épileptiques (voir section 1.9). Notre travail a donc cherché à répondre à la question suivante : est-ce que la gabapentine peut moduler spécifiquement l'activité des canaux de type T ? La réponse à cette question pourrait non seulement nous éclairer sur le mécanisme d'action de la gabapentine mais aussi mieux nous aider à comprendre les mécanismes moléculaires qui contribuent au déclenchement des crises épileptiques.

#### 3.1 Est-ce que la gabapentine affecte les canaux $Ca_v1.2$ et $Ca_v2.3$ ?

Notre première série d'expériences a été effectuée sur les cellules HEK-293 qui expriment de façon stable les canaux calciques  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) avec la sous-unité  $\beta 3$ . Les enregistrements ont été effectués en configuration «cellule entière» en présence de 10 mM  $Ba^{2+}$ . La dose de la gabapentine appliquée était de 10  $\mu M$ . La figure 3.1 (panneau de gauche) démontre les amplitudes des courants calciques  $\alpha 1E$  avant (en haut à gauche) et après (en bas à gauche) l'application de 10  $\mu M$  de gabapentine dans le bain. Les tracés sont pratiquement identiques dans ces deux cas. La partie droite de cette figure représente les pics de courants en fonction du temps durant cette expérience. En

effet, nous avons plutôt observé une légère augmentation du courant après l'addition de la drogue. Donc, on peut constater que la gabapentine n'inhibe pas les courants  $\alpha 1E$ .



**Figure 3.1 L'absence d'inhibition des courants calciques  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) par la gabapentine** Les expériences ont été effectuées sur les cellules HEK-293 qui expriment de façon stable les canaux calciques  $\alpha 1E$  avec une sous-unité  $\beta 3$ . Les courants ont été enregistrés en configuration "cellule entière" en présence de 10 mM BaMes. Les cellules étaient maintenues à un potentiel de repos de -80 mV. Les courants étaient générés en appliquant des potentiels-test variant de -30 mV à +80 mV par intervalle de 10 mV. La dose de la gabapentine (GBP) était de 10  $\mu M$  ( $n=3$ ). La partie gauche démontre les amplitudes des courants  $\alpha 1E$  avant (en haut à gauche) et après (en bas à gauche) l'application de 10  $\mu M$  de gabapentine. La partie droite de cette figure représente les pics de courants (carrés noirs ■) en fonction du temps durant cette expérience. Aucune inhibition du courant n'a été observée après l'addition de GBP, au contraire, une petite augmentation transitoire a été mesurée.

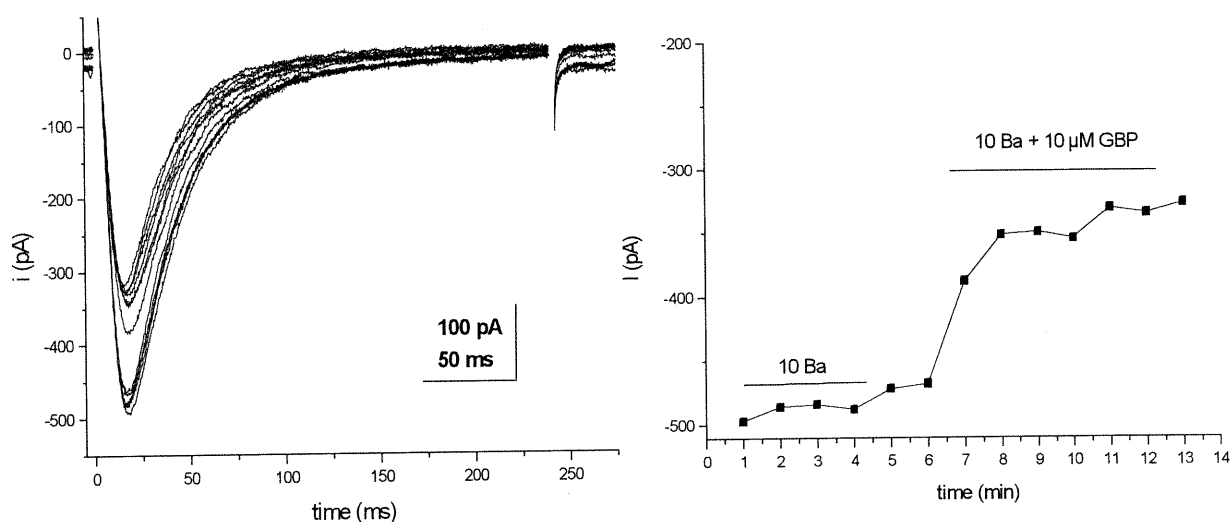
Ces résultats ont été présentés par notre groupe (Agueev et al., 2000) sous forme de résumé de communication au congrès annuel de la Société américaine de Biophysique. De plus, G. Bernatchez dans notre laboratoire n'a pu observer une inhibition significative des courants du  $Ba^{2+}$  à travers les canaux calciques de type L  $\alpha 1C$  ( $\alpha 1C/\alpha 2a\delta/\beta 2a$ ) exprimés de façon stable dans les cellules HEK-293. Toutefois, il faut noter que les courants générés par  $Ca_v1.2$  diminuent constamment avec le temps («rundown») et pour cette raison il est très difficile de distinguer l'inhibition par la gabapentine du «rundown» pour ce canal.

### **3.2 Gabapentine inhibe les canaux calciques de type T $\alpha 1G$ ( $Ca_v3.1$ )**

Nous avons poursuivi notre étude en évaluant le possibilité que la gabapentine exerce son action sur le canal de type T  $\alpha 1G$  ( $Ca_v3.1$ ). Dans cette série d'expériences nous avons observé l'inhibition des courants du  $Ba^{2+}$  à travers les canaux  $Ca_v3.1$  exprimés de façon stable dans les cellules HEK en appliquant les doses différentes de gabapentine (voir plus bas). Nous avons élaboré un protocole qui nous a permis de nous assurer que l'inhibition du canal ne corresponde pas à une diminution non-spécifique du courant avec le temps ou «rundown». Il s'agissait de mesurer le courant à un potentiel-test de  $-30$  mV une fois par minute durant 15 minutes. Ce potentiel-test a été choisi parce qu'il donne le maximum de courant. Les enregistrements ont été faits en configuration «cellule entière» en perfusion continue contenant au début  $10$  mM  $Ba^{2+}$  (solution «témoin») qui a été remplacée durant l'expérience par la solution dans laquelle nous avons ajouté  $10$   $\mu$ M de gabapentine (solution «test»). Les cellules étaient maintenues à des potentiels de  $-100$  mV. Les courants ont été mesurés sur la même



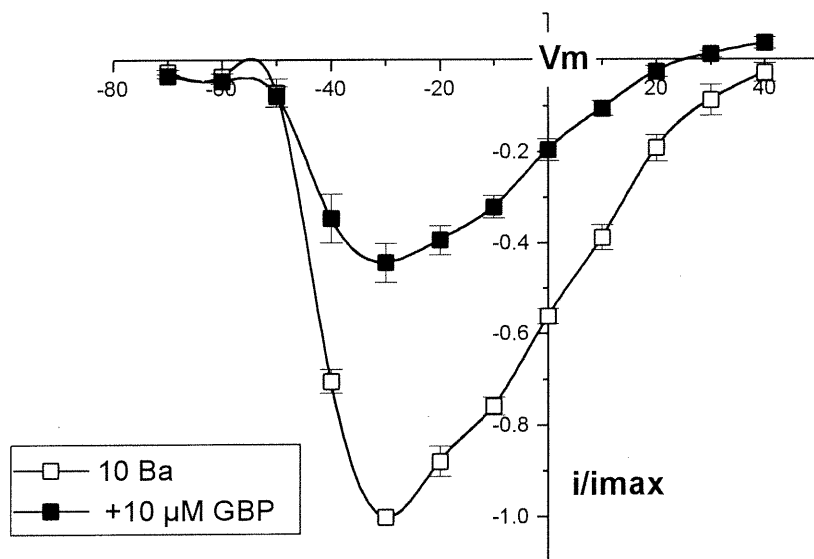
cellule pendant 6 minutes en condition « témoin » pour évaluer la diminution non spécifique du courant  $\alpha 1G$  dans nos conditions expérimentales (partie gauche de la figure 3.2). Tel que le montre la figure, le courant était constant dans nos conditions « témoins ». Ensuite, la gabapentine en concentration de  $10 \mu\text{M}$  a été ajoutée dans le bain à partir de la sixième minute de l'expérience (partie droite de la figure 3.2).



### Figure 3.2 L'inhibition des canaux calciques de type T $\alpha 1G$ ( $\text{Ca}_v3.1$ ) par la gabapentine

Les enregistrements ont été effectués en configuration "cellule entière" en présence de 10 mM BaMes. Les cellules étaient maintenues à un potentiel de repos de  $-100 \text{ mV}$ . Les courants étaient générés en appliquant le potentiel-test de  $-30 \text{ mV}$  sur la même cellule une fois par minute durant 15 minutes. La partie gauche de la figure 3.2 représente les tracés des courants avant et après l'application de la gabapentine. La gabapentine en concentration de  $10 \mu\text{M}$  a été ajoutée à partir de la sixième minute de l'expérience. La partie droite de la figure 3.2 démontre les pics des courant calciques (carrés noirs ■) en fonction du temps durant cette expérience. L'addition de gabapentine cause une diminution rapide d'environ 30 % du courant pendant les deux premières minutes de perfusion alors que la perfusion continue de la solution « témoin » pendant les cinq premières minutes ne cause qu'une diminution d'environ 5% du courant.

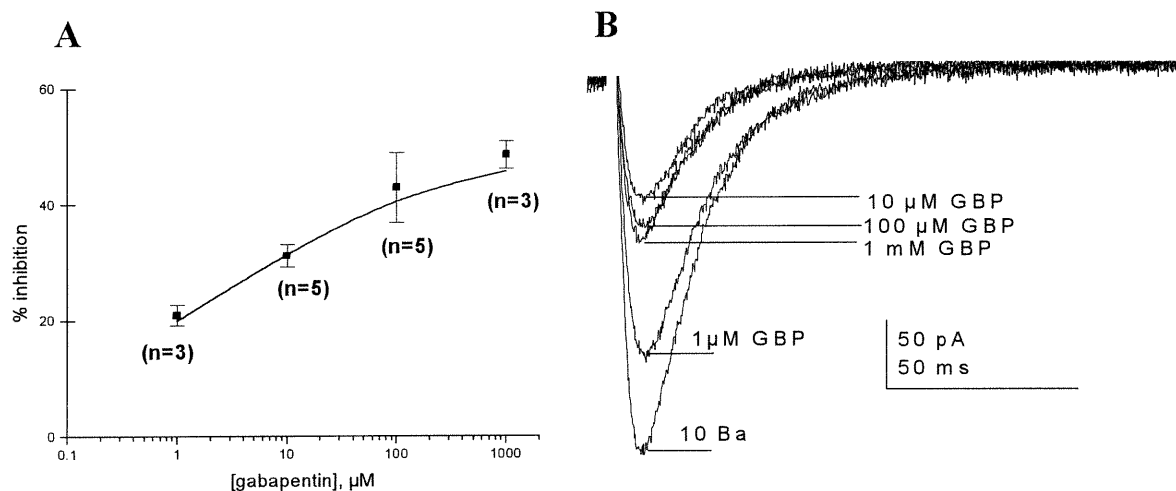
L'inhibition était rapide, s'effectuant pendant la première minute après la perfusion (entre 20 et 30 secondes après la perfusion par la solution «test»), et non réversible après rinçage. Cette observation démontre que 10  $\mu\text{M}$  gabapentine inhibe en partie (entre 30 et 40 %) les courants  $\text{Ca}_v3.1$  exprimés de façon stable dans les cellules HEK. De plus, nous pouvons constater que la perfusion continue de nos solutions n'influence pas les niveaux de courants mesurés ce qui peut témoigner de la fiabilité de nos conditions expérimentales. La figure 3.3 représente les courbes courant-voltage moyennes avant et après l'application de 10  $\mu\text{M}$  de gabapentine.



