

Université de Montréal

# **Couplage entre les régions IIS4-S5 et IIS6 lors de l'activation du canal calcique $Ca_v2.3$**

par

Sébastien Wall-Lacelle

Département de physique  
Faculté des Arts et Sciences

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

21 Décembre 2010

© Sébastien Wall-Lacelle, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Couplage entre les régions IIS4-S5 et IIS6 lors de l'activation du canal  
calcique  $Ca_v2.3$

Présenté par :  
Sébastien Wall-Lacelle

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Rémy Sauvé, président-rapporteur  
Lucie Parent, directrice de recherche  
Alvin Shrier, membre du jury

## Résumé

Les canaux calciques dépendants du voltage  $Ca_v$  font partie de la famille structurale des canaux ioniques à 6 segments transmembranaires. Tout comme les canaux potassiques  $K_v$ , les canaux  $Ca_v$  possèdent une série de résidus chargés dans l'hélice S4 de chaque domaine ou sous-unité qui conférerait à la protéine une sensibilité aux changements de voltage. De plus les hélices S6 tapissent la paroi du pore et forment la porte d'activation de la protéine. Comment le mouvement des hélices S4 se traduit par l'ouverture de la porte d'activation des hélices S6 demeure une question encore non résolue. Suite à la publication de la structure cristalline du canal  $K_v1.2$  en 2005, le groupe de MacKinnon a proposé que le mouvement des hélices S4 est mécaniquement couplé à la porte d'activation S6 à travers le glissement de l'hélice amphiphile S4-S5 selon un mécanisme nommé couplage électromécanique (Long et al. 2005b). Dans le but de déterminer si la région S4-S5 joue un rôle dans l'activation du canal calcique  $Ca_v2.3$ , nous avons étudié, par la méthode d'analyse cyclique de mutations doubles (« Double Mutant Cycle Analysis », (Horovitz 1996)), le couplage entre la boucle S4-S5 et l'hélice S6 du domaine II de ce canal. Les mesures d'énergies d'activation,  $\Delta G_{act}$ , obtenues en présence des sous-unités auxiliaires  $Ca_v\alpha2\delta$  et  $Ca_v\beta3$  ont affiché un couplage significatif pour l'activation entre les paires de résidus V593G/L699G, V593G/A700G, V593G/A702G, S595G/V703G L596G/L699G, L596G/A700G, L596G/I701G, L596G/A702G, L596G/V703G, L596G/D704G, M597G/I701G, et S602G/I701G. Aucune de ces paires de résidus n'a affiché de couplage lors de l'inactivation, suggérant que les effets observés sont spécifiques au mécanisme d'activation. Mis ensemble, ces résultats suggèrent que la boucle IIS4-S5 et l'hélice IIS6 interagissent et jouent un rôle déterminant dans l'activation de  $Ca_v2.3$ .

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

## Abstract

Voltage dependent calcium channels share a strong structural homology with voltage gated potassium channels. Both families present a conserved series of charged residues present in the S4 helix of each domain that most certainly accounts for the voltage sensitivity of these proteins. Moreover, in both cases, the S6 helices seem to be lining up the pore. How does the movement of the S4 sensors translate into channel opening remains elusive in  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Following the publication of the crystal structure of the Kv1.2 channel in 2005, the group of Roderick MacKinnon proposed that the voltage sensor is mechanically coupled to the S6 pore through the amphipathic S4-S5 helix that crosses over the S6 inner helix from the same subunit. To determine if the S4-S5 linker, that runs parallel to the membrane plane inside the cell in the Kv1.2 three-D structure, plays a role in the activation of the  $\text{Ca}_v2.3$  calcium channel, we have studied by double mutant cycle analysis the coupling between the S4-S5 linker and the S6 helix of domain II of this channel. The activation energies,  $\Delta G_{\text{act}}$ , obtained from classical two electrode voltage clamp experiments in the presence of auxiliary subunits  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  and  $\text{Ca}_v\beta3$  displayed significant activation coupling coefficients for the pairs of residues V593G/L699G, V593G/A700G, V593G/A702G, S595G/V703G L596G/L699G, L596G/A700G, L596G/I701G, L596G/A702G, L596G/V703G, L596G/D704G, M597G/I701G, and S602G/I701G. None of these pairs displayed significant coupling in the inactivation mechanism, suggesting that the effects observed were specific to activation. Altogether, our results strongly suggest that the S4-S5 linker and the S6 helix of domain II are actively involved in the activation of  $\text{Ca}_v2.3$ .

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

## Liste des abréviations

### - A -

A : Alanine (Ala)

Achr : Récepteur à l'acétylcholine

AID : « Alpha Interaction Domaine »

### - B -

BID : « Beta Interaction Domain »

BTZ : Benzothiazepine

### - C -

C : Cystéine (Cys)

CDI : Inactivation Dépendante du Calcium

CFU : « Colony Forming Unit »

CICR : « Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release »

CRE : « cAMP Response Element »

### - D -

D : Aspartate (Asp)

$\Delta G_{act}$  : Énergie libre de Gibbs d'activation

$\Delta G_{inact}$  : Énergie libre de Gibbs d'inactivation

DHP : Dihydropyridine

### - E -

E : Glutamate (Glu)

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

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

EDTA : Acide diaminotétracarboxylique

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

**- F -**

F : Phénylalanine (Phe)

**- G -**

G : Glycine (Gly)

GK : Guanylate Kinase

**- H -**

H : Histidine (His)

HVA : « High Voltage Activated »

**- I -**

I : Isoleucine (Ile)

**- K -**

K : Lysine (Lys)

**- L -**

L : Leucine (Leu)

LVA : « Low Voltage Activated »

**- M -**

M : Méthionine (Met)

MAGUK : Guanylates Kinases Associées à la Membrane

MES : Acide méthanesulfonique

MTS : Méthanethiosulfonate

MTSET : Méthanethiosulfonate-éthyltriméthylammonium

**- N -**

N : Asparagine (Asn)

NK : « Nucleotide Kinase »

**- O -**

$\omega$ -CTx-GVIA :  $\omega$ -conotoxine-GVIA

$\omega$ -aga-IVA :  $\omega$ -agatoxine-IVA

**- P -**

P : Proline (Pro)

PAA : Phénylalkylamine

PCR : « Polymerase Chain Reaction »

PDZ : « Post synaptic Disc Large Zona »

**- Q -**

Q : Glutamine (Gln)

**- R -**

R : Arginine (Arg)

R50 : Courant résiduel à 50 ms

R300 : Courant résiduel à 300 ms

R800 : Courant résiduel à 800 ms

RE : Réticulum Endoplasmique

ROC : « Receptor Operated Channel »

RS : Réticulum Sarcoplasmique

**- S -**

S : Serine (Ser)

SCAM : « Substituted Cysteins Accessibility Method »

S.E.M. : Écart standard à la moyenne

SH3 : « Src Homology-3 »

**- T -**

T : Thréonine (Thr)

TEA : Tétréthylammonium

TRP : « Transient Receptor Potential »

$\tau_{\text{deact}}$  : Constante de temps de désactivation

$\tau_{\text{inact}}$  : Constante de temps d'inactivation

**- V -**

V : Valine (Val)

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

VDCC : Canal Calcique Dépendant du Voltage

VDI : Inactivation Dépendante du Voltage

**- W -**

W : Tryptophane (Trp)

**- X -**

X : Acide aminé quelconque

**- Y -**

Y : Tyrosine (Tyr)



## Table des matières

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1. Rôles physiologiques des ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	1
1.1.1. Transport membranaire des ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	1
1.1.1.1. Les canaux de type VDCC.....	2
1.1.1.1.1. Découverte des canaux de type VDCC .....	2
1.1.1.1.2. Classification des canaux VDCC .....	3
1.1.1.2. Les canaux de type TRP.....	5
1.1.1.3. Les canaux de type ROC.....	6
1.2. Propriétés des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC) de type HVA.....	7
1.2.1. Rôles physiologiques .....	8
1.2.1.1. Mécanisme d'excitation-contraction du muscle squelettique ..	8
1.2.1.2. Mécanisme d'excitation-contraction du muscle cardiaque .....	8
1.2.1.3. Fonction au niveau neuronal.....	9
1.2.1.4. Pathologies associées aux canaux HVA.....	10
1.2.2. Éléments structuraux .....	13
1.2.2.1. La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ .....	14
1.2.2.2. La sous-unité $\beta$ .....	17
1.2.2.3. La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ .....	20
1.2.2.4. La sous-unité $\gamma$ .....	21
1.2.3. Propriétés biophysiques.....	22
1.2.3.1. Activation .....	24
1.2.3.2. Inactivation.....	24
1.2.3.2.1 Inactivation dépendante du calcium (CDI) .....	24
1.2.3.2.2. Inactivation dépendante du voltage (VDI).....	25
1.3. Activation des canaux potassiques .....	29
1.3.1 Le senseur au voltage S4 .....	30
1.3.2. La porte d'activation .....	33
1.3.3. La boucle S4-S5.....	36

1.4. Activation des canaux calciques .....	41
1.4.1. Le senseur au voltage S4 .....	41
1.4.2. La porte d'activation .....	43
1.5. Hypothèses et objectifs de recherche .....	49
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>51</b>
2.1. Techniques de biologie moléculaire .....	51
2.2. Expression fonctionnelle des canaux .....	53
2.3. Enregistrements électrophysiologiques .....	54
2.4. Analyse des données .....	58
2.5. Analyse cyclique de doubles mutations .....	62
2.6. Modélisation par homologie .....	66
<b>3. RÉSULTATS .....</b>	<b>67</b>
3.1 Mutations dans l'hélice IIS6 .....	67
3.2. « Glycine scan » de la boucle IIS4-S5 .....	72
3.3. Mutations doubles .....	76
3.3.1. Position A700 .....	77
3.3.2. Position I701 .....	79
3.3.3. Position A702 .....	83
3.3.4. Positions 703 et 704 .....	85
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>88</b>
4.1 Modélisation par homologie .....	88
4.2. Analyse cyclique de doubles mutations .....	90
4.2.1. Les régions IIS4-S5 et IIS6 semblent couplées lors de l'activation de Ca <sub>v</sub> 2.3 .....	91
4.2.2. Les régions IIS4-S5 et IIS6 ne sont pas couplées lors de l'inactivation de Ca <sub>v</sub> 2.3. ....	93
4.2.3. Les résidu V593 et L596 sont fortement couplés à l'hélice IIS6 lors de l'activation de Ca <sub>v</sub> 2.3. ....	96

4.2.4. La boucle IIS4-S5 montre un patron d'interaction hélicoïdal avec l'hélice IIS6 lors de l'activation de $Ca_v2.3$ .....	100
<b>5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>102</b>
<b>6. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>108</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. Correspondance entre les nomenclatures des VDCC, leurs localisations tissulaires et inhibiteurs.....	5
Tableau 2. Propriétés biophysiques des mutations de l'hélice IIS6.....	69
Tableau 3. Propriétés biophysiques des mutations de la boucle IIS4-S5....	73
Tableau 4. Propriétés biophysiques des mutations doubles contenant A700G .....	78
Tableau 5. Propriétés biophysiques des mutations doubles contenant I701G .....	80
Tableau 6. Constantes de temps de désactivation des mutations doubles contenant I701G.....	82
Tableau 7. Propriétés biophysiques des mutations doubles contenant A702G .....	83
Tableau 8. Propriétés biophysiques des mutations doubles contenant V703G ou D704G.....	86

## Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénétique des canaux de type VDCC .....	4
Figure 2. Structure prédite des canaux de type VDCC.....	14
Figure 3. Alignement des motifs DEKA et EEEE dans la P-Loop des canaux sodiques et calciques .....	16
Figure 4. Structure du complexe $Ca_v\beta_2a$ / $Ca_v1.2$ -AID .....	18
Figure 5. Résidus importants lors de la liaison $Ca_v\beta_2a$ / $Ca_v1.2$ -AID.....	19
Figure 6. Diagramme cinétique minimal de $Ca_v2.3$ .....	23
Figure 7. Inactivation des canaux potassiques et sodiques .....	27
Figure 8. Inactivation de type « Hinged-Lid » des canaux de type VDCC ...	29
Figure 9. Hélice S4 de $K_v1.2$ .....	31
Figure 10. Modèles de déplacement du S4 .....	33
Figure 11. Porte d'activation des canaux MthK, KvAP et $K_v1.2$ .....	36
Figure 12. Couplage entre la boucle S4-S5 et la porte d'activation dans $K_v1.2$ .....	40
Figure 13. Alignement des structures primaires des hélices S4 .....	41
Figure 14. Mutations dans les hélices S6 de $Ca_v2.3$ .....	46
Figure 15. Effet des changements d'hydrophobicité sur le potentiel de mi-activation .....	48
Figure 16. Représentation simplifiée du mécanisme d'ouverture des canaux de type $Ca_v$ .....	48
Figure 17. Protocoles de pulses .....	57
Figure 18. Enregistrements électrophysiologiques des mutations de la partie distale de l'hélice IIS6 de $Ca_v2.3$ .....	70
Figure 19. Propriétés de désactivation des mutations de la partie distale de l'hélice IIS6 de $Ca_v2.3$ .....	71

Figure 20. Alignement des structures primaires des boucles S4-S5 de Ca <sub>v</sub> 2.3 .....	72
Figure 21. Enregistrements électrophysiologiques des mutations de la partie distale de l'hélice IIS4-S5 de Ca <sub>v</sub> 2.3 .....	74
Figure 22. Propriétés de désactivation des mutations de la boucle IIS4-S5 de Ca <sub>v</sub> 2.3 .....	76
Figure 23. Courbes IV des mutations doubles de A700G .....	77
Figure 24. Courbes IV des mutations doubles de I701G .....	81
Figure 25. Courbes IV des mutations doubles de A702G .....	84
Figure 26. Courbes IV des mutations doubles de V703G et D704G .....	87
Figure 27. Modélisation par homologie de la boucle IIS4-S5 et IIS6 de Ca <sub>v</sub> 2.3 .....	89
Figure 28. Coefficients de couplage d'activation des mutations doubles entre les régions IIS4-S5 et IIS6 de Ca <sub>v</sub> 2.3.....	92
Figure 29. Coefficients de couplage d'inactivation des mutations doubles entre les régions IIS4-S5 et IIS6 de Ca <sub>v</sub> 2.3.....	95
Figure 30. Coefficients de couplage d'activation des mutations doubles entre la région IIS6 et les résidus V593 et L596 de Ca <sub>v</sub> 2.3.....	97
Figure 31. Vue supérieure du couplage entre le résidu V593 et le segment IIS6 en projection hélicoïdale .....	98
Figure 32. Vue supérieure du couplage entre le résidu L596 et le segment IIS6 en projection hélicoïdale .....	98
Figure 33. Structure hélicoïdale des résidus de la boucle IIS4-S5 couplés avec la région IIS6.....	101

*À Richard et Vida*

## Remerciements

Je tiens à remercier le docteur Lucie Parent pour les trois années passées dans son laboratoire. Les connaissances et la passion qu'elle a su me passer au cours des très nombreuses discussions et débats resteront gravées dans ma mémoire comme un modèle à suivre d'organisation et d'esprit scientifique.

J'adresse aussi mes plus grands remerciements à mes collègues de laboratoire, soit le docteur Benoîte Bourdin, Steve Clément, Pierre Olivier Demers-Giroux, Charles-Hubert Lafantaisie-Favreau, Florian Le Coz, le docteur Fabrice Marger, et Behzad Shakeri pour leur amitié et leur support tout au long de ce projet. Je tiens à adresser des remerciements spéciaux à Alexandra Raybaud qui m'a supervisé et appris toutes les techniques d'électrophysiologie et de biologie moléculaire ainsi qu'à Yolaine Dodier qui a effectué une grande partie de la biologie moléculaire pour les mutations présentées dans ce document.

Je souhaite témoigner ma reconnaissance aux membres du jury, les docteurs Rémy Sauvé et Alvin Shrier, pour leur précieux conseils lors de ce projet et pour l'évaluation de ce document. Je tiens aussi à remercier le docteur Jean-Yves Lapointe qui m'a introduit à la biophysique et qui m'a recommandé au docteur Parent pour mon premier stage au sein du GEPROM.

Finalement, je tiens à remercier du fond du cœur ma sœur Émilie et tout spécialement mes parents Richard Lacelle et Vida Wall pour leur incroyable support tout au long de mes études, sans lequel ce travail n'aurait été possible.



## 1. INTRODUCTION

L'ion calcium figure parmi les ions les plus importants de la machinerie cellulaire. Étant distribué inégalement de chaque côté de la membrane plasmique, soit à une concentration de l'ordre de  $0.1 \mu\text{M}$  à l'intérieur de la cellule et de 1 à 2 mM dans le milieu extracellulaire, c'est l'ion qui possède le plus important gradient chimique en conditions physiologiques (Dong et al. 2006).

### 1.1. Rôles physiologiques des ions $\text{Ca}^{2+}$

L'ion calcium est impliqué à titre de messager second dans de nombreux mécanismes à l'intérieur de la cellule. Par exemple, lors de la libération de neurotransmetteurs, le potentiel d'action déclenche l'ouverture de canaux calciques activés par le voltage dans la membrane plasmique au niveau pré-synaptique, augmentant ainsi la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, ce qui a pour effet d'induire la fusion de vésicules à la membrane plasmique, causant ainsi la libération de neurotransmetteurs. Le  $\text{Ca}^{2+}$  est aussi impliqué dans l'expression de gènes. En effet, ces ions permettent, via une cascade de signalisation, de réguler l'expression de certains gènes. Finalement, lors du couplage excitation-contraction dans le cœur, la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  est le paramètre qui contrôle la contraction et la relaxation du muscle cardiaque. Ces mécanismes seront expliqués en détail à la section 1.2.1.

#### 1.1.1. Transport membranaire des ions $\text{Ca}^{2+}$

La membrane plasmique des cellules constitue une barrière naturelle au passage des ions entre les milieux inter et intracellulaires. En effet, les

phospholipides qui forment la bicouche lipidique sont formés d'une tête polaire à laquelle sont attachées une ou plusieurs chaînes hydrophobes et créent une importante barrière d'énergie entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Pour passer dans le milieu intracellulaire, les ions calciums du milieu extracellulaire nécessitent donc la présence d'une protéine canal. Ces protéines, ayant pour rôle de créer un environnement aqueux pour les ions où la barrière d'énergie entre les deux milieux est diminuée, forment donc un passage aqueux à travers la membrane pour les ions.

Il existe trois types de canaux calciques : les canaux calciques dépendants du voltage (VDCC), les canaux de type « Transient Receptor Potential » (TRP) et les canaux de type « Receptor Operated Channels » (ROC) (Berridge 1997).

### **1.1.1.1. Les canaux de type VDCC**

#### 1.1.1.1.1. Découverte des canaux de type VDCC

La découverte des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC) fut faite peu après les travaux effectués par Hodgkin et Huxley sur les canaux ioniques dans l'axone de calmar géant. En effet, ils démontrèrent qu'en réponse à une stimulation, les ions  $\text{Na}^+$  entrent dans la cellule à travers des protéines qui répondent au potentiel membranaire. Suite à cette entrée de  $\text{Na}^+$ , qui a pour effet une dépolarisation de la membrane, d'autres protéines s'ouvrent en réponse au voltage maintenant positif pour laisser sortir les ions  $\text{K}^+$ , causant ainsi une repolarisation de la cellule qui ramène celle-ci à son potentiel de repos (Hodgkin et al. 1952).

Suite à ces travaux, le groupe de Katz étudia, dans les fibres musculaires de pattes de crabes, des potentiels d'action qui se propagent en absence d'ions sodium dans le milieu extracellulaire. Cette observation sera ensuite expliquée en proposant l'existence d'une entrée de calcium durant la phase

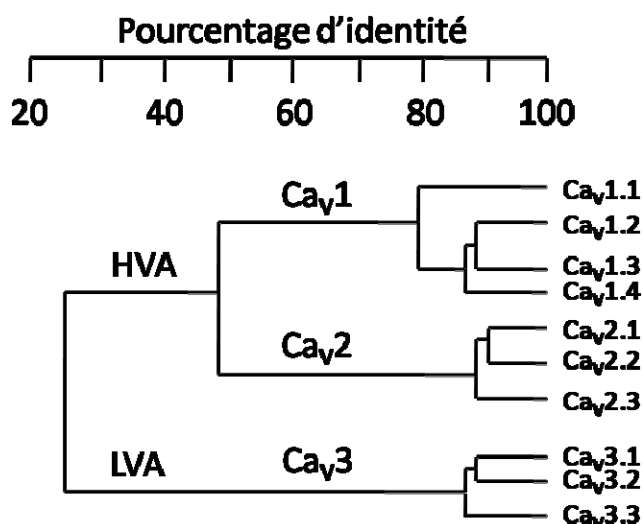
ascendante du potentiel d'action (Fatt et al. 1958a; Fatt et al. 1958b). Cette théorie sera confirmée en 1964 par Hagiwara et Naka par l'observation des modifications engendrées par des agents chélateurs sur ces mêmes potentiels d'actions calciques (Hagiwara et al. 1964).

#### 1.1.1.1.2. Classification des canaux VDCC

Les premières études électrophysiologiques faites sur ces protéines révèlent une forte hétérogénéité dans ces canaux. En effet, les travaux menés par le groupe de Hagiwara en 1975 sur l'œuf d'étoile de mer montrent deux types de courants calciques. Tout d'abord, les courants de type I qui s'activent à des potentiels membranaires voisins du potentiel de repos et les courants de type II qui nécessitent de plus fortes dépolarisations (Hagiwara et al. 1975). Ces deux types de courants furent ensuite observés dans de nombreux tissus (cœur, muscles lisse et squelettique en développement, ostéoblastes, fibroblastes, neurones, etc.) (Kostyuk 1990). La mise au point de la technique de patch-clamp permit, quelques années plus tard, d'étudier les courants calciques des neurones de la racine dorsale du poulet (Carbone et al. 1984b; Carbone et al. 1984a). Carbone et Lux proposent alors, suite à leurs observations, de diviser les canaux de type VDCC en deux catégories, soient ceux donnant lieu à des courants à haut seuil d'activation, nommés HVA (High Voltage Activated) et ceux donnant lieu à des courants à bas seuil d'activation, nommés LVA (Low Voltage Activated).

