

2m11.3402.4

Université de Montréal

Le rôle du motif hydrophobe VAVIM situé au niveau de IVS6  
dans les mécanismes d'activation et d'inactivation du  
canal calcique  $Ca_v2.3$

Par

Ebru-Eylem Baspinar

11731431<sub>mv</sub>

Département de physiologie  
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 2006

© Ebru-Eylem Baspinar



W  
H  
U58  
2006  
V.088

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Le rôle du motif hydrophobe VAVIM situé au niveau de IVS6  
dans les mécanismes d'activation et d'inactivation du  
canal calcique  $Ca_v2.3$

présenté par :

Ebru-Eylem Baspinar

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Louis Schwartz  
Président-rapporteur

Lucie Parent  
directrice de recherche

Nicole Leclerc  
membre du jury

## RÉSUMÉ

Les mécanismes de « gating » déterminant l'influx calcique à travers les canaux calciques activés par la dépolarisation (canaux HVA) sont très peu connus. La cristallisation de la structure de quelques canaux potassiques et l'identification de la mutation I1811L au niveau du segment IVS6 du canal calcique  $Ca_v2.1$  impliquée dans la migraine hémiplegique familiale de type 1 (MHF1), suggèrent un rôle important du segment IVS6 dans les propriétés biophysiques des canaux calciques. Dans le but d'élucider le rôle de cette région, nous avons muté le résidu I1721 du canal  $Ca_v2.3$  équivalent au résidu I1811 du canal  $Ca_v2.1$  par des résidus de propriétés physicochimiques (hydrophobicité, charge, polarité et taille) différentes. Les mutations du résidu I1721 (A, E, G, H, L, P, T, V) même la plus conservatrice I1721L, affectent les propriétés d'inactivation en déplaçant le potentiel de mi-inactivation vers des potentiels plus négatifs (de  $-10$  à  $-40$  mV) que celui observé pour le canal  $Ca_v2.3$  sauvage dans les mêmes conditions. Le résidu I1721 faisant partie d'un motif hydrophobe (VAVIM) strictement conservé au niveau de tous les canaux calciques de type HVA, nous avons proposé que ce motif joue un rôle important dans le « gating » des canaux calciques. Les résultats que nous avons obtenus appuient cette hypothèse. En effet, la mutation en glycine de chacun des résidus (V1718G, A1719G, V1720G, I1721G, and M1722G) affectent la dépendance en voltage de l'activation et de l'inactivation et ainsi que les cinétiques d'inactivation du canal. Les cinétiques d'inactivation des mutants A1719G et V1720G sont ralenties comparativement à celles du canal sauvage, tandis que les cinétiques des mutants I1721G et M1722G sont accélérées. Le mutant V1718G n'a aucun effet significatif sur l'inactivation du canal. Nous avons ensuite testé les mutants en l'absence de la sous-unité  $Ca_v\beta3$  pour en examiner l'importance dans les effets observés. Nos résultats montrent que même en absence de la sous-unité  $Ca_v\beta3$ , les propriétés biophysiques de la sous-unité  $Ca_v\alpha1$  du canal  $Ca_v2.3$  sont significativement altérées par rapport

à celles de la sous-unité  $Ca_v\alpha 1$  de type sauvage, ce qui indique un rôle critique du motif VAVIM du segment IVS6 dans le processus de « gating » des canaux calciques  $Ca_v 2.3$  activés par la dépolarisation.

**Mots Clés :** « gating », canaux potassiques, inactivation, cinétiques des canaux calciques, migraine hémiplegique familiale de type 1 (MHF1),  $Ca_v 2.3$ ,  $Ca_v\beta 3$ , segment IVS6; motif VAVIM

## **ABSTRACT**

The molecular mechanisms underlying calcium influx through high-voltage activated (HVA) calcium channels have yet to be fully elucidated. The crystal structures of several potassium channels as well as the identification of mutant I1811L in segment IVS6 of the  $Ca_v2.1$  channel causing familial hemiplegic migraine type 1 (FHM1), suggest a key role of segment IVS6 in the gating properties of these calcium channels. In the present study we investigated the role of this segment in the activation and inactivation properties of the  $Ca_v2.3$  channel. Substitutions of the I1721 residue in  $Ca_v2.3$ , corresponding to I1811 in  $Ca_v2.1$ , by residues of different physico-chemical properties (hydrophobic, charge, polarity and size) yielded whole-cell currents with altered gating properties. All mutations of the I1721 position tested in this study (A, E, G, H, L, P, T, V), including the conservative I1721L mutation, shifted the voltage dependence of inactivation to more negative potentials (from -10 to -40 mV) compared with the wild-type  $Ca_v2.3$  channel under the same conditions. Since I1721 is localized in a hydrophobic sequence (VAVIM) strictly conserved in all HVA calcium channels, we further investigated the role of these neighboring residues in the gating of  $Ca_v2.3$ . Glycine substitution at each of these positions (V1718G, A1719G, V1720G, I1721G, and M1722G) altered significantly the voltage dependence of activation and inactivation. In addition, the inactivation kinetics of the A1719G and V1720G mutants was decreased as compared to that of the wild-type channel whereas the kinetics of I1721G and the M1722G were faster. The V1718G channel inactivated like the wild-type channel. The altered gating properties remained significantly different in the absence of the  $Ca_v\beta3$  subunit suggesting that the VAVIM locus in segment IVS6 of the  $Ca_v\alpha1$  subunit plays a key role in the gating of the high-voltage activated  $Ca_v2.3$  calcium channel.

**Key words:** gating, potassium channels, inactivation, kinetics calcium channels, familial hemiplegic migraine type 1 (FHM1),  $Ca_v2.3$ ,  $Ca_v\beta3$ , IVS6 segment, VAVIM sequence



## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	vii
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	ix
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	x
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	xii
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	xv
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	1
I.1 L'homéostasie calcique intracellulaire.....	1
I.2 Les canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire .....	3
I.2.1 Les canaux de type LVA.....	3
I.2.2 Les canaux de type HVA .....	4
I.3 Structure des canaux calciques activés par la dépolarisation.....	8
I.3.1 La sous-unité $Ca_{v\alpha 1}$ .....	9
I.3.2 Diversité moléculaire .....	11
I.3.3 La sous-unité $Ca_{v\beta}$ .....	13
I.3.4 La sous-unité $Ca_{v\alpha 2-\delta}$ .....	16
I.3.5 La sous-unité $Ca_{v\gamma}$ .....	17
I.4 Le « gating » des canaux calciques activés par la dépolarisation .....	18
I.4.1 Mécanisme moléculaire d'activation des canaux calciques.....	18
I.4.2 Mécanismes moléculaires impliqués dans l'inactivation des canaux calciques .....	20
I.4.2.1 Mécanisme moléculaire de l'inactivation dépendant du potentiel membranaire .....	23
I.4.2.2 Mécanisme moléculaire de l'inactivation dépendant du calcium intracellulaire .....	25
I.5 Les canalopathies calciques .....	26
I.6 Justification et objectifs du travail.....	30
<b>II. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	31
II.1 Techniques d'ADN recombinant .....	31
II.1.1 Mutagenèse dirigée .....	31
II.1.2 Transcription in vitro .....	32
II.2 Expression fonctionnelle dans les ovocytes de Xénope.....	32
II.3 Enregistrements électrophysiologiques .....	34
II.3.1 Analyse des données .....	35
<b>III. RÉSULTATS</b> .....	37
III.1 Rôle du résidu I1721.....	38

III.1.1 La mutation I1721L .....	39
III.1.2 Résidus ayant des effets au niveau du volume et de la polarité .....	41
III.1.3 Résidus ayant des effets de charge .....	45
III.1.4 La substitution du résidu I1721 par la glycine et la proline .....	48
III.2 Rôle du motif conservé VAVIM .....	53
III.2.1 « Glycine Scan » .....	54
<b>IV DISCUSSION .....</b>	<b>61</b>
IV.1 Le résidu I1721 est impliqué dans les propriétés d'activation du canal $Ca_v2.3$ .....	63
IV.2 Les résidus adjacents (VAVIM) au résidu I1721 modifient les paramètres d'inactivation du canal $Ca_v2.3$ .....	66
IV.3 La sous-unité $Ca_v\beta3$ module la sous-unité $Ca_v\alpha1$ même après mutation des résidus du motif VAVIM .....	70
IV.4 Modèle moléculaire du « gating » des canaux calciques activés par la dépolarisation .....	71
IV.5 Perspectives .....	72
<b>V. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>72</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Différents types de canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire .....	7
<b>Tableau II:</b> Classification moléculaire et localisation tissulaire des dix gènes codant pour les canaux calciques activés par la dépolarisation.....	12
<b>Tableau III:</b> Maladies génétiques associées à des mutations au niveau des gènes codant pour les sous-unités des canaux calciques activés par le voltage .....	29
<b>Tableau IV:</b> Paramètres biophysiques du canal $Ca_v2.3$ sauvage et des mutants I1721 exprimés dans les ovocytes de Xénope. ....	52
<b>Tableau V:</b> Paramètres biophysiques du canal $Ca_v2.3$ sauvage et des mutants VAVIM exprimés dans les ovocytes de Xénope.....	60

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Organisation structurale des cinq sous-unités constituant les canaux calciques activés par la dépolarisation.....	8
<b>Figure 2:</b> Structure simplifiée de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ des canaux calciques activés par la dépolarisation .....	10
<b>Figure 3:</b> Homologie de séquence primaire des canaux calciques activés par la dépolarisation.....	13
<b>Figure 4:</b> Schéma représentant l'interaction entre $Ca_v\alpha_1$ et $Ca_v\beta$ .....	15
<b>Figure 5:</b> Structure tridimensionnelle de la sous-unité $Ca_v\beta$ .....	15
<b>Figure 6:</b> Structure du canal KcsA à l'état fermé et du canal MthK à l'état ouvert.....	20
<b>Figure 7:</b> Modèle d'inactivation des canaux sodiques et potassiques activés par la dépolarisation membranaire.....	21
<b>Figure 8:</b> Modèle prédit d'inactivation des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire .....	22
<b>Figure 9:</b> Modèle de l'inactivation dépendante du calcium induite par la calmoduline .....	26
<b>Figure 10:</b> Identification des 15 mutations causant la migraine hémiplegique familiale de type 1 .....	28
<b>Figure 11:</b> Prélèvement des ovocytes d'une grenouille <i>Xenopus Laevis</i> ....	33
<b>Figure 12:</b> Alignement de séquence primaire du segment IVS6 des canaux calciques HVA.....	37
<b>Figure 13:</b> La mutation I1721L ne modifie pas les cinétiques mais déplace légèrement la dépendance en voltage de l'inactivation du canal $Ca_v2.3$ .....	41
<b>Figure 14:</b> Les résidus ayant des effets au niveau du volume et de la polarité modifient les cinétiques et la dépendance en voltage du canal $Ca_v2.3$ .....	43

<b>Figure 15:</b> Les résidus chargés modifient les cinétiques et la dépendance en voltage du canal Ca <sub>v</sub> 2.3.....	47
<b>Figure 16:</b> Les mutations I1721G et I1721P modifient les cinétiques et la dépendance en voltage de l'inactivation du canal Ca <sub>v</sub> 2.3 .....	50
<b>Figure 17:</b> Les résidus du motif hydrophobe VAVIM modifient les cinétiques et la dépendance en voltage de l'inactivation du canal CaV2.3 .....	56
<b>Figure 18:</b> Les résidus du motif hydrophobe VAVIM exprimés en absence de la sous-unité CaVβ3 .....	57
<b>Figure 19:</b> Les résidus du motif hydrophobe VAVIM modifient les potentiels de mi-activation et de mi-inactivation du canal CaV2.3.....	59
<b>Figure 20:</b> Le segment IVS6 des canaux calciques activés par la dépolarisation .....	69

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>Å</b>	Angstrom
<b>Ω</b>	Ohm
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	concentration du calcium cytoplasmique
<b>A</b>	acide aminé alanine
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AID</b>	« alpha interaction domain » (domaine d'interaction alpha)
<b>AMPA</b>	« α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid »
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>BID</b>	« beta interaction domain » (domaine d'interaction beta)
<b>Boucle I-II</b>	boucle cytoplasmique reliant les domaines I et II de la sous-unité Ca <sub>v</sub> α1
<b>C-terminal</b>	« carboxy-terminal »
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	ion calcium
<b>CaM</b>	calmoduline
<b>Ca<sub>v</sub></b>	canal calcique voltage dépendant
<b>CB</b>	« Calmodulin Binding » (liant la calmoduline)
<b>CEEE</b>	canal chimère formé de Ca <sub>v</sub> 1.2 et Ca <sub>v</sub> 2.3 (domaine I de la sous-unité α1 du canal Ca <sub>v</sub> 1.2)
<b>Cl<sup>-</sup></b>	ion chlore
<b>E</b>	acide aminé glutamate
<b>E<sub>0.5</sub></b>	potentiel de mi-activation ou de mi-inactivation
<b>EA-2</b>	ataxie épisodique de type 2
<b>EGTA</b>	acide éthylène glycol tétraacétique
<b>G</b>	acide aminé glycine
<b>GK</b>	guanylate kinase
<b>H</b>	acide aminé histidine

<b>H<sub>2</sub>O</b>	eau
<b>HEPES</b>	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthane sulfonique
<b>HVA</b>	« high voltage activated » (activé par les potentiels élevés)
<b>HypoPP1</b>	paralysie périodique hypokaliémique
<b>Hz</b>	Hertz
<b>I</b>	acide aminé isoleucine
<b>IC<sub>50</sub></b>	concentration qui produit 50% d'inhibition
<b>IFM</b>	acides aminés hydrophobes isoleucine, phénylalanine, méthionine de la boucle cytoplasmique reliant les domaines III et IV
<b>Ins1,4,5 P<sub>3</sub></b>	inositol-1,4,5-trisphosphate
<b>K<sup>+</sup></b>	ion potassium
<b>kDa</b>	kilodaltons
<b>L</b>	acide aminé leucine
<b>L-type</b>	courant calcique de type L
<b>LVA</b>	« low voltage activated »
<b>M</b>	acide aminé méthionine
<b>M</b>	molaire
<b>MAGUK</b>	« membrane-associated guanylate kinase » (guanylate kinase associé à la membrane)
<b>MeS</b>	acide méthanesulfonique
<b>min</b>	minute
<b>MHF1</b>	migraine hémiplegique familiale de type 1
<b>MTSET</b>	« [2-(triméthylammonium)éthyl]méthanesulfonate bromide »
<b>Na<sup>+</sup></b>	ion sodium
<b>nM</b>	nanomolaire
<b>N-terminal</b>	amino-terminal
<b>N-type</b>	courant calcique de type N
<b>PCR</b>	« polymerase chain reaction »
<b>pH</b>	$-\log[H^+]$
<b>PLC</b>	phospholipase C

<b>PtdIns(4,5)P<sub>2</sub></b>	phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate
<b>Q-type</b>	courant calcique de type Q
<b>R</b>	acide aminé arginine
<b>R-type</b>	courant calcique de type R
<b>R50</b>	fraction du courant restant à la fin d'un pulse de 50 ms
<b>ROC</b>	« receptor-operated channel » (canal activé par un récepteur)
<b>RyR</b>	récepteur à la ryanodine
<b>SCAM</b>	« substituted cystein accessibility method » (méthode d'accessibilité des cystéines substituées)
<b>SCA6</b>	ataxie spino-cérébelleuse de type 6
<b>SH3</b>	« Src homology 3 » (domaine d'interaction de la sous-unité Cavβ3)
<b>SOC</b>	« stock-operated channel » (canal activé par les réserves)
<b>T</b>	acide aminé thréonine
<b>T-type</b>	courant calcique de type T
<b>V</b>	acide aminé valine
<b>VDCC</b>	« voltage dependant calcium channel » (canal calcique activé par la dépolarisation)



## **REMERCIEMENTS**

Je voudrais commencer par remercier le Dr Lucie Parent de m'avoir reçue dans son laboratoire. Ses conseils pertinents, sa grande disponibilité et son dynamisme ont grandement contribué à la réalisation de ce travail de recherche.

J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire, Özlem Topalak pour son aide au début de ma maîtrise, Yolaine Dodier et Alexandra Raybaud.

Merci à tous les membres du GÉPROM et plus particulièrement au Dr Umberto Bandarelli pour sa grande disponibilité lors de mes nombreuses questions au sujet de l'électrophysiologie. Un grand merci à Zeinab Daher pour son amitié et sa présence dans les moments difficiles.

Merci au personnel du département de physiologie et merci surtout à Mme Joanne Payette.

Une profonde pensée pour ma mère, mon père et ainsi que pour ma soeur. Avec leur amour et leurs encouragements, j'ai pu garder confiance et persévérer dans mes études. Merci à tous de si bien m'entourer.

Je tiens surtout à remercier mon mari, Nazmi, qui a dû supporter mes humeurs tout au long de mes études. Merci encore pour ton soutien et pour ton dévouement continu à rendre ma vie plus agréable.

Finalement, je remercie le Dr Jean-Louis Schwartz et le Dr Nicole Leclerc qui ont accepté de juger ce travail.

*Je dédie ce mémoire à mes parents, à mon mari  
Nazmi et ainsi qu'à ma petite fille  
qui grandit en moi, mon inspiration  
tout au long de cette rédaction*

## I. INTRODUCTION

### **I.1 L'homéostasie calcique intracellulaire**

L'ion calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est l'agent de signalisation cellulaire le plus versatile et universel du corps humain. En effet, le calcium joue un rôle de second messenger intracellulaire dans une grande variété de fonctions cellulaires comme la contraction, la transcription des gènes, la sécrétion hormonale, la libération de neurotransmetteurs, l'activité rythmique cardiaque et l'activation de nombreuses enzymes (Klugbauer et al., 2003).

En conditions de repos, la concentration de calcium libre dans le cytosol est maintenue à des niveaux très faibles (0.1 à 2  $\mu\text{M}$ ) par rapport à la concentration de calcium extracellulaire (1 à 2 mM). Les mécanismes contrôlant l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme incluent les canaux calciques membranaires et les canaux calciques intracellulaires. Il existe trois catégories de canaux calciques membranaires (Berridge et al., 2003) :

- les canaux calciques activés par la dépolarisation (VDCC) : présents essentiellement dans les cellules excitables comme les neurones et les cellules musculaires. Lorsque la membrane est à son potentiel de repos, ces canaux sont fermés; sous l'effet d'une dépolarisation, ils s'ouvrent et le calcium entre dans la cellule suivant le gradient électrochimique.
- Les canaux calciques « receptor-operated » (ROC) : présents surtout au niveau des neurones et des cellules musculaires lisses. Ils sont activés en réponse aux neurotransmetteurs.
- Les canaux calciques « stock-operated » (SOC) : sont abondants dans les cellules non excitables. Ils s'ouvrent lorsque les réserves internes du réticulum endoplasmique sont épuisées en  $\text{Ca}^{2+}$ .

Les principales réserves internes sont constituées du réticulum endo- ou sarcoplasmique et des mitochondries. Au niveau du réticulum endo- ou sarcoplasmique, le  $\text{Ca}^{2+}$  est libéré via l'activation de deux familles de canaux : les récepteurs canaux de la ryanodine (RyR), et les récepteurs canaux de l'inositol-1, 4, 5-triphosphate ( $\text{Ins}1,4,5\text{-P}_3$ ) permettant le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans toutes les cellules. En réponse à l'action de différents agents (neurotransmetteurs, hormones), la phospholipase C (PLC) catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4, 5 biphosphate ( $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ) en diacylglycérol et en  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  qui activera ses récepteurs au niveau du réticulum endoplasmique et entraînera le relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  (Baritt, 1999). Le rôle des mitochondries dans l'homéostasie calcique est moins bien connu. Mais ces dernières années, des études ont démontré que les mitochondries sont capables de capter du  $\text{Ca}^{2+}$  durant les signaux calciques évoqués par les agonistes extracellulaires et qu'elles sont capables également de libérer ce  $\text{Ca}^{2+}$  de façon lente et continue (Pozzan et al., 2000).

L'homéostasie calcique est définie comme le maintien de la concentration en calcium cytoplasmique  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  à son niveau basal. Pour survivre, la cellule doit donc être aussi équipée de systèmes permettant l'expulsion rapide du  $\text{Ca}^{2+}$  vers l'extérieur, car une trop grande augmentation du calcium libre est toxique pour la cellule et entraîne la mort cellulaire. Il existe plusieurs systèmes responsables de l'expulsion du  $\text{Ca}^{2+}$  hors de la cellule. Les principaux sont : les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et les pompes calcium-ATPases (Blaustein et al., 2002).

L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  est un mécanisme d'expulsion du  $\text{Ca}^{2+}$  particulièrement bien développé dans les cellules excitables comme les cellules cardiaques, les cellules musculaires, les neurones, et les cellules  $\beta$  pancréatiques (Van Eyle, 1997). Le gradient de concentration des ions  $\text{Na}^+$  de part et d'autre de la membrane plasmique, en association avec le potentiel membranaire, constituent la force motrice pour le transport du  $\text{Ca}^{2+}$ .

C'est l'entrée de  $\text{Na}^+$  dans la cellule selon un gradient électrochimique favorable, qui fournit l'énergie au transport du  $\text{Ca}^{2+}$  vers l'extérieur de la cellule.

Les pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sont localisées aussi bien sur la membrane plasmique que sur la membrane du réticulum. Elles appartiennent à la famille des ATPases de type P, assurant le transport d'ions. Le transport est actif, utilisant l'énergie sous forme d'ATP pour permettre l'expulsion du  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme contre son gradient électrochimique.

## **1.2 Les canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire**

Sur la base de leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques, les différents types de canaux calciques voltage-dépendants peuvent être classés en deux catégories selon leur seuil d'activation : les canaux LVA («low voltage activated») dit de bas seuil et les canaux HVA («high voltage activated») dit de haut seuil (Davila, 1999). Dans les conditions physiologiques, leur sélectivité relative pour le calcium par rapport aux cations monovalents est très grande, avec des rapports de perméabilité  $> 1000$  ( $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ ). Mais en absence de calcium, ou à faible concentration, les canaux calciques laissent passer des ions monovalents (Jones, 1998).

### **1.2.1 Les canaux de type LVA**

Les courants calciques de type T («transient») des canaux LVA ont pour la première fois été découverts dans les neurones du ganglion dorsal et dans les myocytes cardiaques. Les canaux LVA sont activés par de faibles dépolarisations (-70 mV) et leur inactivation est très rapide (20-60 ms). Ils sont inhibés par le nickel ( $\text{IC}_{50} = 4 \mu\text{M}$ ) et le kurtoxine ( $\text{IC}_{50} = 350 \text{ nM}$ ) (Sidach et Mintz, 2002 ; Nikonenko et al., 2005). Le Nickel est un métal divalent

inorganique, possédant une flexibilité géométrique dans les solutés aqueux qui leur permet des liaisons stables avec de nombreux résidus d'acides aminés. Ceci permettrait aux ions  $\text{Ni}^{2+}$  de s'introduire dans le site de liaison du canal (McFarlane et Gilly, 1998). Le Kurtoxine est un peptide de 63 résidus purifié du venin du scorpion *Parabuthus transvaalicus*, qui en se liant sur la boucle S3-S4 du domaine IV modifie préférentiellement le « gating » des canaux neuronaux. Sa sélectivité envers le canal calcique de type T n'est pas absolue, puisque les canaux sodiques sont également inhibés par le kurtoxine. Le mibéfradil est aussi un inhibiteur des canaux de type T ( $\text{IC}_{50} \sim 100\text{nM}$ ). C'est un dérivé tétralol de 568,56 Da, indiqué dans le traitement de l'hypertension et de l'angine grâce à une vasodilatation périphérique, une légère diminution de la fréquence cardiaque et une vasodilatation sélective des coronaires (Mishra et Hermsmeyer, 1994). Cependant, à des concentrations de l'ordre du micromolaire, il inhibe aussi les canaux de type HVA (Jimenez et al., 2000 ; Bernatchez et al., 2001)

### **1.2.2 Les canaux de type HVA**

Les canaux de la famille HVA sont activés par des dépolarisations élevées (seuil à -30 ou -20 mV) et engendrent des courants qui s'inactivent généralement plus lentement. Ce sont des canaux à haut seuil. Il existe différents types de canaux calciques HVA classés: L, N, P, Q et R.

De tous les canaux calciques activés par la dépolarisation, les canaux de type L (« long lasting ») sont ceux qui sont les mieux caractérisés. Le rôle essentiel de ces canaux est le couplage excitation-contraction des cellules squelettiques, cardiaques, et des cellules du muscle lisse, mais ces canaux sont également exprimés au niveau des neurones et des cellules endocrines où ils participent à des processus cellulaires comme la relâche de neurotransmetteurs et d'hormones, la transcription de gènes et participent à l'activation d'autres canaux ioniques (Lipscombe et al., 2004). Du point de

vue pharmacologique, les canaux de type L sont caractérisés par leur sensibilité aux dihydropyridines (DHP), des composés organiques comprenant des antagonistes comme la nifédipine et des agonistes comme le BayK 8644 ( $EC_{50} = 17.3 \text{ nM}$ ) (Zhorov et al., 2001). La Nifédipine est une molécule de 346,3 Da, prescrite dans le traitement de l'hypertension artérielle et de l'angine de poitrine. Suite à l'inhibition du flux calcique par la nifédipine, il y a un relâchement de la contraction du muscle cardiaque ou du muscle lisse vasculaire. Le BayK 8644 est une molécule de 356,3 Da, contribue à l'entrée du flux calcique suite à son effet sur le prolongement d'ouverture du canal. Contrairement à la nifédipine, le BayK 8644 a la propriété de stimuler la contraction du muscle cardiaque ou du muscle lisse et au niveau de la membrane présynaptique, il est responsable de la relâche de neurotransmetteurs (Zhorov et al., 2001). Les canaux de type L sont également inhibés par des toxines comme la calcicludine ( $IC_{50} = 200 \text{ pM}$ ) et la calciseptine ( $IC_{50} = 2 \text{ }\mu\text{M}$ ). La Calcicludine est purifiée du venin du serpent *Dendroaspis angusticeps*, composée de 60 acides aminés avec six résidus cystéines formant trois ponts disulfures. Elle inhibe les canaux d'une variété de cellules excitables en obstruant le pore, avec une plus haute affinité pour les canaux des cellules granulaires du cortex cérébelleux. La Calciseptine est le venin du serpent *Dendroaspis p.polylepsis*, composée de 60 résidus avec 8 cystéines formant 4 ponts disulfures. C'est un relaxant du muscle lisse et un inhibiteur des contractions cardiaques (Schweitz et al., 1994; Garcia et al., 2001).