**Figure 3.3 L'inhibition des canaux calciques de type T  $\alpha_1\text{G}$  par 10  $\mu\text{M}$  gabapentine.** Cette figure représente les courbes courant-voltage moyennes avant (carrés vides  $\square$ ) et après (carrés noirs  $\blacksquare$ ) l'application de 10  $\mu\text{M}$  gabapentine ( $n=5$ ). Les enregistrements ont été effectués en configuration "cellule entière" en présence de 10 mM BaMes. Les cellules étaient maintenues à un potentiel de repos de  $-100$  mV. Les courants étaient générés en appliquant des potentiels-test variant de  $-70$  mV à  $+40$  mV par intervalle de 10 mV. Aucun changement n'a été observé dans la courbe courant-voltage ce qui indique aucun changement significatif dans l'activation du canal.

### 3.3 Inhibition des canaux $\text{Ca}_v3.1$ par la gabapentine est proportionnelle à la concentration

L'inhibition des courants  $\text{Ba}^{2+}$  par 10  $\mu\text{M}$  gabapentine n'était pas complète. Nous avons donc mesuré l'amplitude des courants  $\text{Ca}_v3.1$  en fonction de la concentration de gabapentine, i.e. la courbe «dose-réponse». Cette courbe (Figure 3.4 A) a été obtenue en exposant des cellules différentes à des doses croissantes de gabapentine, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  et 1 mM. Les enregistrements ont été effectués en configuration «cellule entière» en présence de 10 mM  $\text{Ba}^{2+}$ .



**Figure 3.4** L'inhibition par la gabapentine est « dose-dépendante » jusqu'à 10  $\mu\text{M}$ . **A.** Le pourcentage d'inhibition a été calculé et porté en ordonnée en fonction des concentrations correspondantes de gabapentine. Les doses de 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  et 1 mM inhibent les influx de  $\text{Ba}^{2+}$  à travers le canal calcique de type T ( $\alpha_1\text{G}$ ) à  $21 \pm 2\%$  (n=3),  $31 \pm 2\%$  (n=5),  $43 \pm 6\%$  (n=5) et  $49 \pm 2\%$  (n=3) respectivement. La courbe « dose-réponse » a été obtenue en exposant les cellules différentes à des doses différentes de la gabapentine (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  et 1 mM). Les valeurs moyennes de pourcentage d'inhibition ont été lissées à l'équation suivante :

$$\text{PI} = \text{PI max} / (1 + (\text{IC}_{50} / [\text{inhibiteur}])^n)$$

ou PI max est un pourcentage d'inhibition de maximum du courant,  $\text{IC}_{50}$  est la concentration de l'inhibiteur qui produit 50 % d'inhibition maximale, n est le coefficient de Hill. **B.** Les enregistrements ont été faits en configuration « cellule entière » en présence de 10 mM BaMes. La même cellule a été exposée aux doses croissantes de gabapentine. L'intervalle entre les changements de la concentration de la gabapentine était de 1 minute. Le protocole standard pour générer la courbe « courant-voltage » a été utilisé.

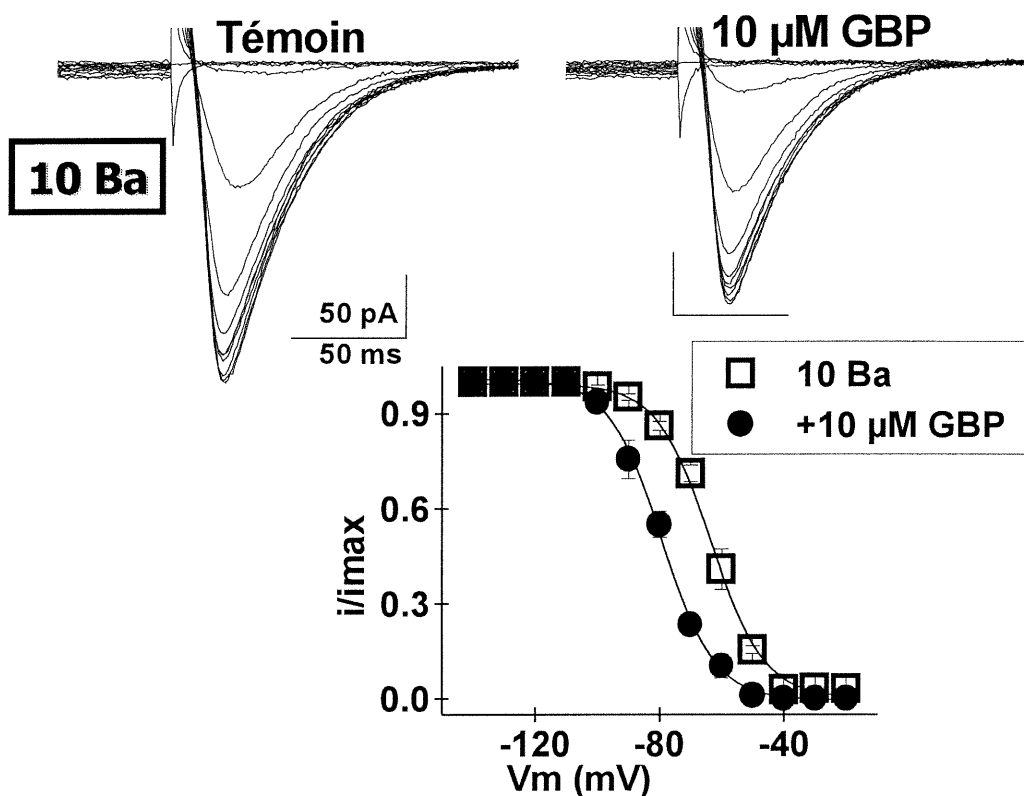
Le protocole standard pour générer la courbe «courant-voltage» a été utilisé. Les cellules étaient maintenues à des potentiels de repos  $-100$  mV avec l'application des potentiels-test variant de  $-70$  mV à  $+40$  mV par intervalle de  $10$  mV. Ensuite, le pourcentage d'inhibition a été calculé par rapport au courant mesuré en condition «témoin» et présenté en fonction des concentrations de gabapentine. Dans ces conditions, l'addition de gabapentine à des doses de  $1$   $\mu$ M,  $10$   $\mu$ M,  $100$   $\mu$ M et  $1$  mM résulte en une inhibition moyenne des courants  $Ca_v3.1$  de  $21 \pm 2\%$  ( $n=3$ ),  $31 \pm 2\%$  ( $n=5$ ),  $43 \pm 6\%$  ( $n=5$ ) et  $49 \pm 2\%$  ( $n=3$ ) respectivement.

Nous avons également effectué une série d'expériences où la même cellule a été exposée à des concentrations croissantes de gabapentine (Figure 3.4 B). Chaque nouvelle concentration de gabapentine était perfusée après un intervalle de  $60$  secondes. Les résultats étaient compatibles avec ceux obtenus sur des cellules différentes. À la lumière de ces résultats, il apparaît que la gabapentine produit une inhibition partielle des courants qui saturent avec une concentration extracellulaire de  $10$   $\mu$ M. Cette concentration de gabapentine est compatible avec les doses thérapeutiques de ce médicament (entre  $300$  et  $2400$  mg par jour). Donc, l'inhibition par la gabapentine se produit aux doses thérapeutiques de la drogue.

### **3.4 La gabapentine déplace les courbes d'inactivation dans un état stable vers les potentiels plus négatifs**

La grande majorité des inhibiteurs cliniques des canaux ioniques semble faciliter le passage du canal vers l'état inactivé. Selon l'hypothèse du récepteur modulé (Ragsdale et Avoli, 1998) l'affinité de l'inhibiteur pour le canal est très faible à l'état

fermé mais augmente après le passage du canal dans l'état ouvert ou inactivé. Nous avons entrepris une série d'expériences pour évaluer la possibilité que la gabapentine module l'état inactivé du canal  $\alpha 1G$ . Cet état était atteint après l'application des pulses conditionnants suffisamment longs (dans notre cas la durée des pulses était de 5 secondes). Par la suite, le potentiel test de  $-30$  mV nous indique la proportion des canaux qui sont disponibles pour ouverture. Nous avons déterminé que l'addition de gabapentine déplace les courbes d'inactivation vers des potentiels plus négatifs avec  $V_{50} = -61 \pm 3$  mV (n=4) (témoin) à  $V_{50} = -82 \pm 2$  mV (n=4) (gabapentine) (Figure 3.5). Cette observation signifie qu'au potentiel de repos de la cellule, il y a moins de canaux disponibles pour l'ouverture en présence de gabapentine par rapport au témoin. Nous pouvons donc conclure que la gabapentine maintient plus de canaux  $\alpha 1G$  dans l'état inactivé qu'en condition « témoin ».



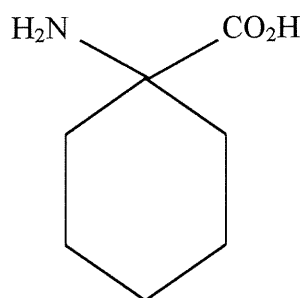
**Figure 3.5 La gabapentine déplace les courbes d'inactivation vers des potentiels plus négatifs.**

$Ca_v3.1$  s'inactive à des potentiels plus négatifs en présence de gabapentine de  $V_{50} = -61 \pm 3$  mV (témoin, représenté par carrés vides □) à  $-82 \pm 2$  mV (après l'addition de 10 μM de gabapentine, représenté par cercles noirs ●). L'inactivation a été mesurée dans 4 expériences ( $n=4$ ) indépendantes après des prepulses conditionnantes de 5 secondes (de -140 à -30 mV) suivi par un potentiel-test de -30 mV. Les courants relatifs ( $i/i_{max}$ ) ont été lissés par l'équation de Boltzmann (section 2.5) en utilisant les routines fournies par le programme Origin (Microcal).

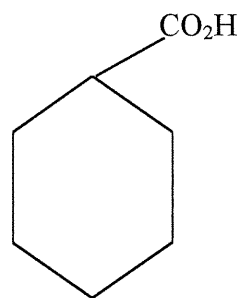
### 3.5 Les courants $\text{Ca}_v3.1$ sont inhibés par l'acide cyclohexane acétique, un analogue de la gabapentine

L'étude des analogues de la gabapentine pourrait nous renseigner quant à la spécificité du site de liaison de la gabapentine sur le canal. L'acide cyclohexane acétique (Figure 3.6-a) en concentration de  $10 \mu\text{M}$  diminue aussi le courant approximativement avec le même pourcentage d'inhibition ( $28 \pm 8\%$ ,  $n=3$ ) que la gabapentine (Figure 3.6-b).