Les canaux de type VDCC sont encodés par 10 gènes distincts identifiés à ce jour. Ces 10 canaux sont divisés selon leur séquence primaire en trois familles. La famille  $Ca_v1$  contient quatre gènes ( $Ca_v1.1$  à  $Ca_v1.4$ ), les familles  $Ca_v2$  ( $Ca_v2.1$  à  $Ca_v2.3$ ) et  $Ca_v3$  ( $Ca_v3.1$  à  $Ca_v3.3$ ) contiennent chacune 3 gènes. Les familles  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$  sont de type HVA tandis que la famille  $Ca_v3$  est de type LVA. On observe une homologie d'environ 25% au niveau de la structure primaire entre les canaux HVA et LVA, tel que montré

à la figure 1. Les canaux d'une même famille montrent une homologie de séquence de l'ordre de 80% à 90% (Lacinova 2005). Il est à noter que les canaux VDCC sont des multimères et que le nom du gène caractérise principalement la sous-unité qui forme le pore, soit la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$ .



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

Il est à noter que, si cette nomenclature a été adoptée officiellement en 2000, l'ancienne nomenclature est encore couramment utilisée dans la littérature. Cette nomenclature nomme chaque gène selon le nom de sa sous-unité  $\alpha_1$ , soit  $\alpha_{1S}$  pour la première isoforme découverte dans le muscle squelettique et  $\alpha_{1C}$  pour l'isoforme découverte dans le cœur, et en ordre alphabétique à partir de  $\alpha_{1A}$  pour les isoformes identifiées par la suite. Ces canaux étaient ensuite classés selon leur fonction et leur localisation par un autre système alphabétique.

Ce système fut abandonné en 2000 pour éviter l'éventuel chevauchement des nomenclatures si les isoformes de la sous-unité  $\alpha_1$  devaient se rendre à

la lettre L (Ertel et al. 2000). Le tableau 1 présente la correspondance entre les deux nomenclatures ainsi que la localisation et les propriétés pharmacologiques des différents canaux VDCC.

Classification fonctionnelle	Type	Canal	$\alpha_1$	Localisation tissulaire	Inhibiteurs
<b>HVA</b>	L	Ca <sub>v</sub> 1.1	$\alpha_{1S}$	Muscles squelettiques et cardiaques neurones, rétine	Dihydropyridines Phénylalkilamines Benzothiasépines
		Ca <sub>v</sub> 1.2	$\alpha_{1C}$		
		Ca <sub>v</sub> 1.3	$\alpha_{1D}$		
		Ca <sub>v</sub> 1.4	$\alpha_{1F}$		
	P/Q	Ca <sub>v</sub> 2.1	$\alpha_{1A}$	Neurones	$\omega$ -aga-IVA
	N	Ca <sub>v</sub> 2.2	$\alpha_{1B}$		$\omega$ -CTX-GVIA
	R	Ca <sub>v</sub> 2.3	$\alpha_{1E}$		SNX-482
<b>LVA</b>	T	Ca <sub>v</sub> 3.1	$\alpha_{1G}$	Neurones et cœur	Mifébradil ( ± spécifique) Kurtoxine
	T	Ca <sub>v</sub> 3.2	$\alpha_{1H}$		
	T	Ca <sub>v</sub> 3.3	$\alpha_{1I}$		

**Tableau 1 : Correspondance entre les nomenclatures des VDCC, leurs localisations tissulaires et inhibiteurs.** (Randall et al. 1995; Ertel et al. 2000; Catterall et al. 2003)

### 1.1.1.2. Les canaux de type TRP

Les canaux de type TRP (pour « Transient Receptor Potential ») ont été identifiés pour la première fois dans les cellules natives et clonés dans la drosophile qui possède des photorécepteurs portant des mutations du gène TRP et montrant une dépolarisation transitoire après une exposition lumineuse continue. À ce jour, on connaît 26 gènes qui codent pour ce type de canal cationique. Ceux-ci sont divisés en six familles : TRPC pour « Canonical », TRPV pour « Vanilloïd », TRPM pour « Melastatin », TRPML

pour « Mucolypin », TRPP pour « Polycystin » et TRPA pour « ANKTM1 ». Ce sont des canaux ioniques ne dépendant pas du voltage et généralement perméables aux cations mono- et divalents, à l'exception de TRPM4/5 qui sont sélectifs aux ions monovalents ainsi que TRPV5/6 qui sont sélectifs aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Vennekens et al. 2002; Clapham 2003).

### **1.1.1.3. Les canaux de type ROC**

Les canaux de type ROC, pour « Receptor Operated Channel », sont activés par la liaison d'un ligand extracellulaire. On distingue dans cette famille deux types de canaux. Les canaux, qui sont nommés récepteurs ionotropiques, voient leur ligand se fixer directement sur le canal qui répond en s'ouvrant immédiatement. Citons comme exemple le récepteur à l'acétylcholine (Achr) au niveau post-synaptique. Lorsque l'acétylcholine se fixe sur le canal Achr, celui-ci s'ouvre pour permettre l'entrée d'ions sodium dans la cellule. Le deuxième type de canal ROC est le récepteur métabotrope. Dans ce cas, le ligand se lie sur un récepteur qui est indépendant du canal ionique en lui-même. Le complexe ainsi formé induira une réponse cellulaire par l'entremise des protéines G qui aboutira à l'ouverture du canal ionique. Notons que les récepteurs associés à ces canaux peuvent occuper une fonction excitatrice ou bien inhibitrice (Salt et al. 1996; Hille 2001).

## 1.2. Propriétés des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC) de type HVA

La classe des canaux HVA regroupe les familles  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$ . Ils sont principalement caractérisés par leur activation sous l'effet d'une forte dépolarisation. Les valeurs de potentiels de mi-activation ( $V_{0.5,act}$ ) sont de l'ordre de -20 mV à 10 mV. Ils sont aussi caractérisés par des cinétiques d'inactivation plus lentes que les canaux LVA, entre 50 et 500 ms en présence d'ions divalents. Ils présentent aussi des inhibiteurs spécifiques différents des canaux LVA.

La famille  $Ca_v1$  contient les canaux de type L. Elle se distingue par une conductance en  $Ba^{2+}$  supérieure par un facteur 2 à la conductance observée en  $Ca^{2+}$  ainsi que par une inactivation lente ( $\tau_{inact} > 500ms$ ) en présence de  $Ba^{2+}$ . Ils sont bloqués spécifiquement par des antagonistes naturels des canaux calcique de type L, tels les dihydropyridines (DHP), phénylalkylamines (PAA) et benzothiazepines (BTZ) (Hockerman et al. 1997; Peterson et al. 1997; Huber et al. 2000).

La famille  $Ca_v2$  contient les canaux de type N, P/Q et R. Ils ne sont généralement pas affectés par les antagonistes des canaux  $Ca_v1$  mais sont inhibés par certaines toxines peptidiques. Certains de ces canaux démontrent, tout comme la famille  $Ca_v1$ , une conductance en  $Ba^{2+}$  supérieure à celle en  $Ca^{2+}$ . Leur inactivation est cependant plus rapide, avec une constante de temps d'inactivation située entre 50 et 500 ms, dépendant de l'isoforme considérée.

### **1.2.1. Rôles physiologiques**

La diversité des fonctions physiologiques occupées par l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  et les canaux VDCC a pour effet que le mauvais fonctionnement de ces derniers peut souvent être la cause de nombreuses pathologies. Les canaux de type HVA occupent des rôles notamment dans la fonction du muscle squelettique, du muscle cardiaque et des neurones.

#### **1.2.1.1. Mécanisme d'excitation-contraction du muscle squelettique**

Les canaux de type  $\text{Ca}_v1$  sont très présents dans le muscle squelettique et assument un rôle important dans le couplage excitation-contraction (Richard et al. 1999). Lors de la propagation d'un potentiel d'action le long de la fibre musculaire, celui-ci permet l'activation des canaux  $\text{Ca}_v1$  qui sont en contact mécanique avec les canaux récepteurs à la ryanodine de type 1 (RyR1) du réticulum sarcoplasmique (RS). L'activation des canaux  $\text{Ca}_v1$  a pour effet l'ouverture des canaux RyR1 qui permet ainsi la relâche du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans le RS. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi libérés peuvent alors se fixer sur le complexe tropomyosine, initiant ainsi la contraction du muscle. Suite à la contraction, le  $\text{Ca}^{2+}$  est repompé dans le RS par la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA qui consomme de l'ATP pour déplacer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  contre leur gradient électrochimique. La diminution de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire engendre alors la relaxation du muscle.

#### **1.2.1.2. Mécanisme d'excitation-contraction du muscle cardiaque**

Tout comme dans le muscle squelettique, le canal  $\text{Ca}_v1.2$  contribue grandement au couplage excitation-contraction de la cellule cardiaque



(Perez-Reyes et al. 1998). Le mécanisme impliqué dans le cœur se nomme «  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release » (CICR). Dans ce mécanisme, le courant calcique traversant le canal  $\text{Ca}_v1.2$  prolonge la dépolarisation pendant le potentiel d'action. Il contribue directement à l'augmentation de la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  et induit le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans le réticulum sarcoplasmique en activant le récepteur à la ryanodine de type 2 (RyR2). L'augmentation massive de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  est à la base du couplage excitation-contraction. En effet, l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  se fixera à la troponine C. Ceci permet à la tête de myosine de se fixer sur les filaments d'actine causant ainsi la contraction du muscle cardiaque. Le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est alors retourné à l'intérieur du sarcoplasme, diminuant ainsi la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  et permettant au complexe tropomyosine de recouvrir les filaments d'actine, ce qui cause la relaxation du muscle. Il est à noter que, contrairement au cas du muscle squelettique, le mécanisme présent dans le muscle cardiaque ne nécessite pas que les sous-unités  $\text{Ca}_v1.2$  soient concentrées à proximité de RyR2, bien que cette proximité favorise l'action du  $\text{Ca}^{2+}$ . Bien que les deux protéines ne soient pas en interaction directe, il a été démontré que certaines protéines, telles la sorcine, qui interagissent avec RyR2 d'une part et avec l'extrémité C-terminale de  $\text{Ca}_v1.2$  d'autre part, favorisent leur couplage fonctionnel (Meyers et al. 1998).

### **1.2.1.3. Fonction au niveau neuronal**

Les canaux  $\text{Ca}_v2.1$  et  $\text{Ca}_v2.2$  ont comme fonction principale la régulation de la libération de neurotransmetteurs au niveau synaptique. Étant localisés préférentiellement au niveau pré-synaptique, ils interagissent avec les différentes protéines du complexe de sécrétion pour permettre l'ancrage des vésicules à la membrane plasmique et la libération  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante de celle-ci. L'interaction des protéines du complexe de sécrétion avec  $\text{Ca}_v2.1$  et  $\text{Ca}_v2.2$  résulte en des complexes fonctionnels permettant d'importantes

augmentations locales de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  à proximité des cibles et donc une grande efficacité du système (Jarvis et al. 2001).

Les canaux de la famille  $\text{Ca}_v1$  sont parfois associés au couplage excitation-transcription. Dans ce mécanisme, l'entrée de calcium via ces canaux pourrait activer la transcription de certains gènes par une interaction avec la protéine CREB. Cette capacité des canaux  $\text{Ca}_v1$  à activer CREB serait due à leur association avec des complexes de signalisation, notamment grâce à la calmoduline (CaM) (Dolmetsch 2003). La protéine CREB est un facteur de transcription qui, lorsque phosphorylée se liera sur une séquence d'ADN de type CRE (« cAMP Response Element »). La liaison de la protéine CREB sur la séquence CRE permet de réguler la transcription du gène associé. Un mécanisme alternatif de signalisation directe entre le canal et le noyau a été proposé par le groupe de Dolmetsch. En effet, ce groupe a montré qu'un fragment de l'extrémité C-terminale de  $\text{Ca}_v1.2$  est capable de se transloquer dans le noyau et de réguler la transcription d'une grande variété de gènes importants pour l'excitabilité et la signalisation neuronale (Gomez-Ospina et al. 2006). Il fut aussi démontré que le canal  $\text{Ca}_v2.1$  est capable de réguler l'expression de la syntaxine 1A qui relie le canal à la machinerie de sécrétion synaptique (Sutton et al. 1999).

#### **1.2.1.4. Pathologies associées aux canaux HVA**

L'importance des canaux calciques dans les différents mécanismes présentés dans les sections précédentes laisse deviner qu'un mauvais fonctionnement de ceux-ci peut facilement causer d'importantes pathologies. Afin d'observer et de comprendre l'effet d'une fonction inadéquate de ces canaux sur l'organisme, des modèles murins sont fréquemment utilisés, dans lesquels le gène qu'on désire étudier est invalidé (modèles « knock-out »). L'importance de ces canaux est aussi mise en évidence par le grand nombre de maladies génétiques qui leur sont associées. Ces mutations peuvent avoir deux effets. Dans le premier cas, la mutation provoque une perte de

régulation du canal qui se traduit en une augmentation anormale de son activité, soit un gain de fonction. Dans le second cas, la mutation provoque une absence totale ou partielle d'activité, soit une perte de fonction. Bien que différents dans leurs effets, ces deux types de modulation fonctionnelle mènent souvent au mauvais fonctionnement de plusieurs tissus (McKeown et al. 2006).

Les mutations invalidant le gène codant pour  $Ca_v1.1$  sont létales chez la souris (Beam et al. 1986). Ces souris sont caractérisées par un développement embryonnaire normal mais suivi d'un arrêt respiratoire lors de la naissance de l'animal. Chez l'homme, des mutations dans le gène codant pour  $Ca_v1.1$  induisent généralement une perte de fonction qui cause des paralysies périodiques hypokalemiques et de l'hyperthermie maligne.

Les souris dans lesquelles le gène codant pour  $Ca_v1.2$  a été invalidé meurent durant leur développement embryonnaire précoce par cause d'insuffisance cardiovasculaire, confirmant le rôle fondamental de ce canal dans le mécanisme de contraction cardiaque (Seisenberger et al. 2000). Chez l'humain, aucune mutation causant une perte de fonction complète n'a été signalée à ce jour, probablement puisqu'elles sont aussi létales. Certaines mutations causant un gain de fonction ont cependant été répertoriées (Splawski et al. 2004; Splawski et al. 2005). Ces mutations interfèrent avec l'inactivation et causent le syndrome de Timothy (Barrett et al. 2008), qui est caractérisé par un dysfonctionnement multi-systémique et des arythmies cardiaques.

Les souris déficientes en  $Ca_v1.3$  sont viables. Elles présentent cependant des troubles auditifs et cardiaques majeurs (Platzter et al. 2000). Leur surdité congénitale s'explique par une perte totale d'influx de  $Ca^{2+}$  dans les cellules ciliées de la cochlée, causant ainsi un important changement dans la morphologie de celle-ci. Dans le cœur,  $Ca_v1.3$  joue un rôle important dans

l'induction de l'activité rythmique cardiaque dans les cellules du nœud sino-auriculaire grâce à son bas seuil d'activation (Zhang et al. 2005).

La mutation du gène codant pour  $Ca_v1.4$  entraîne une interruption de la signalisation calcique et de la transmission synaptique au niveau des terminaisons des photorécepteurs de la rétine et perturbe l'organisation cellulaire de celle-ci chez la souris (Mansergh et al. 2005). Chez l'homme, les mutations répertoriées sont associées à la rétinite pigmentaire de type 2.

Les souris déficientes en  $Ca_v2.1$  meurent 3 à 4 semaines après la naissance et présentent un phénotype sévère d'ataxie et de dystonie (Jun et al. 1999). On observe une absence des courants de type P dans les cellules de Purkinje et de type Q dans les cellules granulaires. Ces courants sont impliqués dans la transmission synaptique rapide qui est tout de même maintenue en leur absence. Chez l'homme, des mutations du canal  $Ca_v2.1$  sont associées à trois maladies : la migraine familiale hémiplégique (gain de fonction), l'ataxie épisodique de type 2 (perte de fonction) et l'ataxie spino-cérébelleuse de type 6 (perte de fonction) (Kraus et al. 1998; Kraus et al. 2000).

Les souris knock-out pour le canal  $Ca_v2.2$  sont viables et ne présentent aucun phénotype sévère (Ino et al. 2001). On observe cependant, chez ces souris, une pression artérielle et un rythme cardiaque élevés, une baisse des réponses nociceptives dans les tests formaline (l'injection de formaline dans la patte de la souris cause des lésions tissulaires. Cette technique permet de caractériser la réponse de l'animal à la douleur persistante) et une sensibilité accrue aux stimuli nociceptifs thermiques (Hatakeyama et al. 2001).

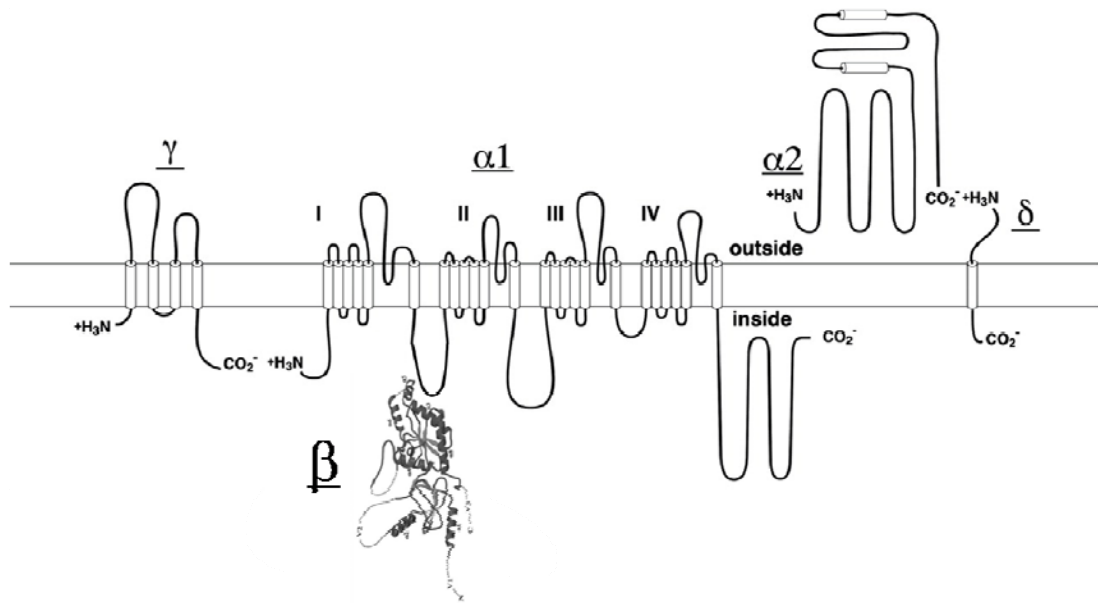
L'invalidation du gène codant pour  $Ca_v2.3$  cause un phénotype plus obscur chez les souris, qui sont viables malgré cette invalidation. Bien qu'aucune maladie ne soit liée à des mutations de ce gène chez l'humain, les travaux effectués par *Jing et al.* sur des souris « knock-out » prédisent que des mutations de ce gène peuvent affecter la sécrétion d'insuline stimulée par le

glucose dans les cellules beta du pancréas (Jing et al. 2005). Le groupe de Schneider a aussi montré que cette invalidation peut causer une baisse de l'activité cardiaque (Lu et al. 2004).

### 1.2.2. Éléments structuraux

Le premier canal calcique de type VDCC à être purifié fut  $Ca_v1.1$  ( $\alpha_{1S}$ ) par le groupe de Catterall en 1984 (Borsotto et al. 1984). Cette purification partielle, qui fut possible grâce à la haute affinité des canaux de type  $Ca_v1$  aux DHP, a permis d'observer que le complexe fonctionnel de la protéine est composé de quatre sous-unités ayant un rapport stœchiométrique de 1 : 1 : 1 : 1 (Striessnig et al. 1986), soit la sous-unité principale formant le pore,  $\alpha_1$  ainsi que trois sous-unités auxiliaires :  $Ca_v\alpha_2\delta$ ,  $Ca_v\beta$  et  $Ca_v\gamma$ . La sous-unité  $Ca_v\alpha_2\delta$  peut être dissociée en deux sous-unités,  $Ca_v\alpha_2$  et  $Ca_v\delta$  en condition réductrices puisqu'elles sont reliées par un pont disulfure extracellulaire (Barhanin et al. 1987; Takahashi et al. 1987a; Takahashi et al. 1987b).

Les observations faites grâce à la purification et le clonage d'autres canaux VDCC ont permis d'élaborer un modèle généralement accepté de nos jours selon lequel la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$ , formée de 24 segments transmembranaires et ayant ses extrémités N- et C-terminales du côté cytoplasmique, est associée aux sous-unités transmembranaires  $Ca_v\delta$  et  $Ca_v\gamma$  (seulement dans le cas de  $Ca_v1.1$ ) ainsi qu'aux sous-unités  $Ca_v\alpha_2$  (extracellulaire et attachée à  $Ca_v\delta$ ) et  $Ca_v\beta$  (cytoplasmique) (figure 2). Ce modèle fut confirmé par la reconstitution en 3D par cryo-microscopie du canal calcique du muscle squelettique (Wolf et al. 2003). Il est cependant à noter que tous les canaux VDCC ne sont pas liés aux quatre sous-unités. À titre d'exemples, citons  $Ca_v1.2$  qui n'interagit pas avec la sous-unité  $\gamma$  ainsi que les canaux LVA ( $Ca_v3.1$  et  $Ca_v3.2$ ) qui s'expriment sans sous-unités auxiliaires.



**Figure 2 : Structure prédite des canaux de type VDCC.** Les canaux VDCC sont formés d'une sous-unité principale,  $Ca_v\alpha_1$ , ainsi que de quatre sous-unités auxiliaires,  $Ca_v\alpha_2$ ,  $Ca_v\delta$ ,  $Ca_v\beta$  et  $Ca_v\gamma$ . La sous-unité  $Ca_v\alpha_1$  est composée de quatre domaines comprenant chacun 6 hélices transmembranaires. Les sous-unités  $Ca_v\delta$  et  $Ca_v\gamma$  sont transmembranaires, la sous-unité  $Ca_v\alpha_2$  est extracellulaire et la sous-unité  $Ca_v\beta$  est intracellulaire. Les sous-unités  $Ca_v\alpha_2$  et  $Ca_v\delta$  sont liées par un pont disulfure. Modifié de (Catterall et al. 2003).