Dans de nombreux neurones, l'influx de calcium par les canaux de type N contrôle la libération de neurotransmetteurs. Ces canaux sont insensibles aux dihydropyridines mais sont inhibés par la  $\omega$ -conotoxine ( $\omega$ -CgTx)-GVIA ( $IC_{50} = 10 \text{ }\mu\text{m}$ ), une toxine basique isolée du venin du cône marin *Conus geographus*, composée de 27 acides aminés avec six résidus cystéines formant trois ponts disulfures. La toxine, par l'intermédiaire du résidu lysine à la position 2 obstrue physiquement le pore du canal en se

liant sur la région S5-S6 du domaine III (Mori et al., 2002). Les courants calciques de type N peuvent se distinguer par leur dépendance en voltage intermédiaire (-20 mV) et une inactivation plus rapide (50-80 ms) que le canal de type L (>500 ms) mais plus lente que les canaux de la famille LVA (20-60 ms) (détails plus bas) (Caterall, 2000).

À l'origine, les canaux de type P et de type Q ont été localisés respectivement dans les cellules de Purkinje et les cellules granulaires du cervelet, mais aujourd'hui ces canaux ont été identifiés dans la plupart des neurones centraux (Llinas et al., 1989 ; Randal et Tsien, 1995). Leur localisation au niveau des terminaisons nerveuses leur permet de contrôler la relâche de neurotransmetteurs. Ces deux types de canaux sont générés à partir du même gène par épissage alternatif. Les courants de type P sont identifiés par leur inhibition à de faibles concentrations ( $IC_{50} \sim 2$  nM) de la toxine  $\omega$ -agatoxine IVA et sont inactivés lentement (> 500 ms), tandis que les courants de type Q sont sensibles à des concentrations plus élevées ( $IC_{50} \sim 100$  nM) de la toxine  $\omega$ -agatoxine IVA et leur taux d'inactivation est plus rapide ( $\sim 100$  ms). La toxine  $\omega$ -Agatoxine IVA est le venin de l'araignée *Agelenopsis aperta* qui est composée de 48 résidus avec huit résidus cystéines formant quatre ponts disulfures. La structure de la toxine révèle la présence de trois résidus arginine aux positions 21, 23 et 39 qui seraient importants pour la liaison de la toxine au Glu1658 situé dans les segments S3-S4 du domaine IV pour modifier les propriétés de « gating » du canal (Mintz et al., 1992 ; Wheeler et al., 1994 et Waterman et al., 1999).

Les courants calciques de type R, pour « resistant HVA calcium current », sont résistants aux inhibiteurs des canaux de type L, N et P/Q mais sensibles à la toxine SNX-482 ( $IC_{50} = 30$  nM) isolée du venin de la tarantule *Hysteroocrates gigas*. C'est une molécule de 4495,07 Da, composée de 41 résidus, en majorité hydrophobes, avec six cystéines formant trois ponts disulfures. La toxine se lie aux régions S3-S4 des



domaines III et IV pour inhiber le « gating » d'activation des canaux (Bourinet et al., 2001). L'inactivation des canaux R se produit plus rapidement que celle des canaux de type N et P/Q mais plus lentement que celle des canaux de la famille LVA. Ils sont présents au niveau des terminaisons nerveuses et jouent un rôle dans la libération de neurotransmetteurs, quoique moindre que celui des canaux de type N et P/Q (Tottene et al., 2000 ; Trimmer et Rhodes, 2004 et Kamp et al, 2005 ).

Activation	Type de courant	Cinétiques d'inactivation	Sensibilité pharmacologique (Inhibiteurs de synthèse)	Sensibilité à des toxines
LVA	type T	rapide	Mibefradil Amiloride Dihydropyridine (+/-)	Kurtoxine
HVA	type L	lente	Dihydropyridine Benzothiazepines Phénylalkylamines	Calcicludine Calciseptine
HVA	type N	lente		$\omega$ -conotoxine-GVIA ++ $\omega$ -conotoxine-MVIIC +
HVA	type P/Q	lente		$\omega$ -agatoxine-IVA ++ $\omega$ -conotoxine-MVIIC +
HVA	type R	rapide		SNX-482

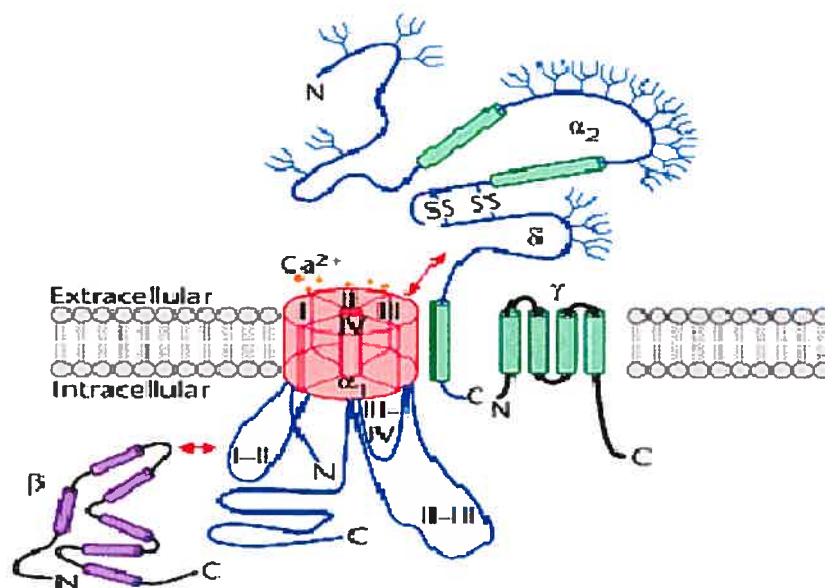
**Tableau I : Familles de canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire.**

Ils sont classés selon leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques : les canaux calciques de type T sont des canaux "bas

seuil ” (« low voltage activated »), activés par de faibles dépolarisations membranaires, alors que des dépolarisation plus fortes sont nécessaires pour activer les canaux de type HVA (« high voltage activated »).

### I.3 Structure des canaux calciques activés par la dépolarisation

La majorité des canaux calciques sont composés de plusieurs protéines (sous-unités) formant un complexe hétéroooligomérique qui traverse la membrane plasmique (Figure1). Alors que les sous-unités  $Ca_v\alpha_1$  (formant le pore) déterminent le type de courant produit, les sous-unités accessoires jouent un rôle important dans la modulation de chaque type de courant calcique voltage-dépendant. Il existe trois sous-unités accessoires : la sous-unité  $Ca_v\alpha_2\delta$ , constituée de deux protéines, un membranaire et l'autre extracellulaire, liés par des pont disulfures et codés par le même gène, la sous-unité  $Ca_v\beta$ , cytosolique, et la sous-unité  $Ca_v\gamma$ , membranaire.



**Figure 1 : Organisation structurale des cinq sous-unités constituant les canaux calciques activés par la dépolarisation.**

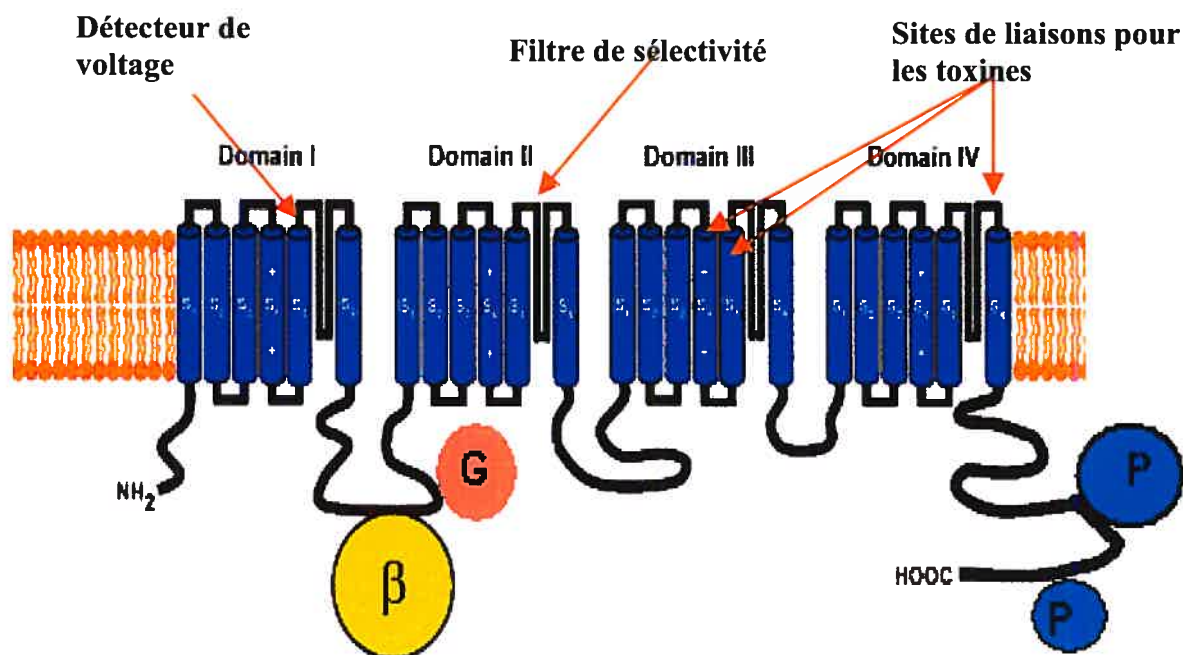
Les sous unités  $Ca_v\alpha 1$ ,  $Ca_v\alpha 2/\delta$  et  $Ca_v\gamma$  sont transmembranaires alors que la sous-unité  $Ca_v\beta$  est cytoplasmique. Les flèches indiquent des sites d'interaction entre les sous-unités. Le site d'interaction entre la sous-unité  $Ca_v\alpha 1$  et  $Ca_v\gamma$  n'est pas encore déterminé (Modifié de Walker et De Waard, 1998).

---

### 1.3.1 La sous-unité $Ca_v\alpha 1$

La sous-unité  $Ca_v\alpha 1$  est la sous-unité principale et la plus volumineuse avec un poids moléculaire de 170-250 kDa. Elle est formée de quatre domaines homologues (I-IV) eux même organisés en six (S1-S6) hélices  $\alpha$  transmembranaires, qui sont reliées par des boucles intracellulaires et extracellulaires (Doering et Zamponi, 2003) (Figure 2). Le pore de conduction, la sélectivité aux ions  $Ca^{2+}$ , le détecteur de voltage, les sites de régulation des sous-unités  $G\beta\gamma$  des protéines G, des seconds messagers, des drogues, et des toxines sont situés au niveau de cette sous-unité. Le quatrième segment (S4) transmembranaire de chaque domaine contient, au sein d'une région hautement hydrophobe, plusieurs résidus chargés positivement. Le segment S4 constitue le détecteur de voltage pour l'activation. En réponse à une dépolarisation de la membrane, les résidus chargés positivement se déplacent, induisant un changement de conformation de la protéine ce qui permet l'ouverture du pore (Kim et al., 1993). Les quatre boucles entre les différents segments S5 et S6 forment le pore du canal. Dans les canaux HVA, la sélectivité du canal pour le calcium repose sur la présence dans ce pore d'un anneau de quatre résidus glutamate EEEE (un par domaine) chargés négativement qui projettent leurs groupement carboxyles dans la lumière du pore (Yang et al., 1993 ; Parent et Gopalakrishnan, 1995 ; Seifert et al., 1999, Wu et al., 2000). Le modèle de diffusion des ions prédisait que le passage du calcium à travers le canal était défini par la présence de deux sites de liaison au calcium de haute affinité

dans le pore. Ainsi, à faible concentration, un seul des deux sites est occupé, et le calcium est retenu. À forte concentration, les deux sites sont occupés : il y a répulsion électrostatique, ce qui réduit le temps de liaison des ions, et produit un flux calcique (Almers et McCleskey, 1984; Hess et Tsien, 1984). Toutefois, des études mutationnelles du locus EEEE ont montré que la simple mutation d'un glutamate par une lysine abolissait complètement l'état où le canal est imperméable à tout cation. Cette observation indique qu'il n'y a pas de site de haute affinité pour le calcium autre que celui défini par les quatre glutamates (Yang et coll., 1993; Ellinor et coll., 1995). Dans les canaux LVA, la sélectivité est déterminée par le locus EEDD où deux glutamates sont substitués par deux aspartates (Talavera et al., 2001).



**Figure 2: Structure secondaire prédite de la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$  des canaux calciques activés par le potentiel.**

La sous-unité  $Ca_v\alpha_1$  est composée de quatre domaines homologues formant le pore du canal. Chaque domaine est composé de six segments

transmembranaires (S1-S6). Le filtre de sélectivité du canal se trouve au niveau des boucles S5 et S6 de chaque domaine. Le segment transmembranaire S4 contient une série de résidus chargés positivement qui forme le détecteur de voltage du canal. La sous-unité  $Ca_v\beta$  interagit avec le domaine AID situé dans la boucle I-II par l'intermédiaire de son domaine guanylate kinase. Les sites d'interactions avec la protéine G, les sites de phosphorylation et les sites de liaisons pour les toxines sont également montrés sur le schéma (Modifié de Jones, 2002 ; Stotz et Zamponi, 2001).

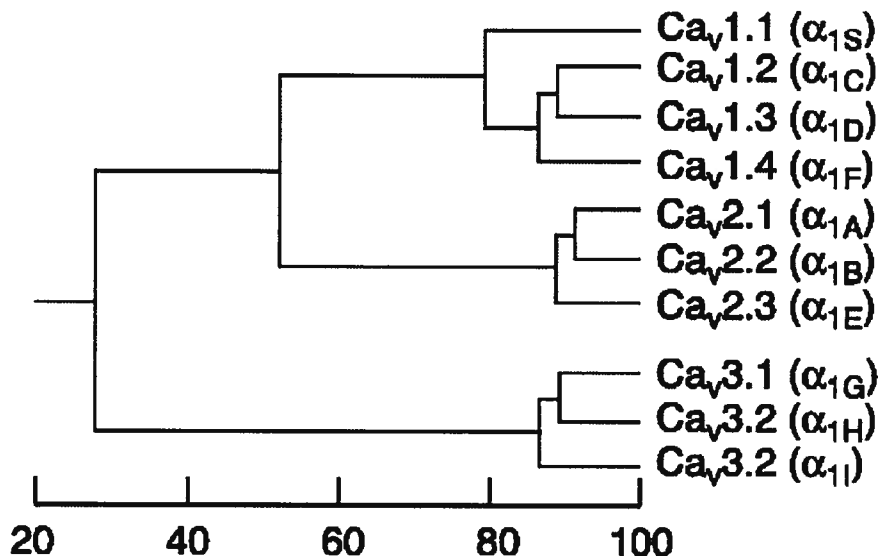
---

### **I.3.2 Diversité moléculaire**

Des études de clonage moléculaire et d'expression fonctionnelle ont pu identifier jusqu'à dix gènes codant la sous-unité principale  $Ca_v\alpha 1$ . Chaque sous-unité  $Ca_v\alpha 1$  présente des propriétés fonctionnelles distinctes mais également une expression tissulaire précise (Tableau II). Ces différentes sous-unités sont regroupées en trois familles phylogénétiquement distinctes :  $Ca_v 1$ ,  $Ca_v 2$  et  $Ca_v 3$ . Ce système de nomenclature est basé sur le symbole chimique de l'ion calcium (Ca) et sur le voltage (V) qui est le régulateur physiologique. La famille  $Ca_v 1$  comprend les canaux à haut seuil d'activation de type L pour lesquels les produits de quatre gènes ont été identifiés: les sous-unités  $Ca_v\alpha 1C$ ,  $Ca_v\alpha 1D$ ,  $Ca_v\alpha 1S$  et  $Ca_v\alpha 1F$ . La deuxième famille,  $Ca_v 2$ , est composée par les sous-unités  $Ca_v\alpha 1A$ ,  $Ca_v\alpha 1B$ , et  $Ca_v\alpha 1E$  qui codent respectivement pour les canaux à haut seuil d'activation de type P et Q, de type N et de type R. Finalement, la famille  $Ca_v 3$  correspond aux canaux calciques à bas seuil d'activation de type T. Les trois sous-unités codant pour les canaux de type T sont  $Ca_v\alpha 1G$ ,  $Ca_v\alpha 1H$ , et  $Ca_v\alpha 1I$  (Tableau II). L'homologie de séquence des sous-unités  $Ca_v\alpha 1$  est identique à 70 % entre les sous-unités d'une même famille, mais elle est souvent inférieure à 50 % entre différentes familles (Figure 3) (Caterall et al., 2003)

Protéine	Gène	Poids moléculaire (kDa)	Localisation tissulaire	Courant calcique
Ca <sub>v</sub> 1.1 (α1S)	CACNA1S	212	Muscle squelettique	Type L
Ca <sub>v</sub> 1.2 (α1C)	CACNA1C	240	Cœur, muscle lisse, cerveau	Type L
Ca <sub>v</sub> 1.3 (α1D)	CACNA1D	187	Cerveau, pancréas, rein, ovaire	Type L
Ca <sub>v</sub> 1.4 (α1F)	CACNA1F	222	Rétine	Type L
Ca <sub>v</sub> 2.1 (α1A)	CACNA1A	257	Cerveau/cervelet	Type P/Q
Ca <sub>v</sub> 2.2 (α1B)	CACNA1B	262	Cerveau	Type N
Ca <sub>v</sub> 2.3 (α1E)	CACNA1E	252	Cerveau	Type R
Ca <sub>v</sub> 3.1 (α1G)	CACNA1G	250	Cerveau, ovaire, muscle lisse	Type T
Ca <sub>v</sub> 3.2 (α1H)	CACNA1H	261	Cerveau, rein, Cœur, foie	Type T
Ca <sub>v</sub> 3.3 (α1I)	CACNA1I	224	Cerveau	Type T

**Tableau II : Classification moléculaire et localisation tissulaire des dix gènes codant pour les canaux calciques activés par la dépolarisation**  
(Lehman-Horn et Jurkat-Rott, 1999)



**Figure 3: Homologie de séquence primaire des canaux calciques activés par la dépolarisation.**

La composition en acides aminés des segments transmembranaires et des boucles S5-S6, présente une homologie de 52% entre la famille Ca<sub>v</sub>1 et Ca<sub>v</sub>2, de 28% Ca<sub>v</sub>3 et Ca<sub>v</sub>1, alors qu'elle est d'au moins 70% entre différentes isoformes de chaque famille (Caterall et al, 2003).

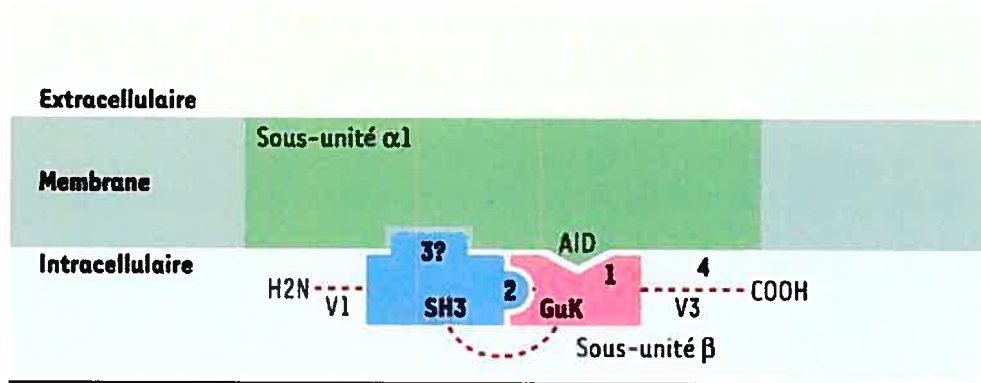
### **I.3.3 La sous-unité Ca<sub>v</sub>β**

Les sous-unités Ca<sub>v</sub>β sont des protéines intracellulaires ayant un poids de 50-78 kDa. L'ensemble des sous-unités Ca<sub>v</sub>β provient de quatre gènes (β1, β2a, β3 et β4) et de nombreuses isoformes sont générées par épissage différentiel. Elles sont composées de deux régions conservées, C1 et C2, de 130 et de 150 acides aminés respectivement, entourées de trois régions variables V1, V2 et V3, qui influencent la localisation de la sous-unité et sont des cibles pour les modifications post-transcriptionnelles (Rousset et al, 2005). La liaison entre la sous-unité Ca<sub>v</sub>α1 des canaux calciques HVA et la sous-unité Ca<sub>v</sub>β conduit à un ensemble de régulation telles que

l'adressage à la membrane plasmique du canal et la régulation de propriétés biophysiques (les cinétiques et la dépendance en voltage de l'activation et de l'inactivation) (Richards et Dolphin, 2004). Les différentes sous-unités  $Ca_v\beta$  peuvent avoir des effets distincts sur le processus d'inactivation des canaux. Ainsi, les cinétiques d'inactivation sont plus rapides avec la sous-unité  $Ca_v\beta 3$  et plus lentes avec  $Ca_v\beta 2a$  ( $Ca_v\beta 3 > Ca_v\beta 1 > Ca_v\beta 4 >> Ca_v\beta 2a$ ) (Sather et al., 1993 ; Parent et al., 1997). Le ralentissement des cinétiques est particulièrement important avec la sous-unité  $Ca_v\beta 2a$ , qui est ancrée à la membrane plasmique suite à une palmitoylation du côté amino-terminal d'une paire de résidus cystéines aux positions trois et quatre (Chien et al., 1996 ; Qin et al., 1998; Restuito et al., 2000; Dafi et al, 2004).

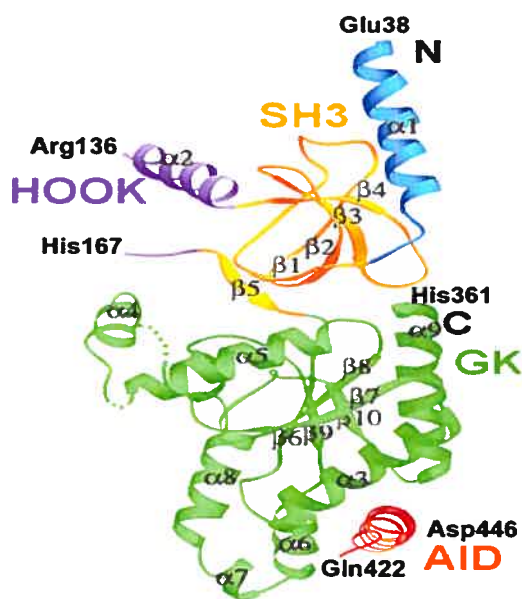
La sous-unité  $Ca_v\beta$  est reliée à la sous-unité principale  $Ca_v\alpha 1$  essentiellement au niveau de la boucle intracellulaire I-II par l'intermédiaire du domaine AID (« Alpha Interaction Domain ») de 18 acides aminés conservés dans tous les canaux de type HVA (Pragnell et al., 1994). Le site de liaison de la sous-unité  $Ca_v\beta$  équivalent au domaine AID, élucidé très récemment par des études de cristallisation, place cette sous-unité dans la famille des protéines MAGUK. En effet, la structure de la sous-unité  $Ca_v\beta$  démontre deux domaines d'interactions: un domaine SH3 situé dans la région C1 et un autre domaine GK (guanylate kinase) au niveau du domaine C2 (Figure 4) (McGee et al, 2004). L'interaction de ces deux domaines, permet la liaison de la sous-unité  $Ca_v\beta$  au domaine AID via des résidus hydrophobes du domaine GK en formant une hélice amphiphatique (Figure 5) (Chen et al, 2004). La localisation du domaine BID au niveau des domaines SH3 et GK révélée par la structure cristalline, ne semblerait pas avoir de rôle direct dans l'interaction avec le domaine AID, contrairement à ce qui avait été proposé (De Waard et al., 1994). Ce domaine, semble plutôt renforcer l'interaction des domaines SHK et GK, ce qui permettrait la liaison de la sous-unité  $Ca_v\beta$  au domaine AID (Opatowsky et al., 2004; Van Petegem et al., 2004).





**Figure 4 : Schéma représentant l'interaction entre  $Ca_v\alpha_1$  et  $Ca_v\beta$ .**

L'interaction entre le domaine SH3 et GK, permet la liaison de la sous-unité  $Ca_v\beta$ , par le domaine GK, au domaine AID de la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$ . Une liaison par le domaine SH3 a aussi été suggérée (Rousset et al., 2005).



**Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la sous unité  $Ca_v\beta$ .**

Le schéma montre la composition en feuillets  $\beta$  et en hélices  $\alpha$  des domaine SH3 et GK de la sous-unité  $Ca_v\beta$  et le domaine AID de la sous unité  $Ca_v\alpha_1$  (Chen et al., 2004).

### I.3.4 La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 2\text{-}\delta$

La sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\text{-}\delta$  est composée de deux segments reliés par un pont disulfure. Le segment extracellulaire  $\alpha 2$  (140 kDa) fortement glycosylé forme la partie N-terminale et le segment  $\delta$  (27 kDa) avec une partie extracellulaire et une autre transmembranaire, forme la partie C-terminale de la protéine (Gurnett et al., 1996). Ces deux segments, produit d'un seul gène, sont obtenus par clivage post-transcriptionnel. Il existe trois isoformes ( $\alpha 2\text{-}\delta 1$ ,  $\alpha 2\text{-}\delta 2$ ,  $\alpha 2\text{-}\delta 3$ ) de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\text{-}\delta$  et plus récemment une quatrième isoforme ( $\alpha 2\text{-}\delta 4$ ) a été identifiée (Qin et al., 2002). La distribution tissulaire de ces sous-unités est variée. L'expression de  $\alpha 2\text{-}\delta 1$  et de  $\alpha 2\text{-}\delta 2$  est ubiquitaire dans les tissus exprimant les canaux calciques activés par la dépolarisation, tandis que  $\alpha 2\text{-}\delta 3$  est exprimé principalement au niveau des neurones et  $\alpha 2\text{-}\delta 4$  dans les cellules endocrines (Klugbauer et al., 2003; Qin et al., 2002).

L'interaction entre la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\text{-}\delta$  et  $\text{Ca}_v\alpha 1$  semble être entièrement extracellulaire. Le segment  $\alpha 2$  contiendrait les résidus responsables de la liaison alors que le segment  $\delta$ , par sa partie extracellulaire, servirait d'ancre à  $\alpha 2$ . Le site de liaison au niveau de  $\text{Ca}_v\alpha 1$  se situerait au niveau du troisième domaine transmembranaire (Arikkath et Campbell, 2003 ; Gurnett et al., 1997). Le rôle précis que pourrait jouer  $\text{Ca}_v\alpha 2\text{-}\delta$  est moins bien établi que celui de la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta$ , mais elle semble contribuer au ciblage à la membrane de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 1$ , et pourrait accélérer les cinétiques et la dépendance en voltage de l'activation et de l'inactivation lorsqu'elle est co-exprimée avec la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta$  (Klugbauer et al., 1999).