**Figure 3.6-a Structure chimique des agents pharmacologiques.**



**Gabapentine (GBP)**  
(Parke-Davis, maintenant Pfizer)

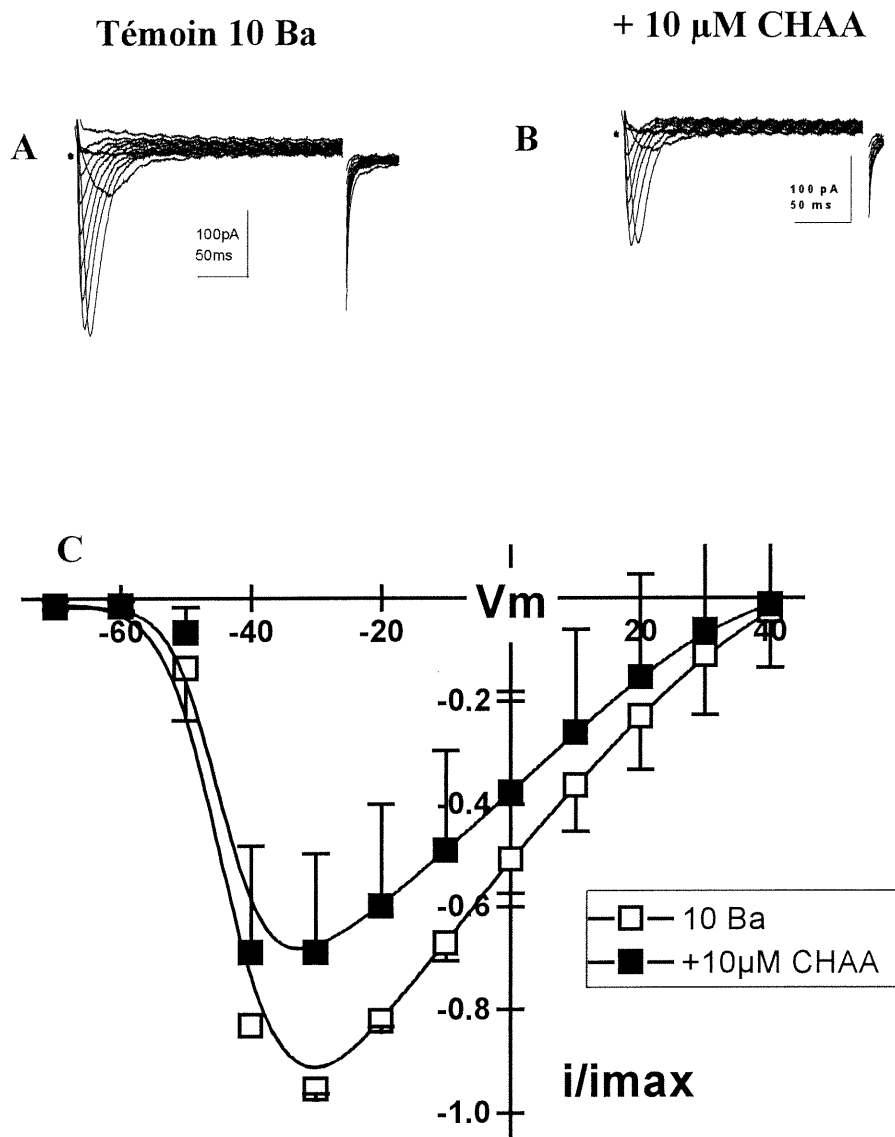


**Acide cyclohexane acétique (CHAA)**  
(Sigma)

Gabapentine est un acide 1-(aminométhyl)-cyclohexaneacétique avec la formule empirique de  $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_2$  et le poids moléculaire de 171.24.

Gabapentine est une substance blanche solide, facilement soluble dans l'eau.

Acide cyclohexane acétique (CHAA) : formule empirique :  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2$ , poids moléculaire : 142.20, une substance blanche solide, facilement soluble dans l'eau.



**Figure 3.6-b L'inhibition des courants calciques de type T  $\alpha$ 1G (Cav3.1) par l'acide cyclohexane acétique.** A.B. L'acide cyclohexane acétique, qui est un analogue structural de la gabapentine, inhibe aussi le courant  $Ba^{2+}$  à travers  $Ca_v3.1$  avec une inhibition maximale de  $28 \pm 8\%$  ( $n=3$ ). C. Les courbes « courant-voltage » moyennes avant (carrés vides □) et après (carrés noirs ■) l'application de  $10 \mu M$  d'acide cyclohexane acétique. L'inhibition était rapide et non réversible après le rinçage. Dans cette expérience on a utilisé le même protocole (Figure 3.3) pour générer les courbes « courant-voltage » et calculer le pourcentage d'inhibition.



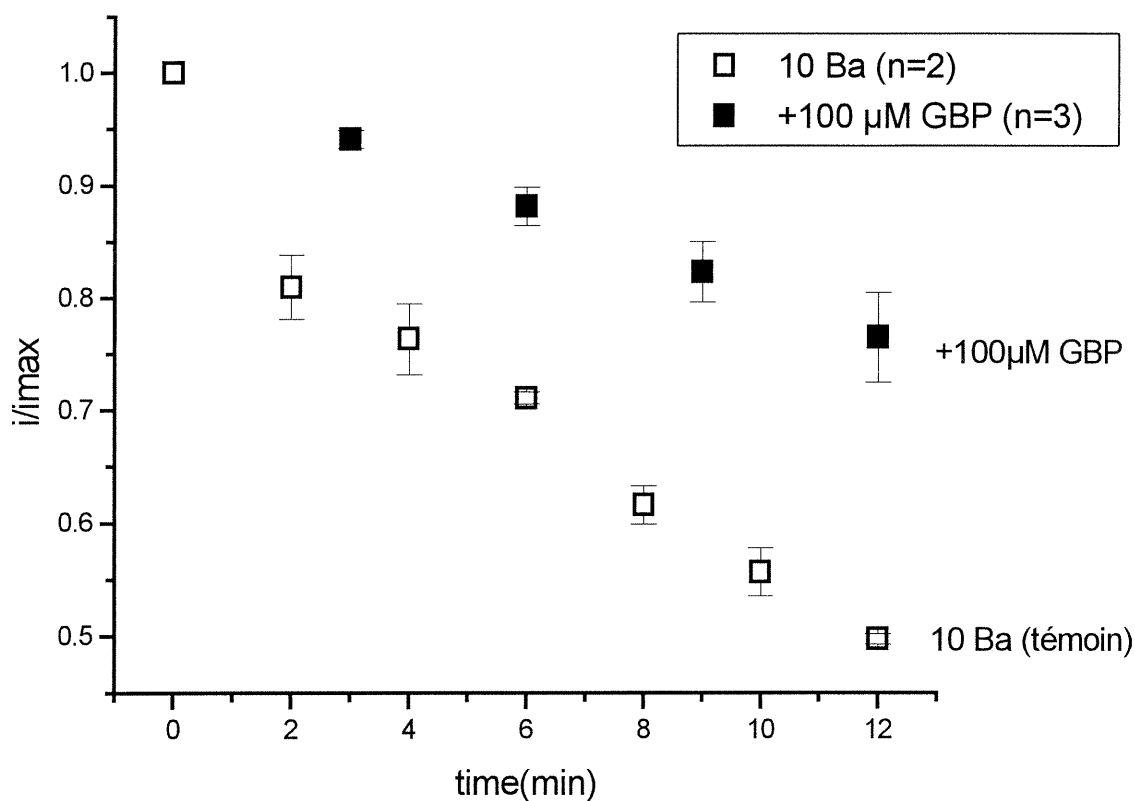
Comme on l'a observé dans le cas de la gabapentine, l'inhibition était aussi rapide et non réversible après le rinçage. Ces résultats suggèrent que le site de liaison de gabapentine peut reconnaître une autre substance possédant une structure analogue.

### 3.6 Est-ce que la sous-unité $\alpha 2\delta$ influence l'inhibition de $Ca_v3.1$ ?

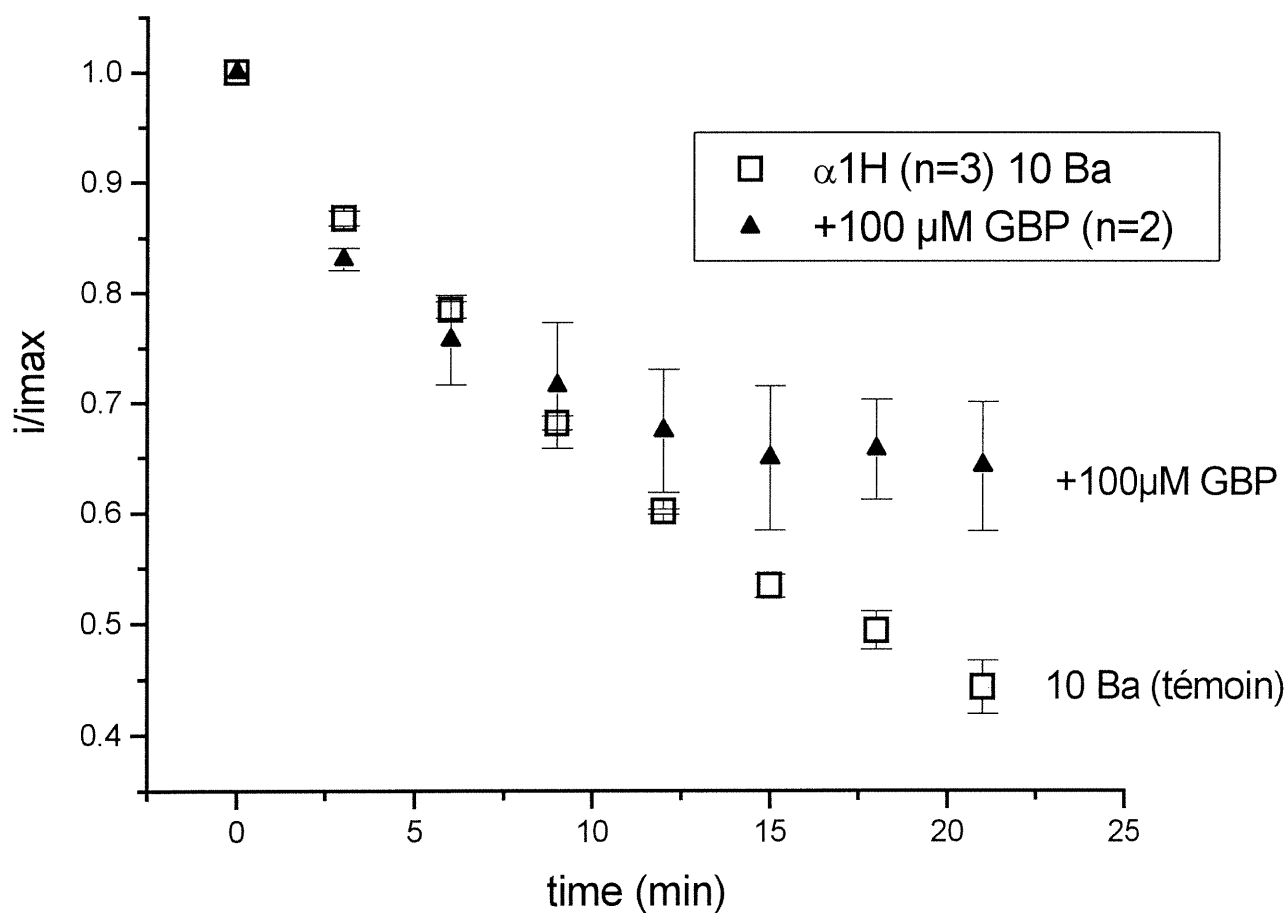
Les lignées cellulaires exprimant les canaux  $\alpha 1E$ ,  $\alpha 1C$  ou  $\alpha 1G$  de façon stable nous permettent de travailler avec niveaux d'expression constant d'une semaine à une autre. Toutefois ces lignées ne possèdent pas la versatilité d'un système d'expression transitoire. Dans notre laboratoire le système d'expression transitoire préféré est le système d'ovocytes de *Xenopus*. Dans ce système l'ARN codant pour les canaux ou les sous-unités de notre choix est injecté dans les proportions qui peuvent varier en fonction des conditions recherchées.