### 1.2.2.1. La sous-unité $Ca_v\alpha_1$

La sous-unité  $Ca_v\alpha_1$  est la sous-unité principale des canaux VDCC et définit les différents canaux de cette famille. Elle forme le pore et contient le senseur de voltage de la protéine. Bien qu'il existe à ce jour 10 sous-unités  $Ca_v\alpha_1$  différentes, leur topologie reste la même, tel que présenté à la figure 2. Comme dans les canaux Nav et certains canaux Kv, elle est composée de quatre domaines (I à IV) reliés entre eux par trois boucles intracellulaires et contenant chacun six segments transmembranaires (S1 à S6). Cependant, contrairement aux canaux potassiques qui s'assemblent en

homotétramères, les quatre domaines des canaux de type VDCC ont une séquence primaire différente.

Les hélices S4 des canaux VDCC affichent un motif conservé dans chaque domaine et où l'on retrouve quatre à cinq acides aminés chargés positivement à pH neutre, majoritairement des arginines, tous espacés de deux acides aminés neutres. Ces résidus chargés pourraient agir en tant que senseur au voltage et se déplacer sous l'effet du champ électrique membranaire. Ce déplacement aurait pour effet un changement de conformation permettant l'ouverture du canal (Bezanilla 2002). Voir section 1.4.

Des études avec la méthode de « Substituted Cysteins Accessibility Method » (SCAM) ont permis au groupe de Yang d'identifier les résidus de l'hélice S6 qui sont accessibles du côté intracellulaire dans le canal  $Ca_v2.1$  (Zhen et al. 2005). Bien que dans les canaux potassiques de type  $K_v$  le pore soit tout à fait symétrique, la situation est différente dans les canaux calcique de type  $Ca_v$  et sodiques de type  $Na_v$ . En effet, les hélices S4 et S5 de ces canaux sont différentes dans les quatre domaines, ayant pour résultat un pore asymétrique tant au niveau structural que fonctionnel (Parent et al. 1995a; Swartz 2004). Il fut observé que, bien que de nombreuses positions de l'hélice S6 soient accessibles au méthaneéthiosulfonate-éthyltriméthylammonium (MTSET) intracellulaire, les effets observés dans les quatre domaines du canal calcique  $Ca_v2.1$  sont différents. Des effets furent aussi observés lorsque certains résidus des hélices S5 étaient remplacés par des cystéines, suggérant que cette hélice soit aussi impliquée dans la fonction du pore interne.

Le filtre des canaux VDCC est situé sur la boucle reliant les hélices S4 et S5, nommée « P-loop ». Cette région présente une affinité aux ions calciques de l'ordre de  $K_d \cong 1\mu M$ . Dans les canaux sodiques dépendants du voltage, quatre résidus conservés formant un motif DEKA (avec un des quatre

résidus distribué dans la boucle S5-S6 des quatre domaines) sont nécessaires à la sélectivité ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) du canal. Dans les canaux calciques, on retrouve un résidu glutamate conservé dans la « P-loop » de chaque domaine (Favre et al. 1996) (figure 3). Il fut cependant montré que dans les canaux Nav, comme dans les canaux  $\text{Ca}_V$ , les quatre résidus ne contribuent pas tous également à la sélectivité (Heinemann et al. 1992; Parent et al. 1995a; Favre et al. 1996). En effet, la lysine du domaine III de Nav1.2 constitue le principal déterminant de la sélectivité de ce canal (Favre et al. 1996).

<b>Ca<sub>v</sub>1.1</b>	{	<u>Na-channel</u>					
		I (398-402)	<b>T</b>	Q	D	Y	<b>W</b>
		II (753-757)	<b>C</b>	G	E	W	<b>I</b>
		III (1235-1239)	<b>T</b>	F	K	G	<b>W</b>
IV (1527-1531)	<b>T</b>	S	A	G	<b>W</b>		
<b>Na<sub>v</sub>1.2</b>	{	<u>Ca-channel</u>					
		I (290-294)	<b>T</b>	M	E	G	<b>W</b>
		II (612-616)	<b>T</b>	G	E	D	<b>W</b>
		III (1012-1016)	<b>T</b>	F	E	G	<b>W</b>
IV (1321-1325)	<b>T</b>	G	E	A	<b>W</b>		

**Figure 3 : Alignement des motifs DEKA et EEEE dans la P-Loop des canaux sodiques et calciques.** L'alignement du filtre de sélectivité de Nav1.2 et Ca<sub>v</sub>1.1 est basé sur la conservation des résidus thréonine (T) et tryptophane (W) (en noir). Modifié de (Favre et al. 1996)

Deux autres régions importantes furent mises en évidence dans le pore de la sous-unité  $\alpha_1$  des canaux HVA. Tout d'abord, il fut observé que des mutations sur les segments transmembranaires IIIS5, IIIS6 et IVS6 affectent grandement l'affinité des canaux Ca<sub>v</sub>1 pour les DHP, PAA et BTZ (Hockerman et al. 1997). En particulier, 11 mutations en alanine réparties sur les segments IIIS6 et IVS6 ont causé une importante réduction de l'affinité du canal pour les DHP (Peterson et al. 1997). Ces résultats



supportent grandement l'hypothèse selon laquelle les hélices S5 et S6 forment le pore du canal.

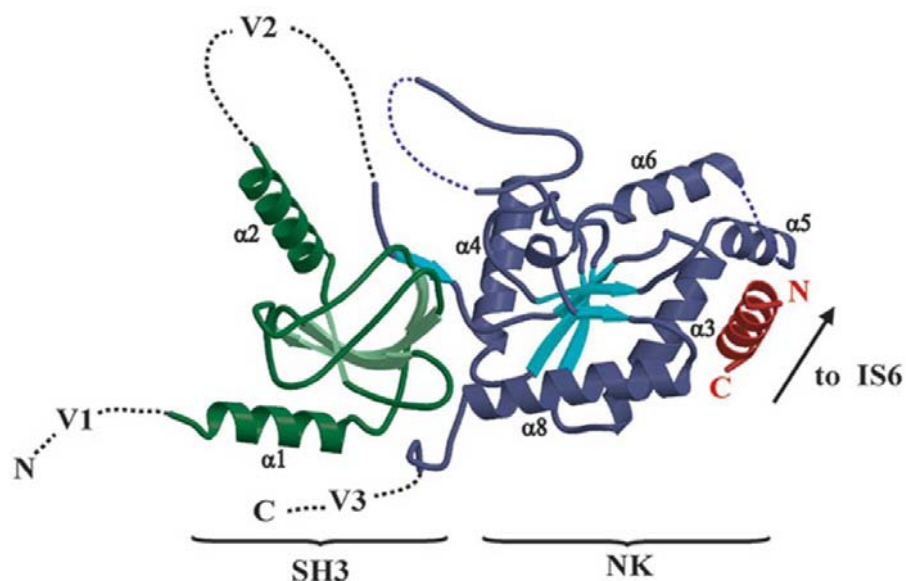
La boucle reliant les domaines I et II a été mise de l'avant comme site de liaison de la sous-unité  $Ca_v\beta$ . En effet, cette boucle contient une région conservée dans les canaux de type HVA, nommé « Alpha Interaction Domain » (AID) qui permettrait la liaison de la sous-unité  $\beta$ . Cette région est composée de 18 acides aminés, dont 9 sont strictement conservés dans tous les canaux de type HVA (Walker et al. 1998). Voir section 1.2.1.2.2.

### 1.2.2.2. La sous-unité $\beta$

La sous-unité intracellulaire  $Ca_v\beta$  des canaux  $Ca_v$  fait partie de la famille des guanylates kinases associées à la membrane (MAGUK). Il en existe quatre isoformes différentes ( $Ca_v\beta1$  à  $Ca_v\beta4$ ) dont les poids moléculaires varient entre 52 et 78 kDa (Walker et al. 1998). L'une de ces sous-unités, soit  $Ca_v\beta2a$ , est ancrée à la membrane plasmique par la palmitoylation de deux cystéines se trouvant sur son extrémité N-terminale. Il a été montré que cette palmitoylation ralentit les cinétiques d'activation dépendante du voltage (Chien et al. 1996; Qin et al. 1998; Dafi et al. 2004; Leroy et al. 2005).

La co-cristallisation du domaine AID de  $Ca_v1.2$  avec la sous-unité  $Ca_v\beta2a$  a permis d'identifier plusieurs régions importantes dans celle-ci (Van Petegem et al. 2004). En effet, les sous-unités  $Ca_v\beta$  comporte deux régions hautement conservées, soit le domaine SH3 (« Src Homology-3 ») et le domaine GK ou NK (« Guanylate Kinase » ou « Nucleotide Kinase »). Ce dernier contient le motif d'interaction avec la sous-unité  $\alpha1$ , nommé « Beta Interaction Domain » (BID). Les protéines  $Ca_v\beta$  se distinguent des autres membres de la famille MAGUK par la présence d'un seul domaine d'interaction protéine-protéine de type PDZ (« Post synaptic Disc Large Zona »). La structure du complexe  $Ca_v\beta2a / Ca_v1.2$ -AID est présentée à la figure 4.

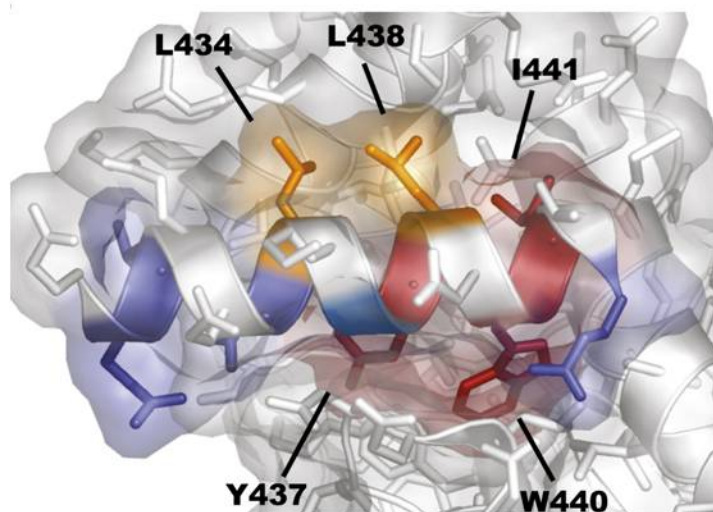
La liaison entre les sous-unités  $Ca_v\alpha_1$  et  $Ca_v\beta$  est possible grâce à la région AID située sur la boucle intracellulaire reliant le domaine 1 au domaine 2. On retrouve dans cette boucle le motif **QQXEXXLXGYXXWIXXXE** où les résidus en gras sont strictement conservés dans toute la famille des canaux HVA et où X désigne un acide aminé quelconque (Walker et al. 1998).



**Figure 4 : Structure du complexe  $Ca_v\beta_2a$  /  $Ca_v1.2$ -AID :** La sous-unité  $Ca_v\beta_2a$  a été co-cristallisée avec le domaine AID de  $Ca_v1.2$  avec une résolution de 1.97 Å. Le domaine SH3 (vert) contient cinq feuillets  $\beta$  antiparallèles ainsi que deux hélices  $\alpha$  ( $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ ). Le domaine NK contient cinq feuillets  $\beta$  parallèles (bleu) entourés de six hélices  $\alpha$  ( $\alpha_3$  à  $\alpha_8$ , mauve). Le domaine AID de  $Ca_v1.2$  est représenté en rouge. Les boucles VI, V2 et V3 n'ont pu être cristallisées en raison de leur forte variabilité.

La région AID contient trois acides aminés importants pour la liaison avec la sous-unité  $\beta$ , soit les résidus Y, W et I (figure 5). Bien que la liaison peut se faire en remplaçant les résidus Y et I par mutagenèse dirigée, la présence du résidu W est essentielle pour observer une liaison. Des mutations hydrophobes, hydrophiles ou aromatiques de ce tryptophane empêchent effectivement toute la liaison de  $Ca_v\beta$  sur la sous-unité  $Ca_v2.3$  (Berrou et al. 2002).

La sous-unité  $\text{Ca}_v\beta$  joue un important rôle dans l'adressage à la membrane plasmique des canaux HVA. En effet, certains canaux  $\text{Ca}_v$ , comme  $\text{Ca}_v1.2$ , ne s'expriment pas à la membrane sans la présence de  $\text{Ca}_v\beta$ . Il a été proposé que la boucle I-II de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha1$  des canaux HVA contienne un signal de rétention qui retient la protéine au réticulum endoplasmique (RE). La haute affinité de  $\text{Ca}_v\beta$  ( $K_d \cong 20 \text{ nM}$ ) permettrait cependant d'arracher la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha1$  du RE et de l'amener à la membrane plasmique (Brice et al. 1997; Bichet et al. 2000). La nature moléculaire de ce signal de rétention n'est toutefois pas encore identifiée.



**Figure 5 : Résidus importants lors de la liaison  $\text{Ca}_v\beta2a$  /  $\text{Ca}_v1.2\text{-AID}$ .** Les résidus Y437, W440 et I441 sont impliqués dans la liaison entre les deux protéines. Le code de couleur indique l'effet des mutations en alanine mesuré par calorimétrie à titrage isothermique. Bleu foncé :  $0.5 - 1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ , bleu pâle :  $1.5 - 3 \text{ kcal mol}^{-1}$ , orange :  $> 3 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Van Petegem et al. 2008).

En plus de son rôle dans l'adressage à la membrane plasmique, la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta$  module fortement les propriétés de gating des canaux  $\text{Ca}_v1$  et  $\text{Ca}_v2$ . En effet, selon la nature de l'isoforme qui est liée à la sous-unité  $\alpha1$ , les propriétés d'activation et d'inactivation peuvent être fortement modulées. Par exemple, dans  $\text{Ca}_v2.3$ , la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta3$  déplace le potentiel de mi-

activation de  $-1,6 \pm 0,6$  (n = 29) en absence de sous-unité  $\text{Ca}_V\beta$  à une valeur de  $-6,7 \pm 0,4$  mV (n = 108, données du laboratoire de Lucie Parent) en présence de  $\text{Ca}_V\beta_3$  le potentiel de mi-inactivation de  $-44$  mV (Parent et al. 1997) à  $-63,5 \pm 0,6$  mV (n = 74, données du laboratoire de Lucie Parent) respectivement, en plus d'accélérer les cinétiques d'inactivation. À l'opposé, la sous-unité  $\text{Ca}_V\beta_2a$  ralentit les cinétiques d'inactivation et déplace la courbe d'inactivation de  $-44$  mV en absence de sous-unité  $\text{Ca}_V\beta$  à  $-31$  mV en présence de  $\text{Ca}_V\beta_2a$  (Parent et al. 1997). Il a été observé dans  $\text{Ca}_V2.3$  que l'amplitude de la modification des cinétiques d'inactivation en fonction de la sous-unité  $\text{Ca}_V\beta$  varie de la plus rapide à la plus lente dans l'ordre  $\text{Ca}_V\beta_3 \cong \text{Ca}_V\beta_{1b} > \text{Ca}_V\beta_{1a} \cong \text{Ca}_V\beta_4 \gg \text{Ca}_V\beta_2a$  (Parent et al. 1997).

### 1.2.2.3. La sous-unité $\text{Ca}_V\alpha_2\delta$

La sous-unité  $\text{Ca}_V\alpha_2\delta$  est constituée de deux protéines. La protéine  $\text{Ca}_V\alpha_2$  est extracellulaire et interagit avec la sous-unité principale  $\text{Ca}_V\alpha_1$ . Elle est reliée par un pont disulfure à la sous-unité  $\delta$  qui est transmembranaire. Ces deux protéines, qui sont issues de l'épissage alternatif d'un même gène, subissent un clivage post-traductionnel pour ensuite être reliées à l'aide d'un pont disulfure (Randall et al. 1999). On retrouve quatre isoformes différentes de cette protéine,  $\text{Ca}_V\alpha_2\delta-1$  à  $\text{Ca}_V\alpha_2\delta-4$ , ayant un poids moléculaire allant de 130 à 200 kDa (Qin et al. 2002; Klugbauer et al. 2003). Les isoformes  $\text{Ca}_V\alpha_2\delta-1$  et  $\text{Ca}_V\alpha_2\delta-2$  sont ubiquitaires,  $\text{Ca}_V\alpha_2\delta-3$  est spécifique au cerveau et  $\text{Ca}_V\alpha_2\delta-4$  se retrouve au niveau du muscle squelettique. Le niveau d'homologie entre les isoformes varie entre 30% et 60%. Ces protéines contiennent toutes plusieurs sites de glycosylation, ce qui en fait des glycoprotéines. Leur rôle sur la sous-unité  $\alpha_1$  varie selon l'isoforme concerné, mais se résume généralement à un accroissement de l'amplitude des courants ioniques ainsi que certaines faibles modulations des cinétiques

d'activation et d'inactivation (Arikkath et al. 2003). Cette modulation demeure dans l'ensemble moins importante que celle de la sous-unité  $Ca_V\beta$ .

#### **1.2.2.4. La sous-unité $\gamma$**

La sous-unité  $Ca_V\gamma$  est formée de quatre segments transmembranaires et ses extrémités N- et C-terminales sont intracellulaires. On connaît à ce jour huit isoformes différentes de cette sous-unité, soit  $Ca_V\gamma_1$  à  $Ca_V\gamma_8$ , dont le poids moléculaire varie entre 28 à 35 kDa. La sous-unité  $Ca_V\gamma_1$  se trouve dans le muscle squelettique couplée à  $Ca_V1.1$  (Sharp et al. 1989). Les isoformes  $Ca_V\gamma_2$  à  $Ca_V\gamma_4$  se retrouvent au niveau du cerveau, en relation avec les canaux  $Ca_V2.1$  et  $Ca_V2.2$  et le récepteur AMPA (Sharp et al. 2001) alors que les isoformes  $Ca_V\gamma_5$  à  $Ca_V\gamma_7$  se retrouvent au niveau du coeur. Finalement,  $Ca_V\gamma_8$  se retrouve au niveau du cerveau (Hansen et al. 2004).

Le rôle physiologique de la sous-unité  $Ca_V\gamma$  est moins bien défini que pour les deux autres sous-unités auxiliaires. Il a été rapporté que dans certains cas,  $Ca_V\gamma$  peut augmenter les niveaux de courants et déplacer la courbe d'activation vers des potentiels hyperpolarisants. Cependant, ces effets sont non seulement fonction de la sous-unité  $Ca_V\alpha_1$  présente, mais aussi de la sous-unité  $Ca_V\beta$  utilisée (Rousset et al. 2001)

### 1.2.3. Propriétés biophysiques

Le mouvement des ions dans la cellule est régi par le potentiel électrochimique présent de part et d'autre de la membrane plasmique. La valeur de ce potentiel peut être obtenue par la formule de Nernst :

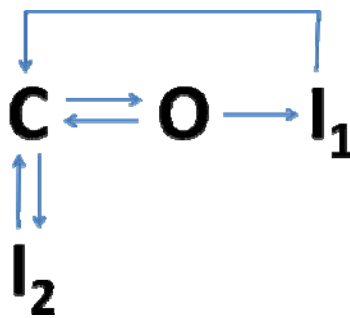
$$E_{ion} = \frac{RT}{z_{ion} F} \ln \left( \frac{[Ca^{2+}]_{ext}}{[Ca^{2+}]_{int}} \right)$$

Pour les ions  $Ca^{2+}$ , cette équation prend les valeurs  $RT/F \approx 25$  mV à 22°C,  $z_{Ca} = 2$ ,  $[Ca^{2+}]_{ext} = 1.5$  mM et  $[Ca^{2+}]_{int} = 10^{-4}$  mM. Le potentiel de Nernst pour l'ion calcium est donc d'environ +120 mV à 22°C. Cette valeur signifie qu'à des potentiels membranaires plus négatifs que +120 mV, donc pour toute la gamme des potentiels physiologiques, les ions calciques subissent une force vers l'intérieur de la cellule alors qu'à des potentiels membranaires plus positifs que +120 mV, ces ions subissent une force vers l'extérieur de la cellule.

Les cellules humaines excitables ont un potentiel de repos normal d'environ -80 mV déterminé par le gradient électrochimique des ions potassiques. Les VDCC sont donc majoritairement dans la conformation fermée ou inactivée lorsque la cellule est au repos. Cependant, lors d'une dépolarisation (la membrane est amenée à un potentiel plus positif) les canaux de type VDCC subissent un changement de conformation vers les états ouverts et inactivés. Ces changements de conformations constituent le « gating » de la protéine.

Les canaux ioniques qui dépendent du voltage ont minimalement accès à trois différents états distincts, soit les états fermé, activé et inactivé (Yellen 1998; Hille 2001). Il faut cependant noter qu'il existe souvent plusieurs conformations différentes qui peuvent mener au même état discernable. Au potentiel de repos de la cellule,  $Ca_v2.3$  est majoritairement fermé ou inactivé. En effet, ayant un potentiel de mi-inactivation, mesuré en présence de la

sous-unité  $\beta_3$  dans une solution de 10 mM  $\text{Ba}^{2+}$ , de  $-63,4 \pm 0,4$  mV ( $n = 74$ ) (Raybaud et al. 2007), on observe que  $14 \pm 1$  % ( $n = 74$ ) des canaux sont dans l'état inactivé au potentiel de repos de la cellule (Patil et al. 1998). Ceci est une propriété du canal  $\text{Ca}_v2.3$  et ne se retrouve pas nécessairement dans tous les canaux calciques. Le canal calcique de type L  $\text{Ca}_v1.2$  a un potentiel de mi-inactivation en 10 mM  $\text{Ba}^{2+}$  de  $-23 \pm 1$  mV ( $n = 21$ ) (Dafi et al. 2004), donc ne s'inactive que très peu à partir de l'état fermé. Un diagramme cinétique simplifié de  $\text{Ca}_v2.3$  est présenté à la figure 6.



**Figure 6. Diagramme cinétique minimal de  $\text{Ca}_v2.3$ .** Le canal calcique  $\text{Ca}_v2.3$  peut passer directement de l'état fermé (C) à l'état inactivé ( $I_1$ ) ou à l'état ouvert (O). De l'état ouvert, il passera ensuite à l'état inactivé où il ne peut retourner à l'état ouvert sans passer par l'état fermé. (Patil et al. 1998)

Lorsque la cellule subit une dépolarisation, les canaux qui se trouvent dans l'état fermé pourront changer de conformation pour passer à l'état activé qui laisse passer les ions. Après un certain temps ( $\tau_{\text{inact}}$ ) qui est une propriété intrinsèque des canaux, ceux se trouvant dans l'état ouvert subiront un changement de conformation pour passer à l'état inactivé, un état conformationnel différent de l'état fermé mais dans lequel la protéine ne laisse pas passer les ions.