### 1.3.5 La sous-unité $Ca_{V\gamma}$

La sous-unité  $Ca_{V\gamma}$  a un poids moléculaire de 32 kDa et contient 222 résidus. Sa structure comporte quatre segments hydrophobes transmembranaires avec le N- et le C- terminal intracellulaires. Huit allèles codant pour  $Ca_{V\gamma}$  ont été identifiés ( $Ca_{V\gamma}1$ - $Ca_{V\gamma}8$ ) (Black, 2003). La première isoforme identifiée  $Ca_{V\gamma}1$  est uniquement exprimée dans le muscle squelettique où elle aurait un rôle à jouer dans l'inhibition du courant calcique de type L. En effet, dans les myotubes en culture de souris dépourvus de la sous-unité  $Ca_{V\gamma}1$ , la densité de courant est supérieure à celles des souris témoins. De même, l'inactivation produite par de longues dépolarisations est ralentie, et la dépendance en voltage de la courbe d'inactivation du courant est déplacée vers des potentiels plus positifs (Ahern et al., 2001). Des études avec des souris *stargazer* présentant le phénotype épileptique de type absence, ont permis l'identification d'une sous-unité  $Ca_{V\gamma}2$  dans les neurones. Par la suite, deux autres sous-unités,  $Ca_{V\gamma}3$  et  $Ca_{V\gamma}4$ , possédant une homologie de séquence de 60% avec la sous-unité  $Ca_{V\gamma}2$ , ont aussi été identifiées au niveau des neurones. Contrairement aux sous-unités  $Ca_{V\beta}$  et  $Ca_{V\alpha}2-\delta$ ,  $Ca_{V\gamma}$  ne semble pas participer au ciblage membranaire et ne serait pas requise pour la formation du complexe hétéroooligomérique du canal. Par contre, elle participerait à la régulation de certaines propriétés biophysiques. Ainsi, des études de coexpression des trois sous-unités neuronales avec la sous-unité  $Ca_{V\alpha}1A$  ( $Ca_{V1.2}$ ), démontrent le déplacement des courbes de la dépendance en voltage de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Klugbauer et al., 2000). Les isoformes  $Ca_{V\gamma}2$ ,  $Ca_{V\gamma}3$  et  $Ca_{V\gamma}4$  sont aussi reconnues comme des protéines régulatrices d'un autre canal ionique, le récepteur transmembranaire AMPA, en participant à son ciblage et son expression à la membrane synaptique (Yamazaki et al., 2004).

## **I.4 Le « gating » des canaux calciques activés par la dépolarisation**

L'ouverture et la fermeture des canaux calciques qui sont activés par la dépolarisation impliquent des changements de conformation au niveau du détecteur de voltage et la transmission du signal dans la région du pore. Chaque protéine canal a généralement trois états conformationnels qui sont relativement stables : fermé et disponible pour l'activation (état de repos), ouvert (actif) et inactivé. Chacune de ces conformations représente un état fonctionnel différent. La transition entre les différents états conformationnels est appelée « gating ». Le « gating » implique des mécanismes de contrôle spécialisés dans chacun des états conformationnels (Hering et al., 2000 ; Jones 2003).

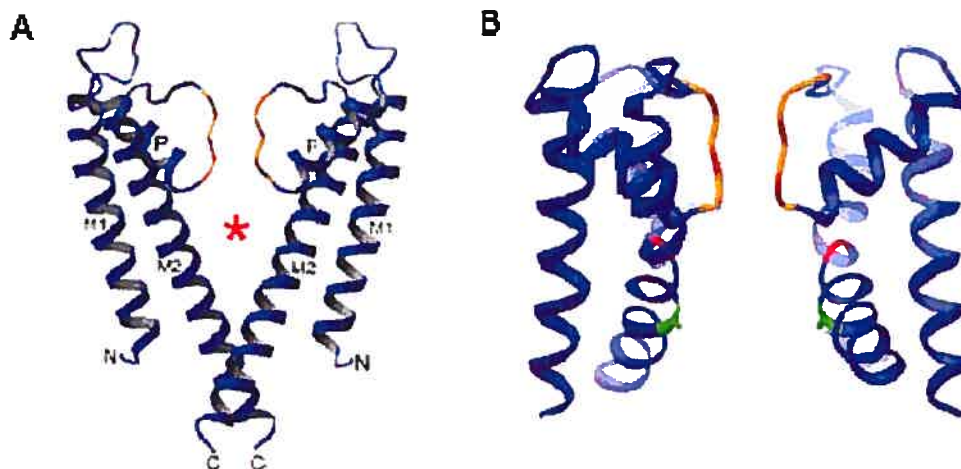
### **I.4.1 Mécanismes moléculaires d'activation des canaux calciques**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation des canaux calciques, suite à une dépolarisation de la membrane, implique le segment S4 de chacun des quatre domaines. Toutefois, le mécanisme moléculaire impliqué dans l'activation des canaux est très peu connu. L'identification par la cristallisation de la structure tridimensionnelle d'au moins deux canaux potassiques pourrait être utile dans la localisation structurale de la région (ou porte) responsable de l'activation des canaux calciques. En effet, ces structures révèlent le changement conformationnel impliquant les segments S6 situés dans le pore interne des canaux potassiques lors d'une dépolarisation de la membrane.

Le canal potassique KcsA, identifié chez la bactérie *Streptomyces Lividans*, est activé par le pH intracellulaire (Cuello et al., 1998): il est fermé à pH neutre et peut être stabilisé dans son état ouvert à pH acide. La cristallisation et la résolution de la structure tridimensionnelle du canal KcsA à l'état fermé a permis notamment d'identifier la structure de la région du

pore et d'apporter de nombreux éclaircissements sur les mécanismes qui régissent la conduction potassique. Le canal KcsA résulte de la tétramérisation de sous-unités  $\alpha$  à deux segments transmembranaires M1 et M2 structurés en hélice  $\alpha$ , homologues aux segments S5 et S6 des canaux de type *Shaker* (canal activé par la dépolarisation membranaire). Les quatre segments M2 délimitent la partie interne du pore de conduction et s'organisent à la manière d'un cône dont la partie étroite est orientée vers la face cytoplasmique de la membrane. Les segments M1 délimitent la partie externe du canal (Doyle et al, 1998).

La structure cristallographique à 3.3 Å de résolution d'un canal K<sup>+</sup> bactérien activé par le calcium, le canal MthK de *Methanobacterium thermoautotrophicum* à l'état ouvert, a été publiée par l'équipe de MacKinnon (Jiang et al, 2002a). Ce canal, comme le KcsA, se compose de deux segments transmembranaires en plus de la région du pore. La différence majeure entre la structure du KcsA et du MthK se situe au niveau des segments M2, bien droits dans le KcsA (état fermé) et courbés dans la partie inférieure chez le MthK (état ouvert) (Figure 6).



**Figure 6 : structure du canal KcsA à l'état fermé (A) et du canal MthK à l'état ouvert (B)**

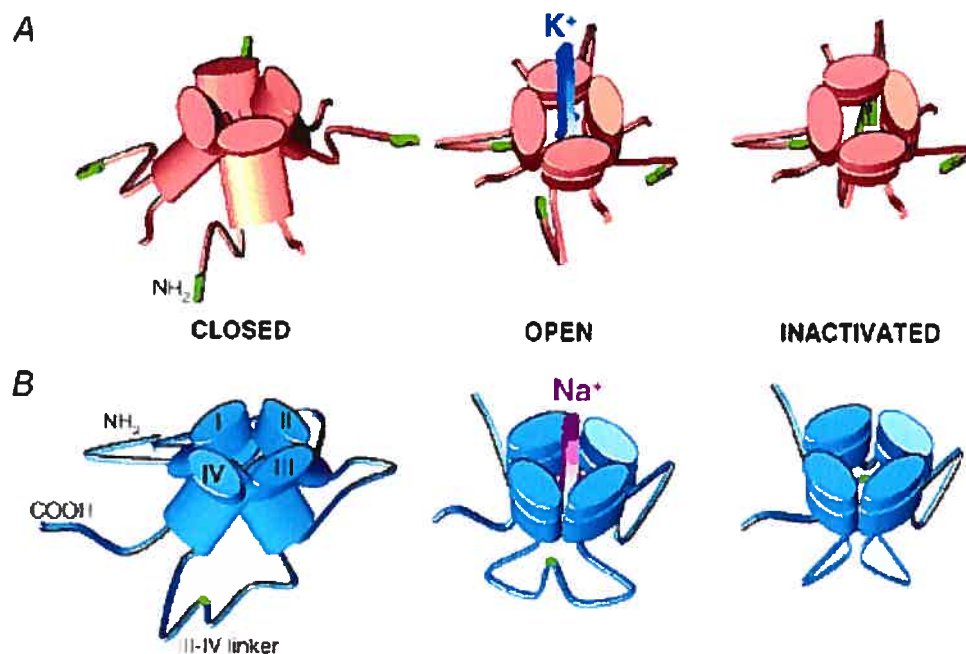
Les hélices M2 du KcsA se croisent dans la partie inférieure du pore tandis que chez le MthK, elles sont recourbées vers l'extérieur (Doyle et al., 1998 et Jiang et al, 2002)

#### **I.4.2 Mécanismes moléculaires impliqués dans l'inactivation des canaux calciques**

Le mécanisme d'inactivation des courants calciques permet de contrôler d'une façon précise l'entrée d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. L'état inactivé des canaux est déclenché en réponse à une dépolarisation prolongée de la membrane mais également suite à une élévation des concentrations du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans les canaux  $\text{Ca}_v1.2$ . L'inactivation est déterminée par la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha1$  mais les cinétiques de ce processus sont modulées par la sous-unité régulatrice  $\text{Ca}_v\beta$ .

Les différents domaines impliqués dans les mécanismes d'inactivation ont été identifiés à la fois pour les canaux sodiques et potassiques. Les premiers mécanismes d'inactivation ont d'abord été identifiés chez les

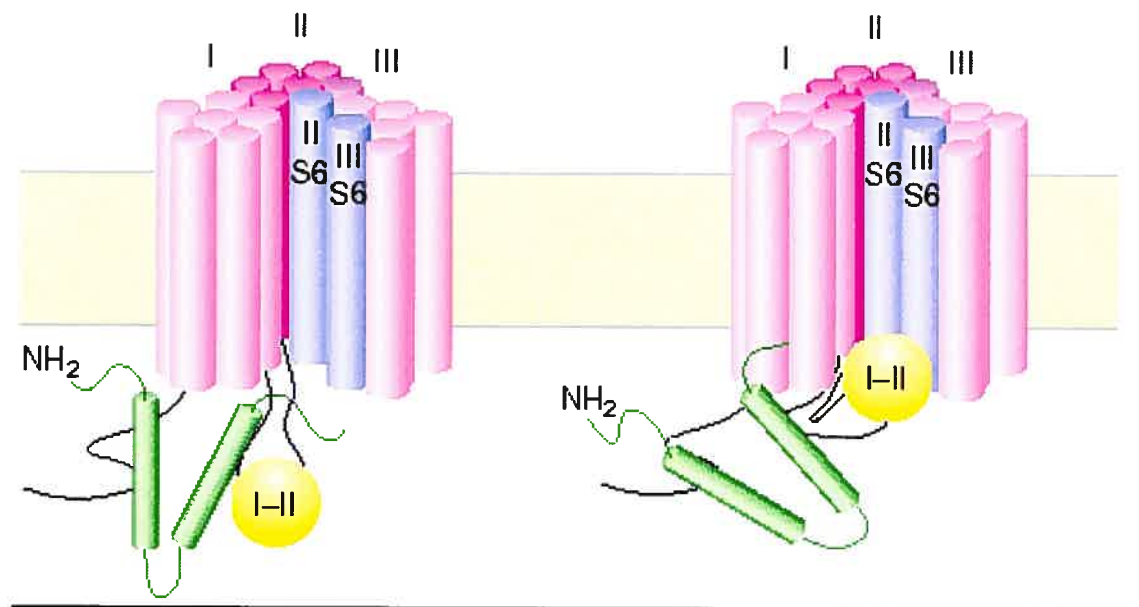
canaux potassiques de type Shaker. Le canal est inactivé par un mécanisme « ball and chain » par lequel le repliement de la particule d'inactivation (balle) formé par une région de 20 acides aminés situés au niveau du N-terminal, vient occlure le pore du canal (Figure 7a). Par ce fait, il n'y a pas de passage d'ions  $K^+$  malgré l'état ouvert du canal (Isacoff et al., 1991). Pour les canaux sodiques, l'inactivation se produit par un mécanisme semblable à celui des canaux potassiques. Un motif de trois résidus hydrophobes et polaires (IFM) se trouvant dans la boucle intracellulaire entre les domaines III et IV de la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$ , vient inactiver le canal en obstruant le pore par un mécanisme de « hinged lid » (Figure 7b) (Eaholtz et al., 1994). Par contre, le mécanisme régissant l'inactivation des canaux calciques n'est pas aussi bien établi, mais semble s'apparenter à celui des deux canaux (Figure 8).



**Figure 7: Modèle d'inactivation des canaux sodiques et potassiques activés par la dépolarisation membranaire.**

**A**, Mécanisme d'inactivation « ball and chain » des canaux potassiques. Les domaines  $NH_2$  terminaux cytosoliques forment des "balles" pouvant obstruer

l'entrée cytosolique du canal. Quatre balles, une pour chaque sous-unité  $\alpha$ , peuvent participer au mécanisme d'inactivation. **B**, Mécanisme «hinged lid» des canaux sodiques. L'inactivation se produit lors de l'occlusion du pore par le repliement de la boucle III-IV dans le vestibule interne (tirée de Stotz et al., 2004).



**Figure 8 : Modèle prédit d'inactivation des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire.**

La boucle I-II en tant que particule d'inactivation pourrait obstruer physiquement le pore du canal en se repliant sur les segments S6 des domaines II et III du canal. La sous-unité  $\text{Cav}\beta$  du canal s'associe à la boucle I-II pour réguler les propriétés d'inactivation (tirée de Stotz et Zamponi, 2001).



#### **I.4.2.1 Mécanisme moléculaire de l'inactivation dépendant du potentiel membranaire**

Comme le montre le tableau I, les cinétiques d'inactivation sont variées entre les différentes classes de canaux calciques. La construction de protéines chimères entre des sous-unités à inactivation lente et d'autres à inactivation rapide a permis d'identifier de nombreux déterminants moléculaires de l'inactivation des canaux calciques de type HVA. Pour les canaux LVA qui possèdent les cinétiques d'inactivation les plus rapides, aucune étude concluante n'a encore été effectuée jusqu'ici. Dans les expériences électrophysiologiques, le remplacement du  $\text{Ca}^{2+}$  par le  $\text{Ba}^{2+}$  élimine l'inactivation des canaux par le  $\text{Ca}^{2+}$  et donc favorise l'inactivation dépendante du potentiel membranaire des canaux de type -L.

Au niveau des domaines transmembranaires, des études de chimères et de mutagenèse dirigée ont démontré que les principales régions impliquées dans l'inactivation des canaux calciques sont les segments S6. Ainsi, en effectuant des chimères entre les canaux  $\text{Ca}_v2.1$  ( $\alpha1A$ ) et  $\text{Ca}_v2.3$  ( $\alpha1E$ ), l'équipe de Tsien a pu suggérer que le segment S6 du domaine I était responsable de la différence du taux d'inactivation entre ces deux canaux (Zhang et al., 1994). Le rôle des segments S6 des domaines II et III a été établi par Stotz et collaborateurs. Leur étude a montré que lorsque les segments S6 des domaines II et III du canal  $\text{Ca}_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) à inactivation lente étaient substitués par ceux du canal  $\text{Ca}_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) à inactivation rapide, les cinétiques d'inactivation du canal sont accélérées au même rythme que  $\text{Ca}_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) (Stotz et al., 2000). L'implication du segment IVS6 a été mise en évidence lorsque des études d'expression fonctionnelle dans les ovocytes de *Xenopus laevis* ont montré que le mutant I1819L impliqué dans la migraine hémiplésique familiale affectait l'inactivation du canal  $\text{Ca}_v2.1$  ( $\alpha1A$ ) (Krauss et al., 1998). Une autre étude menée par le laboratoire de Hering a montré que la simple mutation du résidu méthionine à la position 1811 par le

résidu glutamate accélère les cinétiques d'inactivation de ce même canal (Berjukow et al., 2001).

De nombreuses études menées au niveau des régions cytoplasmiques ont permis de révéler l'implication de la boucle intracellulaire reliant IS6 à IIS1 dans l'inactivation dépendante du potentiel des canaux calciques HVA. Une étude utilisant deux isoformes du canal  $Ca_v2.1$  ( $\alpha1A$ ) a démontré que la seule présence du résidu V421 dans la séquence d'une des isoformes au niveau de cette boucle est suffisant pour convertir les cinétiques d'inactivation rapide de type Q en des cinétiques plus lentes de type P (Bourinet et al., 1999).

L'équipe de Spaetgens et Zamponi a étudié les mécanismes d'inactivation en insérant des portions du canal  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) qui possède des cinétique d'inactivation lentes dans le canal  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) qui possède des cinétiques rapides. La chimère ECEE, dans laquelle le domaine II plus la boucle I-II du canal  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) ont été transférés dans le canal  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ), possède des cinétiques d'inactivation lentes qui se rapprochent plus des cinétiques d'inactivation des canaux  $Ca_v1.2$  (Spaetgens et Zamponi, 1999).

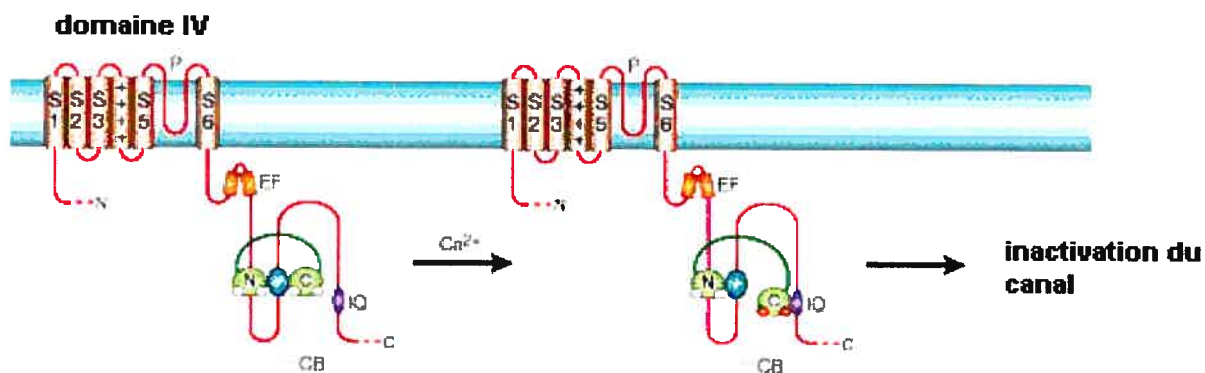
Parallèlement aux travaux de Spaetgens et Zamponi, des études réalisées dans notre laboratoire ont aussi démontré l'importance de la boucle I-II. Ainsi, la chimère CEEE comprenant cette fois le domaine I (avec une partie de la boucle I-II) du canal  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) et les domaines II, III et IV du canal  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ), produit des cinétiques d'inactivation similaire au canal  $Ca_v1.2$ , malgré une homologie plus de 90 % entre CEEE et la structure primaire de  $Ca_v2.3$  (Bernatchez et al., 2001). Notre équipe a également observé que les propriétés d'inactivation étaient influencées par des mutations au niveau du domaine AID impliqué dans la liaison avec la sous-unité  $Ca_v\beta$ . La mutation R387E dans  $Ca_v2.3$  ralentit significativement les

cinétiques d'inactivation et déplace la courbe de dépendance au voltage vers des potentiels plus positif, alors que la mutation homologue E462R dans le canal  $Ca_v1.2$  a des effets inverses (Berrou et al., 2001).

Dans l'ensemble, l'inactivation des canaux calciques HVA semble gérée d'une manière complexe qui implique principalement les segments transmembranaires S6 et la boucle intracellulaire I-II de la sous-unité  $Ca_v\alpha1$ .

#### **1.4.2.2 Mécanismes moléculaires de l'inactivation dépendante du calcium intracellulaire**

L'inactivation dépendante du calcium est un mécanisme de rétrocontrôle négatif en réponse à une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire. Les fluctuations de la concentration locale de calcium sont perçues par la calmoduline (CaM), une protéine de l'ordre de 17 kDa. Elle renferme quatre motifs de liaison au calcium, de type « EF-hand », qui sont regroupés par paires au sein des domaines amino et carboxy-terminal reliés entre eux par une hélice- $\alpha$  (Saimi et Kung, 2002). Lors de l'ouverture du canal, les ions  $Ca^{2+}$  se fixent sur le lobe carboxy-terminal de la calmoduline qui va se lier sur le motif IQ situé au niveau carboxy-terminal de la sous-unité  $Ca_v\alpha1$  (Figure 9) (Budde et al., 2002). Même si la calmoduline semble se lier de façon constitutive sur le motif IQ de tous les canaux HVA, seule la région CB (« Calmodulin Binding ») de  $Ca_v1.2$  lie la calmoduline à des concentrations physiologiques de calcium (Budde et al., 2002 et Liang et al., 2003). L'effet fonctionnel le plus important de cette liaison est l'inactivation dépendant du calcium du canal  $Ca_v1.2$  et la facilitation dépendant du calcium du canal  $Ca_v2.1$  (Lee et al., 1999 ; Lee et al., 2000).



**Figure 9 : Modèle de l'inactivation dépendante du calcium induite par la calmoduline**

Au repos, la liaison du canal avec la calmoduline se fait au niveau du motif CB (« Calmodulin Binding ») du canal. Lors de l'ouverture, le Ca<sup>2+</sup> (cercle rouge) se fixe sur le lobe C-terminal de la calmoduline et il y a liaison avec le motif IQ au niveau C-terminal de la sous-unité Ca<sub>v</sub>α1 (Budde et al., 2002).

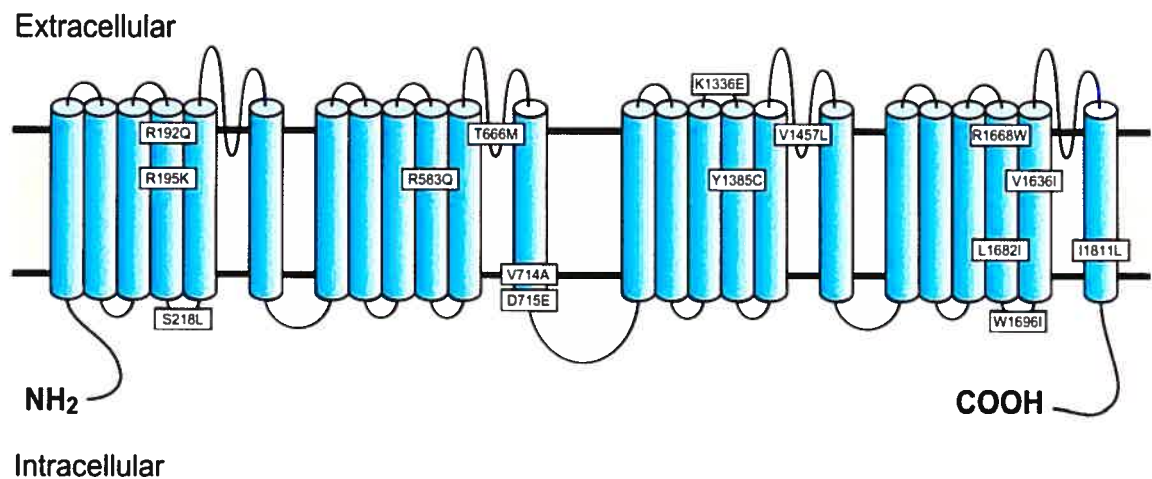
### **I.5 Les canalopathies calciques**

Les canalopathies constituent un groupe de maladies génétiques liées au dysfonctionnement des canaux ioniques. À l'heure actuelle, plusieurs mutations de gènes codant pour la sous-unité Ca<sub>v</sub>α1 des canaux calciques responsables de nombreuses maladies génétiques sont connues. Ces maladies se manifestent surtout au niveau du système nerveux et des muscles. La paralysie périodique hypokaliémique (hypoPP1) fut la première maladie génétique humaine associée à des mutations d'un canal calcique. La forme HypoPP1 est la conséquence de mutations du gène CACNA1S qui code pour la protéine α1S du canal calcique squelettique de type L. D'autres mutations du gène CACNA1S sont responsables d'une forme du syndrome d'hyperthermie maligne (Lehmann-Horn et Jurkat-Rott, 1999).

Au niveau neuronal, des mutations dans la séquence des canaux calciques induisent particulièrement une forme familiale de migraine hémiplésique : la migraine hémiplésique familiale de type 1 (MHF1) ainsi que deux formes d'ataxie cérébelleuse, l'ataxie épisodique de type 2 (EA-2) et l'ataxie spino-cérébelleuse de type 6 (SCA6) . Ces trois formes de maladies sont associées à des mutations du gène CACNA1A situées sur le chromosome 19 qui code pour la sous-unité  $\alpha 1A$  du canal de type P/Q (Ophoff et al. 1996). L'ataxie épisodique est un trouble cérébral qui se traduit par des symptômes épisodiques prolongés (de quelques minutes à quelques jours) sous forme d'ataxie, de dysarthrie, de nausées et de vertiges. L'Ataxie est caractérisée par une incoordination des mouvements volontaires et la dysarthrie se caractérise par des altérations de la voix, de l'articulation, de la déglutition et autres fonctions buccales suite à une lésion neurologique centrale. Les mutations EA-2 produisent des formes tronquées de  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) qui ne forment pas des canaux calciques fonctionnels (Denier et al., 2001). La SCA6 est caractérisée par une ataxie cérébelleuse progressive de l'adulte avec atrophie cérébelleuse par perte des cellules de Purkinje. Elle est due à de petites expansions du triplet CAG contenu dans la partie 3' de CACNA1A et potentiellement traduit en polyglutamine dans certaines des isoformes de la protéine (Zoghbi, 1997).