Il a été démontré d'une part que la gabapentine se lie de façon très spécifique sur la sous-unité  $\alpha 2\delta$  (Gee et al., 1996). De plus, le groupe de Dolphin avait rapporté une interaction spécifique entre la sous-unité  $\alpha 2\delta$  et  $\alpha 1G$  (Dolphin et al., 1999). Dans le but de vérifier le rôle de la sous-unité  $\alpha 2\delta$  sur l'effet de la gabapentine nous avons exprimé de façon transitoire cette dernière avec  $\alpha 1G$  dans les ovocytes de *Xenopus*. Nous n'avons observé aucune augmentation de l'amplitude du courant et aucun changement dans les paramètres cinétiques du canal  $\alpha 1G / \alpha 2\delta$  par rapport au canal  $\alpha 1G$  seul.

De plus, en utilisant ce système, nous avons essayé de déterminer l'effet de la gabapentine sur le canal  $\alpha 1H$  qui appartient aussi à la famille des canaux de type T. Malheureusement, dans ces conditions, il est très difficile de distinguer une véritable inhibition d'une diminution non spécifique du courant (Figure 3.7). L'addition de la gabapentine semble ralentir le processus de diminution du courant  $\alpha 1G$  en fonction du temps, mais le faible nombre d'expériences ( $\leq 3$ ) limite la portée de cette observation. Nous avons observé le même phénomène dans le cas des canaux  $\alpha 1H$  (Figure 3.8).



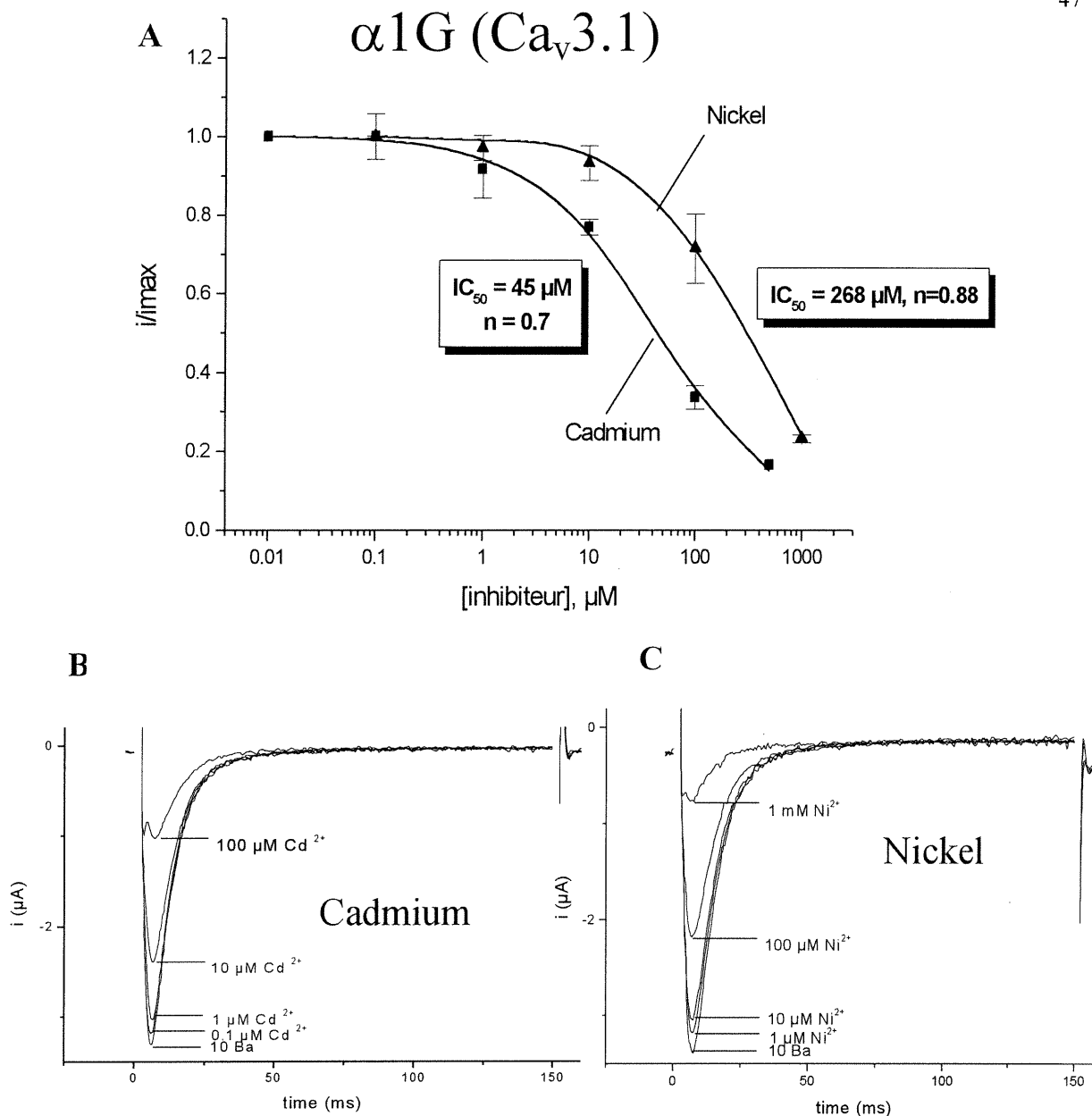
**Figure 3.7 Diminution non-spécifique du courant en fonction du temps ou « rundown » dans les ovocytes de *Xenopus* exprimant les canaux  $\alpha 1G$  (Cav3.1).** Les carrés vides ( $\square$ ) de cette figure représentent les moyennes des pics des courants relatifs obtenus dans deux expériences indépendantes ( $n=2$ ) durant lesquelles les ovocytes ont été perfusés uniquement par la solution contenant 10 mM BaMes. Les carrés noirs ( $\blacksquare$ ) sur la même figure sont les moyennes des maximums de courants enregistrés dans trois expériences indépendantes ( $n=3$ ) mais pendant l'application de 100  $\mu$ M de gabapentine. Les enregistrements ont été effectués à toutes les deux minutes pour la condition témoin et à toutes les trois minutes pour GBP durant 12 minutes. Les moyennes des pics des courants relatifs sont présentées en fonction du temps.



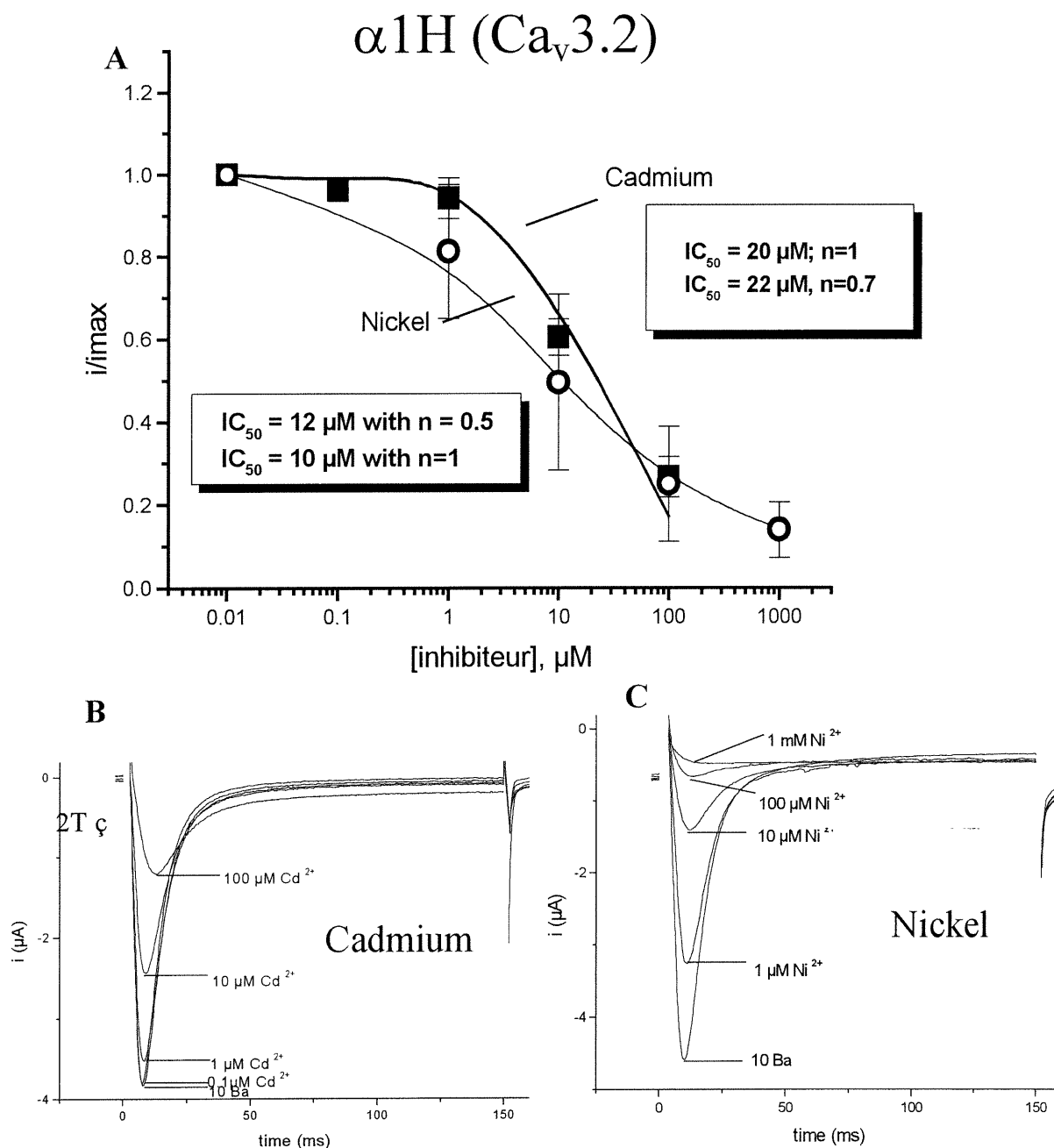
**Figure 3.8 Diminution non-spécifique du courant en fonction du temps ou « rundown » dans les ovocytes de *Xenopus* exprimant les canaux  $\alpha 1H$  (Cav3.2).** Les carrés vides ( $\square$ ) de cette figure représentent les moyennes des pics des courants relatifs obtenus dans trois expériences indépendantes durant lesquelles les ovocytes ont été perfusés uniquement par la solution contenant 10 mM BaMes. Les triangles noirs ( $\blacktriangle$ ) sur la même figure sont les moyennes des pics de courant enregistrés dans trois expériences indépendantes mais pendant l'application de 100  $\mu M$  de gabapentine. Les enregistrement ont été effectués à toutes les trois minutes pendant 21 minutes. Les moyennes des pics des courants relatifs ont été présentées en fonction du temps.

### 3.7 Inhibition des canaux calciques de type T $\alpha$ 1G (Ca<sub>v</sub>3.1), $\alpha$ 1H (Ca<sub>v</sub>3.2) et $\alpha$ 1C (Ca<sub>v</sub>1.2) par des inhibiteurs inorganiques

Les ovocytes de *Xenopus* possèdent une membrane vitelline qui pourrait prévenir le passage de la gabapentine ce qui pourrait expliquer la difficulté de mesurer une inhibition véritable. Les inhibiteurs inorganiques solubles dans l'eau ne devraient pas par contre être affectés par la membrane vitelline. En absence de réponse concluante concernant l'effet de la gabapentine dans les ovocytes, nous avons caractérisé l'effet d'inhibiteurs inorganiques. Les figures 3.9 et 3.10 résument des effets de cadmium (Cd<sup>2+</sup>) et nickel (Ni<sup>2+</sup>) sur les courants calciques de type T  $\alpha$ 1G (Figure 3.9) et  $\alpha$ 1H (Figure 3.10) exprimés dans les ovocytes de *Xenopus*. Ces cations divalents ont peu d'effet sur le taux d'activation ou d'inactivation (Lacinova et al., 2000), donc nous supposons que ces ions agissent sur l'état ouvert du canal.