### 1.2.3.1. Activation

L'activation des canaux VDCC consiste en le passage de l'état fermé à l'état ouvert et se produit en réponse à une dépolarisation de la membrane. Chaque hélice S4 de la protéine contient un motif où l'on retrouve une série d'acides aminés chargés, majoritairement des arginines (nommées R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, etc.), tous espacés de deux à trois acides aminés neutres. Ces résidus chargés se déplacent sous l'effet du champ électrique membranaire. Ce déplacement induit un changement de conformation qui permet l'ouverture des hélices S6 et donc le passage des ions à travers le canal (Yellen 1998). Voir section 1.4.

### 1.2.3.2. Inactivation

En plus des états ouvert et fermé de la protéine, on observe un troisième état qui, malgré le maintien de la dépolarisation membranaire, empêche le passage des ions. Il s'agit de l'état inactivé. Chez les canaux de type VDCC, l'inactivation peut être déterminée soit par le voltage (VDI pour « voltage dependant inactivation ») soit par les ions Ca<sup>2+</sup> (CDI pour « calcium dependant inactivation »).

#### 1.2.3.2.1 Inactivation dépendante du calcium (CDI)

L'inactivation dépendante du Ca<sup>2+</sup> fut d'abord observée dans les canaux de type Ca<sub>v</sub>1 où l'inactivation dépendante du voltage ne suffit pas à complètement inactiver les courants macroscopiques observés en présence de Ba<sup>2+</sup>. En effet, chez Ca<sub>v</sub>1.2 ces courants ne sont inactivés qu'à 50 ± 1% (n = 129) après un pulse de 800 ms en présence de 10 mM Ba<sup>2+</sup>. Or, en présence de la même concentration de Ca<sup>2+</sup>, on observe un courant résiduel de 0,01 ± 0,01 (données du laboratoire de Lucie Parent).



La première hypothèse concernant le site de détection du  $\text{Ca}^{2+}$  fut le motif de type « EF hand » qui se trouve dans la partie C-terminale de la protéine (de Leon et al. 1995). Des études par le groupe de Yue avaient proposé cette région comme responsable de la CDI. Cette théorie fut plus tard abandonnée au profit d'un autre site de liaison situé dans la partie C-terminale et qui ferait intervenir la calmoduline (CaM). La CDI dépendrait alors de la liaison de la calmoduline sur la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux de type VDCC. La CaM est une protéine ubiquitaire qui présente quatre sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  et dont la fonction et la conformation dépendent de la présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Il fut démontré chez  $\text{Ca}_v1.2$  que l'extrémité C-terminale de la protéine présente un motif IQ qui sert de site de liaison à la CaM (Rhoads et al. 1997; Zuhlke et al. 1998). Il fut ensuite démontré que plusieurs mutations de ces acides aminés réduisaient grandement l'inactivation du canal en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , supportant ainsi l'hypothèse que ce motif lie la CaM et que celle-ci est fortement impliquée dans la CDI (Zuhlke et al. 1999; Zuhlke et al. 2000). Finalement, en 2005, le groupe de Minor publia la structure cristalline du complexe  $\text{Ca}_v1.2\text{-IQ/CaM/Ca}^{2+}$  qui montra sans équivoque que le domaine IQ de  $\text{Ca}_v1.2$  forme une hélice enchâssée au milieu des lobes N- et C-terminaux de la CaM (Van Petegem et al. 2005).

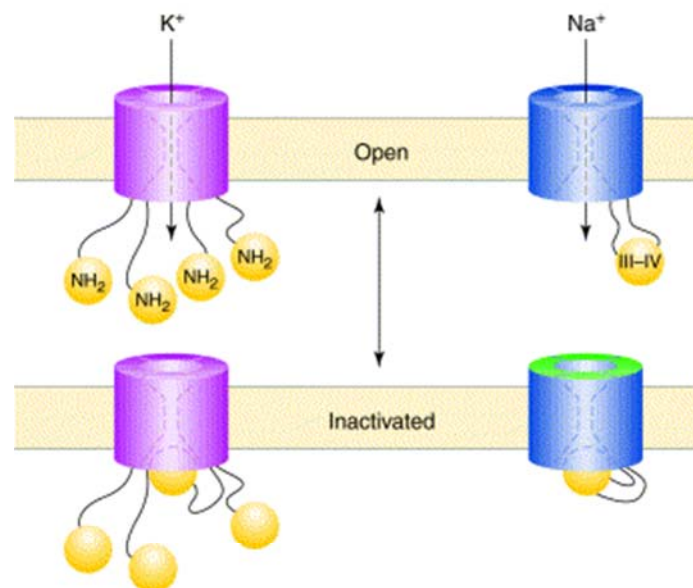
#### 1.2.3.2.2. Inactivation dépendante du voltage (VDI)

Bien que les facteurs déterminants de la CDI soient limités et bien connus, ceux dont dépend l'inactivation dépendante du voltage (VDI) restent à ce jour plus obscurs. Les modèles présentement proposés pour l'inactivation des canaux VDCC sont inspirés des canaux potassiques et sodiques. En effet, les canaux potassiques présentent une inactivation de type « Ball and Chain ». Lors de l'inactivation, la partie N-terminale de la protéine se replie

pour obstruer le pore. On observe alors que les courants sont inhibés, malgré que le pore demeure dans sa conformation ouverte (Yellen 1998). Dans les canaux sodiques, le groupe de Catterall a identifié un motif IFM contenu dans la boucle reliant les domaines III et IV qui serait responsable du repliement de cette boucle intracellulaire qui viendrait bloquer le pore pour inhiber le passage des ions (figure 7) (Catterall 1996).

Les premiers pas vers l'identification des déterminants moléculaires de la VDI des canaux VDCC furent effectués par le groupe de R.W. Tsien. À l'aide de chimères des canaux  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v2.1$  et  $Ca_v2.3$ , ils identifièrent la boucle entre les domaines I et II comme importante dans ce type d'inactivation (Zhang et al. 1994). L'étude de chimères de ces mêmes canaux a permis à plusieurs groupes de montrer que les domaines II et III sont aussi impliqués lors de l'inactivation (Parent et al. 1995b; Spaetgens et al. 1999; Bernatchez et al. 2001; Berrou et al. 2002). Les observations de Tsien et Zamponi semblent alors indiquer que l'inactivation des canaux calciques se produit par un changement de conformation global de la protéine. Ce type de mécanisme fut observé dans les canaux potassiques alors que l'inactivation lente de ceux-ci est causée par l'effondrement du filtre de sélectivité (« pore collapse ») (Kukuljan et al. 1995; Yellen 1998). Dans ce modèle, tous les segments S6 de la protéine seraient impliqués. Il fut démontré en 2000 que lorsqu'on substitue les segments IIS6 ou IIIS6 de  $Ca_v2.3$  dans  $Ca_v1.2$ , on retrouve le phénotype d'inactivation de  $Ca_v2.3$  (Stotz et al. 2000). Le groupe de Lucie Parent a aussi montré un rôle de la boucle entre les domaines I et II qui viendrait se replier sous le pore durant l'inactivation (Raybaud et al. 2006). Ces observations tendent à montrer 2 mécanismes d'inactivation, soit par les boucles intracellulaires (N-type) et par le pore (C-type). Il est important de mentionner que, comme montré à la figure 6, il peut être nécessaire pour la protéine de passer par l'état ouvert pour s'inactiver. La transition C – I n'est pas permise pour plusieurs canaux de type  $Ca_v$ , tel que  $Ca_v1.2$ . Dans ce cas, l'inactivation est forcément liée à l'activation de la

protéine. Notons d'ailleurs que certaines des mutations causant la migraine hémiplegique familiale dans  $Ca_v2.1$  sont situées dans les segments IIS6 et IVS6 (Kraus et al. 1998; Kraus et al. 2000). Mentionnons finalement que l'étude de divers isoformes issues de l'épissage alternatif de  $Ca_v1.2$  (Soldatov et al. 1997) et  $Ca_v2.1$  (Sandoz et al. 2001) a permis d'attribuer un rôle à l'extrémité C-terminale de la protéine dans l'activation dépendante du voltage.



**Figure 7 : Inactivation des canaux potassiques et sodiques.** Les canaux potassiques (mauve) s'inactivent par le repliement de leur région N-terminale en dessous du pore, inhibant ainsi le passage des ions. Dans les canaux sodiques (bleu), le motif IFM fut identifié comme responsable du repliement de la boucle III-IV sous le pore, inhibant encore une fois le passage des ions. Modifié de (Yellen 1998).

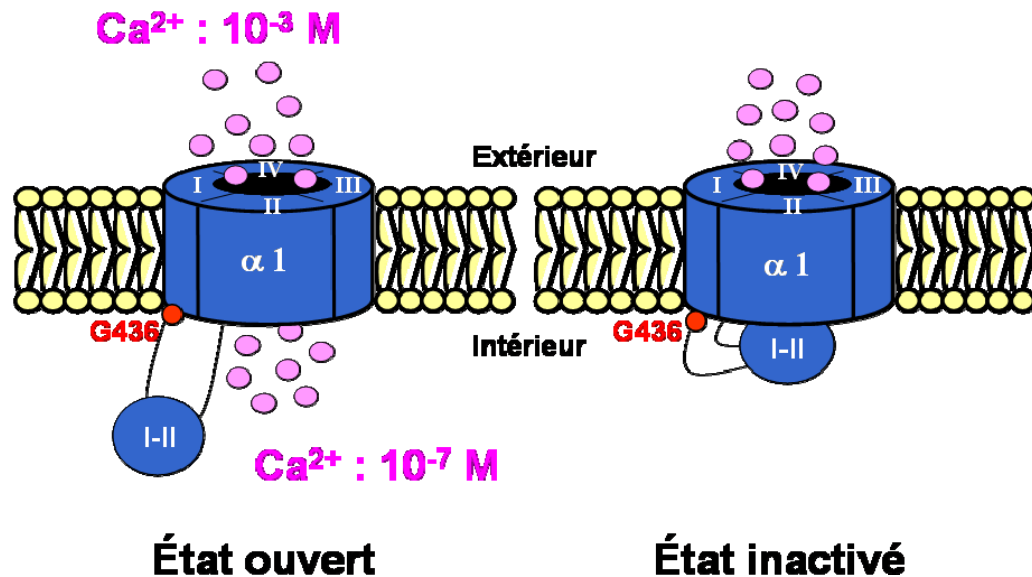
La boucle I-II demeure cependant, dans les canaux de type HVA, la région la plus importante en ce qui concerne la VDI. Des études ont été effectuées sur deux isoformes issues de l'épissage alternatif que  $Ca_v2.1$  nommées  $Ca_v2.1_a$  et  $Ca_v2.1_b$ . La boucle I-II de  $Ca_v2.1_b$  contient une valine supplémentaire. Or, cet isoforme présente des cinétiques d'inactivation beaucoup plus lente et son potentiel de mi-inactivation se voit déplacé de

+20mV (Bourinet et al. 1999). Le laboratoire de Lucie Parent a montré par mutagenèse dirigée que les résidus chargés négativement de la partie N-terminale du AID de  $Ca_v1.2$  (E461, E462 et D463) jouent un rôle dans la VDI de celui-ci (Dafi et al. 2004). La cristallisation du AID a montré que les chaînes latérales de ces résidus pointent à l'opposé du site de liaison et la sous-unité  $\beta$ . Lorsque ces acides aminés sont mutés en résidus neutres ou positifs, on observe une accélération des cinétiques d'inactivation. En effet, il fut observé que la fraction courant résiduel après un pulse de 300 ms (R300) passe de 0,7 pour le canal de type sauvage à 0,3 pour la mutation E462R. Plusieurs observations, incluant celles-ci, ont mené à un modèle de type « Hinged-Lid » (figure 8) où la boucle I-II qui interagit avec la sous-unité  $\beta$  viendrait se replier sous la face cytoplasmique du pore (Stotz et al. 2000; Bernatchez et al. 2001).

D'autres régions ont été identifiées comme étant impliquées dans l'inactivation dépendante du voltage des canaux VDCC, telles que l'extrémité N-terminale de la protéine (Stephens et al. 2000) ainsi que les boucles II-III et III-IV. En effet, la délétion d'une partie de la boucle reliant les domaines II et III de  $Ca_v2.2$  résulte en un déplacement positif de 25 mV de la courbe d'inactivation, sans cependant modifier les cinétiques (Kaneko et al. 2002). Des études par protéines de fusion ont aussi montré que la boucle I-II pourrait interagir avec les boucles II-III et III-IV dans le canal  $Ca_v2.1$ . La sous-unité auxiliaire  $Ca_v\beta4$  antagoniserait cette dernière liaison (Geib et al. 2002).

En 2006, le groupe de Lucie Parent a mis en évidence le rôle de la glycine G436 dans  $Ca_v1.2$  qui agirait à titre de pivot dans le repliement de la boucle I-II sous le canal durant l'inactivation. En effet, les mutations de cette glycine tendent à produire un canal qui ne s'inactive que très peu (les mutations G436P, G436R, G436K, G436H, G436E, et G436D montrent un courant résiduel après 800 ms supérieur à 0,9). Il est intéressant de noter que des

mutations de cette glycine sont associées au syndrome de Timothy, qui a pour symptôme principal de graves arythmies cardiaques (Splawski et al. 2005).



**Figure 8 : Inactivation de type « Hinged-Lid » des canaux de type VDCC :** Lors de l'inactivation des canaux VDCC, le boucle I-II se replierait sous le pore pour bloquer le passage des ions à travers celui-ci. Ce repliement serait possible grâce à la glycine G436 qui se trouve à l'interface membrane/cytoplasme. (Stotz et al. 2000; Bernatchez et al. 2001; Raybaud et al. 2006)

### 1.3. Activation des canaux potassiques

Les canaux potassiques dépendants du voltage (canaux Kv) constituent généralement un modèle de choix pour tenter de mieux comprendre le mode de fonctionnement des canaux calciques. En effet, plusieurs canaux potassiques procaryotes et eucaryotes ont été cristallisés (MthK, KcsA, Kv1.2, KvAP), permettant de voir en détails les diverses régions impliquées dans le fonctionnement de ces protéines. Les travaux effectués sur ces protéines ont permis de mettre en évidence quatre régions critiques dans l'ouverture des canaux potassiques dépendants du voltage, soit le

capteur de voltage S4, la boucle S4-S5, le pore et la porte d'activation formée par une partie de l'hélice S6. La membrane plasmique, étant un milieu hydrophobe, crée une haute barrière d'énergie au passage des ions d'un côté à l'autre de la membrane. Cependant, le pore d'un canal constitue un milieu aqueux propice au passage de ces ions. Lorsque le pore est en conformation ouverte, le courant passant à travers celui-ci ( $I_m$ ) est proportionnel à la différence entre le potentiel membranaire ( $V_m$ ) et le potentiel de Nernst de l'ion en question ( $E_N$ ) (Hodgkin, et al., 1952).

$$I_m = g(V, T) \cdot (V_m - E_N)$$

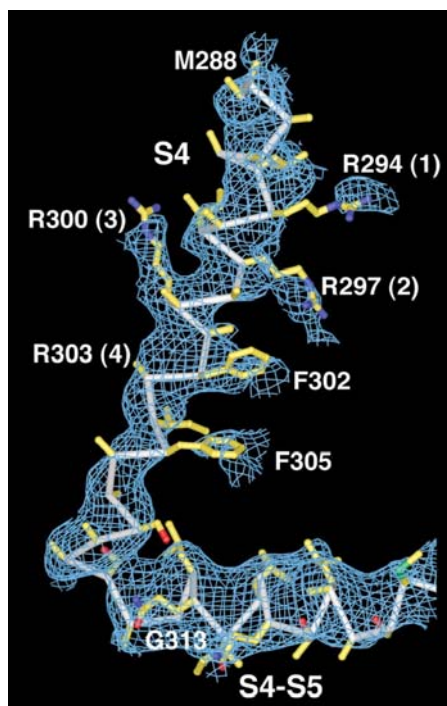
Il est cependant nécessaire, dans le cas des canaux dépendants du voltage, de produire une dépolarisation de la membrane fournissant l'énergie nécessaire au mouvement du capteur de voltage S4 qui permettra l'ouverture de la porte d'activation (Yellen 1998).

### 1.3.1 Le capteur au voltage S4

La sensibilité au voltage des canaux de type  $K_V$  nécessite une sonde moléculaire pouvant détecter et répondre finement à des changements de potentiel membranaire. Cette sonde est constituée d'acides aminés chargés positivement se trouvant dans le champ électrique de la membrane pouvant opérer un déplacement en réponse à un changement du potentiel membranaire (Hodgkin et al. 1952). Dans les canaux potassiques de type  $K_V$ , cette sonde est constituée de quatre arginines situées dans les hélices S4 formant un motif  $RX_3RX_3RX_3R$  où les acides aminés X sont des résidus hydrophobes (figure 9) (Hille 2001). Lorsque le potentiel de repos de la cellule est modifié, ces résidus réagissent à la variation du champ électrique dans la membrane (Bezánilla et al. 1998). Le déplacement de ces arginines à travers le champ électrique de la membrane plasmique donne lieu à un courant électrique, nommé « courant de gating », d'une amplitude d'environ

deux ordres de grandeur de moins que le courant ionique à travers le pore. Ce courant fournit une estimation du nombre de canaux à la membrane par l'intermédiaire du nombre de charges se déplaçant dans le champ électrique de la membrane (Bezanilla et al. 1998).

Bien qu'il soit accepté que les arginines de l'hélice S4 confèrent la sensibilité au voltage, le type de déplacement que subissent ces résidus reste encore sujet à débat. Trois modèles sont proposés, soit le modèle de la vis hélicoïdale, le modèle du transporteur et le modèle de la pagaie.

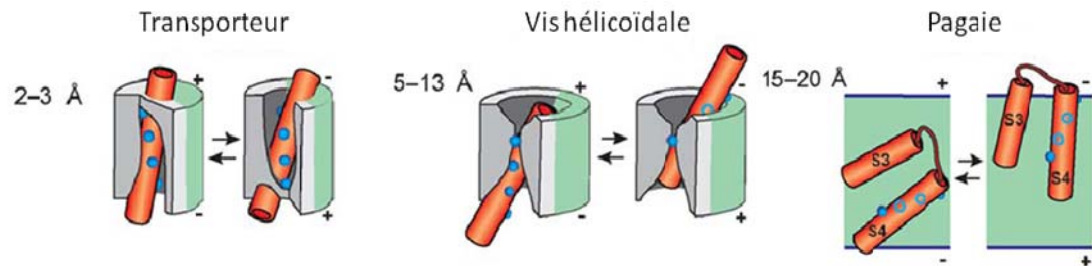


**Figure 9 : Hélice S4 de Kv1.2.** L'hélice S4 de Kv1.2 contient quatre arginines (R294, R297, R300 et R300) formant un motif  $RX_3RX_3RX_3R$  responsable de la sensibilité au voltage (Long et al. 2005a).

Le modèle le plus ancien, celui de la vis hélicoïdale (Catterall 1986; Guy et al. 1986), se distingue des autres modèles par son type de mouvement ainsi que son amplitude. Dans ce modèle, les charges subissent une rotation accompagnée d'une translation le long de l'axe de rotation à travers le

champ membranaire. L'amplitude de ce mouvement est entre 5-13 Å. Certains résidus du S4 (R1, R2 et R3) passeraient alors d'une exposition au milieu intracellulaire à une exposition au milieu extracellulaire. Le modèle du transporteur (Bezanilla 2002) consiste en un mouvement limité (2-3 Å ) de l'hélice S4. Lorsque la protéine se trouve dans l'état fermé, les charges de l'hélice S4 sont situées dans une cavité en contact avec la solution intracellulaire. Lors de l'activation, ces charges se déplacent sous l'effet du potentiel membranaire vers une deuxième cavité, cette fois en contact avec la solution extracellulaire. Le déplacement, dans ce modèle, consiste en une rotation et une inclinaison de l'hélice S4, qui ne subit pas de translation. Le modèle de la pagaie, inspiré par la structure cristalline de KvAP (Jiang et al. 2003a; Jiang et al. 2003b), propose un déplacement non seulement de l'hélice S4, mais aussi de la partie extracellulaire de S3 (S3b). Il se distingue aussi par une amplitude de mouvement nettement supérieure aux deux autres modèles, soit un déplacement net (somme du déplacement vertical et latéral) de 15-20 Å (Ruta et al. 2005). Dans la conformation fermée de la protéine, l'hélice S4 se trouverait enfouie dans la membrane, près du milieu intracellulaire, alors que S3b est situé au-dessus de S4. La dépolarisation de la membrane causerait un mouvement de ces deux régions vers la face externe de la membrane (Bezanilla 2005; Tombola et al. 2006). Il est à noter que contrairement aux deux modèles précédents, le modèle de la pagaie propose un déplacement des arginines de l'hélice S4 dans le milieu lipidique de la membrane. Suite aux données publiées au cours de dernières années, le modèle de la pagaie est pratiquement disparu. Les trois modèles sont montrés à la figure 10.





**Figure 10 : Modèles de déplacement du S4.** Le modèle du transporteur, le modèle de la vis hélicoïdale et le modèle de la pagaie. Modifié de (Tombola et al. 2006).

Le mouvement de l'hélice S4 donne lieu à un courant transitoire, le courant de « gating », qui peut être représenté mathématiquement (Bezanilla 2000). L'intégrale sur le temps du courant de « gating » donne la charge  $Q(V)$ , fonction du voltage, déplacée lors du changement de conformation. Cette charge, lorsque tracée en fonction du voltage, donne une courbe de type Boltzmann, où les asymptotes représentent les deux états à l'équilibre du canal.