La migraine hémiplésique familiale de type 1 est une forme rare de migraine, de transmission autosomique dominante. La crise habituelle se déroule en deux phases. La première phase se manifeste par la paralysie temporaire d'un côté du corps (hémiplésie). Elle peut être isolée ou associée à d'autres types d'aura (visuelle, sensitive, dysphasique, surdité) et dure environ une heure. La deuxième phase consiste en l'apparition de céphalées pulsatiles qui durent habituellement plusieurs heures (Carrera et al., 2001). Des études génétiques effectuées sur des familles atteintes de FHM1 ont permis l'identification de 15 mutations ponctuelles réparties dans le gène CACNA1A (Figure 10). Toutes ces mutations sont de type faux-sens,

entraînant la substitution d'un seul acide aminé de la protéine. Elles siègent dans des régions fonctionnelles du canal, près du pore ou dans la zone de sensibilité au voltage (Wessman et al., 2004). Des études électrophysiologiques ont montré que les mutations responsables de la migraine hémiplegique familiale modifient les propriétés biophysiques et probablement la densité des canaux  $Ca_v2.1$  fonctionnels à la membrane (Kraus et al., 2000 ; Müllner et al., 2004, Barrett et al., 2005)



**Figure 10 : Structure secondaire prédite du canal  $Ca_v2.1$**

Les 15 mutations responsables de la migraine hémiplegique familiale de type 1 qui sont identifiées à ce jour sont indiquées (Adaptée de Wessman et al., 2004).

Des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités régulatrices sont également responsables de maladies génétiques. Le phénotype *lethargic (lh)*, une forme d'ataxie cérébelleuse, et le phénotype « stargazer » chez la souris sont associés respectivement à des mutations des sous-unités  $Ca_v\beta4$  et  $Ca_v\gamma2$ . Chez l'homme, la sous-unité  $Ca_v\alpha2/\delta-1$  est responsable d'une forme d'hyperthermie maligne (Benatar, 1999) (Tableau III).

Sous-unité	Gène	Locus	Pathologie associée	Phénotypes souris
$\alpha 1A$	CACNA1A (Ca <sub>v</sub> 2.1)	19p13.1-.2	Ataxie cérébelleuse (SCA6), Ataxie épisodique (EA-2), Migraine hémiplésique Familiale (MHF)	<i>tottering (tg)</i> <i>leaner (tga)</i>
$\alpha 1F$	CACNA1F (Ca <sub>v</sub> 1.4)	Xp11	Rétinite pigmentaire 2 (CSNB2)	
$\alpha 1S$	CACNA1S (Ca <sub>v</sub> 1.1)	1q31-q32	Paralysie périodique hypokaliémique (HypoPP1), Hyperthermie maligne (MHS5)	<i>muscular dysgenesis (mdg)</i>
$\alpha 2/\delta-1$	CACNA2D1 (Ca <sub>v</sub> 1.3)	7q21-q22	Hyperthermie maligne (MHS3)	
$\beta 4$	CACNB4 (Ca <sub>v</sub> 2.2)	2q22-q23		<i>Lethargic (lh)</i>
$\gamma 2$	CACNG2 (Ca <sub>v</sub> 3.1)	22q12	Épilepsie « stargazer (stg) »	

**Tableau III : Maladies génétiques associées à des mutations au niveau des gènes codant pour les sous-unités des canaux calciques activés par le voltage (Felix, 2000)**

## I.6 Justification et objectifs du travail

L'objectif de ce projet de maîtrise est d'étudier les propriétés d'activation et d'inactivation (ou de « gating ») du canal calcique activé par la dépolarisation de type  $Ca_v2.3$ .

Le mécanisme moléculaire de l'ouverture du pore des canaux calciques reste en grande partie inconnu. Dernièrement, des études ont démontré que la migraine hémiplegique de type familiale était causée entre autres par la mutation relativement mineure I1811L dans le segment IVS6 du canal de type  $Ca_v2.1$  (Kraus et al., 1998). Ce résidu fait partie du motif hydrophobe **VAVIM** conservé strictement au niveau du segment IVS6 des canaux de type  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$ . En se basant sur la structure des canaux potassiques où les quatre segments S6 formeraient le pore interne du canal, nous avons suggéré que le motif conservé VAVIM au niveau du segment IVS6 pourrait jouer un rôle au niveau du « gating » des canaux calciques.

Nous avons entrepris d'étudier en détail le rôle du résidu I1721 du canal  $Ca_v2.3$  équivalent au résidu I1811 du canal  $Ca_v2.1$  et ainsi que le motif conservé VAVIM au niveau du segment IVS6. Nous avons muté ces résidus par des résidus hydrophobes (A, V, L), chargés (H, K, R, D, E), neutre mais polaire (T) et des résidus qui peuvent modifier la flexibilité des hélices- $\alpha$  (G, P).



## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### II.1 Techniques D'ADN recombinant

L'ADNc codant pour le canal calcique humain  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) (Genbank L27745) de type sauvage provient du laboratoire du docteur T. Schneider (Schneider et al., 1994). La sous-unité auxiliaire  $Ca_v\alpha2b\delta$  du cerveau de rat a été fournie par le docteur T. P. Snutch (Williams et al., 1992) et la sous-unité  $Ca_v\beta3$  (Genbank M88751) par le docteur E. Perez-Reyes (Castellano et al., 1993).

#### II.1.1 Mutagenèse dirigée

Les mutations au niveau du canal  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) aux positions 1718, 1719, 1720, 1721 et 1722 ont été réalisées par la méthode du PCR (« polymerase chain reaction ») en utilisant la trousse commerciale « Quick change® XL site-directed kit » (Stratagene, La Jolla, Ca) selon les directives du fabricant. Pour ce faire, deux amorces (sens et antisens) d'une longueur de 39 nucléotides ont été nécessaires pour introduire les mutations. Le produit de PCR obtenu contient non seulement de l'ADN muté mais aussi de l'ADN parental non muté. Afin de s'assurer qu'uniquement l'ADN muté soit amplifié, l'ADN parental a été éliminé par digestion avec l'enzyme de restriction *Dpn I* qui clive les sites de méthylation des résidus adénine. L'ADN muté a par la suite été transformé dans les bactéries XL-Gold ultra-compétentes.

Le séquençage automatisé a permis de montrer que la mutation avait été réalisée et qu'aucune autre mutation indésirable n'avait été introduite au cours de la réaction de PCR (Bio S&T, Lachine, Québec). Suite à la confirmation, l'ADN muté est amplifié dans les bactéries compétentes *E. coli*

DH5 $\alpha$  et est extrait en utilisant la trousse « QIAfilter™ Plasmid Midi» (Qiagen, Mississauga, Ont).

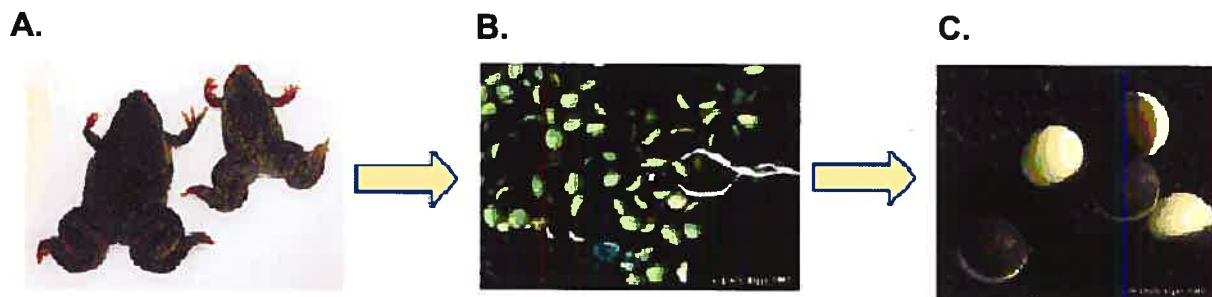
### II.1.2 Transcription in vitro

L'ADN extrait se retrouve inséré dans une version modifiée du plasmide pGem-3 circulaire contenant la séquence 5' non transcrit du « mosaic virus RNA 4 » (Wei et al., 1991). Pour transcrire le brin matrice ADN en ARN, il faut au préalable linéariser le plasmide à l'aide d'une enzyme de restriction choisie, qui reconnaît le site de coupure franche le long de la séquence d'ADN. Ici, les ADN plasmidiques de la sous-unité  $\alpha 1E$  du canal  $Ca_v2.3$  de type sauvage et mutés ont été digérés avec *Hind III*, tandis que les sous-unités  $Ca_v\beta 3$  et  $Ca_v\alpha_2b\delta$  étaient digérées par l'enzyme *Not I*. Après digestion, la solution est purifiée par la méthode de purification phénol/chloroforme. La solution de plasmide linéaire est mise en présence de l'ARN polymérase T7 de la trousse commerciale mMessage mMachine® (Ambion, Austin, TX) pour obtenir les molécules d'ARN. La synthèse se fait dans la direction 5'→3' du brin codant de l'ADN et forme la séquence codante ARN par complémentarité. Les matrices d'ADN sont ensuite détruites par traitement avec l'ADNase. Comme pour la production de la matrice d'ADN, les ARN sont purifiés par des extractions de phénol/chloroforme et resuspendus dans de l'eau autoclavée « RNAase free ». Le poids moléculaire et la qualité des ARN produits ont été visualisés sur gel d'agarose 1% révélé au bromure d'éthidium.

### II.2 Expression fonctionnelle dans les ovocytes de Xénope

Les ovocytes aux stades V et VI sont prélevés chirurgicalement d'une grenouille *Xenopus Laevis* (Nasco, Fort Atkinson, WI) (Figure 11). Les ovocytes sont ensuite dépourvus de leur couche folliculaire par traitement enzymatique de 30-40 minutes à la température ambiante en utilisant 2

mg/ml de collagénase (Gibco, Burlington, Ontario) contenue dans une solution saline sans calcium composé de (en mM): 82.5 NaCl; 2.5 KCl; 1 MgCl<sub>2</sub>; 5 Hepes (pH 7.4). Une solution de 46 nl contenant entre 35 et 50 ng d'ARNc codant pour la sous-unité  $\alpha$ 1E du canal Cav2.3 de type sauvage ou mutée est injectée dans les ovocytes avec un micro-injecteur automatisé à volume variable (WPI, Sarasota, FL) qui permet d'ajuster très précisément le volume injecté (4.6 nl à 46 nl). L'ARNc codant pour la sous-unité  $\alpha$ 1E (Cav2.3) est co-injecté avec les ARNc codant pour les sous-unités Cav $\alpha$ 2b $\delta$  et Cav $\beta$ 3 à un taux de concentration de 3:1:2 respectivement. La vérification de la régulation du canal s'est faite en co-injectant la sous-unité  $\alpha$ 1E (Cav2.3) de type sauvage et mutée en absence de la sous-unité Cav $\beta$ 3 (toujours en présence de la sous-unité Cav $\alpha$ 2b $\delta$ ) en injectant la même concentration d'ARNc. Les ovocytes sont par la suite incubés 1-3 jours à 18°C dans une solution Barth contenant : 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 2.5 mM d'acide pyruvique, 100 U/ml de pénicilline et 50  $\mu$ g/ml de gentamicine (pH 7.6).



**Figure 11 : Prélèvement des ovocytes d'une grenouille *Xenopus Laevis***

**A.** Deux grenouilles *Xenopus Laevis*; **B.** Tissu ovarien prélevé chirurgicalement; **C.** Ovocytes isolés

### II.3 Enregistrements électrophysiologiques

Les courants  $Ba^{2+}$  traversant les canaux  $Ca_v2.3$  de type sauvage et mutés ont été mesurés à la température ambiante à l'aide de la technique du voltage imposé à deux électrodes en utilisant un amplificateur de voltage imposé (OC-725C, Warner instruments, Hamden, CT). Les électrodes de courant et de voltage, finement étirées à partir d'un capillaire en verre, ont été remplies avec une solution de 3 M KCl, 1mM EGTA et 10mM HEPES au pH 7.4. La résistance finale des pipettes est de l'ordre de 0.5 à 1.5 M $\Omega$  avec cette solution. Ces électrodes ont été introduites dans les ovocytes à l'aide de micromanipulateurs. La solution extracellulaire dans laquelle les ovocytes sont placés en début d'expérience est une solution contenant : 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM HEPES titrée au pH 7.4 avec du NaOH. Par la suite, les enregistrements ont été effectués en perfusant le bain par une solution de 10 mM  $Ba(OH)_2$ , 110 mM NaOH, 1 mM KOH, 20 mM HEPES titrée au pH 7.3 avec l'acide méthanesulfonique (MeS). Durant les enregistrements, les ovocytes exprimant les canaux mutés ont été injectés avec 23 nl d'EGTA 50 mM (Sigma, St-Louis, Mo) pour prévenir la contamination par des courants  $Cl^-$  endogènes activés par le  $Ca^{2+}$ . Les ovocytes sont perfusés par gravité à un débit de 2 ml/min.

Le logiciel pClampex 8.0 (Molecular Devices, Foster City, CA) a été utilisé pour l'acquisition des données. Les données ont été échantillonnées à 5 kHz et filtrées à 1 kHz en utilisant le filtre incorporé à l'amplificateur. Pour déterminer les courbes courant-voltage en configuration cellule entière afin de déterminer les paramètres d'activation et les propriétés des cinétiques d'inactivation du canal, les courants ont été enregistrés en maintenant la cellule à un potentiel de -100 mV. Le protocole comprenait un prépulse de 50 ms à -120 mV qui précédait la série de pulses dépolarisants de 450 ms appliqués entre -40 mV et +50 mV par intervalle de 5 mV et à une fréquence de 0.2 Hz. Les mesures de la dépendance en voltage de

l'inactivation ( $I_{inact}$ ) ont été obtenues à un potentiel test de 0 mV en soumettant les ovocytes à une série de préimpulsions dépolarisantes de 5 secondes entre -120 et +10 mV à partir d'un potentiel de repos de -120 mV.

### II.3.1 Analyse des données

Les données brutes ont été extraites en utilisant les logiciels Clampfit 8.2 (Molecular Devices, Foster City, CA) et Origin 7.0 (Microcal Software, Northampton, MA). Pour obtenir les courbes de dépendance en voltage de l'inactivation, les données ont été ajustées avec l'équation 1 de Boltzmann grâce au logiciel Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA) :

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

$E_{0.5,inact}$  = potentiel de la mi-inactivation;  $z$  = pente de la courbe;  $V_m$ , potentiel appliqué pendant le pulse de 5 s;  $R$  = constante des gaz parfaits: 8.315 J/K·mole;  $T$  = température absolue en °K (°K = °C + 273.16);  $F$  = constante de Faraday:  $9.648 \times 10^4$  C/mole;  $RT/F \approx 25$  mV à 20°C

Les potentiels d'activation ont été estimés à partir des courbes courant-voltage. Les mesures ont été normalisées par rapport à l'amplitude maximale et ont été ajustées avec l'équation 2 de Boltzmann modifiée pour tenir compte de la conductance macroscopique :

$$\frac{I}{I_{\max}} = G_{rel} \frac{(V_m - V_{rev})}{1 + \exp\left[-\frac{zF(V_m - E_{0.5,act})}{RT}\right]} \quad (2)$$

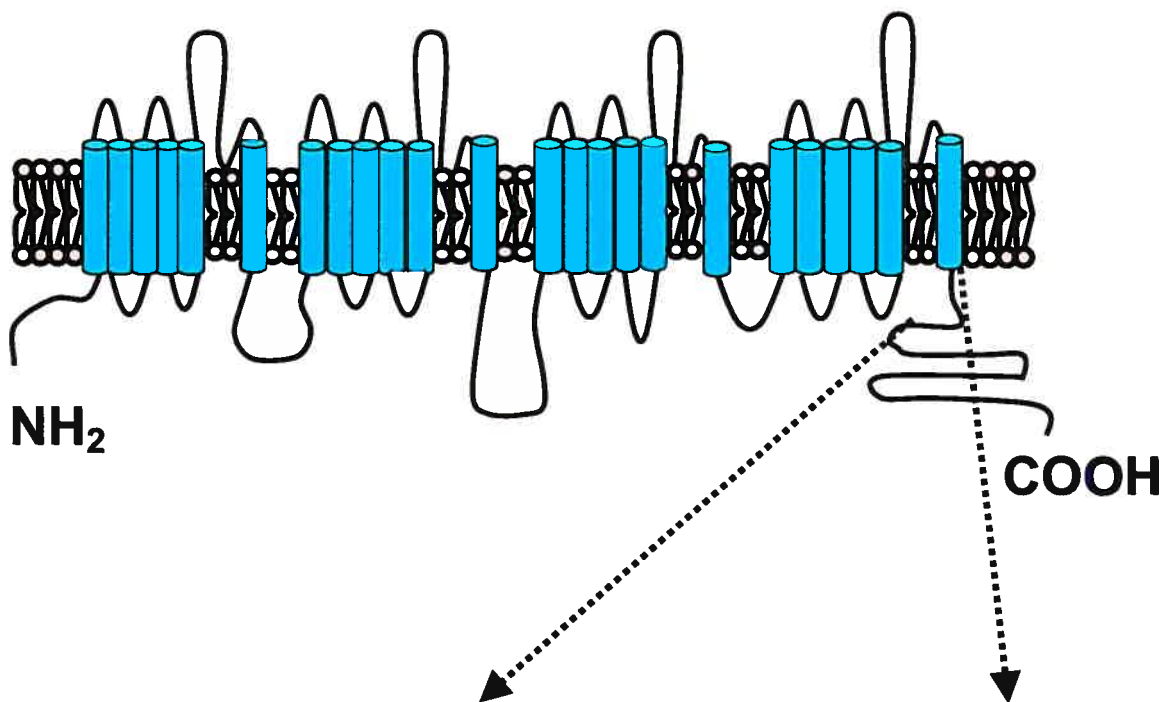
$E_{0.5, act}$  = potentiel de la mi-activation;  $G_{rel}$  = conductance normalisée;  $z$  = pente de la courbe;  $V_m$  = potentiel de test;  $V_{rev}$  = potentiel d'inversion;  $R$  = constante des gaz parfaits: 8.315 J/K·mole;  $T$  = température absolue en °K (°K = °C + 273.16);  $F$  = constante de Faraday:  $9.648 \times 10^4$  C/mole;  $RT/F \approx 25$  mV à 20°C

Les cinétiques d'inactivation ont été mesurées en utilisant les valeurs de  $r_{50}$  qui représentent la fraction  $I/I_{max}$  des courants résiduels après 50 ms du pulse dépolarisant.

Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes  $\pm$  SEM (écart à la moyenne). Les variations entre les canaux  $Ca_v2.3$  mutés et contrôle ont été vérifiées à tous les potentiels à l'aide du test statistique « One-Way ANOVA » du logiciel Origin 7.0. Les valeurs sont considérées significativement différentes pour  $p$  (probabilité d'erreur)  $\leq 0.01$

### III. RÉSULTATS

Les mécanismes moléculaires gouvernant le « gating » des canaux calciques activés par la dépolarisation émergent grâce à la cristallisation de la structure de plusieurs canaux potassiques bactériens (Doyle et al., 1998 ; Jiang et al., 2002a ; Kuo et al., 2003, Long et al., 2005). En effet, les structures cristallines montrent que les segments S6 participent dans le « gating » des canaux en formant le pore interne. Afin d'étudier le rôle que pourraient jouer les segments S6 dans les canaux calciques, nous avons réalisé des mutations simples au niveau du motif hydrophobe VAVIM du segment IVS6 du canal  $Ca_v2.3$  (Figure 12) par mutagenèse dirigée et les avons testées par des études électrophysiologiques à l'aide de la technique de voltage imposé à deux électrodes.



$Ca_v1.1$	FAYYYFISFymLcaFLiINLFVAVIMC
$Ca_v1.2$	FAVFYFISFymLcaFLiINLFVAVIMC
$Ca_v2.1$	FAYFYFVSEIFLCSEFLMLNLFVAVIMC
$Ca_v2.2$	FAYFYFVSEIFLCSEFLMLNLFVAVIMC
$Ca_v2.3$	LAYvYFVSEIFFCSEFLMLNLFVAVIMC
	-A--YF-SF---C-FL--NLFVAVIMC
	-----IVS6

### **Figure 12 : Alignement des séquences primaires pour les segments IVS6 des canaux calciques HVA**

La structure secondaire prédite des canaux calciques activés par de hautes dépolarisations est composée de quatre domaines homologues divisés en six segments transmembranaires. Le N-terminal et le C-terminal du canal sont cytoplasmiques. Le motif hydrophobe VAVIM est encadré en rose. Les séquences des ADNc ont été déposées dans Genbank : Ca<sub>v</sub>1.1 (GenBank M23919), Ca<sub>v</sub>1.2 (GenBank X15539), Ca<sub>v</sub>2.1 (Genbank X57476), Ca<sub>v</sub>2.2 (GenBank D14157) du lapin et Ca<sub>v</sub>2.3 (GenBank L27745) de l'humain.

---

#### **III.1 Rôle du résidu I1721**

Nous avons tout d'abord procédé à des mutations ponctuelles du résidu I1721 du canal Ca<sub>v</sub>2.3 correspondant au résidu I1811 dans le segment IVS6 du canal Ca<sub>v</sub>2.1 impliqué dans la migraine hémiplegique familiale de type 1. Le résidu I1721 a été muté par des résidus similaires hydrophobes, des résidus chargés et des résidus qui altèrent le volume de la chaîne latérale. L'expression fonctionnelle des mutants a été testée par électrophysiologie après co-injection dans les ovocytes de Xénope de l'ARNm codant pour les sous-unités  $\alpha 1$  du canal Ca<sub>v</sub>2.3 de type sauvage et mutées avec les sous-unités auxiliaires Ca<sub>v</sub> $\beta 3$  et Ca<sub>v</sub> $\alpha 2\beta\delta$ . Les courants Ba<sup>2+</sup> ont été enregistrés après une incubation de 1-3 jours des ovocytes injectés.

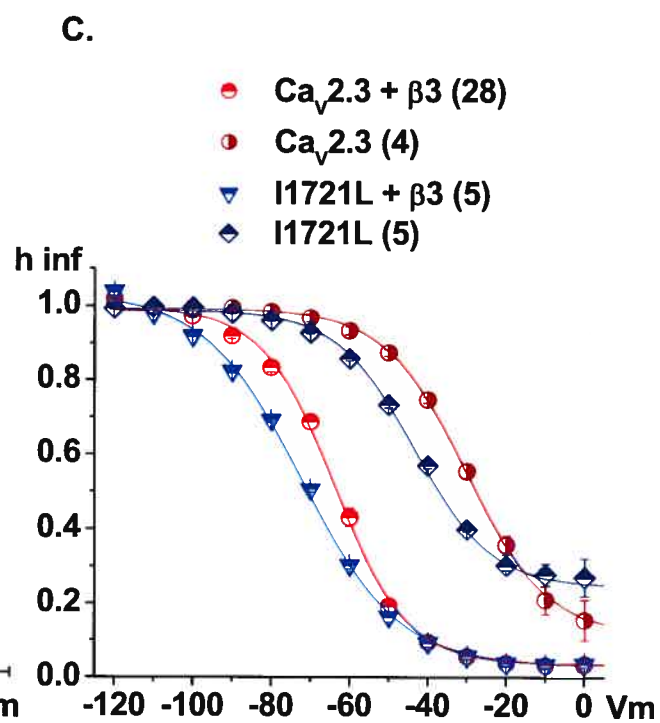
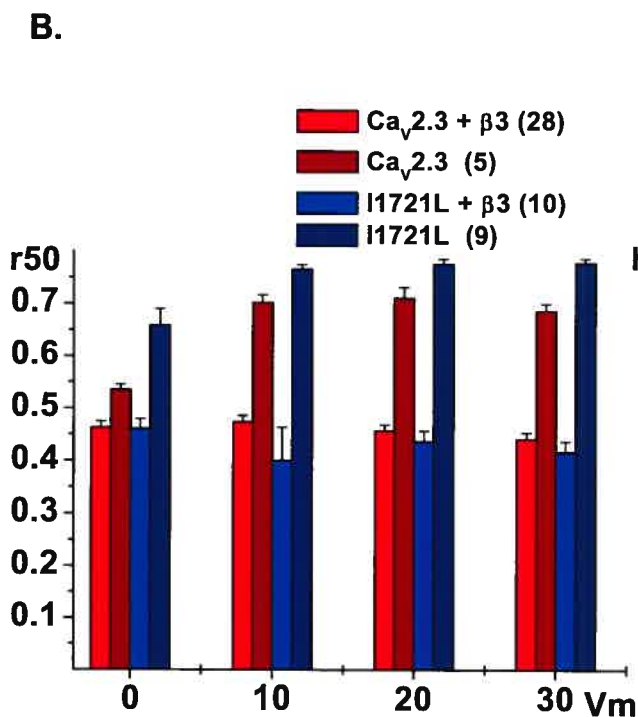
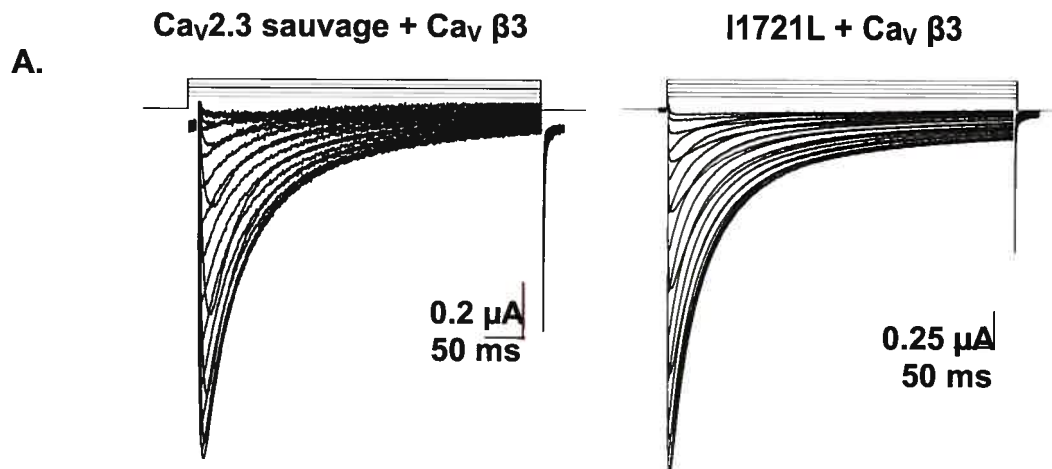
Les canaux calciques HVA sont régulés par la sous-unité Ca<sub>v</sub> $\beta$  qui se lie au motif AID situé dans la boucle I-II de la sous-unité Ca<sub>v</sub> $\alpha 1$ . Pour s'assurer que les effets observés étaient causés par la sous-unité Ca<sub>v</sub> $\alpha 1$ , les ovocytes ont été aussi injectés avec la sous-unité  $\alpha 1$  du canal Ca<sub>v</sub>2.3 sauvage et mutée mais en absence de la sous-unité Ca<sub>v</sub> $\beta 3$  (avec Ca<sub>v</sub> $\alpha 2\beta\delta$ ).