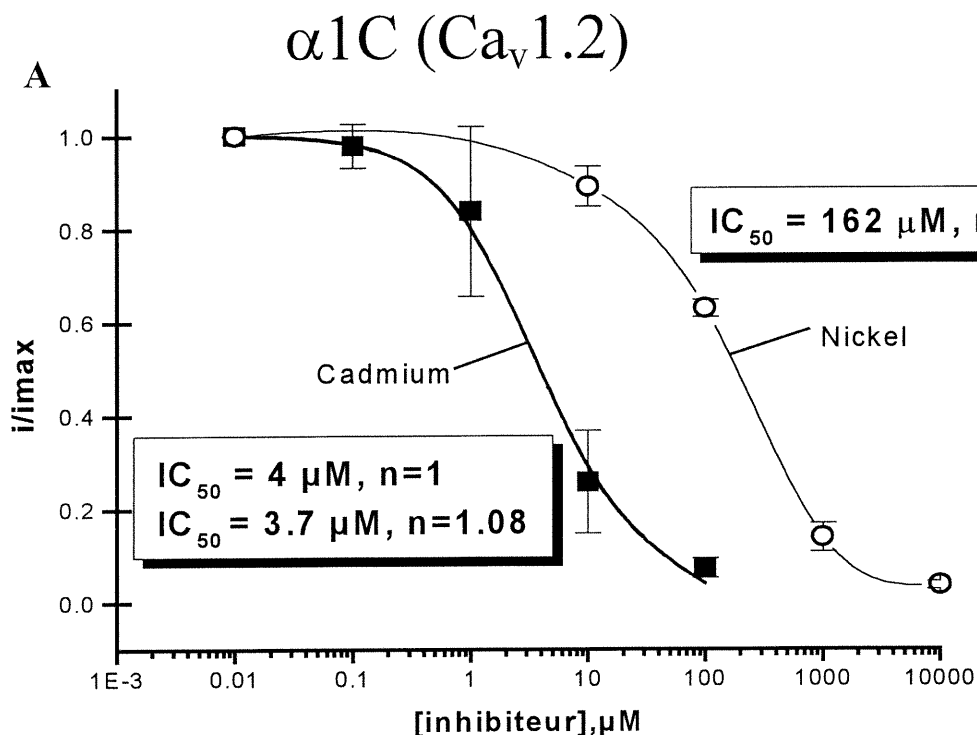
**Figure 3.9 L'inhibition des canaux calciques de type T  $\alpha 1G$  par le Cadmium et le Nickel.** Les expériences sur les ovocytes de *Xenopus* ont été effectuées en utilisant la technique du voltage imposé en présence de 10 mM BaMes. Les cellules ont été maintenues à un potentiel de repos de -100 mV. Les enregistrements ont été effectués 60 secondes après chacune des perfusions de la solution contenant 0,1  $\mu M$ ; 1  $\mu M$ ; 10  $\mu M$  et 100  $\mu M$  Cadmium ( $n=3$ ) et 1  $\mu M$ ; 10  $\mu M$ ; 100  $\mu M$  et 1 mM Nickel ( $n=3$ ). Les moyennes des pics des courant relatifs (A) ont été portées en ordonnée en fonction des doses correspondantes de Cadmium (carrés noirs ■) et Nickel (triangles noirs ▲). Les points expérimentaux ont été lissés par une équation d'inhibition telle que décrite dans la section « Matériel et Méthodes ». Tracés originaux des courants de type T  $\alpha 1G$  pendant la perfusion par les solutions contenant les concentrations différentes de cadmium (B) et de nickel (C)



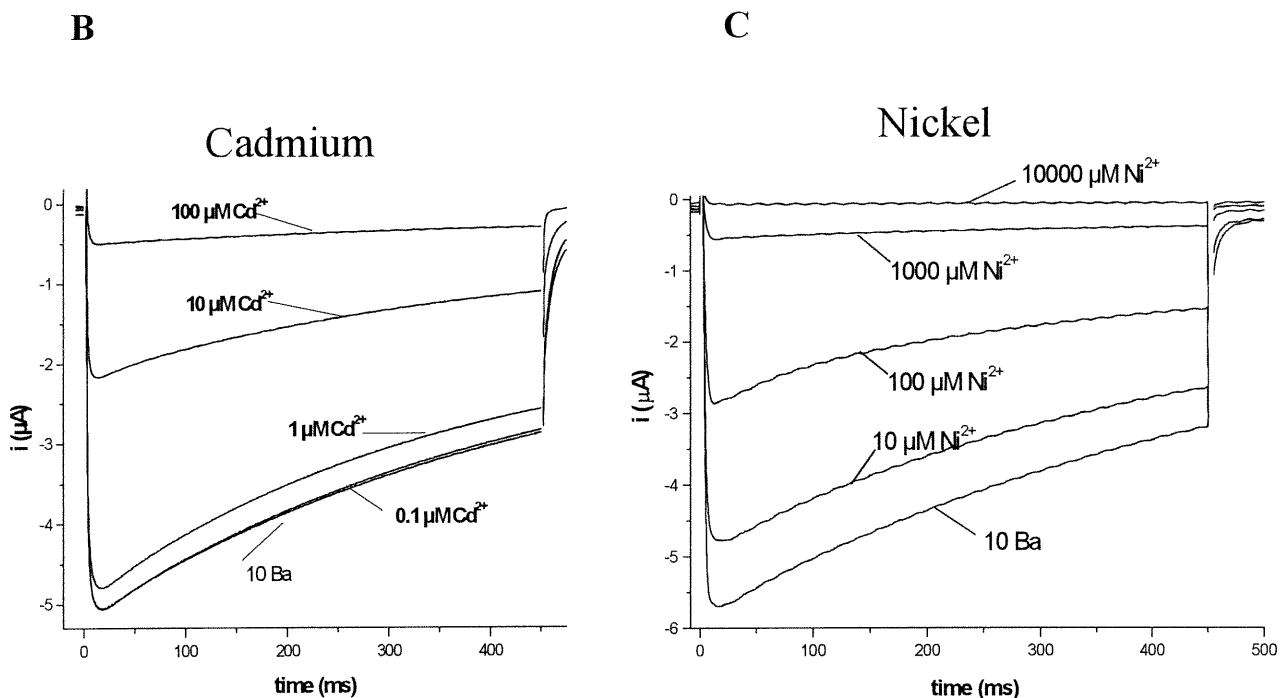
**Figure 3.10** L'inhibition des canaux calciques de type T  $\alpha 1H$  par le Cadmium et le Nickel. Les conditions expérimentales, les solutions, les concentrations des agents inorganiques et le nombre d'expériences étaient identiques à celles décrites pour la Figure 3.9. Les moyennes des pics des courants normalisés à la valeur obtenue en condition «témoin» (A) ont été portées en ordonnée en fonction des doses correspondantes de cadmium (carrés noirs ■) et nickel (cercles vides ○). Les points expérimentaux ont été lissés avec une équation d'inhibition telle que décrite dans la section « Matériel et Méthodes ». Tracés originaux des courants de type T  $\alpha 1H$  pendant la perfusion par les solutions contenant les concentrations différentes de cadmium (B) et de nickel (C).

Les concentrations de  $\text{Cd}^{2+}$  et de  $\text{Ni}^{2+}$  respectivement requises pour inhiber 50% du courant ( $\text{IC}_{50}$ ) étaient  $45 \pm 3 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) et  $268 \pm 5 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) pour  $\text{Ca}_v3.1$  et  $20 \pm 3 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) et  $10 \pm 1 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) pour  $\text{Ca}_v3.2$ . Dans ces deux cas, l'inhibition était presque complète contrairement aux observations avec la gabapentine. De plus, l'inhibition par les inhibiteurs divalents était facilement renversée par la perfusion d'une solution «témoin» en présence de 5 mM EGTA. Comme nous l'avons déjà mentionné, nous n'avons jamais observé le retour du courant après le rinçage dans le cas de la gabapentine. Le coefficient de Hill qui est proche de 1 suggère que les inhibiteurs inorganiques possèdent un seul site de liaison dans le canal.

Le  $\text{Cd}^{2+}$  possède une affinité approximativement de même ordre de grandeur pour  $\text{Ca}_v3.1$  et  $\text{Ca}_v3.2$  ( $45 \mu\text{M}$  et  $20 \mu\text{M}$ ). Nous avons observé une affinité 5 à 10 fois plus forte du  $\text{Cd}^{2+}$  pour les canaux  $\alpha 1\text{C}$  avec  $\text{IC}_{50} = 4 \pm 1 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) (Figure 3.11). Donc, il est possible que le site de liaison pour ces ions ne soit pas entièrement conservé entre  $\alpha 1\text{G}$ ,  $\alpha 1\text{H}$  et  $\alpha 1\text{C}$ .







**Figure 3.11** L'inhibition des canaux calciques de type L  $\alpha 1C$  par Cadmium et Nickel. Les expériences sur les ovocytes de *Xenopus* ont été effectués en utilisant la technique du voltage imposé en présence de 10 mM BaMes. Les cellules ont été maintenues à un potentiel de repos de -60 mV. Les enregistrements ont été effectués 60 secondes après chacune des perfusions par la solution contenant 0,1 μM; 1 μM; 10 μM et 100 μM de Cadmium (n=3) et 10 μM, 100 μM, 1 mM et 10 mM de Nickel (n=3). Les moyennes des pics des courants normalisés à la valeur obtenue en condition «témoin» (A) ont été portées en ordonnée en fonction des doses correspondantes de cadmium (carrés noirs ■) et nickel (cercles vides ○). Les points expérimentaux ont été lissés avec une équation d'inhibition telle que décrite dans la section « Matériel et Méthodes ».

Tracés originaux des courants de type L  $\alpha 1C$  pendant la perfusion par les solutions contenant les concentrations différentes de cadmium (B) et de nickel (C).

### 3.8 Rappel des principaux résultats

La gabapentine inhibe partiellement les canaux de type T  $\alpha 1G$  mais n'a aucun effet sur les canaux de type L ( $\alpha 1C$ ) et de type R ( $\alpha 1E$ ). La gabapentine inhibe  $Ca_v3.1$  de façon dose-dépendante (0,1- 10 μM). L'inhibition maximum varie de 30 à 50% selon les cellules. De plus, le médicament stabilise le canal de type T  $\alpha 1G$  dans l'état

inactivé. L'inhibition même incomplète du canal  $\alpha 1G$  pourrait être suffisante pour produire des effets cliniques importants. Finalement, les expériences avec un analogue structural de la gabapentine ont démontré une faible spécificité de site de liaison du canal. La diminution non spécifique du courant que nous avons observée dans les ovocytes de *Xenopus* ne nous a pas permis de mesurer l'effet de la sous-unité  $\alpha 2\delta$  dans nos conditions expérimentales. Toutefois, les ovocytes de *Xenopus* demeure un système d'expression valable pour caractériser l'effet des inhibiteurs inorganiques solubles sur l'activité de  $Ca_v3.1$  et  $Ca_v3.2$ . Le  $Cd^{2+}$  inhibe  $Ca_v3.1$  avec un  $IC_{50} = 45\mu M$  ce qui est comparable à son effet sur  $Ca_v3.2$  ( $IC_{50} = 20\mu M$ ) et  $Ca_v1.2$  ( $IC_{50} = 4\mu M$ ). Le  $Ni^{2+}$  possède une affinité un peu plus faible pour  $Ca_v3.1$  avec un  $IC_{50} = 268\mu M$ .