### 1.3.2. La porte d'activation

Au potentiel de repos de la cellule (entre -40 mV à -90 mV), les canaux Kv sont dans une conformation qui ne laisse passer peu d'ions ( $P_O < 0,01$ ). Lorsque la membrane subit une dépolarisation, un changement de conformation permet d'accélérer le passage des ions. Ce mécanisme requiert qu'une partie de la protéine assume le rôle d'une porte, qui obstrue le passage des ions dans la conformation fermée et s'ouvre suite à une dépolarisation pour laisser passer ceux-ci. En 1966, le groupe d'Armstrong a démontré qu'il est nécessaire d'ouvrir les canaux potassiques pour permettre l'accès aux inhibiteurs. En effet, la liaison d'ammonium quaternaire, une classe de bloqueurs des canaux potassiques qui se lie sur le pore pour empêcher le passage des ions, nécessite une ouverture préalable du pore

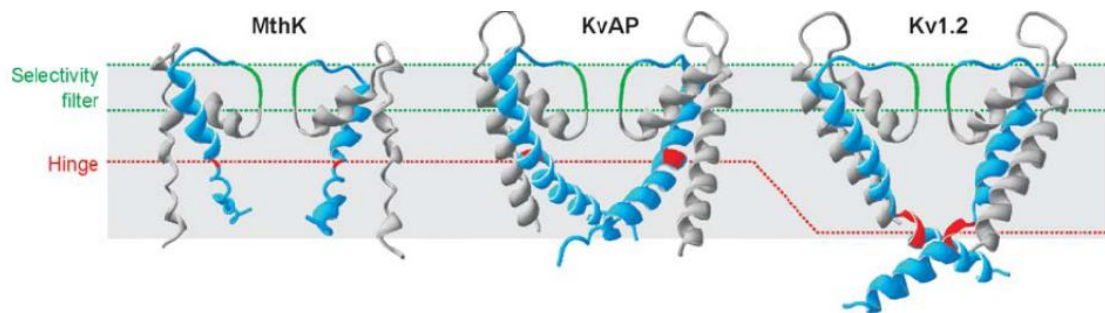
(Armstrong 1966), suggérant fortement que l'accès à celui-ci se trouve du côté intracellulaire de la protéine.

Suivant cette observation, plusieurs groupes de recherche ont mis en évidence le rôle de l'hélice S6 dans le contrôle du passage des ions à travers le pore. En 1993, le groupe de Yellen montra que certaines mutations le long de l'hélice S6 affectent directement la liaison des ammoniums quaternaires (Choi et al. 1993). Le groupe de Jan a aussi démontré qu'une chimère où l'hélice S6 du canal potassique NGK2 est implantée dans le canal  $K^+$  de type Shaker démontre une conductance unitaire et une sensibilité au tétraéthylammonium (TEA) semblable à NGK2 (Lopez et al. 1994). En 1997, le groupe de Yellen a récidivé en mettant en évidence certaines positions dans l'hélice S6 de Shaker qui réagissent avec les agents MTS lorsque mutées en cystéine seulement lorsque la protéine est dans sa conformation ouverte, mettant ainsi en évidence l'accessibilité des résidus de l'hélice S6 à partir du milieu intracellulaire. De plus, certaines positions pouvaient être protégées par l'application d'ammonium quaternaire intracellulaire (Liu et al. 1997). Plus particulièrement, la mutation V476C dans Shaker empêcha la protéine de se fermer complètement à des voltages négatifs en présence de  $Cd^{2+}$ . Bien qu'il fut plus tard démontré que cet effet était plutôt dû à la formation spontanée de ponts entre la cystéine insérée et une histidine présente dans une autre sous-unité qui bloque la protéine dans la conformation ouverte (Holmgren et al. 1998; del Camino et al. 2000), ces découvertes ont démontré que l'hélice S6 jouait un rôle majeur dans l'accès au pore.

Les structures cristallines de plusieurs canaux potassiques, soit KvAP, KcsA, MthK et Kv1.2, ont permis de confirmer que l'hélice S6 forme effectivement le pore de ces canaux. Tout d'abord, la structure cristalline de KcsA (Doyle et al. 1998), un canal potassique activé par les protons intracellulaires, a fourni plus d'informations sur le site de liaison des ammoniums quaternaires. Les structures obtenues pour KvAP, (Jiang et al. 2003a), MthK (Jiang et al.

2002), KcsA (Doyle et al. 1998) et K<sub>ir</sub>Bac1.1 (Kuo et al. 2003) ont ainsi permis de mettre au point un modèle de mouvement possible pour les hélices S6 lors de l'ouverture de la protéine.

Les structures de MthK et KvAP ont permis d'identifier une glycine conservée qui serait potentiellement importante dans le passage de l'état fermé à l'état ouvert. Il a été suggéré que cette glycine, qui est conservée dans tous les canaux potassiques Kv d'origine procaryote précédemment mentionnés, pourrait servir de charnière pour l'ouverture des hélices S6 lors du changement de conformation de la protéine (Jiang et al. 2002). Il faut cependant noter que la structure tridimensionnelle de MthK est d'une résolution très basse, soit de 3,3 Å, rendant ainsi faibles les conclusions faites à partir de celle-ci, spécialement dans la région distale des hélices S6. Dans les canaux d'origine eucaryote, tel Kv1.2, on retrouve plutôt deux prolines formant un motif PXP où X est un résidu hydrophobe, qui est une valine dans les canaux Shaker et Kv1.2. Il est d'ailleurs intéressant de noter que ce motif est immédiatement suivi de la position V476 qui, lorsque muté en cystéine, permet de maintenir la protéine dans la conformation ouverte en présence d'un ion césium. La structure de Kv1.2 obtenue par le groupe de MacKinnon a montré sans équivoque que dans la conformation ouverte de la protéine, l'hélice S6 est pliée au niveau du motif PVP, suggérant fortement que cette région sert en effet de charnière dans l'ouverture de la protéine (Long et al. 2005b) (voir figure 11).



**Figure 11: Porte d'activation des canaux MthK, KvAP et Kv1.2.** Les hélices montrées sont celles qui forment le pore dans chaque protéine, soit S5 (TM1) et S6 (TM2). Les hélices S6 ou TM2 (bleu) se déplacent pour ouvrir ou obstruer le filtre de sélectivité (vert). Ce mouvement est rendu possible grâce à la présence d'une région agissant à titre de charnière (rouge). Cette région est composée d'une glycine chez MthK et KvAP et du motif PVP chez Kv1.2. Il faut cependant noter que la résolution de MthK est très basse. Le fond bleu représente la membrane plasmique. (Tombola et al. 2006)

La structure tridimensionnelle de KcsA a permis de visualiser le pore dans la configuration fermée. En effet, cette structure a montré que les hélices TM2 (équivalentes aux S6) se croisent du côté intracellulaire en forme de tente inversée pour empêcher le passage des ions dans la conformation fermée, formant ainsi une cavité entre la porte d'activation et le filtre de sélectivité. C'est d'ailleurs dans cette cavité que se trouve le site de liaison des ammoniums quaternaires leur permettant d'empêcher le passage des ions.

### 1.3.3. La boucle S4-S5

Bien que les différentes régions de la protéine responsables de la sensibilité au voltage sont connues, il reste tout de même une question à élucider, soit à savoir comment le mouvement de l'hélice S4 est relié à l'ouverture de l'hélice S6. La première étape vers la réponse à cette question fut de chercher à comprendre comment s'effectue le couplage entre les hélices S4 et S6 lors de l'ouverture du pore, à savoir s'il est de nature allostérique ou mécanique, tel que décrit par Isacoff dans (Tombola et al. 2006). Si celui-ci est de nature allostérique, le mouvement des hélices S4 sous l'effet d'une

dépolarisation stabiliserait la protéine dans la conformation ouverte. Un tel modèle pourrait causer des ouvertures spontanées du pore même à des potentiels très négatifs, soit des ouvertures qui sont indépendantes du potentiel membranaire. Dans un modèle de couplage mécanique, l'ouverture du pore ne pourrait se faire sans le mouvement des hélices S4, signifiant un couplage obligatoire entre le potentiel membranaire et l'ouverture du pore. En 1999, le groupe de Sigworth ont démontré qu'à -80 mV, la probabilité d'ouverture spontanée du canal de type Shaker est de l'ordre de  $10^{-9}$ , soit négligeable (Islas et al. 1999) en comparaison à des valeurs entre 0,7 et 0,9 à des potentiels entre +60 et +70 mV. Ces observations suggèrent fortement un couplage obligatoire entre le mouvement des hélices S4 et l'ouverture de la porte d'activation.

En 1991, le groupe de Jan a identifié cinq résidus conservés de la boucle S4-S5 du canal de type Shaker qui, lorsque mutés, affectent significativement la conductance et l'inactivation du canal, suggérant ainsi que ces résidus contrôleraient l'ouverture du pore et auraient un rôle à jouer dans l'inactivation. Or, en 1977, Bezanilla et Armstrong avaient démontré que l'inactivation de type « balle et chaîne » dans les canaux sodiques consistait en un déplacement de la partie intracellulaire de la protéine pour venir obstruer le pore du côté intracellulaire (Armstrong et al. 1977; Bezanilla et al. 1977). Ce mécanisme fut par la suite démontré dans les canaux Kv. Les observations faites par le groupe de Jan sur l'inactivation tendent donc à indiquer que ces cinq résidus seraient situés à proximité du pore. De plus, le groupe de Rudy a identifié, dans la même région, plusieurs mutations qui altèrent grandement la courbe G-V (McCormack et al. 1991). Qui plus est, plusieurs des leucines identifiées parmi ces mutations forment un motif de type heptade de leucines, suggérant ainsi un rôle de cette région dans le couplage entre la porte d'activation et le senseur de voltage.

En 2001, Sanguinetti et Xu ont montré que des mutations effectuées sur des résidus chargés de la boucle S4-S5 et de la région distale de l'hélice S6 dans

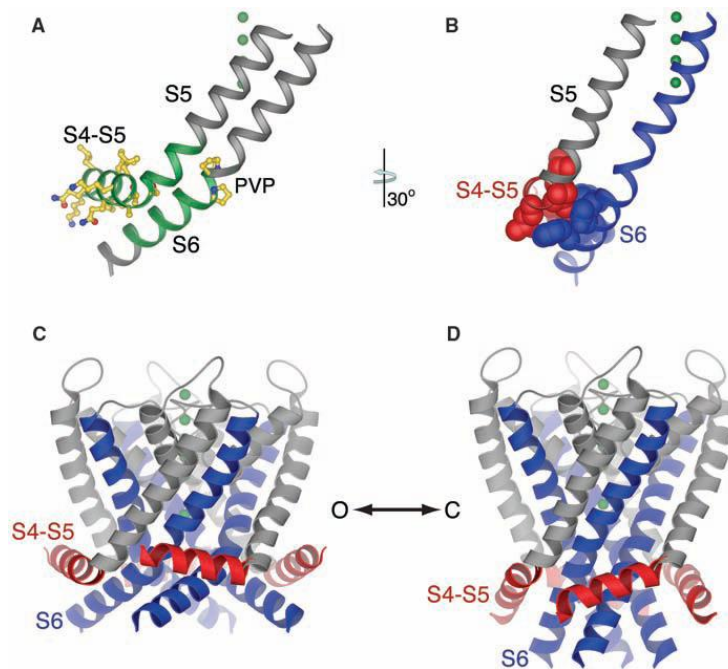
Shaker déplaçaient la courbe G-V vers des potentiels plus négatifs, suggérant ainsi une déstabilisation de l'état fermé de la protéine (Slesinger et al. 1993). Des résultats similaires furent obtenus pour le canal potassique hERG (Sanguinetti et al. 1999). Dans Shaker, le résidu F484 fut mis en évidence (Ding et al. 2002; Ding et al. 2003). Ce résidu, lorsque muté, induit aussi un déplacement considérable de la courbe G-V vers des potentiels plus négatifs. Une série d'expériences sur des chimères des canaux potassiques Shaker, KcsA et Kv2.1 a démontré que lorsque la boucle S4-S5 et l'hélice S6 de deux canaux différents sont jumelés, la dépendance au voltage de l'ouverture du canal est complètement abolie. Cependant, lorsque les deux régions de la même protéine (S4-S5 et S6) sont joints, la chimère résultante montre une dépendance au voltage (Lu et al. 2001; Lu et al. 2002).

L'interaction entre ces deux régions fut confirmée par la structure cristalline de Kv1.2. Cette structure, qui montre Kv1.2 dans sa conformation ouverte, permet de constater que la boucle S4-S5 est à proximité atomique (4 à 5 Å) de la partie distale de l'hélice S6, après le motif PVP (figure 12). L'image obtenue suppose qu'un mouvement de la boucle S4-S5 pourrait contrôler la partie distale du S6, en accord avec un modèle de couplage obligatoire tel que suggéré par Islas et Sigworth. Ces résultats suggèrent tous un couplage mécanique entre la boucle S4-S5 et la porte d'activation.

La présence d'une étape intermédiaire entre le mouvement des S4 en réponse à une dépolarisation et l'ouverture du pore amène un questionnement sur la nature du rôle des hélices S4. En effet, des mesures en canal unitaire montrent que, à des potentiels très dépolarisants, la probabilité d'ouverture n'atteint pas une valeur de 1. Ceci serait causé par des transitions rapides entre les états ouvert et fermé. Ces transitions peuvent être le fruit de fluctuations du senseur de voltage ou bien de fluctuations du pore alors que le senseur au voltage demeure en positive active. Le dernier cas impliquerait que le mouvement des senseurs au voltage dû à la dépolarisation membranaire n'ouvre pas nécessairement le

pore à lui seul, mais qu'il n'a que pour effet d'augmenter la probabilité d'ouverture (Sigworth 1994; Zagotta et al. 1994; Schoppa et al. 1998).

Cette hypothèse est appuyée par des observations qui semblent démontrer que l'hélice S4 joue un rôle dans l'ouverture de la porte d'activation, en plus d'agir en tant que senseur de voltage. Le canal ILT, soit Shaker avec les mutations V369I, I372L et S376T (Ledwell et al. 1999) (Smith-Maxwell et al. 1998), montre un mouvement de l'hélice S4 qui n'est pas relié à son rôle de sonde, donc qui n'est pas causé par la dépolarisation, et qui est associé à l'étape finale de l'activation de la protéine (Pathak et al. 2005). Des mesures de courants de « gating » ainsi que de fluorescence semblent indiquer que, pendant l'ouverture, l'hélice S4 effectue deux mouvements. Dans un premier temps, cette hélice se déplacerait en réponse à une dépolarisation. Suite à ce déplacement, un deuxième mouvement serait associé à l'ouverture de la porte d'activation, en coopération avec le mouvement de la boucle S4-S5.



**Figure 12 : Couplage entre la boucle S4-S5 et la porte d'activation dans Kv1.2.** A. Les résidus 388 à 421 de l'hélice S6 sont montrés en gris et vert, les chaînes latérales du motif PVP en jaune. Les chaînes latérales de la boucle S4-S5 sont montrées en jaune (carbone), rouge (oxygène) et bleu (azote). Les régions en vert doivent nécessairement être provenir de la même protéine pour obtenir une sensibilité au voltage (Lu et al. 2001; Lu et al. 2002). B. Les résidus en contact direct entre la boucle S4-S5 et l'hélice S6 sont montrés en sphère rouge et bleu, respectivement. Boucle S4-S5 : Rouge, hélice S5 : gris, hélice S6 : bleu. C. Vue tétramérique de la protéine en rubans. Boucle S4-S5 : Rouge, hélice S5 : gris, hélice S6 : bleu. D. Modèle hypothétique de Kv1.2 en conformation fermée. Modélisation faite à partir de la structure de KcsA (PDB 1K4C) dans sa conformation fermée en positionnant les boucles S4-S5 de manière à maintenir une porte d'activation fermée. (Long et al. 2005b)



## 1.4. Activation des canaux calciques

### 1.4.1. Le senseur au voltage S4

Bien que les mécanismes d'activation des canaux Kv aient été amplement étudiés, un nombre relativement faible de travaux sur les canaux calciques ont été publiés. Les mécanismes moléculaires et atomiques régissant l'activation en demeure donc moins connus que pour les canaux potassiques et sodiques. Dans les canaux de type  $Ca_v$  (HVA et LVA), tout comme dans les canaux potassiques et sodiques, l'hélice S4 de chaque domaine contient 4 à 5 résidus chargés positivement (figure 13), suggérant que cette hélice sert aussi de senseur de voltage. Lors d'une dépolarisation, ces résidus se déplaceraient sous l'effet du champ membranaire, causant ainsi l'ouverture du canal.

S4		
<b>CaV2.3_IS4</b>	<b>186</b>	<b>LRTLRAVRVLRPLKLVSGI</b>
<b>CaV2.3_IIS4</b>	<b>562</b>	<b>LRALRLRLRIFKITKYWASL</b>
<b>CaV2.3_IIIS4</b>	<b>1250</b>	<b>IKSLRVLRVLRPLKTIKRL</b>
<b>CaV2.3_IVS4</b>	<b>1571</b>	<b>MSFLKLFRAARLIKLLRQG</b>
<b>Kv1.2_S4</b>	<b>291</b>	<b>LRVIRLVRVFRIFKL-SRH</b>

**Figure 13 : Alignement des structures primaires des hélices S4.** Les hélices S4 de  $Ca_v2.3$  ont été alignées avec Kv1.2 par T-Coffee [<http://www.tcoffee.org/>]. Ces hélices montrent une série de résidus conservés chargés positivement qui confèrent la sensibilité au voltage à leurs canaux respectifs.

Bien qu'assumé semblable à celui des canaux potassiques, le mécanisme d'activation des canaux calciques semble présenter quelques différences et être plus complexe. Alors que les canaux potassiques se composent généralement d'une même sous-unité répétée quatre fois, soit un homo-tétramère, les canaux calciques se composent d'une sous-unité formée quatre domaines ayant des séquences primaires différentes.

Il est donc plus difficile, dans le cas des canaux calciques, d'identifier spécifiquement les résidus qui seraient responsables du couplage entre les hélices S4 et S6. De plus, alors que dans les canaux de type  $K_V$ , il est nécessaire que tous les S4 bougent pour laisser passer le courant (Zagotta et al. 1990), il a été montré que certains canaux calciques peuvent s'ouvrir avant le mouvement de tous les S4 (Marks et al. 1992; Lacinova et al. 2002). Puisque chaque domaine des canaux calciques contient des résidus différents, il est raisonnable de penser que leurs contributions aux changements de conformations induits par le voltage ne sont pas égales.

Plusieurs observations sur l'inactivation des canaux  $Ca_V$  semblent aussi aller dans cette direction. En effet, cette hypothèse est appuyée par une série d'expériences sur les canaux calciques de type T ( $Ca_V3$ ) qui montre que ces canaux atteignent leur maximum d'inactivation à un potentiel où seulement la moitié des canaux sont ouverts. Ceci suggère que certains senseurs ne sont pas ou peu impliqués dans le processus d'inactivation dépendante du voltage (Frazier et al. 2001). Des résultats semblables ont été observés dans les canaux sodiques, où il fut montré que le domaine IV est très fortement couplé à l'inactivation (Chen et al. 1996). Une étude sur l'impact des résidus arginines dans les hélices S4 de  $Ca_V3.1$  a montré que l'effet obtenu par la neutralisation de la première arginine de chaque S4 est très dépendant du domaine dans lequel elle se trouve (Kurejova et al. 2007). En effet, les effets sur les courbes d'activation et d'inactivation des canaux où un domaine avait été neutralisé variaient grandement selon le domaine étudié. Ces résultats semblent donc indiquer que les senseurs de voltage opèrent indépendamment les uns des autres.

Les travaux effectués pour déterminer l'importance relative de chaque senseur ne semblent pas montrer de règle générale pour tous les canaux de type  $Ca_V$ . Des études par chimères de plusieurs groupes ont permis d'observer divers effets des segments S4 (Parent et al. 1995a). En effet, le groupe de Beam a montré qu'il ne suffit que de transférer le domaine I de

Ca<sub>v</sub>1.1 dans Ca<sub>v</sub>1.2 pour faire passer ce dernier d'une activation lente à une activation rapide, qui est caractéristique de Ca<sub>v</sub>1.1 (Tanabe et al. 1991). Cette étude fut plus tard approfondie pour montrer que l'hélice S3 et la boucle S3-S4 sont critiques dans la différence de cinétiques d'activation de ces deux protéines (Nakai et al. 1994). En 1997, le même groupe a montré que les domaines I et III occupent un rôle important dans la dépendance au voltage et le temps d'activation, alors que les domaines II et IV auraient moins d'impact. À l'opposé, d'autres études par chimère entre Ca<sub>v</sub>3.1 et Ca<sub>v</sub>1.2 suggèrent que les domaines I, III et IV sont critiques pour la différence de la dépendance au voltage de ces deux canaux (Li et al. 2004), tandis que le groupe de Zamponi a montré que les éléments déterminants du potentiel d'activation des canaux LVA se trouvent dans les domaines I et IV (Hamid et al. 2006). Il faut cependant noter que dans plusieurs cas, les changements observés sur les propriétés biophysiques ne sont que de l'ordre de quelques mV, rendant ainsi l'interprétation des résultats très délicate. De plus, il est très difficile de découpler le mouvement des quatre hélices S4, de manière à isoler le rôle d'une seule hélice, ce qui rend encore une fois difficile l'interprétation des résultats. Malgré tout, ces études suggèrent une grande complexité dans l'étude des mécanismes d'activation des canaux calciques.