### III.1.1 La mutation I1721L

Les enregistrements des courants macroscopiques  $Ba^{2+}$  pour le canal  $Ca_v2.3$  et le mutant I1721L sont montrés sur la Figure 13A. Les cinétiques d'inactivation sont estimées à partir des ratios  $r_{50}$  représentant la fraction du courant résiduel à la fin d'un pulse de 50 ms. Tel que montré sur la Figure 13B, le mutant I1721L ne procure aucun changement significatif au niveau des cinétiques d'inactivation comparativement au canal de type sauvage. Par contre, un déplacement de l'inactivation à des potentiels légèrement plus négatifs ( $E_{0.5, inact} = -72.2 \pm 0.7$  mV,  $n=5$ ) que le canal contrôle ( $E_{0.5, inact} = -63.9 \pm 0.6$  mV,  $n=28$ ) est remarqué sur la courbe  $h_{inf}$  représentant la dépendance en voltage de l'inactivation mesurée à la fin d'une série de prépulses dépolarisants de 5 s (de -120 mV à +50 mV) appliqués à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV (Figure 13C). La substitution du résidu I1721 par la leucine n'a pas d'effet significatif au niveau de l'activation. En effet, le potentiel de mi-activation du mutant est de  $-14.1 \pm 0.2$  mV ( $n=10$ ), tandis que celui du  $Ca_v2.3$  sauvage est de  $-6.1 \pm 0.2$  mV ( $n=29$ ). Il ne s'agit pas d'erreurs expérimentales mais bien d'erreurs sur le « fitting ».

En absence de la sous-unité  $Ca_v\beta3$ , les cinétiques d'inactivation du mutant I1721L ( $p < 10^{-3}$ ) et du canal sauvage ( $p < 0,005$ ) sont significativement ralenties. L'inactivation de I1721L sans  $Ca_v2.3$  se produit à des potentiels plus positifs ( $E_{0.5, inact} = -43.6 \pm 0.8$  mV,  $n=5$ ) que le mutant I1721L exprimé en présence de la sous-unité  $Ca_v\beta3$  mais légèrement plus négatif que le canal sauvage exprimé sans la sous-unité  $Ca_v\beta3$  ( $E_{0.5, inact} = -31 \pm 1$  mV,  $n=4$ ). Ces résultats démontrent que la régulation de l'inactivation par la sous-unité  $Ca_v\beta3$  est maintenue avec un  $\Delta h_{inf} < -30$  mV et que la mutation I1721L a un effet intrinsèque sur l'inactivation de la sous-unité  $Ca_v\alpha1$ .



**Figure 13 : La mutation I1721L ne modifie pas les cinétiques mais déplace légèrement la dépendance en voltage de l'inactivation du canal Cav2.3**

Le canal calcique Cav2.3 et le mutant ont été exprimés dans les ovocytes de Xénope. Les courants ont été mesurés avec la technique de voltage imposé à deux électrodes en présence de 10 mM Ba<sup>2+</sup>. **(A)** Les enregistrements des courants macroscopiques pour le canal Cav2.3 et le mutant I1721L ont été obtenus en utilisant une série de pulses de potentiels (de -40mV à +50mV) de 450 ms appliquée à partir d'un potentiel de -120mV. **(B)** Les ratios r50 (la fraction du courant résiduel après 50 ms) correspondants sont présentés aux potentiels de 0, 10, 20 et 30 mV en présence et en absence de la sous-unité Cavβ3. **(C)** La dépendance en voltage de l'inactivation a été mesurée à la fin d'une série de pré-pulses dépolarisants de 5 s (de -120 mV à +10 mV) appliqués à partir d'un potentiel de -120 mV. La courbe h inf est obtenue en ajustant les données à l'équation de Boltzmann (équation 1, voir section Matériel et Méthodes) avec le logiciel Origin 7.0. Pour alléger les figures, le nom de la sous-unité principale Cav2.3 n'est pas indiqué.

### III.1.2 Résidus ayant des effets au niveau du volume et de la polarité

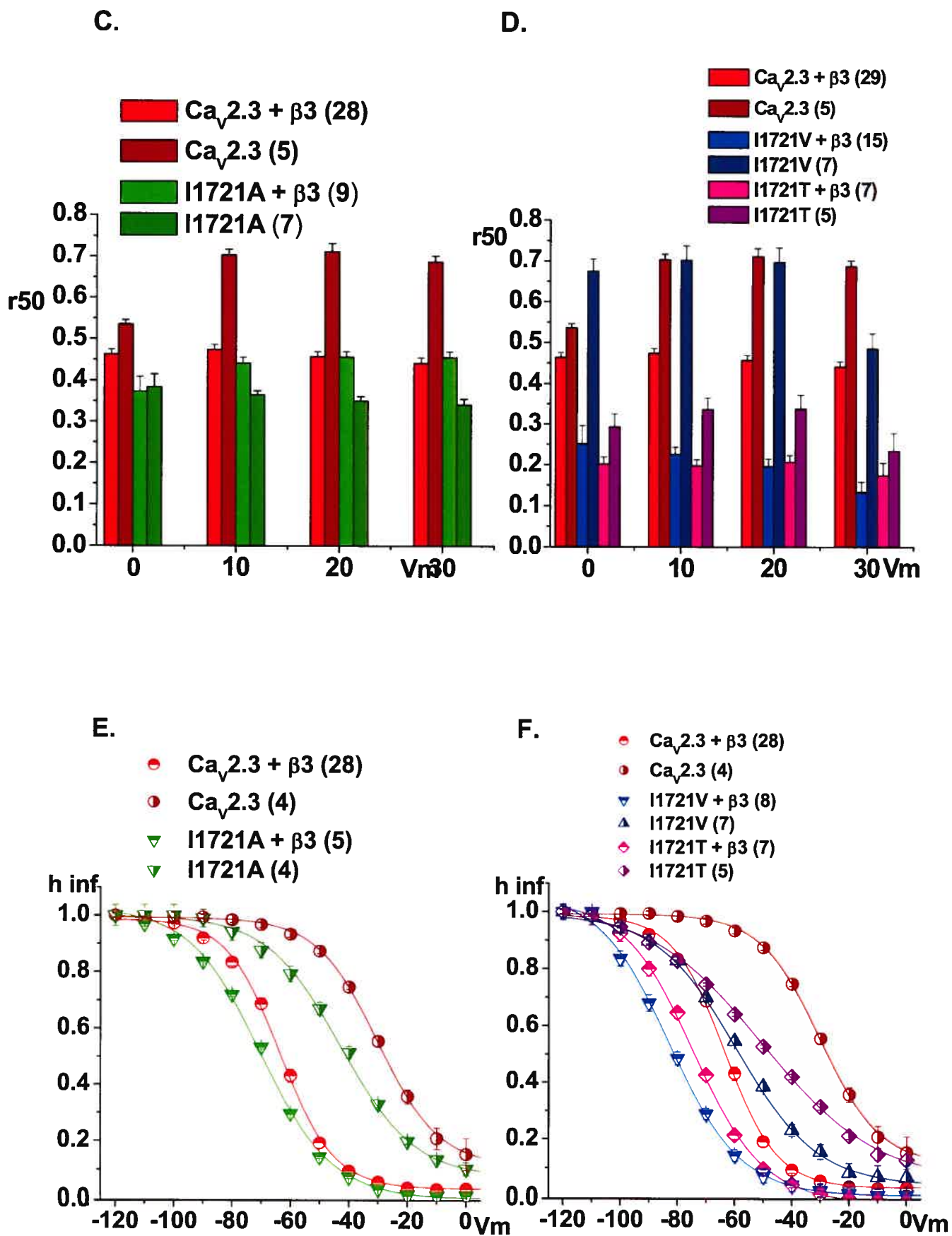
Dans le but de déterminer l'importance du volume et de la polarité de la chaîne latérale, nous avons muté le résidu hydrophobe I1721 par les résidus alanine (A), thréonine (T) et valine (V), qui sont aussi des résidus hydrophobes (Figure 14A). Les ratios r50 montrent que le taux d'inactivation de la mutation neutre I1721A, possédant une chaîne latérale de petite taille sont accélérées à 0 mV mais aux potentiels dépolarisants, l'inactivation est ralentie pour se produire au même taux que le canal sauvage. La mutation I1721V (volume = 140.0 Å<sup>3</sup>) qui est plus volumineux que I1721A (volume = 88.6 Å<sup>3</sup>) mais inférieur au résidu Isoleucine du canal sauvage (volume= 166.7 Å<sup>3</sup>) (Zamyatin, 1972) procure des cinétiques d'inactivation rapides au

canal  $\text{Ca}_v2.3$  ( $p < 10^{-3}$ ). Le résidu thréonine, polaire grâce à son groupement -OH hydroxyle, produit aussi des cinétiques d'inactivation significativement plus rapides ( $p < 10^{-3}$ ) par rapport au canal sauvage mesuré dans les mêmes conditions expérimentales.

Les résultats obtenus en absence de la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta3$  montrent que le mutant I1721A est très peu modulé par la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta3$ . Toutefois, les enregistrements des courants macroscopiques et les ratios  $r50$  (Figure 14A) montrent qu'en absence de la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta3$ , il y a un ralentissement significatif de l'inactivation des mutants I1721V ( $p < 0.005$ ) et I1721T ( $p < 10^{-3}$ ). La régulation par la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta3$  est donc préservée chez le mutant I1721V et I1721T, malgré une atténuation du mutant I1721V à +30 mV (Figures 14C, D).

La substitution du résidu I1721 par les résidus Ala (A), Val (V) et Thr (T) hyperpolarise la dépendance en voltage de l'inactivation, c'est-à-dire que l'inactivation se produit à des potentiels plus négatifs après 5 s de prépulses dépolarisants. Cette hyperpolarisation est légère ( $\Delta \sim -10$  mV) dans le cas des mutants I1721A ( $E_{0.5, \text{inact}} = -70.4 \pm 0.9$  mV,  $n=5$ ) et I1721T ( $E_{0.5, \text{inact}} = -74.0 \pm 0.6$  mV,  $n=7$ ), mais très significative dans le cas du mutant I1721V ( $p < 0.001$ ), l'inactivation se produisant à des potentiels beaucoup plus négatifs ( $E_{0.5, \text{inact}} = -85.0 \pm 1$  mV,  $n=8$ ). Par contre, les canaux mutés sont toujours modulés pas la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta3$ . En effet, l'expression du canal sauvage  $\text{Ca}_v2.3$  et des mutants en absence de la sous-unité régulatrice  $\text{Ca}_v\beta3$ , procure des potentiels de mi-inactivation plus positifs. Ainsi, le mutant I1721A s'inactive à  $-44 \pm 2$  mV ( $n=4$ ), I1721T à  $-56 \text{ mV} \pm 3$  mV ( $n=5$ ), I1721V à  $-58 \pm 1$  ( $n=7$ ) comparativement au canal sauvage à  $-31 \pm 1$  mV ( $n=4$ ) (Figures 14E, F). Ces résultats indiquent que les mutations du résidu I1721 modifient intrinsèquement l'inactivation de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha1$ .





**Figure 14 : Les résidus ayant des effets au niveau du volume et de la polarité modifient les cinétiques et la dépendance en voltage de l'inactivation du canal Cav2.3**

Les enregistrements des courants macroscopiques pour le canal Cav2.3 sauvage et les mutants I1721A, I1721T et I1721V en présence (A) et en absence (B) de la sous-unité Cavβ3 ont été obtenus tel que décrit à la Figure 13. Les ratios r50 (la fraction du courant résiduel après 50 ms) correspondants aux mutants I1721A (C), I1721V et I1721T (D) sont présentés aux potentiels de 0, 10, 20 et 30 mV en présence et en absence de la sous-unité Cavβ3. (E), (F) La dépendance en voltage de l'inactivation a été mesurée à la fin d'une série de pré-pulses dépolarisants de 5 s appliqués à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV.

### III.1.3 Résidus ayant des effets de charge

L'effet de charge à la position 1721 a été testé en utilisant le résidu histidine (H) chargé positivement à pH physiologique et le résidu glutamate (E) chargé négativement. Les enregistrements des courants macroscopiques ainsi que l'histogramme représentant les ratios r50 sont présentés respectivement sur les Figures 15A et 15B. Les cinétiques d'inactivation des deux mutants sont plus rapides que celles du canal sauvage ( $p < 10^{-4}$ ). En absence de la sous-unité Cavβ3, l'inactivation est significativement ralentie pour le mutant I1721E ( $p < 10^{-3}$ ). Par contre, l'inactivation du mutant I1721H se produit aux mêmes taux que celle du mutant exprimé en présence de la sous-unité Cavβ3.

Au niveau de la dépendance en voltage de l'inactivation, les deux mutants s'inactivent à des potentiels plus négatifs que le canal sauvage. Cependant, le mutant I1721H possède un potentiel de mi-inactivation plus négatif ( $E_{0.5, \text{inact}} = -81.0 \pm 1$ ,  $n=9$ ) que le mutant I1721E ( $E_{0.5, \text{inact}} = -73.7 \pm 0.8$ ,

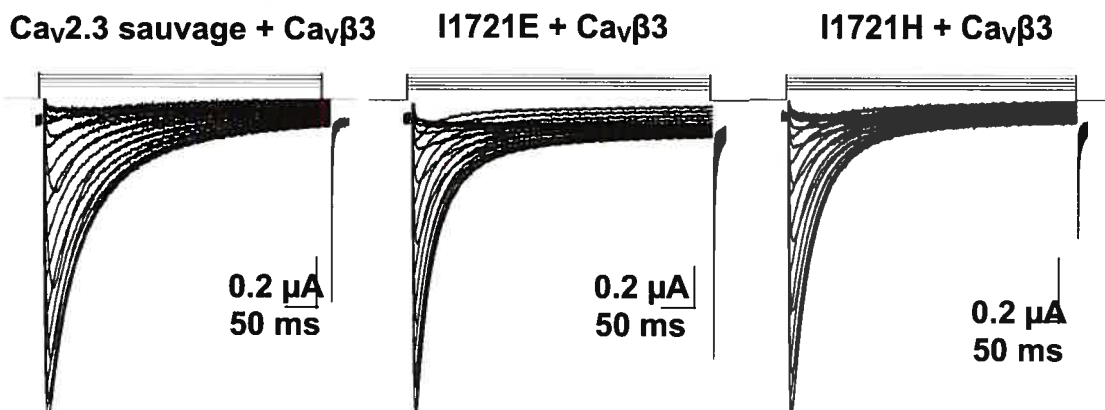
n=5). En absence de la sous-unité  $Ca_v\beta_3$ , la courbe de la dépendance en voltage de l'inactivation est déplacée vers des potentiels plus positifs tel qu'observé précédemment pour les mutants A, L, T, V. Le potentiel de mi-inactivation du mutant I1721H est de  $-39 \pm 4$  mV (n=8) ( $\Delta = 42$  mV) et  $-44 \pm 2$  mV (n=8) ( $\Delta = 29.7$  mV) pour le mutant I1721E (figure 15C). Ces résultats suggèrent la préservation de la régulation du canal  $Ca_v2.3$  par la sous-unité  $Ca_v\beta_3$  des mutants I1721E et I1721H malgré le peu de modulation des cinétiques d'inactivation chez ce dernier.

L'activation semble peu affectée par ces mutations. En effet, les potentiels de mi-activation du mutant I1721E est de  $-3.4 \pm 0.2$  mV (n=8) et celle du mutant I1721H est de  $-6.4 \pm 0.3$  mV (n=15)

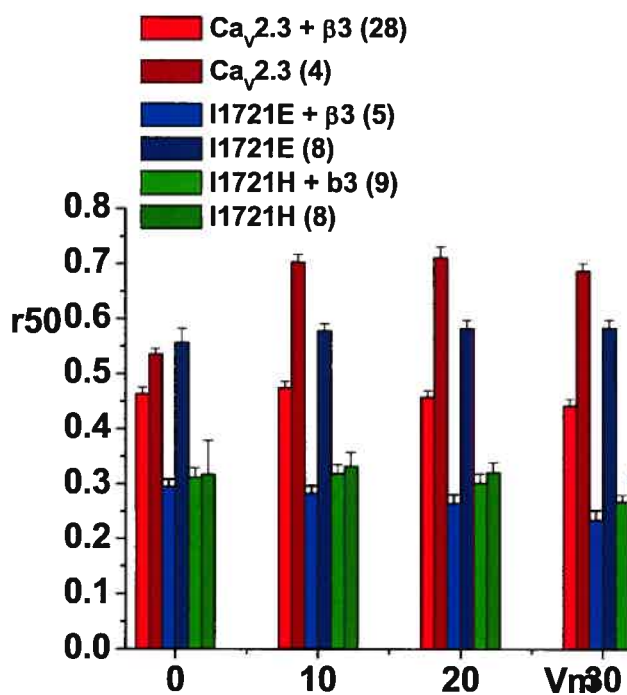
Afin d'évaluer plus en profondeur le rôle des résidus chargés, nous avons muté le résidu I1721 par l'arginine (R), la lysine (K) et l'aspartate (D). La co-expression de ces trois mutants avec et sans la sous-unité régulatrice  $Ca_v\beta_3$  a été testé dans deux préparations d'ovocytes distinctes à plusieurs concentrations d'ARNm et aucun des mutants n'a produit de courants. Étant donné que le seul anticorps commercial spécifiquement dirigé contre la boucle II-III du canal  $Ca_v2.3$  ne fonctionne pas dans nos préparations d'ovocytes de Xénope, il a été impossible de vérifier l'expression membranaire des trois mutants par immunobuvardage.



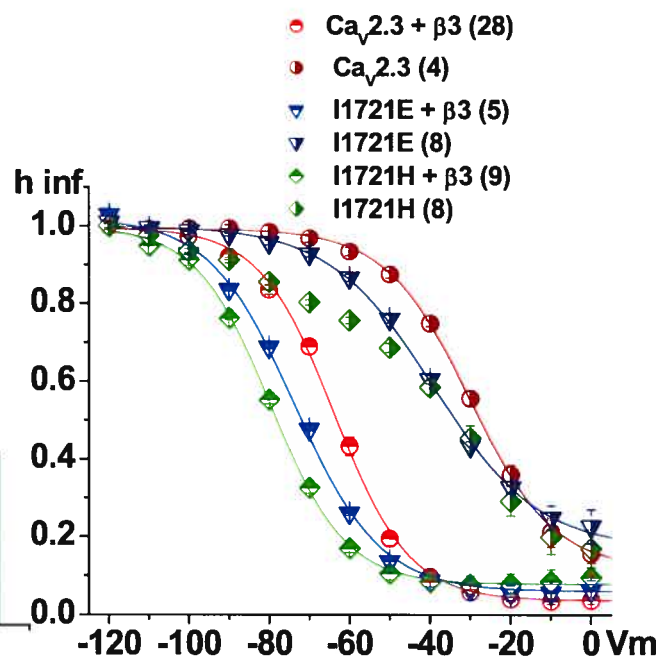
A.



B



C



**Figure 15: Les résidus chargés modifient les cinétiques et la dépendance en voltage de l'inactivation du canal Ca<sub>v</sub>2.3**

(A) Les enregistrements des courants macroscopiques pour le canal Ca<sub>v</sub>2.3 sauvage et les mutants I1721E et I1721H ont été obtenus tel que décrit à la Figure 13. (B) Les ratios r<sub>50</sub> (la fraction du courant résiduel à la fin d'un pulse de 50 ms) correspondants sont présentés aux potentiels de 0, 10, 20 et 30 mV en présence et en absence de la sous-unité Ca<sub>v</sub>β3. (C) La dépendance en voltage de l'inactivation a été mesurée à la fin d'une série de prépulses dépolarisants de 5 s appliqués à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV.

### III.1.4 La substitution du résidu I1721 par la glycine et la proline

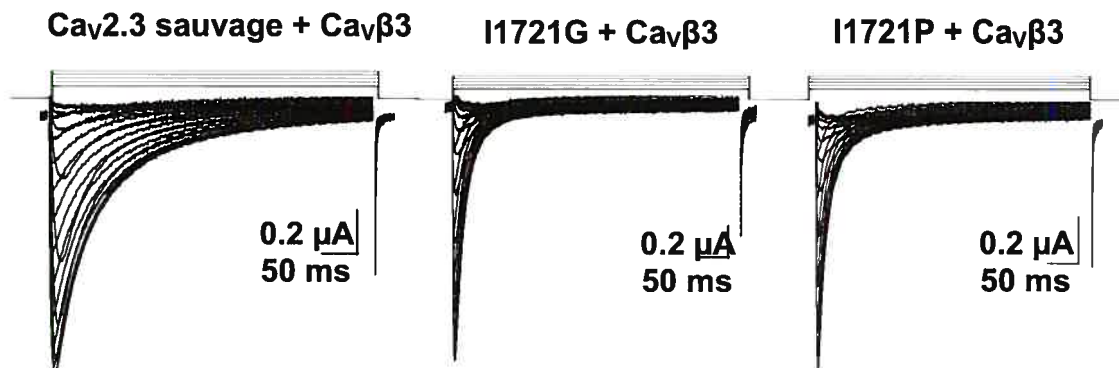
Une analyse mutationnelle indique que le résidu proline (P) qui selon sa localisation peut affecter la conformation hélicoïdale (Hessa et al., 2005) ainsi que le résidu glycine (G) qui peut augmenter la flexibilité d'une chaîne latérale, accélèrent le « gating » de l'inactivation du canal Ca<sub>v</sub>2.3. En effet, les enregistrements des courants Ba<sup>2+</sup> et l'histogramme r<sub>50</sub> (Figures 16A, B) montrent que l'inactivation est significativement plus rapide pour les mutants I1721G ( $p < 10^{-4}$ ) et I1721P ( $p < 5 \cdot 10^{-4}$ ) que le canal sauvage. Les cinétiques d'inactivation sont plus rapides pour le mutant I1721G et aux potentiels dépolarisants les cinétiques des deux mutants sont accélérées. Toutefois, en absence de la sous-unité Ca<sub>v</sub>β3, l'inactivation du mutant I1721G est ralentie ( $p < 0.005$ ) à tous les potentiels tandis que celle du mutant I1721P n'est pas affectée.

Les résultats obtenus pour la dépendance en voltage de l'inactivation indiquent que la régulation par la sous-unité Ca<sub>v</sub>β3 est préservée malgré les mutations au niveau du segment IVS6. Ainsi, lors de la co-expression avec la sous-unité Ca<sub>v</sub>β3, la courbe de la dépendance en voltage de l'inactivation

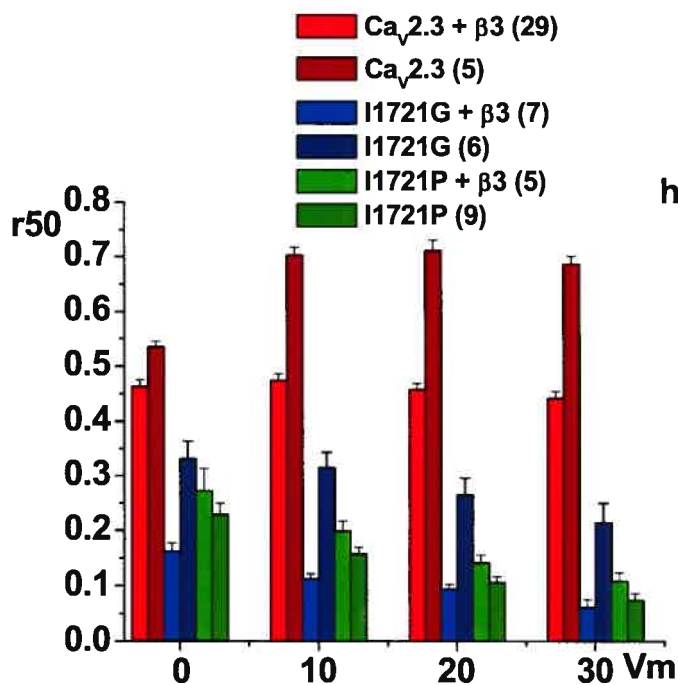
est décalée vers des potentiels plus négatifs pour les mutants I1721G ( $E_{0,5, \text{inact}} = -90 \pm 1 \text{ mV}$ ,  $n=7$ ) et I1721P ( $E_{0,5, \text{inact}} = -79 \pm 1 \text{ mV}$ ,  $n=5$ ). Au contraire, l'absence de la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta 3$  fait que l'inactivation a lieu à des potentiels beaucoup plus positifs avec des potentiels de mi-inactivation de  $-64 \pm 3 \text{ mV}$  ( $n=3$ ) pour le mutant I1721G et  $-44 \pm 1 \text{ mV}$  ( $n=9$ ) pour I1721P (figure 16C).

L'activation des mutants I1721G et I1721P se produit à des potentiels plus positifs que le canal sauvage ( $E_{0,5, \text{act}} = -6.1 \pm 0.2 \text{ mV}$ ,  $n=29$ ). Ainsi, le potentiel de mi-activation du mutant I1721G est de  $3.5 \pm 0.4 \text{ mV}$  ( $n=17$ ) et celui du mutant I1721P est de  $9.3 \pm 0.3 \text{ mV}$  ( $n=8$ ).

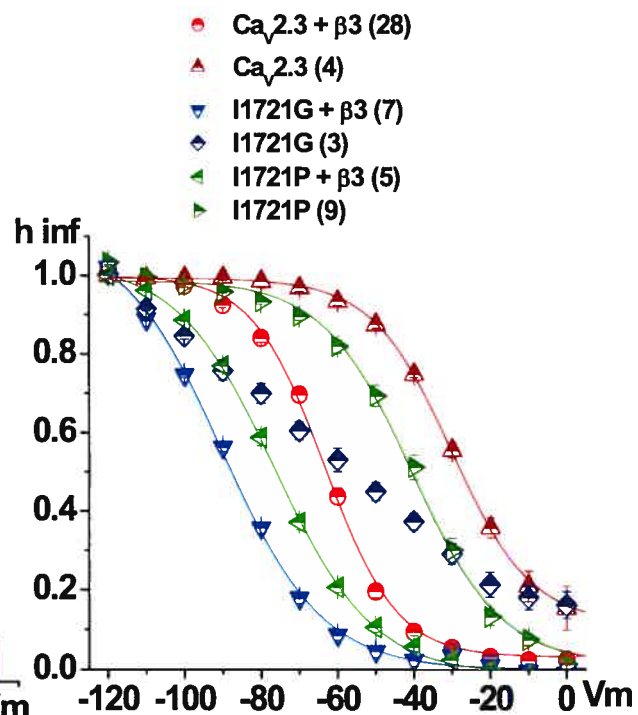
A.