## 4.0 DISCUSSION

Nos résultats démontrent que la gabapentine pourrait diminuer l'amplitude des courants macroscopiques à travers les canaux calciques de type T  $\alpha 1G$ . La perfusion par la gabapentine entraîne une diminution des courants  $Ba^{2+}$  à travers les canaux calciques de type T  $\alpha 1G$ . L'inhibition était assez rapide. Seulement 30 secondes après le début de perfusion par 10  $\mu M$  gabapentine le courant était déjà diminué d'environ 25 % pour atteindre un maximum d'inhibition entre 30 et 50 % à 70-80 secondes. Par contre, nous avons constaté que la gabapentine a peu d'effets fonctionnels sur l'activité des canaux calciques de type R  $\alpha 1E$  ou sur des canaux calciques de type L  $\alpha 1C$ . Nous sommes venus à la conclusion que la gabapentine inhibe spécifiquement les canaux calciques de type T  $\alpha 1G$ . Étant donné l'absence des inhibiteurs vraiment spécifiques des canaux calciques de type T à l'heure actuelle, nos expériences pourraient contribuer à déterminer le profil pharmacologique des différents membres de la famille  $Ca_v3$ .

### 4.1 Comparaison avec d'autres études fonctionnelles

Plusieurs chercheurs ont rapporté l'absence d'effet de la gabapentine sur les courants calciques soit sur les cellules neuronales en culture (Rock et al., 1993), soit sur les cellules qui proviennent de patients épileptiques (Schumacher et al., 1998). D'autre part, d'autres groupes de chercheurs ont observé une diminution très modérée causée par la gabapentine des courants calciques sur des cellules de neocortex, *striatum* et *globus pallidus* externe de rat enregistrés en configuration «cellule entière» (Stefani et

al., 1998). Nous devons mentionner que les travaux ci-haut décrits ont été effectués sur des cellules neuronales natives ce qui implique une distribution non-homogène des canaux calciques étudiés. L'effet de la gabapentine peut donc varier en fonction de la proportion relative d'une population de canaux calciques sur une cellule donnée. Nos conditions expérimentales nous ont permis de travailler séparément sur des types de canaux calciques précis car les cellules HEK exprimaient de façon stable soit les canaux  $\alpha 1G$ , soit  $\alpha 1E$ , soit  $\alpha 1C$ . Donc, un seul type de canaux calciques était étudié à la fois. Dans nos expériences nous avons détecté une diminution du courant dû aux ions barium à travers le canal de type T  $\alpha 1G$  seulement. Étant donné la faible homologie structurale ( $< 20\%$ ) entre les canaux  $\alpha 1G$  d'une part et les canaux  $\alpha 1C$  et  $\alpha 1E$  d'autre part, la différence au plan fonctionnel d'un même agent pharmacologique n'est pas surprenante. Dans ce contexte, nous pourrions parler d'un certain degré de spécificité de l'effet fonctionnel du canal  $\alpha 1G$  sous l'influence de la gabapentine.

#### **4.2 Cible moléculaire de la gabapentine**

Les expériences de Taylor et Bonhaus (2000) prouvent l'existence d'un site de liaison à la gabapentine qui serait conservé parmi plusieurs types des canaux calciques. En travaillant sur les cellules du cortex cérébral de souris ces chercheurs ont observé une modulation de la liaison de la [ $^3H$ ]gabapentine par un ligand relativement peu spécifique des canaux calciques, le rouge de ruthénium. Par contre, d'autres ligands plus spécifiques des canaux calciques voltage-dépendants (vérapamil,  $\omega$ -conotoxin MVIIC et GVIA, ryanodine, caféine, capsiacin, MK-801) n'ont produit aucun effet significatif sur la liaison de la [ $^3H$ ]gabapentine ce qui suggère que la gabapentine ne partage pas les

mêmes sites de liaison sur la sous-unité  $\alpha 1$  que ces drogues et toxines. Cette idée peut être en partie supportée par la découverte qui démontre que la gabapentine se lie à la protéine qui est identique à la sous-unité  $\alpha 2\delta$  du canal calcique de type L du muscle squelettique du lapin (Gee et al., 1996) ce qui fait de cette sous-unité une cible moléculaire potentielle de ce médicament. Nous avons échoué dans nos tentatives d'étudier le rôle de la sous-unité  $\alpha 2-\delta$  à cause de la diminution non spécifique du courant dans nos expériences sur les ovocytes de *Xenopus*. Dans cette optique, la création d'une lignée cellulaire stable que exprime les sous-unités  $\alpha 1G$  avec les sous-unités  $\alpha 2-\delta$  pourrait être très utile pour les expériences ultérieures.

Nous avons observé une inhibition partielle des courants dûs aux ions barium à travers le canal calcique de type T  $\alpha 1G$  exprimé seul, sans aucune sous-unité auxiliaire, dans les cellules HEK ce qui suggère une interaction entre la gabapentine et la sous-unité principale  $\alpha 1G$ . À ce jour, nous ne pouvons pas rejeter la possibilité que la gabapentine agisse sur plusieurs sites conjointement. Nous pouvons supposer que l'action de la gabapentine sur le canal calcique pourrait se manifester soit par l'action directe de cette drogue sur le canal, soit par l'intermédiaire de la sous-unité  $\alpha 2\delta$ . Il est possible que la gabapentine puisse altérer la fonction du canal en produisant un découplage physique du canal avec des constituants cytoplasmiques impliqués dans la régulation intracellulaire.

### 4.3 L'hypothèse du récepteur modulé pourrait expliquer l'effet de la gabapentine

Même une dose maximale de gabapentine de 1 mM inhibe partiellement les courants  $\alpha 1G$  à  $42 \pm 7\%$  ( $n=4$ ). L'inhibition du canal  $\alpha 1G$  pourrait être expliquée par la capacité de la gabapentine à modifier l'état conformationnel du canal. C'est le mécanisme d'action le plus souvent cité pour expliquer l'action des inhibiteurs sur les canaux ioniques (Ragsdale et Avoli, 1998; Bezprozvanny et Tsien, 1995). Selon l'hypothèse du récepteur modulé un médicament donné se lie très difficilement au canal dans un état fermé, mais beaucoup plus facilement si le canal se trouve dans un état ouvert ou inactivé. Cette hypothèse implique un mécanisme allostérique d'interaction entre la drogue et le canal. D'abord, le canal possède un site modifiable par la drogue. Ce site est de faible affinité ou même inaccessible quand le canal reste dans son état fermé et pourrait être converti dans un site de plus haute affinité quand le canal est ouvert ou inactivé. Le médicament en se liant au canal inactivé stabilise ce canal dans cet état et par conséquent déplace l'équilibre de l'état ouvert vers l'état inactivé. Ce changement provoque un déplacement de la courbe d'inactivation dans un état stable vers des potentiels plus négatifs, ce qu'on a observé dans notre cas avec des potentiels d'inactivation de  $V_{50} = -61 \pm 3$  mV mesurés en condition témoin à  $-82 \pm 2$  mV en présence de gabapentine. Il en résulte une diminution du nombre de canaux disponibles pour ouverture à un potentiel donné en réponse au potentiel-test.

Nous avons observé la réversibilité du courant après le rinçage dans le cas des inhibiteurs non organiques, mais ce n'était pas le cas de la gabapentine. Donc, nous pourrions attribuer à la gabapentine un rôle de modulateur du canal. La drogue se lie à son site dans un état inactivé d'un canal, stabilise le canal dans cet état en déplaçant une

courbe d'inactivation dans un état stable vers les potentiels plus négatifs ce qui est en conformité avec l'hypothèse de récepteur modulé.

#### 4.4 Spécificité structurale de la gabapentine

Nous devons constater que l'effet fonctionnel de la gabapentine ne requiert pas une très grande spécificité structurale du médicament. Les expériences avec l'acide cyclohexane acétique, un analogue structural de la gabapentine, démontrent une inhibition significative mais toutefois plus faible ( $28 \pm 8\%$ ,  $n=3$ ) que la gabapentine.

#### 4.5 Inhibition partielle des canaux $\alpha 1G$ et prévention de crises épileptiques

Est-ce que nos résultats avec la gabapentine nous permettent de comprendre ses effets cliniques reconnus, i.e. la réduction de crises chez les patients épileptiques? Tout d'abord, rappelons que les travaux de Talley et al. (2000) indiquent une augmentation spécifique de l'ARNm de  $\alpha 1G$  dans les neurones des noyaux de relais thalamique postérieur ventrale chez les rats GAERS (pour «*Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg*»). L'hybridation *in situ* a été utilisée pour comparer l'expression des ARNm codant pour  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$ ,  $\alpha 1I$  et  $\alpha 1E$ . Quoique les expériences aient été effectuées chez le rat, il est probable que des mécanismes moléculaires similaires soient à l'origine des crises épileptiques chez l'humain. Étant donné que les canaux de type T sont responsables de la génération de rythmicité spontanée dans le cerveau, il est possible que l'activité électrique du cerveau change de façon dramatique dans des conditions de surexpression de ces canaux en provoquant des crises épileptiques.

De plus, comme nous l'avons observé, la gabapentine produit une inhibition à une dose relativement faible (10  $\mu\text{M}$ ) et cette inhibition reste incomplète même si le médicament est appliqué à des concentrations beaucoup plus fortes (100  $\mu\text{M}$ , 1 mM). En effet, 10  $\mu\text{M}$  correspond à la dose moyenne de gabapentine mesurée dans le sérum des patients traités par ce médicament. Donc, l'inhibition observée se produit à des doses cliniques de la gabapentine. Il est possible que l'inhibition partielle du courant par la gabapentine pourrait suffire à diminuer l'activité électrique pathologique dans le cerveau et à réduire les crises épileptiques.

#### **4.6 Inhibition des canaux $\alpha 1\text{G}$ , $\alpha 1\text{H}$ et $\alpha 1\text{C}$ par les inhibiteurs inorganiques**

Contrairement à nos expériences avec la gabapentine, nous avons obtenu une diminution presque complète des courants après l'addition de  $\text{Cd}^{2+}$  ou de  $\text{Ni}^{2+}$  à travers les canaux  $\alpha 1\text{G}$  et  $\alpha 1\text{H}$  exprimés en absence de sous-unité  $\alpha 2\delta$  dans les ovocytes de *Xenopus*. Cette inhibition était facilement réversible après rinçage ce qui n'était pas le cas pour la gabapentine. Cette observation suggère l'existence d'un site de liaison aux inhibiteurs inorganiques dans le canal.

Nos expériences avec le cadmium démontrent une sensibilité du même ordre de grandeur des canaux calciques de type T  $\alpha 1\text{G}$  ( $\text{IC}_{50} = 45 \pm 3 \mu\text{M}$ ,  $n=3$ ) et  $\alpha 1\text{H}$  ( $\text{IC}_{50} = 20 \pm 3 \mu\text{M}$ ,  $n=3$ ) pour ces ions. De plus, nous avons observé une sensibilité un peu plus forte des canaux de type L  $\alpha 1\text{C}$  pour les ions cadmium ( $\text{IC}_{50} = 4 \pm 1 \mu\text{M}$ ,  $n=3$ ). Donc, on suppose qu'il existe une région commune qui peut être conservée parmi les plusieurs



types des canaux calciques. Il est possible que cette région comporte des résidus glutamate qui possèdent une haute affinité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  (Yang et al., 1993; Parent et Gopalakrishnan, 1995).