### **1.4.2. La porte d'activation**

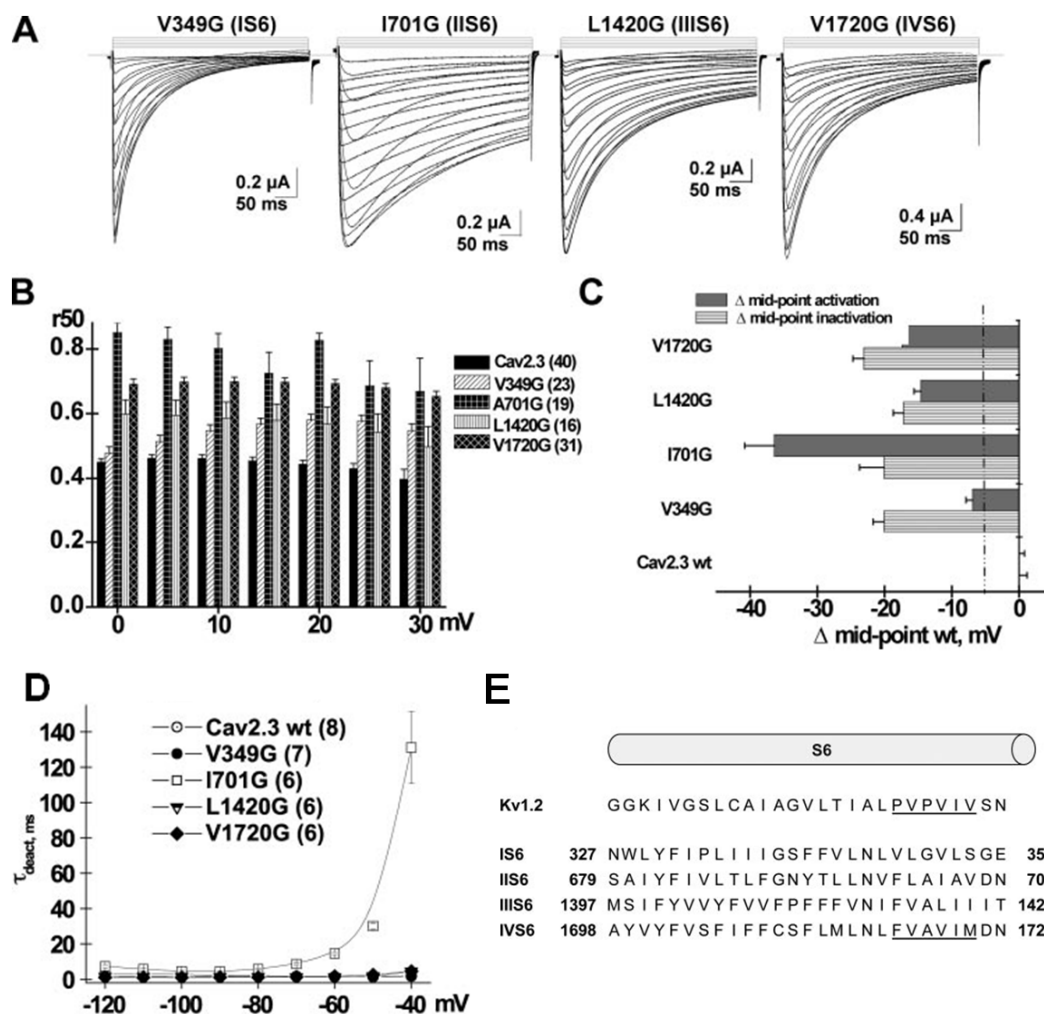
L'activation des canaux de type Ca<sub>v</sub> peut être vue comme un processus comprenant plusieurs étapes. Tout d'abord, le mouvement du senseur de voltage, suivi de la transmission de ce mouvement à la porte d'activation, pour terminer avec l'ouverture du pore (Bezaniilla 2000). Plusieurs efforts ont été faits au cours des dernières années pour caractériser la région responsable de la troisième étape, soit le pore du canal. En effet, plusieurs études par mutations ont démontré que cette région est un point très

sensible dans l'activation et l'inactivation (Raybaud et al. 2006). Tout d'abord, il fut observé sur le canal calcique de type L rétinale  $Ca_v1.4$  que la mutation I745T sur l'allèle CACNA1F cause d'importantes déficiences visuelles (Hemara-Wahanui et al. 2005). Des mutations correspondantes à I745T (hélice S6 du domaine II) furent testées dans d'autres canaux calciques. Il fut montré que la mutation I781T dans  $Ca_v1.2$  cause le même effet (Hohaus et al. 2005), tout comme la mutation I701G dans  $Ca_v2.3$  (Raybaud et al. 2007). Il fut par la suite observé que l'environnement de cette isoleucine s'avère important. En effet, le motif LAIA fut identifié comme crucial pour l'activation. Les mutations en proline de ces quatre résidus dans  $Ca_v2.3$  ont induit des changements similaires au niveau du gating de la protéine, soit un déplacement vers la gauche de la courbe d'activation, un ralentissement des cinétiques d'activation et de désactivation ainsi que d'importantes variations dans la dépendance au voltage de l'inactivation (Raybaud et al. 2007). Ces observations semblent indiquer une stabilisation de l'état ouvert lorsque les résidus LAIA sont mutés.

Bien que les effets les plus spectaculaires aient été observés dans le domaine II, les autres domaines montrent aussi une sensibilité aux mutations des résidus de l'hélice S6. Il fut effectivement observé, suite à une étude de mutagenèse sur la séquence VAVIM, présente dans le segment IVS6 et conservée à travers les différents canaux calciques, que la mutation en glycine de chacun de ces résidus a d'importants effets sur les propriétés d'activation et d'inactivation. En effet, la courbe d'inactivation de ces mutations est déplacée de -20 à -30 mV, selon les mutations étudiées. Le potentiel d'activation de ces mutations est aussi déplacé de -5 à -20 mV, quoique cet effet soit moins important que les déplacements de l'ordre de -40 mV observés pour le domaine II, qui est aussi le seul domaine à montrer une augmentation significative de la constante de temps de désactivation. Les mutations des segments IS6 et IIIS6 ont montré des effets semblables mais beaucoup plus modérés sur l'activation et l'inactivation, mais aucun changement sur la désactivation (figure 14). Ces observations permettent

deux conclusions. Dans un premier temps, les mutations de la région distale des hélices S6 de  $Ca_v2.3$  semblent avoir pour effet la stabilisation de l'état ouvert. De plus, les effets différents observés pour chacun des quatre domaines viennent appuyer l'hypothèse que, dans les canaux calciques, les quatre senseurs au voltage ont une contribution différente à l'ouverture du pore.

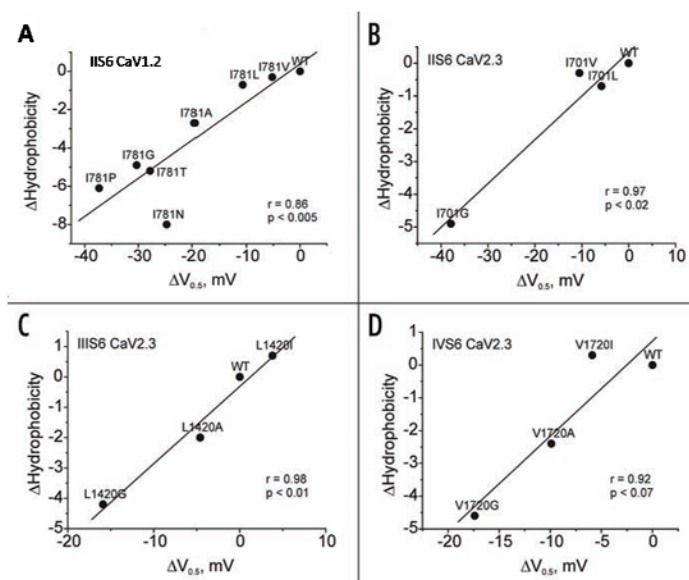
La comparaison entre les structures des canaux potassiques et calciques laisse prédire que l'hélice S6 des canaux calciques pourrait former le pore, comme dans le cas des canaux potassiques (Doyle et al. 1998; Long et al. 2005a). Bien que cette idée soit bien acceptée, le mouvement de l'hélice S6 qui permet aux canaux de passer de la conformation fermée à la conformation ouverte demeure inconnu. Les structures cristallines de MthK (Jiang et al. 2002) et KcsA (Doyle et al. 1998) ont permis d'identifier une glycine (G98 dans MthK et G99 dans KcsA) qui est hautement conservée dans les canaux ioniques. Une mutation de la glycine équivalente dans NaChBac démontre un important effet sur les propriétés de gating du canal (Zhao et al. 2004), ce qui porte les auteurs à caractériser cette glycine comme une charnière d'activation, où se plierait l'hélice S6 pour ouvrir le pore. Une glycine est présente au même endroit dans l'hélice IIS6 de  $Ca_v1.2$ , mais les mutations de cette glycine en proline (Raybaud et al. 2006) ou autres résidus ne montrent aucun effet sur l'activation ou l'inactivation (Hohaus et al. 2005) ce qui suggère que son rôle n'est pas le même que dans NaChBac. De plus, le rôle de cette glycine a été remis en question (Rosenhouse-Dantsker et al. 2006). Il est cependant intéressant de noter la correspondance entre les régions identifiées dans  $Ca_v2.3$  et la structure cristalline de Kv1.2. L'alignement présenté à la figure 14E montre que les motifs LAIA (IIS6) et VAVIM (IVS6) de  $Ca_v2.3$  sont alignés avec la séquence PVP présente dans l'hélice S6 de Kv1.2.



**Figure 14: Mutations dans les hélices S6 de  $Ca_v2.3$ .** **A.** Courants ioniques des mutations de  $Ca_v2.3$  en présence des sous-unités  $Ca_v\alpha2\delta$  et  $Ca_v\beta3$  dans une solution de 10mM  $Ba^{2+}$ . **B.** Courant résiduel à 50 ms (R50) des mutations dans les hélices S6 de  $Ca_v2.3$ . Le R50 représente la fraction de courant résiduel après 50 ms à un voltage donné. **C.** Différence entre les potentiels de mi-activation et mi-inactivation des mutations  $Ca_v2.3$  V349G, I701G, L1420G et V1720G par rapport aux valeurs du canal de type sauvage ( $Ca_v2.3$  wt). **D.** Constantes de temps d'inactivation des mutations  $Ca_v2.3$  V349G, I701G, L1420G et V1720G. Ces mesures sont obtenues à partir d'un lissage mono-exponentiel des courbes de déactivation. **E.** Alignement des quatre hélices S6 de  $Ca_v2.3$  avec l'hélice S6 du canal potassique Kv1.2. Modifié de (Raybaud et al. 2007).

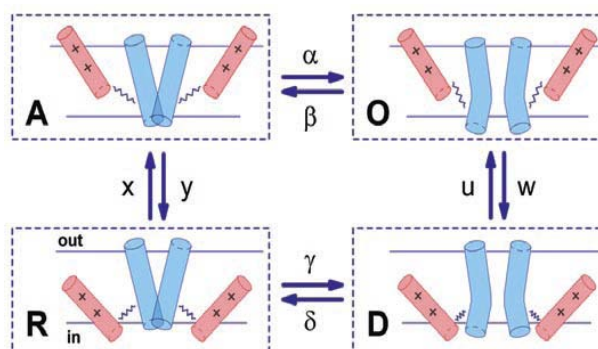
Les résidus 699 à 702 (motif LAIA) et 1418 à 1422 (motif VAVIM) identifiés dans  $Ca_v2.3$  semblent critiques pour la fonction du canal non seulement par la position de ces résidus, mais aussi par leur hydrophobicité. En effet, lorsqu'on effectue une série de mutations dans les domaines II, III et IV de  $Ca_v2.3$  (Raybaud et al. 2007) ainsi qu'à la position 781 dans le domaine II de  $Ca_v1.2$  (Hering et al. 2008), il existe une relation linéaire entre l'indice d'hydrophobicité du résidu utilisé et le changement dans le potentiel de mi-activation du canal (figure 15). Ces résultats semblent indiquer que les chaînes latérales de ces acides aminés sont dans un environnement hydrophobe lorsque le canal se trouve dans sa conformation fermée ou que ces résidus sont dans un milieu aqueux dans l'état ouvert, ce qui stabilise la configuration ouverte avec des résidus hydrophiles. Des modèles créés par homologie avec  $Kv1.2$  dans l'état ouvert montrent que cet environnement pourrait être créé par l'interaction entre les différentes hélices S6.

Les observations faites sur les segments S4 et S6 permettent d'élaborer un modèle simplifié du mécanisme d'activation des canaux  $Ca_v$ . Le groupe de Hering propose qu'on puisse considérer ces canaux comme étant formés de deux parties distinctes. Le senseur au voltage peut se trouver soit dans l'état au repos où il bloque le pore dans sa conformation fermée ou l'état activé qui permet mais n'oblige pas l'ouverture du pore. Le pore peut se trouver dans les états fermé ou ouvert. Le canal a donc accès à quatre combinaisons d'états différents, soit repos/fermé (R), activé/fermé (A), ouvert (O) et repos/ouvert (D) (Figure 16). L'étape reliant le mouvement du senseur de voltage S4 à l'ouverture du pore demeure encore inconnu.



**Figure 15 : Effet des changements d'hydrophobicité sur le potentiel de mi-activation.**

Relation entre l'hydrophobicité et la variation du potentiel de mi-activation pour les mutations de (A) Ca<sub>v</sub>1.2 I781, (B) Ca<sub>v</sub>2.3 I701, (C) Ca<sub>v</sub>2.3 L1420 et (D) Ca<sub>v</sub>2.3 V1720. Les courants ont été enregistrés dans une solution de 10mM Ba, en présence des sous-unités  $\alpha_2\delta$  et  $\beta_3$ . Pour chaque série de données, le coefficient de corrélation est supérieur ou égal à 0.86, indiquant qu'il existe une forte corrélation entre l'hydrophobicité du résidu introduit et le changement du potentiel de mi-activation. Modifié de (Hering et al. 2008).



**Figure 16 : Représentation simplifiée du mécanisme d'ouverture des canaux de type Ca<sub>v</sub>.**

Le mécanisme d'activation est formé de deux composantes distinctes : le senseur de voltage (rouge) et le pore (bleu). Le canal peut se trouver dans quatre combinaisons d'états : (R) le pore est fermé et le senseur de voltage au repos le maintient fermé, (A) le senseur au voltage activé permet l'ouverture du pore mais celui-ci est fermé, (O) le pore est ouvert, (D) le senseur de voltage revient au repos alors que le pore est toujours ouverte. Les constantes  $x$ ,  $y$ ,  $u$  et  $w$  sont dépendantes du voltage alors que les constantes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  en sont indépendantes (Hering et al. 2008).



## 1.5. Hypothèses et objectifs de recherche

Beaucoup de similarités structurales peuvent être observées entre les canaux calciques  $Ca_v$  et les canaux potassiques  $K_v$ . Tout d'abord, plusieurs groupes de recherche ont émis l'hypothèse que ces canaux présentent la même structure tri-dimensionnelle, soit quatre domaines contenant chacun six hélices transmembranaires. De plus, dans ces deux familles, l'hélice S4 de chaque domaine montre un motif conservé de résidus chargés qui sert de senseur au voltage et les hélices S6 servent de porte d'activation qui semble se déplacer pour laisser passer ou inhiber le passage des ions.

Bien qu'aucune étude fonctionnelle ou dynamique ne l'ait confirmé, selon l'hypothèse actuelle formulée par le groupe de MacKinnon à partir de la structure cristalline de  $K_v1.2$ , le lien entre les régions S4 et S6 est assuré, dans les canaux  $K_v$ , par la boucle intracellulaire S4-S5, qui transmet le mouvement de l'hélice S4 en tirant ou en poussant sur l'hélice S6. Ce mécanisme est nommé couplage électromécanique. Puisque le mécanisme d'activation des canaux  $Ca_v$  est présumé être très semblable à celui des canaux potassiques activés par le voltage, la même étape pourrait relier le mouvement de l'hélice S4 à l'ouverture du pore.

Il est cependant important de préciser que les canaux  $K_v$  sont symétriques alors que les canaux  $Ca_v$  possèdent quatre domaines qui possèdent certaines homologies mais qui ne sont pas identiques, il est possible que le mécanisme d'activation soit lui-même asymétrique.

Le laboratoire de Lucie Parent a montré précédemment que des mutations ponctuelles effectuées à la position I701 dans le domaine II de  $Ca_v2.3$ , en particulier la mutation I701G, altèrent significativement le potentiel d'activation du canal ( $\Delta V_{0.5,act} = -35$  mV) (Raybaud et al., 2007). Nous proposons que ce résidu, situé dans la portion distale de l'hélice S6 du domaine II, constitue un point critique lors de l'activation de la protéine et

qu'il pourrait venir en contact avec la boucle S4-S5 de ce même domaine si ces deux régions sont couplées lors de l'activation.

Une étude par mutagenèse dirigée couplée à l'analyse cyclique de doubles mutants permettra de tester cette hypothèse. Cette technique d'analyse permettra, en comparant l'effet de deux mutations simple en glycines, soit une dans la boucle S4-S5 et la deuxième dans l'hélice S6, à celui de la mutation double associée, de caractériser le couplage entre les deux résidus mutés. En effet, les mesures effectuées en électrophysiologie à voltage imposé à deux électrodes permettront de déterminer l'énergie d'activation,  $\Delta G_{act}$ , pour chaque mutation effectuée. Si les résidus mutés agissent sur la protéine de manière indépendante l'un de l'autre, la variation de  $\Delta G_{act}$  par rapport à la protéine sauvage de la mutation double contenant ces deux résidus devrait être la somme des variations de  $\Delta G_{act}$  des deux mutations simples (voir section 2.5). Cependant, si les deux résidus sont couplés, cette additivité n'est pas respectée. Cette propriété de l'énergie d'activation permet d'introduire un coefficient de couplage,  $\Omega$ , qui permet de déterminer si deux régions sont couplées lors d'un mécanisme. Cette technique, qui a déjà été utilisée pour étudier le lien entre deux résidus dans les canaux potassiques (Ranganathan et al. 1996), calciques (Kudrnac et al. 2009) et CNG (Kusch et al. 2010), sera utilisée pour déterminer si la boucle IIS4-S5 et l'hélice IIS6 sont couplées lors de l'activation de  $Ca_v2.3$ .

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Techniques de biologie moléculaire

Les ADNc codants pour les protéines de type sauvage  $Ca_v2.3$  dans le vecteur pGEM 3Z (lapin, Genbank L27745),  $Ca_v\beta3$  dans le vecteur pBluescript (rat, Genbank M88751) ont gracieusement été donnés par le Dr. Edward Perez-Reyes. La sous-unité  $Ca_v\alpha2b\delta$  dans le vecteur pBluescript (rat, Genbank NM\_000722) a été obtenue auprès du docteur Terry P. Snutch.

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

Le produit de PCR a ensuite été amplifié par bactéries compétentes X-10 Gold fournies avec la trousse *QuickChange™ XL*. Ces bactéries ont une efficacité de  $5 \times 10^9$  cfu/ $\mu$ g d'ADN pUC. (cfu signifie « Colony Forming Unit »). Les bactéries sont initialement incubées pendant 10 minutes sur glace avec  $\beta$ -mercaptoéthanol pour augmenter l'efficacité de la transformation. Le produit de PCR est alors ajouté et le mélange incubé pendant 30 minutes sur glace. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique de 30 secondes à 42°. Le milieu de culture NZY+ Broth (125 mM  $MgCl_2$ , 12.5 mM  $MgSO_4$ , 20 mM glucose dans milieu LB Broth (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)) est alors ajouté et le mélange est incubé sous agitation pendant une heure à 37°C. Le produit final est alors étendu sur une boîte de LB Agar (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)

contenant l'antibiotique de sélection approprié qui est incubée entre 16 et 18 heures à 37°C.

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

Une colonie est alors repiquée dans du milieu LB avec 400 µg/mL d'antibiotique de sélection et incubée sous agitation pendant 16 à 18 heures à 37°C. L'ADN ainsi amplifié est alors extrait à l'aide de la trousse *QIAprep® Spin Midiprep Kit* (Qiagen, Mississauga, Ont) et séquencé de nouveau pour vérifier la présence de la mutation. L'ADN circulaire ainsi obtenu est linéarisé par une incubation de 2 heures à 37°C avec l'enzyme de restriction approprié (*HindIII* 3 u/µg pour Ca<sub>v</sub>2.3 et *NotI* 1,5 u/µg pour Ca<sub>v</sub>α2bδ et Ca<sub>v</sub>β3). L'ADN linéaire issu de cette incubation est alors vérifié sur gel d'agarose 1% dans le but de vérifier sont poids moléculaire ainsi que son intégrité.

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

## 2.2. Expression fonctionnelle des canaux

Les protéines étudiées sont exprimées dans les ovocytes de grenouille de type *Xenopus Laevis* (Nasco, Fort Atkinson, WI). Les ovocytes choisis sont de stade V et VI. Les sacs ovariens sont retirés de la grenouille par une incision au niveau de la partie ventrale postérieure de l'abdomen. Ils sont manuellement séparés des sacs ovariens avant d'être incubés dans une solution de Barth sans calcium (en mM : 90 NaCl; 3 KCl; 0.82 MgSO<sub>4</sub>; 5 HEPES; pH 7,6) contenant 2mg/ml de collagénase (Gibco, Burlington, Ont). Cette incubation permet de détacher la membrane folliculaire qui entoure les ovocytes. Ceux-ci sont alors incubés pendant une heure dans une solution de Barth (en mM : 90 NaCl; 3 KCl; 0,82 MgSO<sub>4</sub>; 0,41 (CaCl<sub>2</sub> + 2 H<sub>2</sub>O); 0,33 (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 4 H<sub>2</sub>O; 5 HEPES; pH 7,6) contenant 1 g/L d'albumine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) afin d'arrêter la réaction de la collagénase. Les ovocytes sont ensuite triés et stockés dans une solution de Barth sérum (en mM : 90 NaCl; 3 KCl; 0,82 MgSO<sub>4</sub>; 0,41 (CaCl<sub>2</sub> + 2 H<sub>2</sub>O); 0,33 (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 4 H<sub>2</sub>O; 5 HEPES; 2,5 Na pyruvate; 100 unités/mL de Pen-Strep; 10mg/100mL de kanamycine; 5% de Horse serum; pH 7,6) à 18°C. La solution à injecter est préparée en mélangeant 6 µg de l'ARNm codant pour le canal muté ou de type sauvage (sous-unité Ca<sub>v</sub>α1), 2 µg de la sous-unité Ca<sub>v</sub>α2δ et 3 µg de la sous-unité Ca<sub>v</sub>β3 dans 10 µL d'eau. On injecte entre 4,6 et 46 nL du mélange ainsi obtenu dans le cytoplasme des ovocytes. Ceux-ci sont, pendant l'injection, dans une solution de Barth antibiotique (en mM : 90 NaCl; 3 KCl; 0,82 MgSO<sub>4</sub>; 0,41 (CaCl<sub>2</sub> + 2 H<sub>2</sub>O); 0,33 (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 4 H<sub>2</sub>O; 5 HEPES; 2,5 Na pyruvate; 100 unités/mL de Pen-Strep; 10mg/100mL de kanamycine; pH 7,6) et sont ensuite retournés à 18°C dans la solution de Barth sérum pendant 2 à 5 jours.