B.



C.



**Figure 16 : Les mutations I1721G et I1721P modifient les cinétiques et la dépendance en voltage de l'inactivation du canal Ca<sub>v</sub>2.3**

**(A)** Les enregistrements des courants macroscopiques pour le canal Ca<sub>v</sub>2.3 sauvage et les mutants I1721G et I1721P ont été obtenus tel que décrit à la Figure 13. **(B)** Les ratios r<sub>50</sub> (la fraction du courant résiduel à la fin d'une pulse de 50 ms) correspondants sont présentés aux potentiels de 0, 10, 20 et 30 mV en présence et en absence de la sous-unité Ca<sub>v</sub>β3. **(C)** La dépendance en voltage de l'inactivation a été mesurée à la fin d'une série de préimpulsions dépolarisantes de 5 s appliqués à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV.

Cav $\alpha$ 1	Inactivation (5s) E <sub>0.5, inact</sub> (mV)		Activation E <sub>0.5, act</sub> (mV)		Maximum des courants I <sub>Ba</sub> ( $\mu$ A)	
	- Cav $\beta$ 3	+ Cav $\beta$ 3	- Cav $\beta$ 3	+ Cav $\beta$ 3	- Cav $\beta$ 3	+Cav $\beta$ 3
<b>Cav2.3 sauvage</b>	-31 $\pm$ 1 (4) z = 2.3	-63.9 $\pm$ 0.6 (28) z = 2.8	1.5 $\pm$ 0.4 (5) z = 3.4	-6.1 $\pm$ 0.3 (29) z = 4.1	-0.44 $\pm$ 0.07 (5)	-1.04 $\pm$ 0.08 (29)
<b>I1721G</b>	-64 $\pm$ 3 (3) z = 1.1	-90 $\pm$ 1 (8) z = 1.98	6.9 $\pm$ 0.2 (6) z = 2.7	3.4 $\pm$ 0.4 (19) z = 3.2	-0.14 $\pm$ 0.02 (6)	-0.74 $\pm$ 0.07 (19)
<b>I1721A</b>	-44 $\pm$ 2 (4) z = 1.8	-70.4 $\pm$ 0.9 (5) z = 2.1	-0.6 $\pm$ 0.1 (7) z = 3.7	-11.1 $\pm$ 0.3 (9) z = 5.2	-1.0 $\pm$ 0.1 (7)	-2.7 $\pm$ 0.3 (9)
<b>I1721L</b>	-44 $\pm$ 0.8 (5) z = 2.5	-72.2 $\pm$ 0.7 (5) z = 2.0	-8.8 $\pm$ 0.2 (9) z = 3.8	-14.1 $\pm$ 0.2 (10) z = 4.4	-1.4 $\pm$ 0.2 (9)	-2.3 $\pm$ 0.3 (10)
<b>I1721T</b>	-56 $\pm$ 3 (5) z = 1.7	-74.0 $\pm$ 0.6 (7) z = 2.13	-6.5 $\pm$ 0.2 (10) z = 3.7	-6.2 $\pm$ 0.3 (12) z = 4.8	-1.2 $\pm$ 0.3 (10)	-1.7 $\pm$ 0.3 (12)
<b>I1721V</b>	-58 $\pm$ 1 (7) z = 1.9	-85 $\pm$ 1 (8) z = 1.8	-1.1 $\pm$ 0.5 (7) z = 5.0	-4.1 $\pm$ 0.2 (15) z = 3.3	-0.9 $\pm$ 0.1 (7)	-1.1 $\pm$ 0.1 (15)
<b>I1721H</b>	-39 $\pm$ 4 (8) z = 1.2	-81 $\pm$ 1 (9) z = 2.4	1.8 $\pm$ 0.2 (13) z = 3.7	-6.4 $\pm$ 0.3 (15) z = 4.4	-1.0 $\pm$ 0.1 (13)	-2 $\pm$ 1 (15)
<b>I1721K</b>	n.d.	N/E (2)	n.d.	N/E (2)	n.d.	N/E (2)
<b>I1721R</b>	N/E (1)	N/E (2)	N/E (1)	N/E (2)	N/E (1)	N/E (2)
<b>I1721D</b>	n.d.	N/E (2)	n.d.	N/E (2)	n.d.	N/E (2)
<b>I1721E</b>	-44 $\pm$ 2 (8) z = 2.8	-73.7 $\pm$ 0.8 (5) z = 2.4	-3.4 $\pm$ 0.2 (6) z = 3.7	-3.4 $\pm$ 0.2 (8) z = 4.3	-1.0 $\pm$ 0.1 (6)	-2.2 $\pm$ 0.1 (8)
<b>I1721P</b>	-40 $\pm$ 1 (9) z = 2.2	-79 $\pm$ 1 (5) z = 1.8	9.3 $\pm$ 0.3 (11) z = 2.9	9.3 $\pm$ 0.3 (8) z = 3.2	-1.1 $\pm$ 0.2 (11)	-0.9 $\pm$ 0.1 (8)

**Tableau IV : Paramètres biophysiques du canal Ca<sub>v</sub>2.3 sauvage et des mutants I1721 exprimés dans les ovocytes de Xénope.**

Les courants macroscopiques ont été enregistrés avec la technique de voltage imposé à deux électrodes en présence de 10 mM Ba<sup>2+</sup>. La dépendance en voltage de l'inactivation a été mesurée après une série de prépulses dépolarisants de 5 s (de -120 mV à +10 mV) appliqués à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. Les données ont été ajustées à l'équation 1 de Boltzmann (voir section Matériel et Méthodes) avec le logiciel Origin 7.0. Les paramètres d'activation ont été estimés à partir des courbes courant-voltage et ajustés à l'équation 2 de Boltzmann. Les courants I<sub>Ba</sub> ont été déterminés à partir du courant maximum (« peak current ») des courbes courant-voltage. N.D.= non déterminé, N.E.= non exprimé. La sous-unité Ca<sub>v</sub>α2bδ a été co-injectée dans tous les cas.

---

### **III.2 Rôle du motif conservé VAVIM**

Les résultats des mutations obtenues au niveau du résidu I1721 soulève la question à savoir si les segments S6 des canaux calciques activés par la dépolarisation participent à la porte d'activation du canal dans un modèle où les segments S6 des canaux potassiques (Doyle et al., 1998 ; Jiang et al., 2002a ; Kuo et al., 2003, Long et al., 2005) forment le pore interne du canal. Pour répondre à cette question, nous avons entrepris l'étude des quatre résidus hydrophobes aux positions 1718 à 1722 (VAVM) adjacents au résidu I1721 dans le segment IVS6, et conservés chez tous les canaux calciques de type HVA.

### III.2.1 « Glycine Scan »

L'étude du rôle du motif VAVIM s'est effectuée en mutant les résidus par la glycine qui favorise la flexibilité des hélices. Les enregistrements des courants macroscopiques  $Ba^{2+}$  pour les mutants V1718G, A1719G, I1721G et M1722G sont présentés à la Figure 17A, avec l'analyse r50 correspondante à la Figure 17B. Tel que montré, le mutant V1718G n'a pas d'effet sur les cinétiques d'inactivation du canal entre 0 et 20 mV. Par contre, à 30 mV l'inactivation est plus rapide que le canal sauvage ( $p < 0.05$ ). Le plus grand changement est remarqué avec les quatre autres résidus. En effet, les cinétiques d'inactivation sont significativement plus lentes que le canal sauvage dans le cas des mutants A1719G ( $p < 0.005$ ) et V1720G ( $p < 10^{-5}$ ). Quant aux mutants I1721G et M1722G, contrairement aux deux mutants précédents, ils s'inactivent plus rapidement ( $p < 10^{-4}$ ) que le canal sauvage. La dépolarisation favorise cette inactivation rapide. Entre 0 et 20 mV, en absence de la sous-unité  $Ca_v\beta_3$  (figures 18A, B et C), paradoxalement le mutant V1718G s'inactive plus rapidement ( $p < 0.005$ ) et le mutant V1720G n'est pas modulé. Toutefois, à 30 mV, les cinétiques d'inactivation rapide du mutant V1718G se produisent aux mêmes taux que le mutant exprimé en présence de la sous-unité  $Ca_v\beta_3$  alors que celles du mutant V1720G sont significativement accélérées ( $p < 0.005$ ). Un ralentissement significatif de l'inactivation est observé dans le cas des mutants rapides I1721G et M1722G tout au long de la dépolarisation ( $p < 0.005$ ). Aucun changement significatif n'est observé pour le mutant A1719G.

La dépendance en voltage de l'inactivation du mutant A1719G ( $E_{0.5} = -71 \pm 0.6$  mV,  $n=8$ ) est légèrement décalée vers des potentiels plus négatifs que le canal sauvage. Cependant, les mutants V1718G ( $E_{0.5, inact} = -87 \pm 3$  mV,  $n=11$ ), V1720G ( $E_{0.5, inact} = -87 \pm 1$  mV,  $n=15$ ), I1721G ( $E_{0.5, inact} = -90 \pm 1$  mV,  $n=8$ ) et M1722G ( $E_{0.5, inact} = -95 \pm 1$  mV,  $n=12$ ), possédant des potentiels de mi-inactivation semblables, déplacent la courbe vers des potentiels

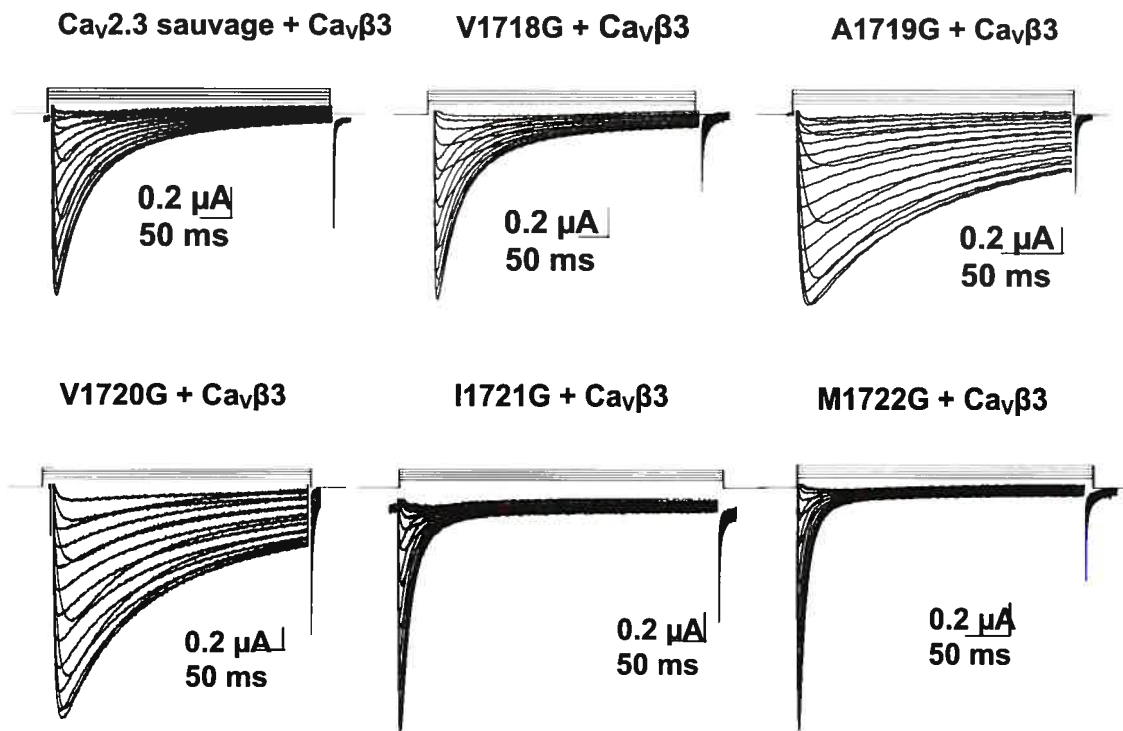


significativement plus négatifs (figure 17C). En absence de la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta 3$ , les potentiels de mi-inactivation des cinq mutants sont plus positifs que les mutants exprimés en présence de la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta 3$ , mais aussi plus négatifs que le potentiel de mi-inactivation du canal sauvage dans les mêmes conditions expérimentales (Tableau V).

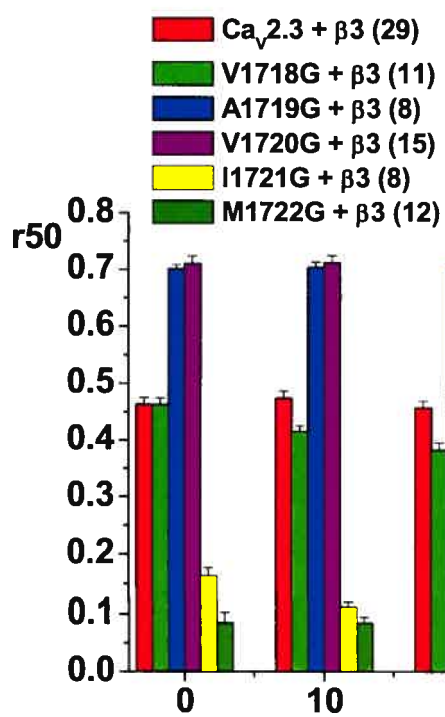
Une comparaison des potentiels de mi-activation et de mi-inactivation des résidus du motif VAVIM avec le canal sauvage est représentée à la Figure 19 sous forme d'histogramme. L'observation de la figure nous indique qu'en plus de la dépendance en voltage de l'inactivation, un changement au niveau de la dépendance en voltage de l'activation se produit. En effet, le canal  $\text{Ca}_v 2.3$  ( $E_{0.5,act} = -6.1 \pm 0.3$  mV,  $n=29$ ) s'active à des potentiels légèrement plus négatifs lorsqu'il est muté en V1718G ( $E_{0.5,act} = -10.2 \pm 0.4$  mV,  $n=18$ ) et très significativement pour les mutants A1719G ( $E_{0.5,act} = -22 \pm 1$  mV,  $n=9$ ) ( $\Delta = 14.9$  mV) et V1720G ( $E_{0.5,act} = -24 \pm 1$  mV,  $n=25$ ) ( $\Delta = 17.9$ ), alors que l'activation se produit à des potentiels plus positifs dans le cas des mutants I1721G ( $E_{0.5,act} = 3.4 \pm 0.4$  mV,  $n=19$ ) et M1722G ( $E_{0.5,act} = 4.4 \pm 0.3$  mV,  $n=17$ ).

Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec l'étude approfondie du résidu I1721 et des résidus adjacents (VAVM) nous amènent à conclure que le segment IVS6 du canal calcique  $\text{Ca}_v 2.3$  activé par la dépolarisation joue un rôle important dans le « gating ». En plus, la préservation de la régulation du canal par la sous-unité auxiliaire  $\text{Ca}_v\beta 3$  suggère que les effets observés sont dus intrinsèquement à la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 1$ .

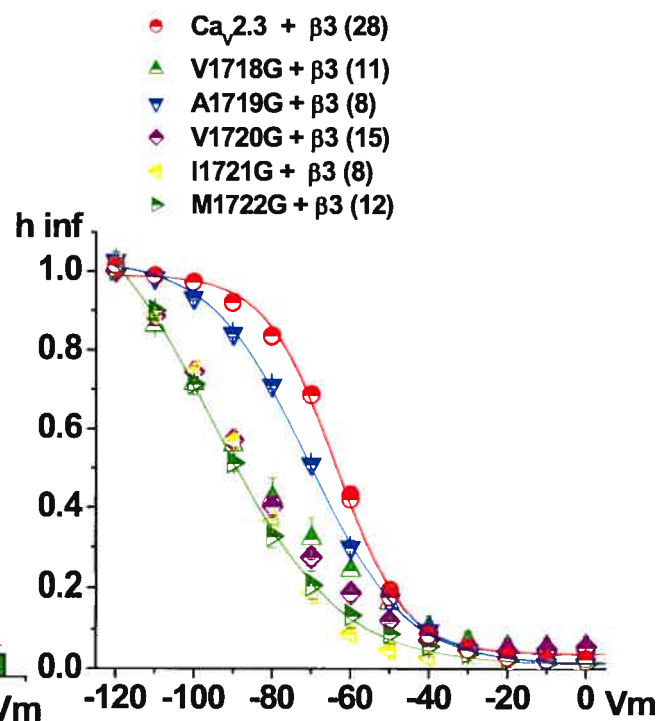
A.



B.

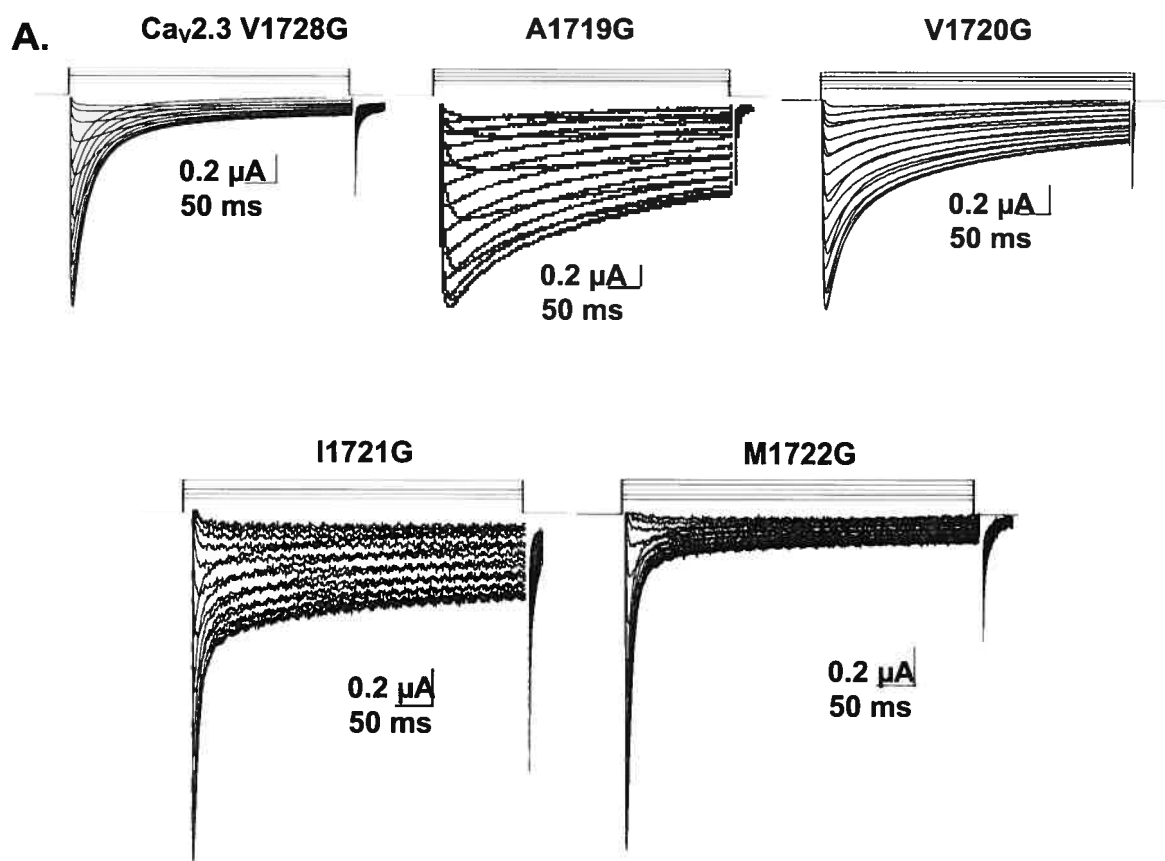


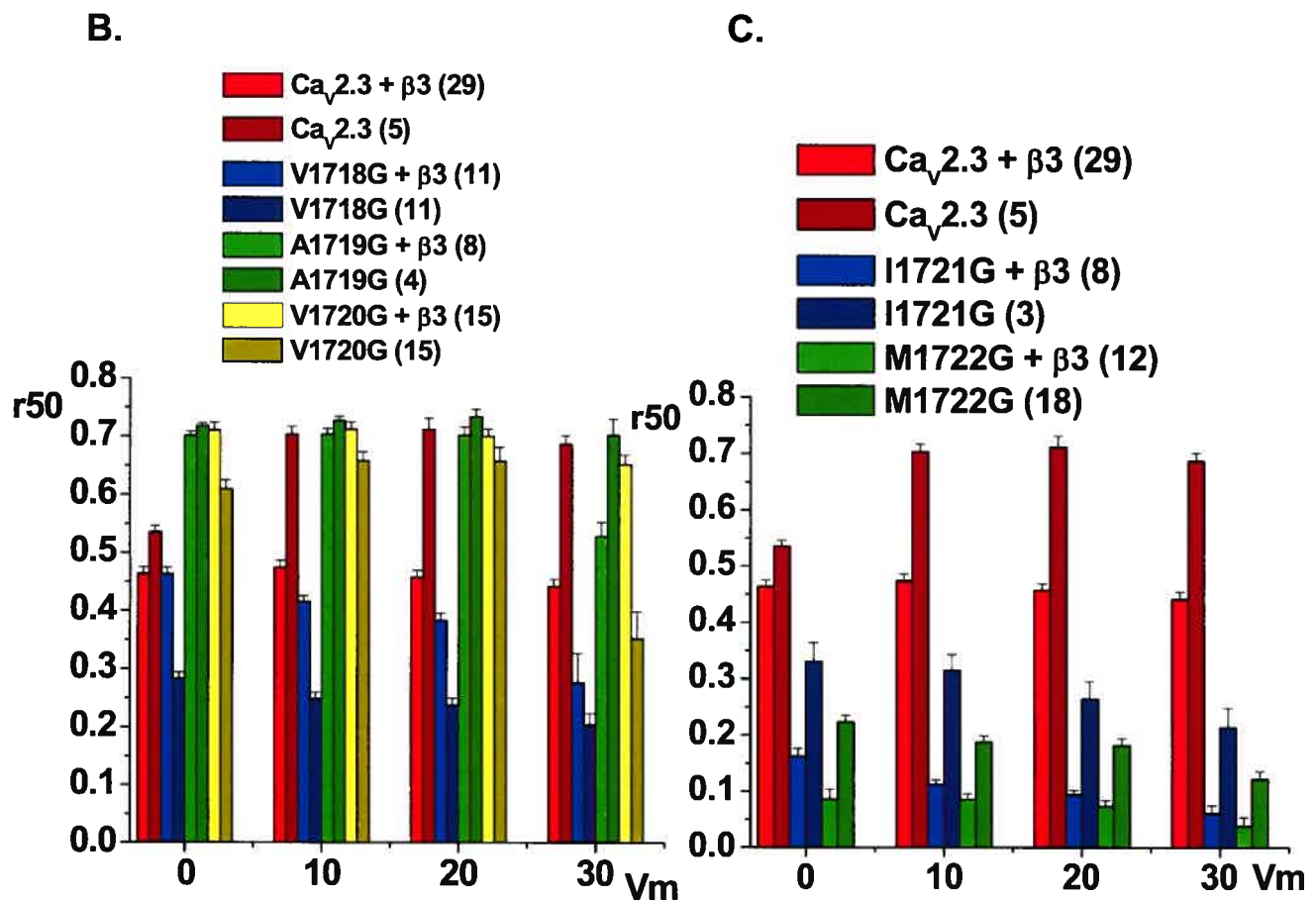
C.



**Figure 17 : Les résidus du motif hydrophobe VAVIM modifient les cinétiques et la dépendance en voltage de l'inactivation du canal  $Ca_v2.3$**

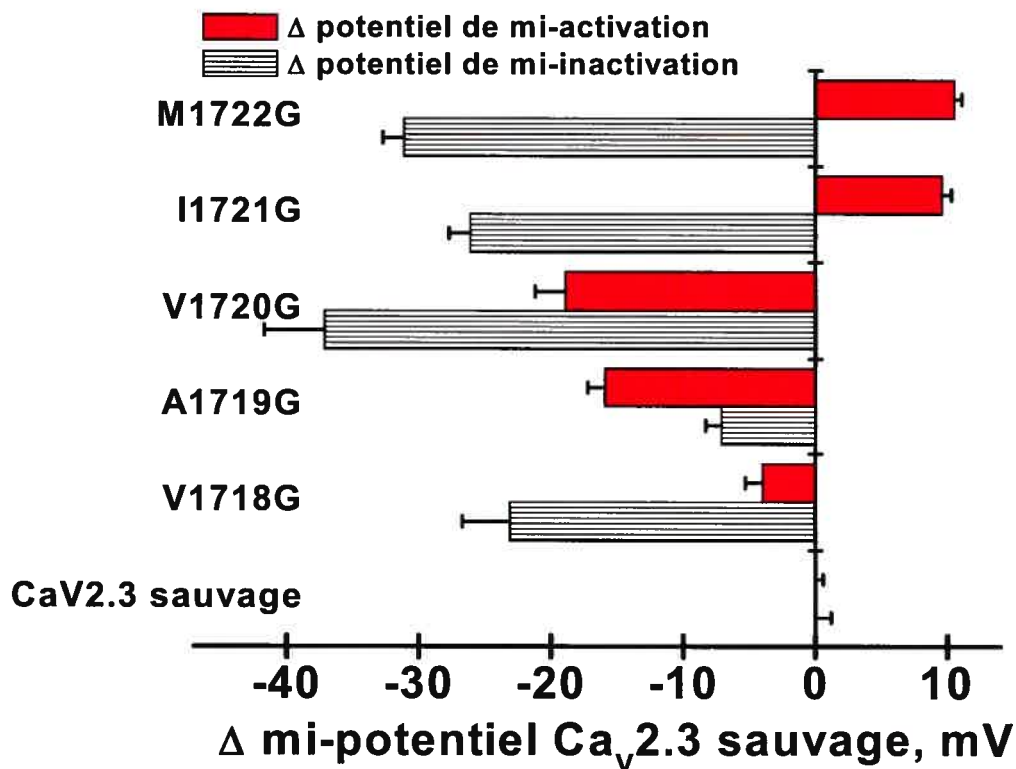
(A) Les enregistrements des courants macroscopiques pour le canal  $Ca_v2.3$  sauvage et les mutants V1718, A1719G, V1720G, I1721G et M1722G ont été obtenus tel que décrit à la Figure 13. (B) Les ratios  $r_{50}$  (la fraction du courant résiduel à la fin d'un pulse de 50 ms) correspondant sont présentés aux potentiels de 0, 10, 20 et 30 mV en présence de la sous-unité  $Ca_v\beta3$ . (C) La dépendance en voltage de l'inactivation a été mesurée à la fin d'une série de prépulses dépolarisants de 5 s appliqués à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV.