Malgré une sensibilité relativement semblable des canaux  $\alpha 1\text{G}$ ,  $\alpha 1\text{H}$  et  $\alpha 1\text{C}$  pour le cadmium, ces canaux diffèrent fortement quant à la sensibilité au nickel (Tableau 4.1).

**Tableau 4.1** Données comparatives des IC<sub>50</sub> (en  $\mu\text{M}$ ) obtenues par les différents groupes des chercheurs qui utilisaient le  $\text{Cd}^{2+}$  et le  $\text{Ni}^{2+}$  comme inhibiteurs les ions divalents en travaillant soit sur les cellules HEK-293 soit sur les ovocytes de *Xenopus*

	Ca <sub>v</sub> 3.1				Ca <sub>v</sub> 3.2				Ca <sub>v</sub> 1.2	
	ovocytes		HEK		ovocytes		HEK		ovocytes	
	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>
<b>Agueev et al. (2000)</b>	45±3	268±5			20±3	10±1			4±1	162±4
<b>Lacinova et al. (2000)</b>			162±13	470±40						
<b>Lee et al. (1999)</b>		167±15		250±22		5,7±0,3		12±2		
<b>Williams et al. (1999)</b>								6,6		

Le nickel a été proposé comme inhibiteur sélectif des canaux de type T (Hagivara et al., 1988; Todorovic et Lingle, 1998). Cependant, il existe une différence considérable quant à la sensibilité des canaux de type T pour le nickel (Huguenard, 1996) ce qui suggère une diversité des canaux de type T en fonction de leur provenance tissulaire. Nos résultats démontrent que l'inhibition du canal  $\alpha\text{1H}$  présent au niveau du cœur se

produit à la concentration de nickel environ 25 fois plus faible comparativement au canal  $\alpha 1G$  avec des valeurs de  $IC_{50} = 268 \mu M$  pour  $\alpha 1G$  et  $IC_{50} = 10 \mu M$  pour  $\alpha 1H$ . Selon Lee (1999), parmi les trois sous-types des canaux calciques de type T, seul le canal  $\alpha 1H$  est inhibé à de faibles concentrations de nickel avec des valeurs de  $IC_{50} = 12 \mu M$  quand  $\alpha 1H$  est exprimé dans les cellules HEK et  $IC_{50} = 5,7 \mu M$  dans les ovocytes de *Xenopus* ce qui est en accord avec nos données. Donc, parmi les sous-unités  $\alpha 1$  qui forment les canaux calciques de type T,  $\alpha 1H$  est la sous-unité la plus sensible au nickel.

En ce qui concerne l'effet comparatif du cadmium et du nickel, nous avons observé que le canal  $\alpha 1G$  exprimé sans sous-unité auxiliaire dans les ovocytes de *Xenopus* est plus sensible au cadmium ( $IC_{50} = 45 \mu M$ ) qu'au nickel ( $IC_{50} = 268 \mu M$ ). Il existe une corrélation entre nos résultats et ceux de Lacinova et collaborateurs qui travaillaient sur les mêmes canaux exprimés dans les cellules HEK et qui ont mesuré des valeurs de  $IC_{50} = 162 \mu M$  pour le cadmium et  $IC_{50} = 470 \mu M$  pour le nickel. Ces chercheurs ont aussi rapporté une plus forte sensibilité du canal  $\alpha 1G$  pour le  $Cd^{2+}$  par rapport à nickel. En ce qui concerne  $\alpha 1H$ , nous avons observé une sensibilité similaire aux inhibiteurs inorganiques avec des valeurs de  $IC_{50} = 20 \mu M$  pour le cadmium et  $IC_{50} = 10 \mu M$  pour le nickel. Étant donné qu'il existe peu d'inhibiteurs spécifiques des canaux de type T, les données obtenues dans nos expériences pourraient établir des points de référence dans la caractérisation pharmacologique de divers sous-types des canaux de type T. D'autre part, la similitude de nos résultats avec ceux de Lacinova ainsi que Lee nous indique que le système d'expression des canaux sur les ovocytes de

*Xenopus* s'avère assez fiable pour la caractérisation de l'affinité des inhibiteurs inorganiques.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agueev, V., Bernatchez, G., Perez-Reyes, E., Parent, L. 2000. Low-affinity block of the T-type  $\alpha 1G$   $Ca^{2+}$  channel by the antiepileptic drug gabapentin. *Biophys.J.* 78 : 457A
- Bartoszyk, G.D., Meyerson, N., Reimann, W., Satzinger, G., von Hodenberg, A. 1986. Gabapentin. *Current problems in epilepsy*. Edited by Meldrum BS, Porter RJ. London : John Libbey & Company; 147-164
- Bartoszyk, G.D., Reinmann, W. 1985. Preclinical characterisation of the anticonvulsant gabapentin. *16<sup>th</sup> Epilepsy International Congress, Hamburg, Germany*
- Bean, B.P., 1985. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J.Gen.Physiol.* 86 : 1-30
- Bezprozvanny, I and Tsien, R.W. 1995. Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels expressed in *Xenopus* oocytes by the  $Ca^{2+}$  channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). 1995. *Mol. Pharmacol.* 48 :540-549
- Black, J.L., Lennon, V.A. 1999. Identification and cloning of putative human neuronal voltage-gated calcium channel  $\gamma$ -2 and  $\gamma$ -3 subunits: neurologic implications. *Mayo Clinic Proceedings* 74(4) : 357-361
- Bosse, E., Regulla, S., Biel, M., Ruth, P., Meyer, H.E., Flockerzi, V., Hofmann, F. 1990. The cDNA and deduced amino acid sequence of the  $\gamma$  subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.* 267 :153-156
- Brust, P.F., Simerson, S., McCue, A.F., Deal, C.R., Schoonmaker, S., Williams, M.E., Veliçelebi, G., Johnson, E.C., Harpold, M.M., Ellis, S.B. 1993. Human neuronal

- voltage-dependent calcium channel : studies on subunit structure and role in channel assembly. *Neuropharm.* 32 : 1089-1102
- Calabresi, P., Centonze, D., Marfia, G.A., Pisani, A., Bernardi, G. 1999. An in vitro electrophysiological study on the effects of phenytoin, lamotrigine and gabapentin on striatal neurons. *Brit. J. Pharm.* 126 : 689-696
- Carbon, E., Lux, H.D. 1984. A low voltage-activated, fully inactivating  $\text{Ca}^{2+}$  channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310: 501-502
- Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L., Perez-Reyes, E. 1993a. Cloning and expression of a third calcium channel  $\beta$  subunit. *J.Biol.Chem.* 268 : 3450-3455
- Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L., Perez-Reyes, E. 1993b. Cloning and expression of a neuronal calcium channel  $\beta$  subunit. *J.Biol.Chem.* 268 : 12359-12366
- Chuang, R., S-I., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, E., Swartz, K.J. 1998. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nature Neuroscience* 1: 668-674
- Cochran, J.W. 1996. Restless legs syndrome. *J.Am.Med.Assoc.* 275, 187
- Cribbs, L.L., Lee, J.-H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., Perez-Reyes, E. 1998. Cloning and characterisation of  $\alpha 1\text{H}$  from human heart, a member of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel gene family. *Circulation Res.* 83 : 103-109
- Cribbs, L.L., Gomora, J.C., Daud, A.N., Lee, J.H., and Perez-Reyes, E. 2000. Molecular cloning and functional expression of  $\text{Ca(v)}3.1\text{c}$ , a T-type calcium channel from human brain *FEBS Lett.* 466 (1), 54-58

- De Waard, M., Campbell, K.P. 1995. Subunit regulation of the neuronal  $\alpha 1A$   $Ca^{2+}$  channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J.Physiol.* 485 : 619-634
- De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E.S., Gurnett, C.A., Campbell, K.P. 1997. Direct binding of G-protein  $\beta\gamma$  complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385 : 446-450
- Dolphin, A.C., Wyatt, C.N., Richards, J., Beattie, R.E., Craig, P., Lee, J-H., Cribbs, L.L., Volsen, S.G., Perez-Reyes, E. 1999. The effect of  $\alpha 2-\delta$  and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel  $\alpha 1G$ . *J.Physiol.* 519 : 35-45
- Eberst, R., Dai, S., Klugbauer, S., Hofmann, F. 1997. Identification and functional characterization of a calcium channel gamma subunit. *Pflug.Arch. (European Journal of Physiology)* 433 : 633-637
- Ellis, S.B., Williams, M.E., Ways, N.R., Brenner, R., Sharp, A.H., Leung, A.T., Campbell, K.P., Mckenna, E., Koch, W.J., Hui, A., Schwartz, A., Harpold, M.M. 1998. Sequence and expression of mRNA encoding the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  subunits of a DHP sensitive calcium channel. *Science* 241 : 1661-1664
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hoffman, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., Catterall, W.A. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 25 : 533-535
- Fedulova, S.A., Kostyuk, P.G., Veselovsky, N.S. 1985. Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J.Physiol.* 359 : 431-446

- Fink, K., Meder, W., Dooley, D.J., Gethert, M. 2000. Inhibition of neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  influx by gabapentin and subsequent reduction of neurotransmitter release from rat neocortical slices. *Brit. J. Pharm.* 130 : 900-906
- Fox, A.P., Nowycky, M.C., Tsien, R.W. 1987. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J.Physiol.* 394 : 173-200
- Gao, T., Yatani, A., Dell'Acqua, M.L., Sako, H., Green, S.A., Dascal, N., Scott, J.D., Hosey, M.M. 1997. cAMP-dependent regulation of cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron* 19 : 185-196
- Gee, N.S., Brown, J.P., Dissanayake, V.U.K., Offord, J., Thurlow, R., Woodruff, G.N. 1996. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the  $\alpha 2\delta$  subunit of a calcium channel. *J. Biol. Chem.* 271 : 5768-5776
- Hagivara, N., Irasawa, H., Kameyama, M. 1988. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J.Physiol.(Lond)* 395 : 233-253
- Heinemann, S.H., Terlau, H., Stühmer, W., Imoto, K., Numa, S. 1992. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356 : 441-443
- Herrington, J., Lingle, C.J. 1992. Kinetic and pharmacological properties of low voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  current in rat clonal (GH3) pituitary cells. *J.Neurophysiol.* 68 : 213-232



- Hobom, M., Dai, S., Marais, E., Lacinova, L., Hofmann, F., Klugbauer, N. 2000. Neuronal distribution and functional characterisation of the calcium channel  $\alpha 2\text{-}\delta\text{-}2$  subunit. *European J.Neurosci.* 12 : 1217-1226
- Huguenard, J.R. 1996. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58 : 329-348
- Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F., Flockerzi, V. 1992. Calcium channel  $\beta$  subunit heterogeneity : functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.* 11: 885-890
- Jansen, H., Llinás, R.R. 1984. Ionic basis for the electroresponsiveness and oscillatory properties of guinea pig thalamic neurones *in vitro*. *J.Physiol.(Lond)* 349 : 227-247
- Jasper, H.H., Kershman, J. 1941. Electroencephalographic classification of the epilepsies. *Arc. Neurol. Psychiatry* 45 : 903-943
- Klößner, U., Lee, J.-H., Cribbs, L.L., Daud, A., Hescheler, J., Pereverzev, A., Perez-Reyes, E., Schneider, T. 1999. Comparison of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents induced by expression of three cloned  $\alpha 1$  subunits,  $\alpha 1\text{G}$ ,  $\alpha 1\text{H}$  and  $\alpha 1\text{I}$ , of low voltage-activated T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Europ. J.Neurosci.* 11 : 4171-4178
- Klugbauer, N., Lacinová, L., Flockerzi, V., Hofmann, F. 1995. Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-gated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO J.* 14 : 1084-1090.
- Lacinova, L., Klugbauer, N., Hofmann, F. 1999. Absence of modulation of the expressed calcium channel  $\alpha 1\text{G}$  subunit by  $\alpha 2\text{-}\delta$  subunits. *J.Physiol.* 516 : 639-645