## 2.3. Enregistrements électrophysiologiques

Les enregistrements électrophysiologiques en  $Ba^{2+}$  sont effectués en voltage imposé à deux électrodes à l'aide de l'amplificateur OC-725C (Warner instruments, Hamdes, CT). Les électrodes en verres sont étirées par l'étireur 700C (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) sous un courant de 18 A. Elles sont remplies d'une solution de (en mM) 3000 KCl, 1 EGTA et 10 HEPES (pH 7,4). Dans la technique de voltage imposé à deux électrodes, la première électrode sert à mesurer le potentiel membranaire tandis que la seconde électrode injecte le courant nécessaire à maintenir ce potentiel constant. Pour prévenir les artefacts dus aux courants  $Cl^-$  activés le  $Ca^{2+}$  intracellulaire, 23 nL d'une solution d'EGTA (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) à 50 mM sont injectés dans les ovocytes (l'EGTA est un chélateur de calcium) environ 30 minutes avant le début des expériences.

L'ovocyte repose dans une solution Ringer (en mM : 96 NaCl; 2 KOH; 98 acide méthanesulfonique (MES); 1,8 ( $CaCl_2 + 2 H_2O$ ); 1 ( $MgCl_2 + 6 H_2O$ ); 10 HEPES; pH 7,4) lorsqu'il est perforé par les deux électrodes. La solution est ensuite remplacée par perfusion par gravité par une solution de 10 mM  $Ba^{2+}$  (en mM : 10  $Ba(OH)_2$  ; 110 NaOH ; 1 KOH ; 20 HEPES ; pH 7,4 ajusté avec MES). Le potentiel est imposé suite au changement de solution et les courants macroscopiques de  $Ba^{2+}$  sont ainsi mesurés.

Tel que mentionné à la section 1.2.3.2, les canaux calciques s'inactivent selon deux mécanismes distincts, soit l'inactivation dépendante du voltage et l'inactivation dépendante du  $Ca^{2+}$ . Afin de réduire au minimum toute contribution possible du  $Ca^{2+}$  et d'isoler avec certitude l'inactivation dépendante du voltage, les mesures électrophysiologiques sont effectuées en présence d'une solution de 10mM  $Ba^{2+}$

L'acquisition des données lors des expériences est effectuée avec le logiciel Clampex 10 de la suite pClamp 10 (Molecular Devices, Axon instruments,

Foster City, CA). Les données sont enregistrées à une fréquence de 5 kHz et filtrées à 1 kHz grâce au filtre intégré à l'amplificateur.

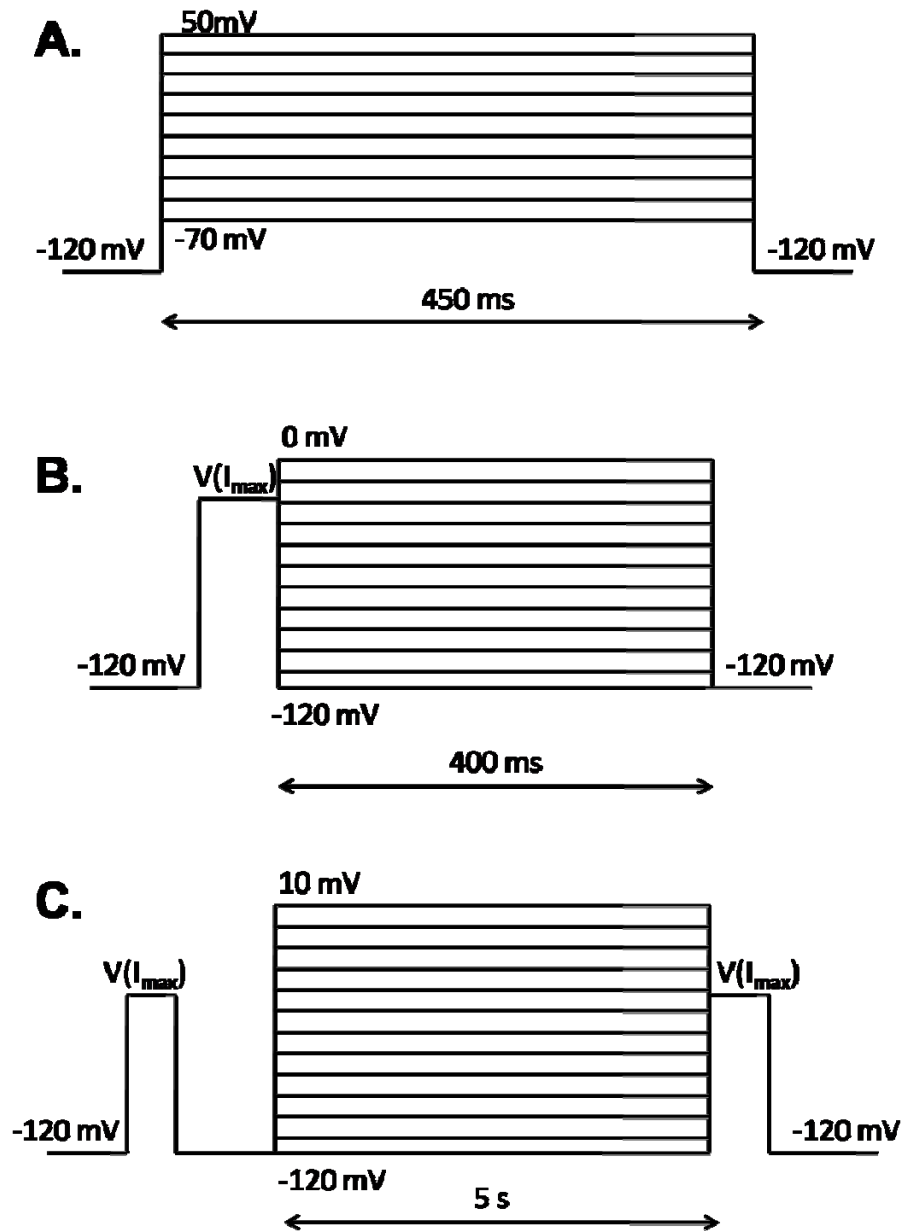
Les ovocytes qui expriment la protéine dont l'ARN a été injecté sont soumis à trois protocoles de pulses. Le premier protocole (figure 17A) mesure la dépendance en voltage de l'activation ainsi que les cinétiques d'inactivation. Dans ce protocole, l'ovocyte est tout d'abord maintenu à un potentiel de repos de -120 mV où les canaux se trouvent majoritairement dans l'état fermé. Des pulses de 450 ms sont ensuite appliqués à des voltages variant de -70 mV à +50 mV, par intervalle de 5 mV, selon la mutation étudiée. La plage de voltage balayée est choisie de manière à pouvoir observer au complet l'activation du canal. Le canal est ensuite soumis de nouveau à un potentiel de repos de -120 mV pour permettre aux canaux de retourner à l'état fermé.

Le deuxième protocole (figure 17B) permet de mesurer la dépendance en voltage de la désactivation (passage de l'état ouvert à l'état fermé). À partir d'un potentiel de repos de -120 mV, l'ovocyte est amené par un court pulse de 20 ms au potentiel où le courant ionique mesuré à l'aide du premier protocole est maximal (le potentiel en question dépend de la mutation étudiée). Une série de pulses de 400 ms est alors appliquée de -120 mV à 0 mV par intervalle de 5 mV afin de mesurer la dépendance en voltage de la constante de temps de désactivation. Le canal est ensuite soumis de nouveau à un potentiel de repos de -120mV pour permettre aux canaux de retourner à l'état fermé.

Finalement, le troisième protocole (figure 17C) permet de mesurer la dépendance en voltage de l'inactivation. À partir d'un potentiel de repos de -120 mV, l'ovocyte est exposé à un potentiel test où tous les canaux sont ouverts pendant 50 ms (ce potentiel varie selon les mutations étudiées et est le même que celui utilisé pour le protocole de désactivation). L'ovocyte est ensuite exposé de nouveau à un potentiel de repos de -120 mV pendant 225 ms afin de ramener les canaux l'état fermé. Il est ensuite exposé à une série de pulses dépolarisants allant de -120 mV à +10 mV par intervalle de 10 mV pendant 5

secondes. Immédiatement après ce pulse, l'ovocyte est exposé à deuxième pulse test de 50 ms au même voltage que le premier, pour ensuite retourner au potentiel de repos de -120 mV. Durant le second pulse test, les seuls canaux qui peuvent passer à l'état activé et donc laisser passer un courant ionique sont ceux qui ne se sont pas activés pendant le pulse de 5s. Le rapport du courant résiduel mesuré pendant le second pulse sur le courant total mesuré pendant le premier pulse test nous donne une mesure de la fraction des canaux qui sont inactivés.





**Figure 17 : Protocoles de pulses.** (A) Protocole utilisé pour obtenir la dépendance en voltage de l'activation et les cinétiques d'inactivation. (B) Protocole utilisé pour obtenir la dépendance en voltage de la déactivation. (C) Protocole utilisé pour obtenir la dépendance en voltage de l'inactivation.

## 2.4. Analyse des données

Les données brutes obtenues en électrophysiologie à partir des protocoles décrits à la section précédente sont importées dans le logiciel Clampfit 10 de la suite pClamp 10 (Molecular Devices, Axon instruments, Foster City, CA). Ce logiciel permet d'effectuer une soustraction de fuite (option « Leak Substraction ») afin de ramener le courant initial à une valeur nulle. La valeur du courant maximal observé durant le pulse de 450 ms du protocole d'activation ainsi que la valeur du courant résiduel 50 ms après ce maximum sont extraites et reportées sur une feuille de calcul dans le logiciel Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA). Le rapport entre le courant maximal et le courant résiduel après 50 ms est calculé et sera utilisé pour caractériser les cinétiques d'inactivation. Le courant maximal observé sur chaque pulse est normalisé. La courbe d'activation sera tracée en effectuant un lissage des séries de courants normalisés en fonction du potentiel en utilisant une courbe de Boltzmann d'équation

$$\frac{I}{I_{\max}} = G_{rel} \frac{(V_m - V_{inv})}{1 + \exp\left[-\frac{zF(V_m - E_{0.5,act})}{RT}\right]} \quad (9)$$

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

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

$$\Delta G_{act} = z \cdot F \cdot E_{0.5,act} \quad (10)$$

Les données obtenues à partir du protocole B sont importées dans le logiciel Clampfit 10 et sont soumises à une réduction de fuite afin de ramener le courant initial à une valeur nulle. La fonction de lissage de Clampfit 10 est alors utilisée pour lisser le courant observé durant les 100 premières ms de chaque pulse dépolarisant en fonction du temps à l'aide d'une fonction exponentielle d'équation

$$I(t) = A \exp\left[\frac{-t}{\tau_{deact}}\right] + C \quad (11)$$

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

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

$$\frac{I}{I_{max}} = 1 - \frac{(1 - Y_0)}{1 + \exp\left[-\frac{zF(V_m - E_{0.5,inact})}{RT}\right]} \quad (12)$$

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

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

$RT/F \cong 25$  mV à 22°C

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

$$\Delta G_{inact} = z \cdot F \cdot E_{0.5,inact} \quad (13)$$

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

- Le potentiel de mi-activation,  $E_{0.5,act}$ , et le potentiel de mi-inactivation,  $E_{0.5,inact}$ , sont issus du lissage individuel de la courbe d'activation ou d'inactivation de chaque enregistrement et nous informe sur la sensibilité au voltage de l'activation/inactivation du canal étudié. Ils correspondent aux potentiels auxquels on observe 50% du courant maximal ou de l'inactivation maximale. Le potentiel de mi-inactivation est souvent couplé au potentiel d'activation. Or, dans Cav2.3, l'inactivation se produit aussi directement à partir de l'état fermé et n'est donc pas complètement couplée à l'activation.
- Le courant résiduel après 50 ms, R50, reflète les cinétiques d'inactivation du canal. Il est extrait du potentiel d'activation et correspond à la fraction du courant résiduel 50 ms après le courant maximal pour chaque enregistrement.
- L'énergie d'activation ou d'inactivation,  $\Delta G_{act}$  ou  $\Delta G_{inact}$  respectivement, représente l'énergie associée au changement de conformation observé (état fermé à état ouvert pour  $\Delta G_{act}$ , état ouvert à état inactivé pour  $\Delta G_{inact}$ ). Elle est calculée à partir des potentiels de mi-activation/inactivation et du paramètre de pente calculés pour chaque enregistrement.

- Finalement, la constante de temps de désactivation,  $\tau_{deact}$ , mesure la stabilité de l'état ouvert.

Dans tous les cas, les analyses des données d'activation sont effectuées en fonction des données normalisées par rapport au courant maximal. Les valeurs obtenues expérimentalement à partir des courbes d'activation individuelles ont été moyennées. L'incertitude sur ces valeurs correspond à l'écart standard à la moyenne (S.E.M.) calculé par Origin 7.0. La comparaison entre les canaux mutés et les canaux de type sauvage a été évaluée statistiquement à l'aide la fonction *One-way ANOVA* d'Origin 7.0. À moins d'une mention contraire, deux populations seront considérées statistiquement différentes si l'analyse *One-way ANOVA* présente un facteur  $p < 0.001$ .

## 2.5. Analyse cyclique de doubles mutations

L'analyse cyclique de doubles mutations (« Double Mutant Cycle Analysis ») permet de quantifier l'interaction entre deux résidus à l'intérieur d'une protéine (Horovitz 1996). Soient deux résidus, X et Y, dont on cherche à étudier l'interaction lors d'un changement de conformation. La méthode d'analyse cyclique de doubles mutations permet de quantifier l'interaction potentielle entre deux résidus Y et X à l'aide d'expériences faites sur la protéine de type sauvage, P-XY, la mutation unique de chacun des deux résidus, P-X et P-Y, ainsi que la double mutation correspondante, P. La variation d'énergie libre due à la mutation du résidu X sera alors  $\Delta G_{P-XY \rightarrow P-Y}$  et sera obtenue expérimentalement à partir de la différence entre l'énergie libre de la protéine de type sauvage et celle de la protéine contenant la mutation du résidu X.

$$\Delta G_{P-XY \rightarrow P-Y} = \Delta G_{P-XY} - \Delta G_{P-Y} \quad (14)$$

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

$$(\Delta G_{P-XY} + \Delta G_P) - (\Delta G_{P-Y} + \Delta G_{P-X}) \neq 0 \quad (15)$$

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

$$\Omega = \frac{k_{P-XY} \cdot k_P}{k_{P-X} \cdot k_{P-Y}} \quad (16)$$

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

$$k = \exp(\Delta G / RT) \quad (17)$$

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

$$\Omega = \frac{\exp(\Delta G_{P-XY}/RT) \cdot \exp(\Delta G_P/RT)}{\exp(\Delta G_{P-X}/RT) \cdot \exp(\Delta G_{P-Y}/RT)} \quad (18)$$

Il est à noter que la condition 15 peut être retrouvée en prenant le logarithme naturel du coefficient de couplage :

$$RT \cdot \ln(\Omega) = (\Delta G_{P-XY} + \Delta G_P) - (\Delta G_{P-Y} + \Delta G_{P-X}) \quad (19)$$

La combinaison des équations (15) et (19) permet une interprétation aisée des valeurs du coefficient  $\Omega$ , tel une valeur du coefficient  $\Omega$  est près de 1 implique une forte additivité entre les énergies libres d'activation et donc un couplage nul entre les résidus étudiés. À l'opposé, une valeur éloignée de 1 implique que les énergies libres d'activation ne sont pas additives et par conséquent que les résidus peuvent être couplés. Il est important de noter que l'information contenue dans le facteur  $\Omega$  ne réside pas tant dans sa valeur numérique absolue que dans le rapport observé entre le numérateur et le dénominateur du rapport de l'équation (18). Par exemple, une valeur  $\Omega$  de 0,1 a exactement la même signification qu'une valeur de 10 en ce qui concerne la force du couplage entre les deux résidus. Pour cette raison, et pour permettre de plus facilement comparer les coefficients  $\Omega$  entre eux, les valeurs présentées seront en fonction de la valeur absolue du logarithme naturel de  $\Omega$ ,  $|\ln(\Omega)|$ .

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

$$\delta F(x_1, x_2, \dots, x_n) = \sum_{i=1}^n \left| \frac{\partial F}{\partial x_i} \right| \cdot \delta x_i \quad (20)$$

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

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

Les dérivées peuvent être effectuées ainsi :

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

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

Ces expressions permettent de calculer l'erreur sur  $\Omega$  :

$$\delta \Omega = \frac{\Omega}{RT} (\delta \Delta G_{XY} + \delta \Delta G_{WT} + \delta \Delta G_X + \delta \Delta G_Y) \quad (21)$$



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

$$\delta \ln \Omega = \left| \frac{\partial \ln \Omega}{\partial \Omega} \right| \delta \Omega = \frac{1}{\Omega} \cdot \frac{\Omega}{RT} \left( \sum_i \delta \Delta G_i \right)$$
$$\delta \ln \Omega = \frac{1}{RT} \sum_i \delta \Delta G_i \quad (22)$$

où les  $\Delta G_i$  sont les différents  $\Delta G$  présents dans l'équation (18).

## 2.6. Modélisation par homologie

L'alignement de séquence primaire entre Ca<sub>v</sub>2.3 (Genbank L27745) et Kv1.2 (Genbank NP\_004965) fut obtenu via l'outil d'alignement T-coffee [<http://www.tcoffee.org>]. La région alignée s'étend du début de l'hélice S4 de chaque domaine jusqu'à la fin de l'hélice S6. Cependant, en raison de la très faible homologie entre Ca<sub>v</sub>2.3 et Kv1.2 hors des hélices transmembranaires, chaque région de chaque domaine fut modélisée séparément. Ainsi, huit modèles finaux furent produits, soit un modèle allant du début de l'hélice S5 à la fin de l'hélice S5 et un deuxième ne contenant que l'hélice S6, et ce pour chacun des quatre domaines. Les alignements utilisés pour la modélisation sont présentés dans la section 4.

La modélisation par homologie fut effectuée à l'aide de la structure cristalline du canal potassique Kv1.2 qui possède une résolution de 2,9 Å (2A79.pdb). Les modèles ont été produits par le logiciel Modeler 9v2 (Sali et al. 1993; Fiser et al. 2000; Marti-Renom et al. 2000; Eswar et al. 2007). Pour chaque région modélisée, 100 modèles furent produits. Les modèles retenus sont ceux qui présentaient la moindre énergie après minimisation. Ceux-ci furent ensuite soumis au logiciel PROCHECK (Laskowski et al. 1993; Laskowski et al. 1996) qui ne trouva aucun problème majeur dans les modèles sélectionnés. Les images furent produites à l'aide du logiciel PyMOL1.1 (DeLano Scientific).

## 3. RÉSULTATS

### 3.1 Mutations dans l'hélice IIS6

Les données présentées dans cette section sont tirées des expériences effectuées durant le projet ici présenté combinées à quelques résultats obtenus préalablement par Alexandra Raybaud et Ebru-Eylem Baspinar dans le laboratoire de Lucie Parent.

Notre laboratoire a identifié, dans l'hélice S6 du domaine II de  $Ca_v2.3$ , une isoleucine qui, lorsque mutée en glycine, déplace le potentiel de mi-activation de -40 mV (Raybaud et al. 2007). En effet, alors que  $Ca_v2.3$  de type sauvage affiche une énergie d'activation de  $\Delta G_{act} = -1,0 \pm 0,1$  kcal/mol ( $n = 108$ ), la mutation I701G s'active avec  $\Delta G_{act} = -4,7 \pm 0,3$  kcal/mol ( $n = 24$ ). Cette mutation est caractérisée par un potentiel de mi-inactivation de  $-84 \pm 1$  mV ( $n = 12$ ), comparativement à une valeur de  $E_{inact} = -63,5 \pm 0,6$  mV ( $n = 74$ ) pour le canal de type sauvage (tableau 2).

Le voisinage de I701 a été étudié pour déterminer si l'effet est spécifique à cette position (figure 18). Tel que montré au tableau 2, bien que toutes les mutations étudiées affichent un potentiel de mi-activation significativement différent du canal sauvage ( $p < 0,001$ ), seules les mutations L699G et V703G montrent une énergie d'activation qui est significativement différente de celle du canal de type sauvage. De plus, ces mutations montrent un effet bien moins prononcé que I701, avec des valeurs de  $\Delta G_{act} = -2,0 \pm 0,2$  kcal/mol pour L699G et  $-3,6 \pm 0,2$  kcal/mol pour V703G, comparativement à  $-4,7 \pm 0,3$  kcal/mol pour la mutation I701G.

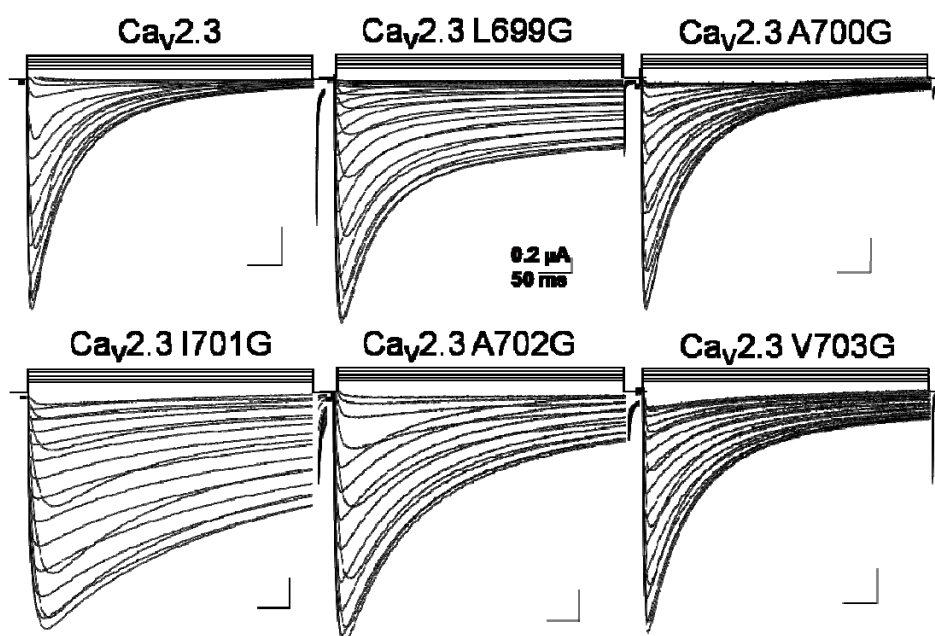
Les propriétés d'inactivation sont fortement affectées pour la majorité des mutations étudiées. En effet, la valeur  $R_{50}$  n'est jamais inférieure à 0,6 pour toutes les mutations étudiées dans cette région, alors qu'elle se trouve, pour le canal sauvage, à  $0,41 \pm 0,02$  ( $n = 41$ ). De plus, les valeurs de  $R_{50}$  pour les mutations en glycine des positions 699 à 703 affichent un écart significatif ( $p <$

0,001) par rapport au canal de type sauvage. Le potentiel de mi-inactivation est aussi sensible aux mutations dans cette région. En effet, les mutations A700G, I701G, V703G et D704G montrent un potentiel de mi-inactivation qui est significativement plus négatif que la valeur du canal sauvage. Ces résultats concordent avec les données rapportées dans la littérature qui affirment que les résidus dans la région distale de l'hélice IIS6 jouent un rôle important dans l'inactivation des canaux  $Ca_v1.2$  (Kudrnac et al. 2009) et  $Ca_v2.3$  (Raybaud et al. 2007).