**Figure 18: Les cinétiques d'inactivation des résidus du motif hydrophobe VAVIM après mutation en Gly**

(A) Les enregistrements des courants macroscopiques pour le canal  $\text{Ca}_v2.3$  sauvage et les mutants V1718, A1719G, V1720G, I1721G et M1722G ont été obtenus tel que décrit à la Figure 13. (B), (C) Les ratios r50 (la fraction du courant résiduel à la fin d'un pulse de 50 ms) correspondants sont présentés aux potentiels de 0, 10, 20 et 30 mV en présence et en absence de la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta 3$ .



**Figure 19: Les mutations en Gly des résidus du motif hydrophobe VAVIM modifient les potentiels de mi-activation et de mi-inactivation du canal Ca<sub>v</sub>2.3**

Différence de potentiel de mi-activation et de mi-inactivation des mutants avec le canal calcique Ca<sub>v</sub>2.3 sauvage ( $\Delta = E_{0,5} \text{ Ca}_v2.3 \text{ sauvage} - E_{0,5} \text{ mutant}$ ). Les potentiels de mi-inactivation sont obtenus par l'ajustement à l'équation 1 de Boltzmann (voir Matériel et Méthodes) des données mesurées après une série de pré-pulses dépolarisants de 5 s (de -120 mV à +10 mV) appliqués à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. Les potentiels de mi-activation ont été estimés à partir des courbes courant-voltage obtenues suite à une série de pulses de potentiels (de -40mV à +50mV) de 450 ms appliqués à partir d'un potentiel de maintien de -120mV. Les valeurs des potentiels de mi-activation et de mi-inactivation sont présentées au Tableau V.

Ca <sub>v</sub> α1	Inactivation (5s) E <sub>0.5, inact</sub> (mV)		Activation E <sub>0.5, act</sub> (mV)		Maximum des courants I <sub>Ba</sub> (μA)	
	- Ca <sub>v</sub> β3	+ Ca <sub>v</sub> β3	- Ca <sub>v</sub> β3	+ Ca <sub>v</sub> β3	- Ca <sub>v</sub> β3	+Ca <sub>v</sub> β3
<b>Ca<sub>v</sub>2.3 sauvage</b>	-31 ± 1 (4) z = 2.3	-63.9 ± 0.6 (28) z = 2.8	1.5 ± 0.4 (5) z = 3.4	-6.1 ± 0.3 (29) z = 4.1	-0.44±0.07 (5)	-1.04±0.08 (29)
<b>V1718G</b>	-56 ± 2 (11) z = 2.2	-87 ± 3 (11) z = 1.6	-9.3 ± 0.3 (11) z = 3.7	-10.2±0.4 (18) z = 3.8	-1.0 ± 0.1 (11)	-0.61±0.03 (18)
<b>A1719G</b>	-44.4±0.3 (4) z = 2.6	-71.0 ± 0.6 (8) z = 2.0	-18 ± 1 (5) z = 5.0	-22 ± 1 (9) z = 5.7	-1.1 ± 0.2 (5)	-1.0 ± 0.1 (9)
<b>V1720G</b>	-64 ± 2 (15) z = 1.85	-87 ± 1 (15) z = 1.98	-22.4 ± 0.5 (18) z = 4.6	-24 ± 1 (25) z = 4.9	-1.4 ± 0.2 (18)	-1.3 ± 0.1 (25)
<b>M1722G</b>	-74 ± 3 (18) z = 1.3	-95 ± 1±0.7 (12) z = 1.7	-2.3 ± 0.3 (20) z = 3.3	-4.4 ± 0.3 (17) z = 3.6	-0.55±0.04 (20)	-1.1 ± 0.3 (17)
<b>I1721G</b>	-64 ± 3 (3) z = 1.1	-90 ± 1 (8) z = 1.98	6.9 ± 0.2 (6) z = 2.7	3.4 ± 0.4 (19) z = 3.2	-0.14±0.02 (6)	-0.74 ± 0.07 (19)

**Tableau V : Paramètres biophysiques du canal Ca<sub>v</sub>2.3 sauvage et des mutants VAVIM mutés exprimés dans les ovocytes de Xénope.**

Les courants macroscopiques ont été enregistrés avec la technique de voltage imposé à deux électrodes en présence de 10 mM Ba<sup>2+</sup>. La dépendance en voltage de l'inactivation a été mesurée après une série de prépulses dépolarisants de 5 s (de -120 mV à +10 mV) appliqués à partir d'un potentiel de maintien de -120 mV. Les données ont été ajustées à l'équation 1 de Boltzmann (voir section Matériel et Méthodes) avec le logiciel Origin 7.0. Les paramètres d'activation ont été estimés à partir des courbes courant-voltage et ajustés à l'équation 2 de Boltzmann. Les courants I<sub>Ba</sub> ont été déterminés à partir du courant maximum (« peak current ») des courbes courant-voltage. Les mesures ont toujours été effectuées en présence de la sous-unité auxiliaire Ca<sub>v</sub>α2bδ.

#### IV DISCUSSION

Le projet présenté ici a comme point de départ un projet différent qui concernait le rôle du C-terminal dans la fonction du canal  $Ca_v2.3$ . Nous avons créé une mutation non silencieuse en introduisant par la technique du PCR, un site de restriction *NdeI* (**C A / T A T G**) dans le segment IVS6 du canal calcique  $Ca_v2.3$  ( $\alpha 1E$ ). Ceci permet de remplacer une isoleucine par une histidine (**C A T**) à la position 1721 (I1721H). Le canal ainsi obtenu montrait des propriétés biophysiques très différentes du canal sauvage. Une recherche bibliographique nous a permis de découvrir que le résidu I1811 du canal  $Ca_v2.1$  ( $\alpha 1A$ ), correspondant au résidu I1721 du canal  $Ca_v2.3$ , est impliqué dans la migraine hémiplégique familiale de type 1 (MHF1) lorsqu'il est muté en leucine (Kraus et al., 1998). Les effets de la mutation I1811L et des autres mutations identifiées chez les patients atteints de la MHF1 sur les propriétés biophysiques des canaux de type P/Q ont été étudié dans des systèmes d'expression hétérologues. Il a été montré que ces mutations déplacent la dépendance en voltage de l'activation vers des potentiels plus négatifs, prolongent la durée d'ouverture des canaux et accélèrent les cinétiques d'inactivation. Une autre conséquence des mutations est la modification de la densité des canaux fonctionnels au niveau des neurones entraînant ainsi une baisse de la densité de courant (Tottene et al., 2002). Ceci pourrait avoir des effets sur l'activité neuronale et rendre les patients susceptibles aux attaques migraineuses.

Ce résultat ainsi que la cristallisation de nombreux canaux potassiques (Doyle et al., 1998 ; Jiang et al., 2002a ; Kuo et al., 2003, Long et al., 2005) nous ont incité à éclaircir le rôle des segments S6 dans le « gating » des canaux calciques. En effet, la cristallisation des structures en conformation fermée (canal KcsA) et ouverte (canal MthK) révèle la participation des segments S6 du pore interne dans l'activation des canaux lors de la dépolarisation de la membrane.

Pour ce projet de maîtrise, nous avons cherché à élucider le rôle du segment IVS6 dans le « gating » du canal calcique  $Ca_v2.3$  activé par la dépolarisation. Pour ce faire, nous avons étudié dans un premier temps, par mutagenèse dirigée, l'implication du résidu I1721 en le remplaçant par des résidus préservant l'hydrophobicité tels que Leu, Val et l'Ala qui altère également le volume. Les mutations en His, Glu, Arg, Lys et Asp altèrent à la fois la charge du résidu et le volume (de  $138,4 \text{ \AA}^3$  à  $173,4 \text{ \AA}^3$ ) (Zamyatin, 1972). La polarité au niveau de ce résidu a été testée par l'acide aminé neutre Thr et les résidus Gly et Pro ont été utilisés afin d'étudier la flexibilité des hélices- $\alpha$ . Ensuite, pour approfondir notre étude, nous avons muté les résidus hydrophobes adjacents (V1718, A1719, V1720, M1722) au résidu I1721 qui sont conservés au niveau de tous les canaux  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$  qui s'activent à de fortes dépolarisations. Les mutants ont été étudiés par électrophysiologie après expression dans des oeufs de Xénope en présence de la sous-unité  $Ca_v\alpha2\delta$  et en présence ou en absence de  $Ca_v\beta3$ .

Le canal  $Ca_v2.3$  joue un rôle important dans l'excitabilité neuronale et dans la relâche de neurotransmetteurs et d'hormones au niveau de nombreux neurones tels que les neurones du globus pallidus, les neurones oxytocines et les cellules chromaffines de la médullosurrénale (Wu et al., 1998; Wang et al., 1999, Hanson et Smith, 2002). Dans la membrane présynaptique, la localisation du canal  $Ca_v2.3$  étant plus importante dans des zones éloignées du site actif de la relâche de neurotransmetteurs, son rôle serait moins important que les canaux neuronaux de type N et P/Q. Le canal  $Ca_v2.3$  est aussi responsable du flux calcique dendritique des neurones pyramidaux de l'hippocampe à la suite du déclenchement du potentiel d'action (Sabatini et al., 2000) et serait impliqué dans la potentialisation à long terme des fibres moussues (Dietrich et al., 2003). Des études électrophysiologiques ont permis à l'équipe de Grassi d'identifier pour la première fois la présence des canaux  $Ca_v2.3$  dans les astrocytes de rat. Ces canaux aurait donc aussi un rôle à jouer dans la production du signal



calcique des cellules gliales, contribuant ainsi à la relâche de neurotransmetteurs (D'Ascenzo et al., 2004)

#### **IV.1 Le résidu I1721 est impliqué dans les propriétés d'activation du canal Ca<sub>v</sub>2.3.**

La première étape de ce travail a consisté à muter le résidu isoleucine par des résidus de propriétés chimiques et physiques (hydrophobicité, charge, polarité et taille) différentes afin de faire ressortir la corrélation entre les propriétés du résidu I1721 et les propriétés biophysiques du canal Ca<sub>v</sub>2.3. Le mutant I1721L possède des cinétiques d'inactivation identique au canal Ca<sub>v</sub>2.3 sauvage telle que mesurées à 50 ms. Les résidus isoleucine et leucine sont des résidus hydrophobes de même taille (166,7Å<sup>3</sup>) (Zamyatin, 1972). La différence entre ces deux résidus se situe uniquement au niveau du branchement d'un groupement méthyle dans la chaîne latérale. Malgré cette quasi-similitude, le mutant I1721L déplace légèrement mais significativement la dépendance en voltage de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs ( $\Delta h_{inf} = -8,3$  mV) que ceux du canal sauvage.

Notre étude de mutagenèse détaillée n'a pu identifier un facteur unique qui expliquerait l'influence du résidu à la position 1721 sur les cinétiques d'inactivation. Le mutant alanine, dans lequel I est remplacé par un acide aminé hydrophobe et non polaire de petite taille tend à s'inactiver comme le canal Ca<sub>v</sub>2.3 sauvage. Toutefois, il est surprenant de voir que le plus petit résidu glycine, par ailleurs un acide aminé hydrophobe, non polaire comme l'alanine, est le mutant qui affecte le plus les propriétés biophysiques du canal. Cet effet du résidu glycine sur les cinétiques d'inactivation peut être expliqué essentiellement par l'absence de chaîne latérale, ce qui permet à ce résidu d'adopter les conformations qui sont stériquement interdites pour d'autres acides aminés. Ceci permet de conférer un certain degré de flexibilité locale à la structure peptidique. La proline, tout comme la glycine,

est un acide aminé influençant la conformation de la chaîne peptidique. Elle confère une forte rigidité au squelette peptidique et peut introduire des brisures locales au sein des hélices- $\alpha$  transmembranaires. En effet, la rigidité et la non disponibilité de son amine pour former des liaisons hydrogène conviennent mal aux structures secondaires régulières. Bien que ces deux résidus aient des propriétés opposées, les cinétiques d'inactivation du mutant I1721P sont presque semblables à celles du mutant I1721G. Le mutant I1721V, également hydrophobe et non polaire, possédant une chaîne latérale de plus grande taille que les acides aminés alanine et glycine, mais plus petite que celle du résidu isoleucine du canal sauvage, produit des cinétiques d'inactivation plus rapides. On peut noter qu'il existe une balance presque parfaite entre la valine et l'isoleucine, deux acides aminés qui sont très proches chimiquement et souvent interchangeableables au niveau structural (Callebaut et al., 1997). Par contre, la polarité de la chaîne latérale semble affecter les cinétiques d'inactivation. En effet, les cinétiques d'inactivation du résidu I1721T (polaire, neutre) sont accélérées comparativement à celles du canal de type sauvage.

D'après les résultats obtenus suite à la substitution du résidu I1721 par des résidus chargés, la charge semblerait moduler de façon significative l'inactivation. En effet, les acides aminés histidine, chargé positivement à pH physiologique, et glutamate, chargé négativement, accélèrent les cinétiques d'inactivation du canal  $Ca_v2.3$ . L'inactivation du mutant I1721E est plus rapide que celle du mutant I1721H, ce qui pourrait suggérer qu'une charge négative à la position 1721 aurait un plus grand effet sur les cinétiques d'inactivation du canal qu'une charge positive. Toutefois, aucune conclusion ne peut être retenue, car des mutations par les résidus arginine (chargé positivement), lysine (chargé positivement) et aspartate (chargé négativement) n'ont produit aucun courant. En raison de l'impossibilité de vérifier l'expression membranaire des trois mutants par immunobuvardage avec l'anticorps commercial pour  $Ca_v2.3$ , il est difficile d'établir la raison pour

laquelle ces mutants ne sont pas exprimés. Cela peut découler d'un problème dans la biogenèse de la protéine (repliement, glycosylation, targetting, insertion dans la membrane, rapide turnover, etc) mais aussi peut indiquer que les propriétés de ces protéines sont incompatibles, ne permettant plus le passage des ions.

Le changement des cinétiques d'inactivation provoqué par les mutations effectuées au niveau du résidu I1721 du segment IVS6 est accompagné d'un changement de la dépendance en voltage de l'inactivation du canal  $Ca_v2.3$ . Ainsi, un déplacement de la dépendance en voltage de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs a été observé pour tous les mutants. Les acides aminés glycine, proline et valine sont ceux qui affectent le plus la dépendance en voltage de l'inactivation ( $E_{0,5,inact}$  entre -79 et -90 mV) et les acides aminés alanine, leucine, glutamate et thréonine ont une dépendance en voltage de l'inactivation à des potentiels intermédiaires entre ceux du canal sauvage et ceux des trois autres mutants (glycine, proline, valine) ( $E_{0,5,inact}$  entre -71 et -74 mV) (voir tableau IV de la section des résultats). Ces résultats semblent indiquer que les cinétiques d'inactivation et la dépendance en voltage de l'inactivation seraient gouvernées par des mécanismes semblables mais pas toujours identiques et nous suggèrent de plus qu'il n'existe pas de corrélation directe ou unique entre le « gating » et les propriétés chimiques et physiques du résidu I1721.

Les propriétés d'activation du canal sont également altérées par les mutations du résidu I1721, mais ne semblent pas non plus être fonction d'une seule des propriétés du résidu par lequel il est substitué. Les résidus glycine et proline, ayant une influence sur la conformation de la chaîne peptidique, déplacent la dépendance en voltage de l'activation vers des potentiels plus positifs que le canal sauvage. La proline qui produit le plus grand changement, pourrait favoriser la conformation ouverte. Les acides aminés hydrophobes, leucine et alanine, déplacent légèrement l'activation

vers des potentiels plus négatifs, alors que les autres résidus hydrophobes (valine et thréonine) ne changent pas la dépendance en voltage de l'activation, tout comme les résidus chargés (histidine et glutamate).

#### **IV.2 Les résidus adjacents (VAVM) au résidu I1721 modifient les paramètres d'inactivation du canal $Ca_v2.3$**

Le fait que le résidu I1721 fasse partie d'un motif hydrophobe (VAVIM) conservé strictement à la fin de l'hélice IVS6 de tous les canaux calciques de type HVA (Figure 20), nous a conduit à déterminer le rôle des résidus voisins de ce motif dans le « gating » des canaux  $Ca_v2.3$ . Nous avons muté ces résidus par la glycine, un résidu connu pour conférer aux polypeptides une certaine flexibilité et aussi parce que c'est le résidu qui avait le plus affecté les propriétés du canal  $Ca_v2.3$  lors des mutations du résidu I1721. Les résultats obtenus indiquent un ralentissement des cinétiques d'inactivation pour les mutants A1719G et V1720G et une accélération pour les mutants I1721G et M1722G. Le mutant V1718G n'affecte pas les cinétiques. On observe également un changement au niveau de la dépendance en voltage de l'inactivation et de l'activation. Alors que la dépendance en voltage de l'inactivation du mutant A1719G est déplacée vers des potentiels légèrement plus négatifs que ceux du canal sauvage, l'inactivation des mutants V1718G, V1720G, I1721G et M1722G à des potentiels plus négatifs est très significative. Du point de vue de l'activation, sauf dans le cas du mutant V1718G, qui se comporte comme le canal sauvage, les autres mutants affectent de façon significative la dépendance en voltage de l'activation. Les mutations même conservatrices du résidu I1721 produisent des effets significatifs sur les cinétiques et aussi sur les potentiels d'activation et de mi-inactivation. Dans tous les cas, l'inactivation se produit à des  $V_m$  plus négatifs que le canal sauvage. Il est à noter que les mutations de charge dans la boucle I-II ralentissaient les cinétiques et amenaient le canal à s'inactiver à des  $V_m$  plus positifs sans

aucun effet sur l'activation (Berrou et al., 2001 ; Dafi et al., 2004). Les observations rapportées ici suggèrent donc que les effets observés sur l'inactivation pourraient être conséquents aux effets des mutations sur l'activation du canal dans un modèle où l'inactivation et l'activation sont couplées. Toutefois, il a été démontré que l'inactivation peut aussi se produire directement à partir de l'état fermé dans les canaux  $Ca_v2.3$  (Jones et al., 1998). Les mutants I1721G et M1722G déplacent la dépendance en voltage de l'activation vers des potentiels plus positifs, ce qui pourrait suggérer, avec l'accélération des cinétiques d'inactivation, une déstabilisation du canal en conformation ouverte, c'est-à-dire une diminution des temps d'ouverture du canal. Cette hypothèse devrait être vérifiée en canal unitaire. Il est plus difficile d'expliquer les cinétiques d'inactivation observées pour les mutants A1719G et V1720G. Dans ces deux derniers cas, les cinétiques d'inactivation sont ralenties ce qui pourrait supposer une stabilisation de l'état ouvert. Toutefois, l'activation et l'inactivation se produisent à des potentiels membranaires plus négatifs qui sont incompatibles avec une simple stabilisation de l'état ouvert. Il est donc probable que le ralentissement des cinétiques résulte de plusieurs effets partiellement contradictoires.

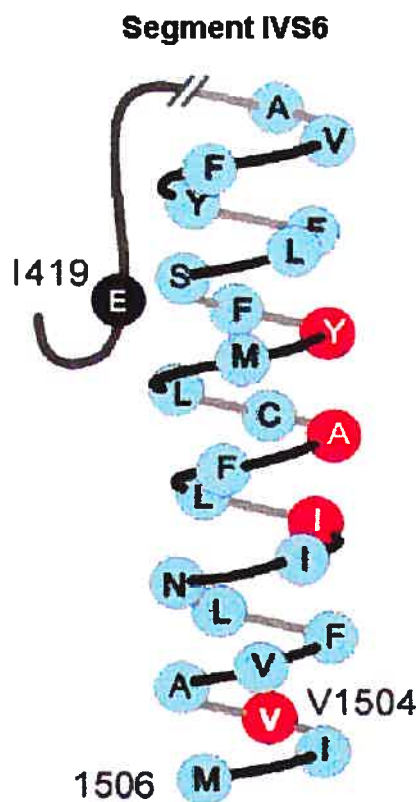
D'après ces résultats, nous proposons que le résidu I1721 avec les résidus V1718, A1719, V1720 et M1722 jouent un rôle important dans le recourbement de l'hélice IVS6 lors de l'ouverture du canal et nous proposons également que la position des résidus est importante dans le « gating » d'activation et d'inactivation des canaux calciques. En effet, les résidus VAVIM sont situés à l'extrémité cytoplasmique du segment IVS6 formant le pore interne (Figure 20) du canal  $Ca_v2.3$ . Cette observation confirme des résultats obtenus avec les canaux  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v2.1$ . Ainsi, l'équipe de Hering (Berjukow et al., 1999) a identifié le résidu V1504 du canal  $Ca_v1.2$  du lapin (équivalent au résidu V1720 du canal  $Ca_v2.3$ ) comme étant un déterminant crucial de l'inactivation de ce canal. En effet, une simple

substitution de la valine par l'alanine provoque une diminution des cinétiques d'inactivation du canal. Ces travaux concordent bien avec le ralentissement des cinétiques du canal  $Ca_v2.3$  que nous avons obtenus avec la mutation V1720G, ce qui suggère donc un rôle important de la séquence VAVIM dans les propriétés de « gating » des canaux calciques.

Nos résultats viennent en quelque sorte compléter les travaux récents des équipes de Yang (Zhen et al., 2005) et de Hering (Hohaus et al., 2005 ; Berjukow et al., 2001). Dans le premier cas, les études du groupe de Yang consistaient à identifier l'architecture du pore interne du canal calcique  $Ca_v2.1$  par la technique du SCAM (« Substitued-Cysteine Accessibility Method »). Pour ce faire, ils ont procédé à la mutation de chacun des résidus du pore interne par un résidu cystéine (1 substitution par mutant) et ont utilisé des agents tels que le MTSET (méthanethiosulfonate éthyltriméthylammonium) pour observer l'accessibilité des résidus S6. Par cette méthode, plusieurs résidus contigus situés sur chacun des quatre segments ont été modifiés par l'agent oxydant MTSET, indiquant ainsi que le pore interne du canal est formé par les segments S6. Au niveau du segment IVS6, le résidu D1821 (D1723 chez  $Ca_v2.3$ ) formerait l'interface membrane/cytoplasme et les résidus placés au dessus (dont le motif conservé VAVIM) seraient les résidus accessibles seulement dans l'état ouvert. Cependant, ce groupe n'a pas caractérisé le rôle des résidus dans les propriétés d'activation et d'inactivation du canal.

Des résultats obtenus dernièrement par l'équipe de Hering (Hohaus et al., 2005) mettent aussi en lumière le rôle du S6 du domaine II (IIS6) dans l'activation et l'inactivation du canal calcique  $Ca_v1.2$  ( $\alpha 1C$ ). Par la technique de mutagenèse dirigée, ils ont substitué le motif LAIA des résidus 779-782 conservés au niveau de tous les canaux de type  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$  par des résidus de taille, de polarité et d'hydrophobicité différentes. Ils ont constaté un déplacement de la courbe de la dépendance en voltage de l'activation du

canal vers des potentiels plus négatifs que le canal de type sauvage et un ralentissement de l'inactivation, suggérant ainsi le rôle possible des segments S6 dans les propriétés biophysiques des canaux calciques. Un autre travail réalisé par la même équipe sur le canal  $Ca_v2.1$ , montre que des mutations des résidus M1811 (Q, N, E, K), L1812 (I), N1813 (A) et A1817 (M) (équivalents aux résidus M1713, L1714, N1714 et A1719 respectivement du canal  $Ca_v2.3$ ) accélèrent les cinétiques d'inactivation du canal (Berjukow et al., 2001).



**Figure 20 : Le segment IVS6 des canaux calciques activés par la dépolarisation.**

Représentation de l'hélice- $\alpha$  de la séquence en acides aminés du segment IVS6 du canal  $Ca_v1.2$  du lapin. La similarité avec le canal  $Ca_v2.3$  se situe au niveau des résidus VAVIM situés à l'extrémité interne de l'hélice (Tiré de Hering et al., 2000). Les résidus déterminant l'inactivation du canal  $Ca_v1.2$  au niveau du segment IVS6 sont indiqués en rouge.

### IV.3 La sous-unité $Ca_v\beta_3$ module la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ même après mutation des résidus du motif VAVIM

Les sous-unités  $Ca_v\beta$  régulent l'activité des canaux calciques HVA activés par la dépolarisation ainsi que leur expression à la membrane (Brice et al., 1997; Walker et De Waard, 1998). Le site principal d'interaction des sous-unités  $Ca_v\alpha_1$  avec la sous-unité  $Ca_v\beta$  se fait par l'intermédiaire du site AID (« Alpha Interaction Domain ») situé sur la boucle intracellulaire entre les domaines I et II de la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$ .

Dans le but de déterminer si la substitution des résidus V1718, A1719, V1720, I1721 et M1722 au niveau du segment IVS6 interfère avec la régulation par la sous-unité  $Ca_v\beta$ , nous avons injecté, dans les oeufs de *Xenopus laevis*, nos mutants sans la sous-unité  $Ca_v\beta_3$ . Dans presque tous les cas, l'absence de la sous-unité  $Ca_v\beta_3$  provoque un ralentissement des cinétiques d'inactivation. Sauf pour les mutants I1721A, I1721H, I1721P et A1719G. Le potentiel de mi-inactivation est par ailleurs toujours déplacé vers des potentiels plus positifs ( $\Delta h_{inf} \sim 30$  mV) de façon similaire à celui du canal  $Ca_v2.3$  sauvage, en absence de la sous-unité  $Ca_v\beta_3$ . Ces résultats indiquent que la sous-unité  $Ca_v\beta_3$  continue de moduler la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$  même après la mutation des résidus du motif conservé VAVIM, ce qui tend à démontrer un rôle intrinsèque du segment IVS6 dans l'activation du canal  $Ca_v2.3$ . Nous ne pouvons expliquer l'absence de modulation des cinétiques sauf pour le mutant I1721P qui procure une rigidité au segment IVS6 qui serait incompatible avec la modulation par  $Ca_v\beta_3$ .



#### **IV.4 Modèle moléculaire du « gating » des canaux calciques activés par la dépolarisation**

L'objectif de ce travail était d'identifier le rôle du motif conservé VAVIM du segment IVS6 dans le « gating » du canal calcique  $Ca_v2.3$ . Les résultats obtenus suite à la caractérisation électrophysiologique de la substitution du résidu I1721 par des résidus d'hydrophobicité, de charge, de polarité et de taille différents et ainsi que la substitution par la glycine des résidus adjacents (V1718, A1719, V1720, M1722) indiquent un effet significatif au niveau de la dépendance en voltage de l'activation et de l'inactivation et ainsi que sur les cinétiques d'inactivation du canal, ce qui suggère l'implication de ce motif dans le « gating » du canal calcique  $Ca_v2.3$ . De plus, le fait que ce motif soit conservé chez tous les canaux de type  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$ , le « gating » de ces canaux pourrait être gouverné par un même mécanisme.