- Lacinova, L., Klugbauer, N., Hofmann, F. 2000. Regulation of the calcium channel  $\alpha 1G$  subunit by divalent cations and organic blockers. *Neuropharmacology* 39 : 1254-1266
- Lee, J.-H., Daud, A., Cribbs, L.L., Lacerda, A.E., Pereverzev, A., Klöckner, U., Schneider, T., Perez-Reyes, E. 1999. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J.Neurosci.* 19 : 1912-1921
- Lee, J.-H., Gomora, J.C., Cribbs, L.L., Perez-Reyes, E. 1999. Nickel block of three cloned T-type calcium channels : low concentrations selectively block  $\alpha 1H$ . *Biophys.J.* 77 : 3034-3042
- Letts, V.A., Felix, R., Biddlecome, G.H., Arikkat, J., Mahaffey, C.L., Valenzuela, A., Bartlett II, F.S., Mori, Y., Campbell, K.P., Frankel, W.N. 1998. The mouse stargazer gene encodes a neural  $Ca^{2+}$  channel  $\gamma$  subunit. *Nature genetics* 19 : 340-346
- Loscher, W., Honack, D., Taylor, C.P. 1991. Gabapentin increases aminooxyacetic acid-induced GABA accumulation in several regions of rat brain. *Neurosci Lett.* 128 : 150-154
- Macdonald, R.L., Kelly, K.M. 1994. Mechanisms of action of currently prescribed and newly developed antiepileptic drugs. *Epilepsia* 35 : S41-S50
- Marescaux, C., Vergnes, M., Depaulis, A. 1992. Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg. *J.Neural Transm.* 35 : 37-69
- Matteson, D.R., Armstrong, C.M. 1986. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J.Gen.Physiol.* 87 : 161-182

- McCormick, D.A. 1992. Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog.Neurobiol.* 39 : 337-388
- Mellick, G.A., Mellick, L.B. 1996. Management of restless legs syndrome with gabapentin (Neurontin). *Sleep* 19 : 224-226
- Mishra , S.K., and Hermsmeyer, K. 1994. Selective inhibition of T-type  $Ca^{2+}$  channels by Ro 40-5967. *Circ.Res.* 75 :144-148
- Mittman, S., Guo, J., and Agnew,W.S. 1999. Structure and alternative splicing of the gene encoding alpha1G, a human brain T calcium channel alpha1 subunit *Neurosci. Lett.* 274 (3), 143-146
- Nargeot, J., et Charnet, P. 1994. Diversité moléculaire des canaux calciques : du gène à la fonction. *Médecine/Sciences* 10 :1293-1308
- Niïdome, T., Kim, M.S., Friedrich, T., Mori, Y. 1992. Molecular cloning and characterisation of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 308 : 7-13
- Nilius, B., Hess, P., Lansman, J.B., Tsien, R.W. 1985. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316 : 443-446
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., Tsien, R.W. 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316 : 440-443
- Page, K.M., Stephens, G.J., Berrow, N.S., Dolphin, A.C. 1997. The intracellular loop between domains I and II of the B-type calcium channel confers aspects of G-protein sensitivity to the E-type calcium channel. *J Neurosci.* 17(4) : 1330-1338

- Parent, L., Gopalakrishnan, M. 1995. Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Biophysical J.* 69 : 1801-1813
- Parent, L., Schneider, T., Moore, C.P., Talwar, D. 1997. Subunit regulation of the human brain  $\alpha 1\text{E}$  calcium channel. *J.Membrane Biol.* 160 : 127-140
- Patel, J., Naritoku, D.K. 1996. Gabapentin for the treatment of hemifacial spasms. *Clin.Neuropharmacol.* 19 : 185-188
- Pereverzev, A., Klöckner, U., Henry, M., Grabsch, H., Vajna, R., Olyschlager, S., Viatchenko-Karpinski, S., Schroder, R., Hescheler, J., Schneider, T. 1998. Structural diversity of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha 1\text{E}$  subunit. *Europ.J.Neurosci.* 10 : 916-925
- Perez-Reyes, E., Castellano, A., Kim, H.S., Bertrand, P., Bagstrom, E., Lacerda, A.E., Wei, X.Y., Birnbaumer, L. 1992. Cloning and expression of a cardiac/brain  $\beta$  subunit of the L-type calcium channel. *J.Biol.Chem.* 267 : 1792-1797
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A.E., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., Lee, J.-H. 1998. Molecular characterisation of a neuronal low voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391 : 896-900
- Petroff, O.A.C., Rothman, D.L., Behar, K.L., Lamoureux, D., Mattson, R.H. 1996. The effect of gabapentin on brain gamma-aminobutyric acid in patients with epilepsy. *Ann neurol.* 39 : 95-99
- Platano, D., Qin, N., Noceti, F., Birnbaumer, L., Stefani, E., Olcese, R. 2000. Expression of the  $\alpha 2\delta$  subunit interferes with prepulse facilitation in cardiac L-type calcium channels. *Biophysical Journal.* 78 : 2959-2972

- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, I., Tanabe, T., Snutch, T.P. Campbell, K.P. 1994. Calcium channel  $\beta$ -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha 1$ -subunit. *Nature* 368 : 67-70
- Ragsdale, D.S., Avoli, M. 1998. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain Res.Reviews* 26: 16-28
- Rock, D.M., Kelly, K.M., Macdonald, R.L. 1993. Gabapentin actions on ligand- and voltage-gated responses in cultured rodent neurons. *Epilepsy Res.* 16 : 89-98
- Rowen, A.J., Schear, M.J., Weiner, J.A., Luciano, D. 1989. Intensive monitoring and pharmacokinetic studies of gabapentin in patients with generalized spike-wave discharges. *Epilepsia* 30 : 30
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning : A laboratory manual (2<sup>nd</sup> ed). *Cold Spring Harbor, New-York* : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schmidt, D. 1989. Potential antiepileptic drugs : gabapentin. *Antiepileptic drugs* edn 3. Edited by Levy RH, Dreyfus FE, Mattson RH, Meldrum BS, Penry JK. New York : *Raven Press* : 925-935
- Schumacher, T.B., Beck, H., Steinhauser, C., Schramm, J., Elger, C.E. 1998. Effects of phenytoin, carbamazepine, and gabapentin on calcium channels in hippocampal granule cells from patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 39 : 355-363
- Segal, A.Z., Rordorf, G. 1996. Gabapentin as a novel treatment for postherpetic neuralgia. *Neurology.* 1175-1176
- Shistik, E., Ivanina, T., Puri, T., Hosey, M., Dascal, N. 1995.  $Ca^{2+}$  current enhancement by  $\alpha 2$ - $\delta$  and  $\beta$  subunits in *Xenopus* oocytes : contribution of changes in channel gating and  $\alpha 1$  protein level. *J.Physiol.(Lond)* 489 : 55-62

- Shistik, E., Keren-Raifman, T., Idelson, G.H., Blumenstein, Y., Dascal, N., Ivanina, T. 1999. The N terminus of the cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha 1C$  subunit. The initial segment is ubiquitous and crucial for protein kinase C modulation, but is not directly phosphorylated. *J.Biol.Chem* 274 : 31145-31149
- Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., Dascal, N. 1991. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253 : 1553-1557
- Slavik K.J., Wang, J.P., Aghdasi, B., Zhang, J.Z., Mandel, F., Malouf, N., Hamilton, S.L. 1997. A carboxy-terminal peptide of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  - release channels. *Am.J. Physiol.* 1997. 272 : 1475-1481
- Snutch, T.P., Reiner, P.B. 1992.  $\text{Ca}^{2+}$  channels diversity of form and function. *Curr.Opin.Neurobiol.* 2 : 247-253
- Soong, T.W., Stea, A., Hodson, C.D., Dubel, S.J., Vincent, S.R., Snutch, T.P. 1993. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260 : 1133-1136
- Spiegel, E.A., Wycis, H.T. 1950. Thalamic recordings in man with special reference to seizure discharges. *EEG Clin.Neurophysiol.* 2 : 23-27
- Stefani, A., Spadoni, F., Bernardi, G. 1998. Gabapentin inhibits calcium currents in isolated rat brain neurons. *Neuropharmacol.* 37 : 83-91
- Steriade, M., Deschenes, M. 1984. The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain Res.Rev.* 8 : 1-31
- Steriade, M., McCormick, D.A., Sejnowski, T.J. 1993. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262 : 679-685

- Stringer, J.L., Taylor, C.P. 2000. The effects of gabapentin in rat hippocampus are mimicked by two structural analogs, but not by nimodipine. *Epilepsy Res.* 41 : 155-162
- Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.-H., Daud, A., Perez-Reyes, E., Bayliss, D.A. 1999. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J.Neurosci.* 19 : 1895-1911
- Talley, E.M., Solorzano, G., Depaulis, A., Perez-Reyes, E., Bayliss, D.A. 2000. Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Molecular Brain Research* 75 : 159-165
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangava, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., Numa, S. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328 : 313-318
- Taylor, C.P. 1993. The anticonvulsant lamotrigine blocks sodium currents from cloned alpha-subunits of rat brain Na<sup>+</sup> channels in a voltage-dependent manner but gabapentin does not. *Soc Neurosci Abstr* 19 : 1631
- Taylor, M.T., Bonhaus, D.W. 2000. Allosteric modulation of [<sup>3</sup>H]gabapentin binding by ruthenium red. *Neuropharmacology.* 39 : 1267-1273
- Todorovic, S.M., Lingle, C.J. 1998. Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurones: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J.Neurophysiol.* 79 : 240-252
- Tsakiridou, E., Bertollini, L., De Courtis, M., Avanzini, G., Pape, H.-C. 1995. Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurones in rat model of absence epilepsy. *J.Neurosci.* 15 : 3110-3117

- Tsien R.W., Ellinor, P.T., Horne, W.A. 1991. Molecular diversity of voltage-dependent calcium channels. *Trends Physiol. Sci.* 12 :349-354
- Walker, D., De Waard, M. 1998. Subunit interaction sites in voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels: role in channel function. *Trends in Neurosci.* 21 : 148-154
- Wamil, A.W., McLean, M.J. 1994. Limitation by gabapentin of high frequency action potential firing by mouse central neurons in cell culture. *Epilepsy Res.* 17 : 1-10
- Wei, X., Perez-Reyes, E., Lacerda, A.E., Schuster, G., Brown, A.M., Birnbaumer, L. 1991. Heterologous regulation of the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha 1$ -subunit by skeletal muscle  $\beta$  and « gamma » subunits. Implications for the structure of the cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J.Biol.Chem.* 266 : 21943-21947
- Welty, D.F., Selielke, G.P., Rothstein, J.D. 1995. Potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis with gabapentin : a hypothesis. *Ann. Pharmacother.* 29 : 1164-1167
- Wheeler, D.B., Randal, A., Tsien, R.W. 1994. Roles of N-type and Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264 :107-111
- Williams, D. 1953. Study of thalamic and cortical rhythms in petit mal. *Brain* 76 : 50-69
- Williams, M.E., Washburn, M.S., Hans, M., Urrutia, A., Brust, P.F., Prodanovich, P., Harpold, M.M., Stauderman, K.A. 1999. Structure and functional characterisation of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J.Neurochem.* 72 : 791-799
- Yang, J., Ellinor, P.T., Sather, W.A., Zhang, J.F., Tsien, R.W. 1993 Molecular determinants of  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity and ion permeation in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Nature* 366 : 158-161