Toutefois, la structure tridimensionnelle des canaux calciques activés par le voltage reste encore à élucider. Les résultats obtenus appuient un modèle moléculaire dans lequel les segments S6 des domaines transmembranaires pourraient être importants dans l'activation des canaux. En effet, dans ce modèle, il est suggéré (Stotz et al., 2000 ; Berrou et al., 2001 ; Dafi et al., 2004) que la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v\alpha1$  des canaux calciques pourrait jouer le rôle d'une particule d'inactivation par analogie aux mécanismes « hinged-lid » des canaux sodiques (Eaholtz et al., 1994) et « ball and chain » des canaux potassiques (Hoshi et al., 1991). Ainsi, l'inactivation impliquerait un changement conformationnel de la boucle I-II qui pourrait alors obstruer physiquement la région interne du pore formé par les segments S6.

## IV.5 Perspectives

Nos travaux suggèrent un rôle important du segment IVS6 dans le « gating » des canaux HVA. Pour les travaux ultérieurs, nous voudrions donc déterminer le rôle des autres segments IS6, IIS6 et IIIS6 dans les propriétés biophysiques (activation et inactivation) des canaux calciques activés par la dépolarisation. Une comparaison de la séquence en acides aminés démontre que les trois autres segments S6, tout comme le segment IVS6, présentent des résidus hydrophobes conservés strictement au niveau de tous les canaux calciques  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$ . Dans le but de déterminer la flexibilité des hélices- $\alpha$ , il serait intéressant d'effectuer des mutations en glycine et en proline de tous ces résidus. Des mutations au niveau des segments S6 des canaux calciques sont impliquées dans de nombreuses canalopathies. Récemment, l'équipe de Keating a montré que deux résidus glycines (en rouge), un situé dans la séquence hydrophobe (G402R chez les sujets atteints) et l'autre à l'extrémité du segment IS6 (G406S) du canal calcique  $Ca_v1.2$  seraient impliqués dans le syndrome de Timothy, caractérisé par un allongement de l'intervalle QT (Splawski et al., 2005). Au laboratoire, le projet de recherche d'Alexandra Raybaud qui étudie les arythmies ventriculaires associées au syndrome de Timothy consiste à élucider le rôle de ces résidus.

### Segment IS6:

```

Cav1.1  W I Y F V T L I I I G S F F I L N L V L G V L S G E F
Cav1.2  W V Y F V S L V I f G S F F V L N L V L G V L S G E F
Cav2.1  W L Y F I P L I I I G S F F M L N L V L G V L S G E F
Cav2.2  W L Y F I P L I I I G S F F M L N L V L G V L S G E F
Cav2.3  W L Y F I P L I I I G S F F V L N L V L G V L S G E F

```

## Segment IIS6:

Cav1.1 CIYFIILFVCGNYILLNVFLAIAV  
 Cav1.2 CIYFIILFICGNYILLNVFLAIAV  
 Cav2.1 SIYFIILTLFGNYTLLNVFLAIAV  
 Cav2.2 SFYFIILTLFGNYTLLNVFLAIAV  
 Cav2.3 SVYFIILTLFGNYTLLNVFLAIAV

## Segment IIIS6:

Cav1.1 AIFFIYYIIIIAFFMMNIFVGFVI  
 Cav1.2 SIFFIYYIIIIAFFMMNIFVGFVI  
 Cav2.1 SIFYVVYFVVFPPFFVNIFVALII  
 Cav2.2 SIFYVVYFVVFPPFFVNIFVALII  
 Cav2.3 SIFYVVYFVVFPPFFVNIFVALII

D'après les structures cristallines des canaux potassiques où les segments M2 (S6) du canal KcsA (état fermé) sont bien droits mais ils sont déployés vers l'intérieur de la protéine dans le cas du canal MthK (état ouvert), MacKinnon et son équipe proposent qu'une glycine du segment M2, très conservée dans différents canaux potassiques, confère à la chaîne peptidique la flexibilité requise pour faire pivoter le segment S6 lors de l'ouverture du pore (Jiang et al., 2002b). Dans la séquence des canaux calciques, il existe également un résidu glycine conservé dans le segment IS6 et un autre dans le segment IIS6 aux positions équivalentes des canaux potassiques. Il serait donc important de tester ces deux glycines afin d'établir un modèle complet de « gating » des canaux calciques.

## V. BIBLIOGRAPHIE

Ahern C.A., Powers P.A., Biddlecome G.H., Roethe L., Vallejo P., Mortenson L., Strube C., Campbell K.P., Coronado R., Gregg R.G. (2001). "Modulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current but not activation of  $\text{Ca}^{2+}$  release by the gamma1 subunit of the dihydropyridine receptor of skeletal muscle." *BMC Physiol.* **1**:8.

Almers W., McCleskey E.W. (1984). "Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore." *J Physiol.* **353**: 585–608.

Arikkath J., Campbell K.P. (2003). "Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex." *Curr Opin Neurobiol.* **13**(3): 298-307.

Barrett C.F., Cao Y.Q., Tsien R.W. (2005). "Gating deficiency in a familial hemiplegic migraine type 1 mutant P/Q-type calcium channel." *J Biol Chem.* **280**(25): 24064-71.

Barritt, G.J. (1999). "Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling requirements." *Biochem J.* **337** ( Pt 2): 153-169.

Benatar, M.G. (1999). "Calcium channelopathies." *Q J Med* **92**: 133-141.

Berjukow S., Gapp F., Aczel S., Sinnegger M.J., Mitterdorfer J., Glossmann H., Hering S. (1999). "Sequence differences between alpha1C and alpha1S  $\text{Ca}^{2+}$  channel subunits reveal structural determinants of a guarded and modulated benzothiazepine receptor." *J Biol Chem.* **274**(10): 6154-60.

Berjukow S., Marksteiner R., Sokolov S., Weiss R.G., Margreiter E., Hering S. (2001). "Amino acids in segment IVS6 and beta-subunit interaction support distinct conformational changes during  $\text{Ca}_v2.1$  inactivation." *J Biol Chem.* **276**(20): 17076-82.

Bernatchez G., Berrou L., Benakezouh Z., Ducay J., Parent L. (2001a). "Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the  $\text{Ca}_v2.3$  channel." *Biochim Biophys Acta* **1514**(2): 217-229.

Bernatchez G., Sauve R., Parent L. (2001b). "State-dependent inhibition of inactivation-deficient  $\text{Ca}_v1.2$  and  $\text{Ca}_v2.3$  channels by mibefradil." *J Membr Biol.* **184**(2): 143-159.

- Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4(7)**: 517-529.
- Berrou L., Bernatchez G., Parent L. (2001). "Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of alpha1E (Ca<sub>v</sub>2.3) calcium channels." *Biophys J.* **80(1)**: 215-228.
- Black , J.L. (2003). "The voltage-gated calcium channel gamma subunits: a review of the literature." *J Bioenerg Biomembr.* **35(6)**: 649-660.
- Blaustein M.P., Juhaszova M., Golovina V.A., Church P.J., Stanley E.F. (2002). "Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications." *Ann N Y Acad Sci.* **976**: 356-366.
- Bourinet E. Soong T.W., Sutton K., Slaymaker S., Mathews E., Monteil A., Zamponi G.W., Nargeot J., Snutch T.P. (1999). "Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P-and Q-type calcium channels." *Nat Neurosci.* **2(5)**: 407-415.
- Brice N.L., berrrow N.S., Campbell V., Page K.M., Brickley K., Tedder I., Dolphin A.C. (1997). "Importance of the different beta subunits in the membrane expression of the alpha1A and alpha2 calcium channel subunits: studies using a depolarization-sensitive alpha1A antibody." *Eur J Neurosci.* **Apr;9(4)**: 749-759.
- Budde T., Meuth S., Pape H.C. (2002). "Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels." *Nat Rev Neurosci.* **3(11)**: 873-883.
- Callebaut I., Labesse G., Durand P., Poupon A., Canard L., Chomilier J., Henrissat B., Mornon J. P. (1997). "Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives." *Cell Mol Life Sci* **53(8)**: 621-645.
- Carrera P., Stenirri S., Ferrari M., Battistini S. (2001). "Familial hemiplegic migraine: a ion channel disorder." *Brain Res Bull.* **56(3-4)**: 239-241.
- Castellano A., Wei X., Birnbaumer L., Perez-Reyes E. (1993). "Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit." *J Biol Chem.* **268(17)**: 12359-12366.
- Catterall, W.A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels." *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**: 521-555.

Catterall W.A., Striessnig J., Snutch T.P., Perez-Reyes E.; (2003). "International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels." *Pharmacol Rev.* **55(4)**: 579-581.

Chen Y.H., Li M.H., Zhang Y., He L.L., Yamada Y., Fitzmaurice A., Shen Y., Zhang H., Tong L., Yang J. (2004). "Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels." *Nature* **429(6992)**: 675-680.

Chien A.J., Carr K.M., Shirokov R.E., Rios E., Hosey M.M. (1996). "Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channels B2a subunit and effects on channel function." *J Biol Chem.* **271**: 26465-26468.

Cuello L.G., Romero J.G., Cortes D.M., Perozo E. (1998). "pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> channel." *Biochemistry* **37(10)**: 3229-3236.

Dang T.X., McCleskey E.W. (1998). "Ion channel selectivity through stepwise changes in binding affinity." *J Gen Physiol.* **111(2)**: 185-193.

D'Ascenzo M., Vairano M., Andreassi C., Navarra P., Azzena G.B., Grassi C. (2004). "Electrophysiological and molecular evidence of L-(Ca<sub>v</sub>1), N-(Ca<sub>v</sub>2.2), and R- (Ca<sub>v</sub>2.3) type Ca<sup>2+</sup> channels in rat cortical astrocytes." **45(4)**: 354-363.

Denier C., Ducros A., Durr A., Eymard B., Chassande B., Tournier-Lasserre E. (2001). "Missense CACNA1A mutation causing episodic ataxia type 2." *Arch Neurol.* **58(2)**: 292-295.

De Waard M., Pragnell M., Campbell K.P. (1994). "Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved beta subunit domain." *Neuron* **13(2)**: 495-503.

DeWaard M., Campbell K.P. (1995). "Subunit regulation of the neuronal  $\alpha$ 1A Ca<sup>2+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes." *J physiol.* **485**: 619-634.

Doering C.J., Zamponi G.W. (2003). "Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels." *J Bioenerg Biomembr.* **35 (6)**: 491-505.

Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity." *Science* **280**: 69-77.

Eaholtz G., Scheuer T., Catterall W.A.. (1994). "Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide." *Neuron* **12(5)**: 1041-1048.

Ellinor P.T., Yang J., Sather W.A., Zhang J.F., Tsien R.W. (1995). "Ca<sup>2+</sup> channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca<sup>2+</sup> interactions." *Neuron* **15(5)**: 1121-1132.

Felix, R. (2000). "Channelopathies: ion channel defects linked to heritable clinical disorders." *J Med Genet* **37**: 729-740.

Garcia M.C., Hernandez-Gallegos Z., Escamilla J., Sanchez J.A. (2001). "Calciseptine, a Ca<sup>2+</sup> channel blocker, has agonist actions on L-type Ca<sup>2+</sup> currents of frog and mammalian skeletal muscle." *J Membr Biol.* **184(2)**: 121-129.

Gurnett C.A., De Waard M., Campbell K.P. (1996). "Dual function of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction." *Neuron* **16(2)**: 431-440.

Gurnett C.A., Felix R., Campbell K.P. (1997). "Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta and alpha1 subunits." *J Biol Chem.* **272(29)**: 18508-18512.

Hering S., Berjukow S., Sokolov S., Marksteiner R., Weiß R.G., Kraus R., Timin E.N. (2000). "Molecular determinants of inactivation in voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels." *J Physiol.* **528**: 237-249.

Hess P., Tsien R.W. (1984). "Mechanism of ion permeation through calcium channels." *Nature* **309**: 453-56.

Hessa T., Kim H., Bihlmaier K., Lundin C., Boekel J., Andersson H., Nilsson I., White S.H., von Heijne G. (2005). "Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon." *Nature.* **433(7024)**: 377-381.

Hohaus A., Beyl S., Kudrnac M., Berjukow S., Timin E.N., Marksteiner R., Maw M.A., Hering S. (2005). "Structural determinants of L-type channel activation in segment IIS6 revealed by a retinal disorder." *J Biol Chem.* **280(46)**: 38471-7.

Hoshi T., Zagotta W.N., Aldrich R.W. (1991). "Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region." *Neuron* **7(4)**: 547-556.

Isacoff E.F., Jan N.Y., Jan Y.L. (1991). "Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K<sup>+</sup> channel." *Nature* **353**: 86 - 90.

Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. (2002a). "Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel." *Nature* **417**: 515-522.

Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon, R. (2002b). "The open pore conformation of potassium channels." *Nature* **417**: 523-526.

Jimenez C., Bourinet E., Leuranguer V., Richard S., Snutch T.P., Nargeot J. (2000). "Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels." *Neuropharmacology* **39(1)**: 1-10.

Jones L.P., Wei S.K., Yue D.T. (1998). "Mechanism of auxiliary subunit modulation of neuronal  $\alpha$ 1E calcium channels." *J Gen Physiol.* **112**: 125-143.

Jones, O. T. (2002). " $\text{Ca}^{2+}$  channels and epilepsy." *Eur J Pharmacol.* **447**: 211-225.

Jones, S.W. (1998). "Overview of voltage-dependent calcium channels." *J Bioenerg Biomembr.* **30**: 299-312.

Jones, S.W. (2003). "Calcium channels: unanswered questions." *J Bioenerg Biomembr.* **35(6)**: 461-475.

Kamp M.A., Krieger A., Henry M., Hescheler J., Weiergraber M., Schneider T. (2005). "Presynaptic 'Ca<sub>v</sub>2.3-containing' E-type Ca channels share dual roles during neurotransmitter release." *Eur J Neurosci.* **21**: 1617-1625.

Kim M.S., Morii T., Sun L.X., Imoto K., Mori Y. (1993). "Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel." *FEBS Lett.* **318(2)**: 145-148.

Klugbauer N., Lacinova L., Marais E., Hobom M., Hofmann F. (1999). "Molecular diversity of the calcium channel  $\alpha$ 2delta subunit." *J Neurosci.* **19(2)**: 684-691.

Klugbauer N., Marais E., Hofmann F. (2003). "Calcium channel  $\alpha$ 2delta subunits: differential expression, function, and drug binding." *J Bioenerg Biomembr.* **35(6)**: 639-647.

Kraus R.L., Sinnegger M.J., Glossmann H., Hering S., Striessnig J. (1998). "Familial hemiplegic migraine mutations change  $\alpha$ 1A  $\text{Ca}^{2+}$  channel kinetics." *J Biol Chem.* **273(10)**: 5586-90.

Kraus R.L., Sinnegger M.J., Koschak A., Glossmann H., Stenirri S., Carrera P., Striessnig J. (2000). "Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel kinetics." *J Biol Chem.* **275(13)**: 9239-43.



Kuo A., Gulbis J.M., Antcliff J.F., Rahman T., Lowe E.D., Zimmer J., Cuthbertson J., Ashcroft F.M., Ezaki T., Doyle D.A. (2003). "Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state." *Science* **300(5627)**: 1922-6.

Lee A., Scheuer T., Catterall W.A. (2000). " $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent facilitation and inactivation of P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels." *J Neurosci.* **20(18)**: 6830-8.

Lee A., Wong S.T., Gallagher D., Li B., Storm D.R., Scheuer T., Catterall W.A. (1999). " $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels." *Nature* **399(6732)**: 155-159.

Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K. (1999). "Voltage-gated ion channels and hereditary disease." *Physiol Rev.* **79(4)**: 1317-1372.

Liang H., DeMaria C.D., Erickson M.G., Mori M.X., Alseikhan B.A., Yue D.T. (2003). "Unified mechanisms of  $\text{Ca}^{2+}$  regulation across the  $\text{Ca}^{2+}$  channel family." *Neuron* **39(6)**: 951-960.

Lipscombe D., Helton, T.D., Xu, W. (2004). "L-type calcium channels: the low down." *J Neurophysiol.* **92**: 2633-2641.

Llinas R., Sugimori M., Lin J.W., Cherksey B. (1989). "Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **146**: 119-127.

Long S.B., Campbell E.B., Mackinnon R. (2005). "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family  $\text{K}^+$  channel." *Science* **309(5736)**: 897-903.

McFarlane M.B., Gilly W.F. (1998). "State-dependent nickel block of a high-voltage-activated neuronal calcium channel." *J Neurophysiol.* **80(4)**: 1678-1685.

McGee A.W., Nunziato D.A., Maltez J.M., Prehoda K.E., Pitt G.S., Bretz D.S. (2004). "Calcium channel function regulated by the SH3-GK module in beta subunits." *Neuron* **42(1)**: 89-99.

Mintz I.M., Adams M.E., Bean B.P. (1992). "P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons." *Neuron* **9**: 85-95.

Mishra S.K., Hermsmeyer K. (1994). "Selective inhibition of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by Ro 40-5967." *Circ. Res.* **75**: 144-148.

Moreno Davila, H. (1999). "Molecular and functional diversity of voltage-gated calcium channels." *Annals New York Academy of Sciences* **868**: 102-117.

Mori Y., Nishida M., Shimizu S., Ishii M., Yoshinaga T., Ino M., Sawada K., Niidome T. (2002). "Ca<sup>2+</sup> channel alpha(1B) subunit Ca<sub>v</sub> 2.2 knockout mouse reveals a predominant role of N-type channels in the sympathetic regulation of the circulatory system." *Trends Cardiovasc Med.* **12**: 270-275.

Mullner C., Broos L.A., van den Maagdenberg A.M., Striessnig J. (2004). "Familial hemiplegic migraine type 1 mutations K1336E, W1684R, and V1696I alter Cav2.1 Ca<sup>2+</sup> channel gating: evidence for beta-subunit isoform-specific effects." *J Biol Chem.* **279(50)**: 51844-50.

Nikonenko I., Bancila M., Bloc A., Muller D., Bijlenga P. (2005). "Inhibition of T-type calcium channels protects neurons from delayed ischemia-induced damage." *Mol Pharmacol.* **68**: 84-89.

Opatowsky Y., Chen C.C., Campbell K.P., Hirsch J.A. (2004). "Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain." *Neuron* **42(3)**: 387-399.

Ophoff R.A., Terwindt G.M., Vergouwe M.N., van Eijk R., Oefner P.J., Hoffman S.M., Lamerdin J.E., Mhrenweiser H.W., Bulman D.E., Ferrari M., Haan J., Lindhout D., van Ommen G.J., Hofker M.H., Ferrari M.D., Frants R.R. (1996). "Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4." *Cell* **87(3)**: 543-552.

Parent L., Gopalakrishnan M. (1995). "Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca<sup>2+</sup> channel." *Biophys J.* **69(5)**: 1801-1813.

Parent L., Schneider T., Moore C.P., Talwar D. (1997). "β-subunit regulation of the human brain α1E calcium channel." *J Membr Biol.* **160**: 127-140.

Pozzan T., Magalhaes P., Rizzuto R. (2000). "The comeback of mitochondria to calcium signalling." *Cell Calcium* **28(5-6)**: 279-283.

Pragnell M., De Waard M., Mori Y., 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(6466)**: 67-70.

Qin N., Platano D., Olcese J., Constantin L., Stefani E., Birnbaumer L. (1998). "Unique regulatory properties of the type 2a  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\beta$  subunit caused by palmitoylation." *Proc.Natl. Acad Sci. USA* **95**: 4690-4695.

Qin N., Yagel S., Momplaisir M.L., Codd E.E., D'Andrea M.R. (2002). "Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel  $\alpha(2)\delta-4$  subunit." *Mol Pharmacol.* **62(3)**: 485-496.

Randall A., Tsien R.W. (1995). "Pharmacological dissection of multiple types of  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents in rat cerebellar granule neurons." *J. Neurosci.* **15**: 2995-3012.

Restituito S., Cens T., Barrere C., Geib S., Galas S., De W.M., Charnet P. (2000). "The  $\beta 2a$  subunit is a molecular groom for the  $\text{Ca}^{2+}$  channel inactivation gate." *J Neurosci.* **20**: 9046-9052.

Richards M.W., Butcher A.J., Dolphin A.C. (2004). " $\text{Ca}^{2+}$  channel beta-subunits: structural insights AID our understanding." *Trends Pharmacol Sci.* **25(12)**: 626-632.

Rousset M., Charnet P., Cens T. (2005). "Structure de la sous-unité  $\beta$  du canal calcique : la place du  $\beta$ -interaction domain." *Médecine/sciences* **21(3)**: 279-283.

Sabatini B.L., Svoboda K. (2000). "Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis." *Nature* **408**: 589-593.

Saimi Y., Kung C. (2002). "Calmodulin as an ion channel subunit." *Annu Rev Physiol.* **64**: 289-311.

Sather, W.A. (2003). "Permeation and selectivity in calcium channels." *annurev.physiol.* **65**: 133-159.

Schneider T., Wei X., Olcese R., Costantin J.L., Neely A., Palade P., Perez-Reyes E., Qin N., Zhou J., Crawford G.D. (1994). "Molecular analysis and functional expression of the human type E neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  channel alpha 1 subunit." *Receptors Channels* **2(4)**: 255-270.

Schweitz H., Heurteaux C., Bois P., Moinier D., Romey G., Lazdunski M. (1994). "Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold  $\text{Ca}^{2+}$  channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons." *Proc Natl. Acad Sci. U S A* **91(3)**: 878-882.

Seifert R., Eismann E., Ludwig J., Baumann A., Kaupp U.B. (1999). "Molecular determinants of a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding site in the pore of cyclic

nucleotide-gated channels: S5/S6 segments control affinity of intrapore glutamates." *EMBO J.* **18(1)**: 119-130.

Sidach S.S., Mintz I.M. (2002). "Kurtotoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold  $\text{Ca}^{2+}$  channels." *J Neurosci.* **22**: 2023-2034.

Spaetgens R.L., Zamponi G.W. (1999). "Multiple structural domains contribute to voltage-dependent inactivation of rat brain  $\alpha(1E)$  calcium channels." *J Biol Chem.* **274(32)**: 22428-36.

Stephens G.J., Page K.M., Bogdanov Y., Dolphin A.C. (2000). "The  $\alpha(1B)$   $\text{Ca}^{2+}$  channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties." *J Physiol.* **525**: 377-390.

Stotz S.C., Hamid J., Spaetgens R.L., Jarvis S.E., Zamponi G.W. (2000). "Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism?" *J Biol Chem.* **275(32)**: 24575-82.

Stotz S.C., Jarvis S.E., Zamponi G.W. (2004). "Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels." *J Physiol.* **554(Pt 2)**: 263-273.

Stotz S.C., Zamponi G.W. (2001). "Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels." *Trends Neurosci.* **24(3)**: 176-181.

Talavera K., Staes M., Janssens A., Klugbauer N., Droogmans G., Hofmann F., Nilius B. (2001). "Aspartate residues of the Glu-Glu-Asp-Asp (EEDD) pore locus control selectivity and permeation of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha(1G)$ ." *J Biol Chem.* **276(49)**: 45628-45635.

Tottene A., Fellin T., Pagnutti S., Luvisetto S., Striessnig J., Fletcher C., Pietrobon D. (2002). "Familial hemiplegic migraine mutations increase  $\text{Ca}^{2+}$  influx through single human  $\text{Ca}_v2.1$  channels and decrease maximal  $\text{Ca}_v2.1$  current density in neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99(20)**: 13284-13289.

Tottene A., Volsen S., Pietrobon D. (2000). "Alpha(1E) subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties." *J Neurosci.* **20(1)**.

Triggle, D.J. (2003). "1,4-Dihydropyridines as calcium channel ligands and privileged structures." *Cell Mol Neurobiol.* **23(3)**: 293-303.

- Trimmer J.S., Rhodes K.J. (2004). "Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain." *Annu Rev Physiol.* **66**: 477-519.
- Van Eylen F., Svoboda M., Herchuelz A. (1997). "Identification, expression pattern and potential activity of Na/Ca exchanger isoforms in rat pancreatic  $\beta$ -cells." *Cell Calcium* **21(3)**: 185-193.
- Van Petegem F., Clark K.A., Chatelain F.C., Minor D.L. Jr. (2004). "Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain." *Nature* **429(6992)**: 671-675.
- Walker D., De Waard M. (1998). "Subunit interaction sites in voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels: role in channel function." *Trends Neurosci.* **21**: 148-154.
- Wang G., Dayanithi G., Newcomb R., Lemos J.R. (1999). "An R-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in neurohypophysial terminals preferentially regulates oxytocin secretion." *J Neurosci.* **19**: 9235-9241.
- Waterman, SA (2000). "Voltage-gated calcium channels in autonomic neuroeffector transmission." *Prog Neurobiol.* **60**: 181-210.
- Wei X.Y., 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 cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels." *J Biol Chem.* **266(32)**: 21943-7.
- Wessman M., Kaunisto M.A., Kallela M., Palotie A. (2004). "The molecular genetics of migraine." *Ann Med.* **36(6)**: 462-473.
- Wheeler D.B., Randall 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 M.E., Feldman D.H., McCue A.F., Brenner R., Velicelebi G., Ellis S.B., Harpold M.M. (1992). "Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype." *Neuron* **8(1)**: 71-84.
- Wu L.G., Borst J.G., Sakmann B. (1998). "R-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents evoke transmitter release at a rat central synapse." *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4720-4725.

Wu X.S., Edwards HD, Sather WA (2000). "Side chain orientation in the selectivity filter of a voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel." *J Biol Chem.* **275(41)**: 31778-85.

Yamazaki M., Ohno-Shosaku T., Fukaya M., Kano M., Watanabe M., Sakimura K. (2004). "A novel action of stargazin as an enhancer of AMPA receptor activity." *Neurosci Res.* **50(4)**: 369-374.

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(6451)**: 158-161.

Zhang J.F., Ellinor P.T., Aldrich R.W., Tsien R.W. (1994). "Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels." *Nature.* **372(6501)**: 97-100.

Zhen X.G., Xie C., Fitzmaurice A., Schoonover C.E., Orenstein E.T., Yang J. (2005). "Functional architecture of the inner pore of a voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel." *J Gen Physiol.* **126(3)**: 193-204.

Zhorov B.S., Folkman E.V., Ananthanarayanan V.S. (2001). "Homology model of dihydropyridine receptor: implications for L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel modulation by agonists and antagonists." *Arch Biochem Biophys* **393(1)**: 22-41.

Zoghbi, H.Y. (1997). "CAG repeats in SCA6. Anticipating new clues." *Neurology* **49(5)**: 1196-9.