La mutation I701G montre aussi un ralentissement unique de la constante de temps de désactivation. En effet, alors que la constante de temps de désactivation à -50 mV est rapide pour le canal de type sauvage ( $1,3 \pm 0,2$  ms,  $n = 10$ ) et les mutations L699G ( $2,4 \pm 0,2$  ms,  $n = 5$ ), A700G ( $1,18 \pm 0,09$  ms,  $n = 5$ ), A702G ( $1,0 \pm 0,4$  ms,  $n = 5$ ), V703G ( $0,8 \pm 0,1$  ms,  $n = 5$ ) et D704G ( $1,7 \pm 0,3$  ms,  $n = 5$ ), la mutation I701G affiche une valeur de  $20 \pm 3$  ms ( $n = 12$ ) (figure 19).

Ca <sub>v</sub> 2.3/α2δ/β3 10 mM Ba <sup>2+</sup>	Activation		Inactivation	
	E <sub>0.5,act</sub> (mV)	ΔG (kcal / mol)	E <sub>0.5,inact</sub> (mV)	R50 à 10 mV
<b>Ca<sub>v</sub>2.3 témoin</b>	-6,7 ± 0,4 (108)	-1,0 ± 0,1	-63,5 ± 0,6 (74)	0,41 ± 0,02 (41)
<b>L699G</b>	-19 ± 1 (13)**	-2,0 ± 0,2**	-62 ± 1 (7)	0,64 ± 0,01 (13)**
<b>A700G</b>	-14,1 ± 0,9 (10)**	-1,5 ± 0,1	-80 ± 1 (5)**	0,69 ± 0,01 (10)**
<b>I701G</b>	-45 ± 2 (24)**	-4,7 ± 0,3**	-84 ± 1 (12)**	0,82 ± 0,04 (24)**
<b>I701C</b>	-33 ± 3 (23)**	-4,2 ± 0,5**	-72 ± 2 (7)**	0,83 ± 0,01 (23)**
<b>I701L</b>	-12,9 ± 0,7 (5)	-1,2 ± 0,1	-56 ± 1 (5)**	0,61 ± 0,06 (5)**
<b>I701V</b>	-18 ± 1 (19)**	-2,1 ± 0,2**	-67,3 ± 0,8 (9)**	0,73 ± 0,02 (19)**
<b>A702G</b>	-11 ± 1 (20)**	-1,2 ± 0,1	-62 ± 1 (10)	0,67 ± 0,01 (20)**
<b>V703G</b>	-29 ± 1 (15)**	-3,6 ± 0,2**	-81 ± 1 (7)**	0,68 ± 0,02 (15)**
<b>D704G</b>	-16,7 ± 0,3 (5)**	-1,9 ± 0,1	-70,8 ± 0,9 (5)**	0,61 ± 0,02 (5)

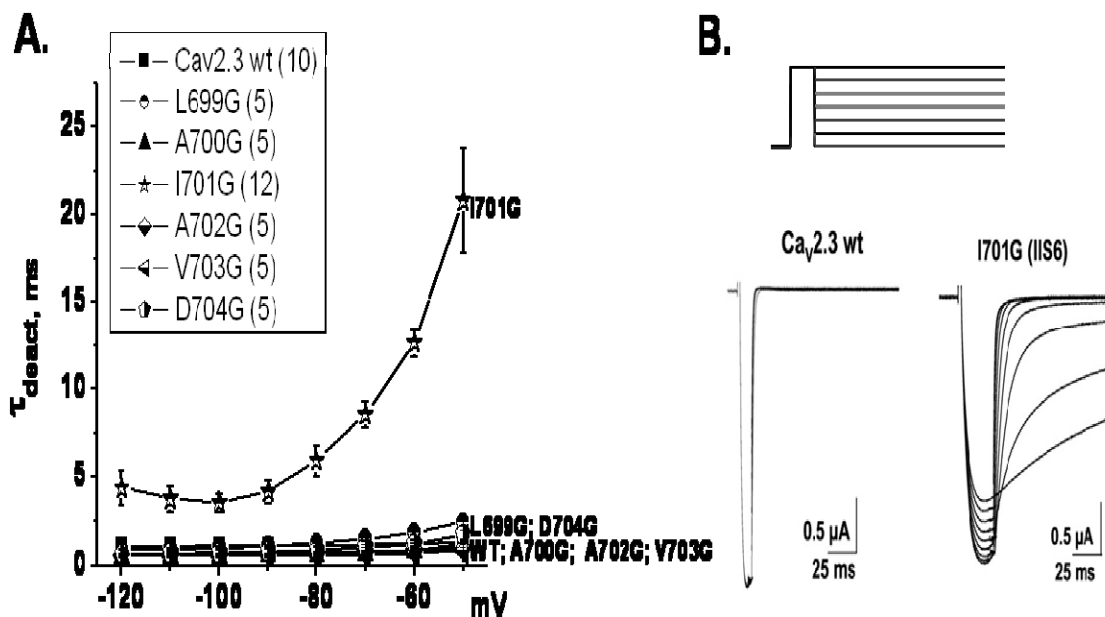
**Tableau 2 : Propriétés biophysiques des mutations de l'hélice IIS6.** Les paramètres d'activation sont extraits à partir du protocole d'activation (figure 17A) et les paramètres d'inactivation à partir du protocole d'inactivation (figure 17C). Les expériences ont été effectuées en présence des sous-unités auxiliaires Ca<sub>v</sub>α2δ et Ca<sub>v</sub>β3. Les courants ont été enregistrés dans une solution de 10mM Ba<sup>2+</sup>. \*\* : p < 0,001. Les données pour I701L et I701V ainsi qu'une partie des données pour L699G, A700G, I701G, A702G et V703G sont tirées de (Raybaud et al. 2007). Les données pour D704G ne sont pas publiées.



**Figure 18 : Enregistrements électrophysiologiques des mutations de la partie distale de l'hélice IIS6 de  $Ca_v2.3$ .** Les courants macroscopiques ont été enregistrés dans une solution de 10mM  $Ba^{2+}$  en présence des sous-unités auxiliaires  $Ca_v\alpha2\delta$  et  $Ca_v\beta3$ . À partir d'un potentiel de repos de -120 mV, une série de pulse dépolarisants allant de -70 mV à 50 mV a été appliquée. Sur chaque tracé, les barres d'échelle indiquent un temps de 50 ms (horizontal) et un courant de 0,2  $\mu A$  (vertical).

Les mutations I701C, I701L et I701V ont aussi été testées pour tenter de corréliser les changements observés sur les propriétés biophysiques avec la nature physique et/ou chimique du résidu inséré à la position 701, tel que précédemment effectuée par le laboratoire de Lucie Parent dans (Raybaud et al. 2007). La mutation I701C montre l'effet le plus semblable à I701G. En effet, cette mutation affiche un  $E_{act} = -33 \pm 3$  mV (23) et présente une énergie d'activation,  $\Delta G_{act} = -4,2 \pm 0,5$  kcal/mol. Cette mutation présente un courant résiduel R50 de  $0,83 \pm 0,01$  et un potentiel de mi-inactivation de  $-72 \pm 2$  (7). Les mutations en leucine et valine présentent des énergies d'activation moins négatives par rapport au canal de type sauvage, soit  $\Delta G_{act} = -1,2 \pm 0,1$  kcal/mol (5) et  $-2,1 \pm 0,2$  kcal/mol (19) respectivement. Les courants résiduels R50 sont de  $0,61 \pm 0,06$  (5) et  $0,73 \pm 0,02$  (19) respectivement. Les potentiels de mi-

inactivation sont de  $-56 \pm 1$  (5) et  $-67,3 \pm 0,8$  (9) respectivement. Ces valeurs sont moins décalées par rapport au canal sauvage que les mutations I701G et I701C mais suggèrent que le degré d'hydrophobicité du résidu étudié détermine son potentiel d'activation.



**Figure 19 : Propriétés de déactivation des mutations de la partie distale de l'hélice IIS6 de Ca<sub>v</sub>2.3.** Les mesures de constante de temps des mutations étudiées ont été effectuées en présence des sous-unités auxiliaires Ca<sub>v</sub> $\alpha$ 2 $\delta$  et Ca<sub>v</sub> $\beta$ 3 dans une solution de 10mM Ba<sup>2+</sup> à l'aide du protocole de déactivation (figure 17B). (A) Dépendance en voltage de la constante de déactivation. (B) Tracés électrophysiologiques obtenus par le protocole de déactivation (voir figure 17B pour les valeurs des potentiels). Le panneau B ainsi qu'une partie des données utilisées pour le graphique A sont tirées de (Raybaud et al. 2007).

### 3.2. « Glycine scan » de la boucle IIS4-S5

Alors que l'hélice S6 des canaux VDCC a été le sujet de nombreuses études, la boucle S4-S5 et son rôle dans l'activation de ces canaux commencent à peine à être étudiés. Pour cette raison, chaque résidu de cette boucle a été muté en glycine et la construction résultante a été étudiée en électrophysiologie. La glycine a été choisie afin de minimiser l'encombrement stérique qui pourrait être causé par le résidu inséré. Puisque les effets les plus importants sur l'activation ont été observés dans l'hélice S6 du domaine II, les expériences ont été effectuées sur la boucle S4-S5 du même domaine. Les acides aminés contenus dans cette région ont été identifiés par alignement avec la structure cristalline de Kv1.2 (2A79.pdb). L'alignement obtenu est présenté à la figure 20.



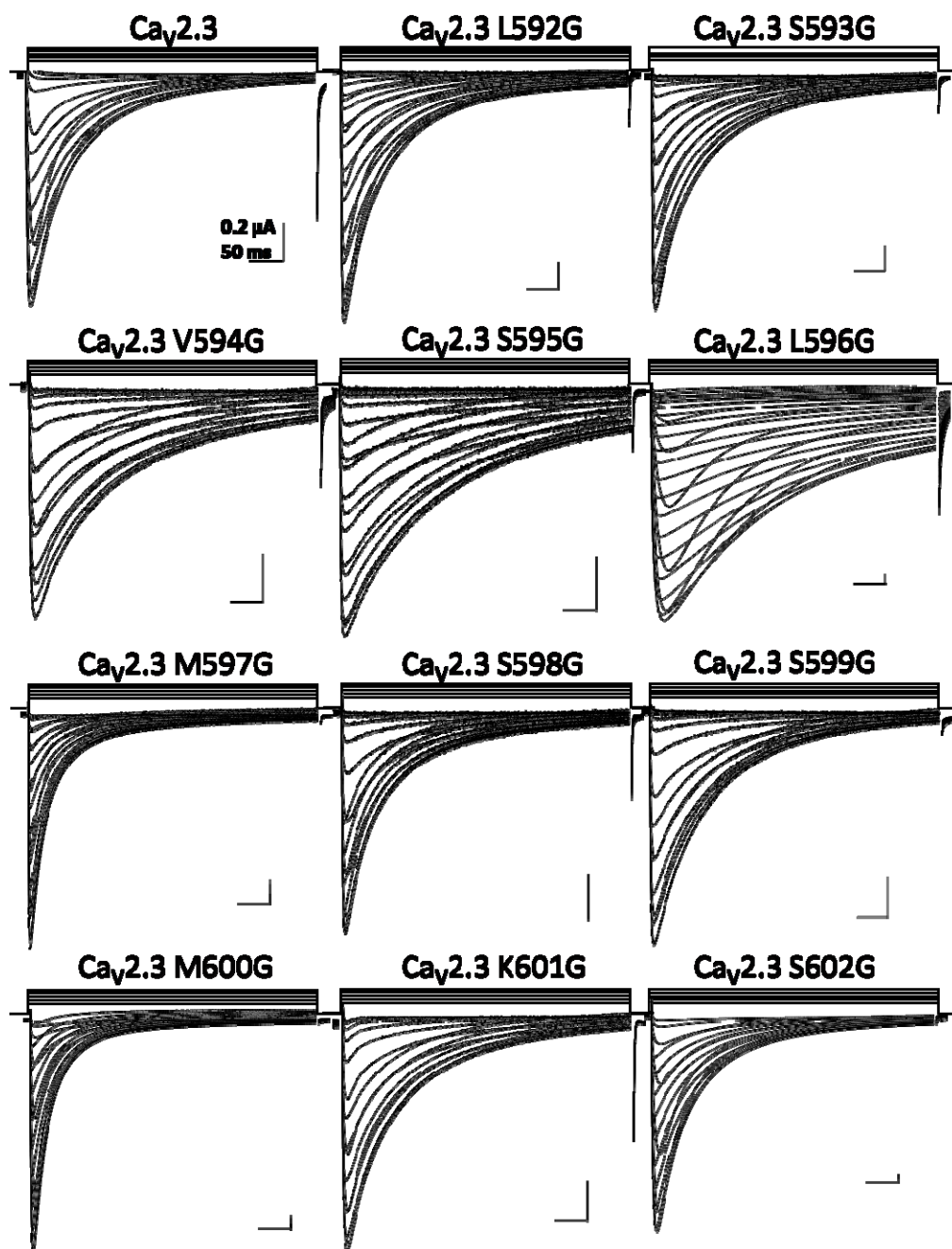
**Figure 20 : Alignement des structures primaires des boucles S4-S5 de Ca<sub>v</sub>2.3.** Les boucles S4-S5 de Ca<sub>v</sub>2.3 ont été alignées avec Kv1.2 par T-Coffee [<http://www.tcoffee.org/>].

Les résultats obtenus montrent certains déplacements importants des courbes d'activation et d'inactivation (tableau 3, figure 21). Parmi les effets les plus importants, la mutation L596G montre un  $E_{0.5,act} = -53 \pm 1$  mV ( $n = 6$ ), soit un écart de 46,3 mV avec la valeur mesurée sur le canal de type sauvage. Ce potentiel d'activation se traduit en  $\Delta G_{act} = -6,5 \pm 0,7$ . Les propriétés d'inactivation de cette mutation sont aussi fortement modifiées. En effet, elle présente un  $E_{0.5,inact} = -108 \pm 3$  mV ( $n = 6$ ) et un courant résiduel  $R50 = 0,87 \pm 0,03$ .



Ca <sub>v</sub> 2.3/ $\alpha$ 2 $\delta$ / $\beta$ 3 10 mM Ba <sup>2+</sup>	Activation		Inactivation	
	E <sub>0.5,act</sub> (mV)	$\Delta G$ (kcal / mol)	E <sub>0.5,inact</sub> (mV)	R50 à 10 mV
<b>Ca<sub>v</sub>2.3 témoin</b>	-6,7 ± 0,4 (108)	-1,0 ± 0,1	-63,5 ± 0,6 (74)	0,41 ± 0,02 (41)
<b>L592G</b>	-11 ± 1 (5)	-1,2 ± 0,1	-63 ± 1 (5)	0,54 ± 0,01 (5)
<b>V593G</b>	-5 ± 1 (5)	-0,5 ± 0,2	-68 ± 1 (5)*	0,47 ± 0,03 (5)
<b>V594G</b>	-11 ± 1 (5)	-1,3 ± 0,1	-55 ± 2 (4)*	0,73 ± 0,02 (5)**
<b>S595G</b>	-17 ± 2 (9)	-1,7 ± 0,3	-39 ± 1 (5)**	0,73 ± 0,03 (5)**
<b>L596G</b>	-53 ± 1 (6)**	-6,5 ± 0,7**	-108 ± 3 (6)**	0,87 ± 0,03 (6)**
<b>M597G</b>	-14 ± 1 (4)*	-1,5 ± 0,2	-82 ± 1 (4)**	0,26 ± 0,07 (4)
<b>S598G</b>	-4 ± 2 (5)	-0,5 ± 0,2	-59 ± 1 (5)	0,41 ± 0,02 (5)
<b>S599G</b>	-2 ± 1 (9)*	-0,3 ± 0,2	-55 ± 1 (7)**	0,49 ± 0,02 (9)
<b>M600G</b>	-16 ± 1 (5)**	-2,1 ± 0,2*	-65 ± 1 (5)	0,33 ± 0,03 (5)
<b>K601G</b>	-5 ± 1 (5)	-0,6 ± 0,2	-51 ± 1 (5)**	0,53 ± 0,03 (5)
<b>S602G</b>	-20 ± 1 (6)**	-3,1 ± 0,4**	-70 ± 1 (5)**	0,58 ± 0,06 (6)*

**Tableau 3 : Propriétés biophysiques des mutations de la boucle IIS4-S5.** Les paramètres d'activation sont extraits à partir du protocole d'activation (figure 17A) et les paramètres d'inactivation à partir du protocole d'inactivation (figure 17C). Les expériences ont été effectuées en présence des sous-unités auxiliaires Ca<sub>v</sub> $\alpha$ 2 $\delta$  et Ca<sub>v</sub> $\beta$ 3. Les courants ont été enregistrés dans une solution de 10mM Ba<sup>2+</sup>. \* : p < 0,005, \*\* : p < 0,001.

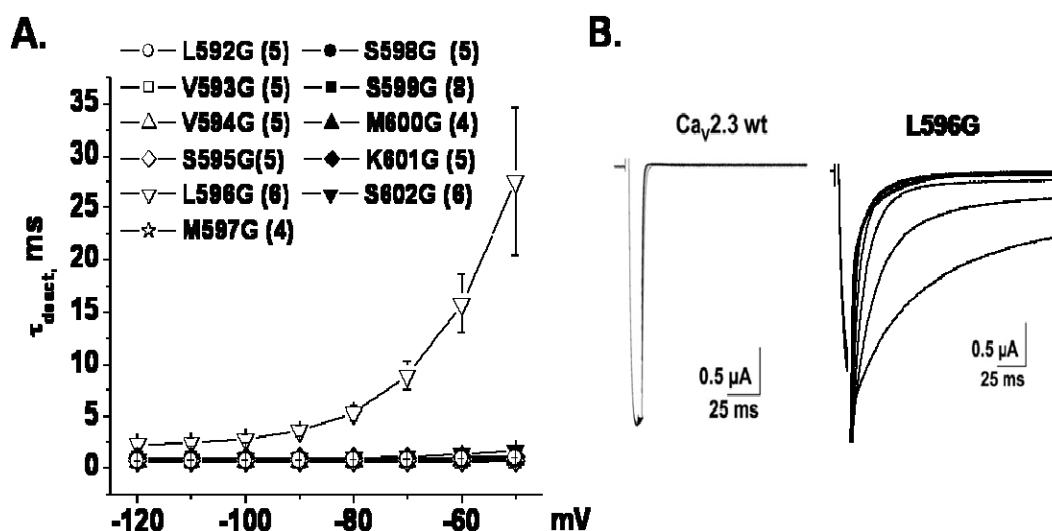


**Figure 21 : Enregistrements électrophysiologiques des mutations de la partie distale de l'hélice IIS4-S5 de  $Ca_v2.3$ .** Les courants macroscopiques ont été enregistrés dans une solution de 10mM  $Ba^{2+}$  en présence des sous-unités auxiliaires  $Ca_v\alpha2\delta$  et  $Ca_v\beta3$ . À partir d'un potentiel de repos de -120 mV, une série de pulse dépolarisants allant de -70 mV à 50 mV a été appliquée. Sur chaque tracé, les barres d'échelle indiquent un temps de 50 ms (horizontal) et un courant de 0,2  $\mu A$  (vertical).

Les mutations situées aux positions proximales par rapport à L596 ne présentent aucun effet significatif sur l'activation du canal. Les mutations V593G et V594G modifient légèrement ( $p < 0,005$ ) le potentiel de mi-inactivation, avec des valeurs de  $E_{0,5,inact} = -68 \pm 1$  mV ( $n = 5$ ) et  $E_{0,5,inact} = -55 \pm 2$  mV ( $n = 5$ ) respectivement. La mutation V594G présente seulement un changement significatif du courant résiduel R50 avec une valeur de  $0,73 \pm 0,02$  ( $n = 5$ ). La mutation S595G modifie significativement le potentiel de mi-inactivation et le courant résiduel R50 par rapport au canal sauvage, avec des valeurs de  $E_{0,5,inact} = -39 \pm 1$  mV et  $R50 = 0,73 \pm 0,003$  ( $n = 5$ ).

Les mutations situées à des positions distales sur la boucle S4-S5 modifient légèrement plus les propriétés biophysiques. En effet, les potentiels de mi-activation des mutations M597G ( $-14 \pm 1$  mV) et S599G ( $-2 \pm 1$  mV) sont légèrement modifiés par rapport au canal sauvage. De plus, les mutations M600G et S602G présentent des potentiels de mi-activation qui sont significativement différents du canal de type sauvage, soit  $-16 \pm 1$  mV pour M600G et  $-20 \pm 1$  mV pour S602G. Ces mutations présentent aussi certains effets sur les propriétés d'inactivation. Les potentiels de mi-inactivation des mutations M597G ( $-82 \pm 1$  mV), S599G ( $-55 \pm 1$  mV), K601G ( $-51 \pm 1$  mV) et K602G ( $-70 \pm 1$  mV) sont significativement différents de la valeur observée pour le canal sauvage ( $-63,5 \pm 0,6$  mV). Seule la mutation S602G présente un effet sur le courant résiduel R50, avec une valeur de  $0,58 \pm 0,06$  ( $p < 0,05$ ).

Les propriétés de désactivation sont aussi très peu modifiées par ces mutations. En effet, la seule mutation présentant une constante de temps de désactivation plus lente est L596G, qui présente une valeur de  $27 \pm 7$  ms. Les autres mutations présentent des valeurs entre 0,5 et 2 ms, soit comme le canal de type sauvage (figure 22).



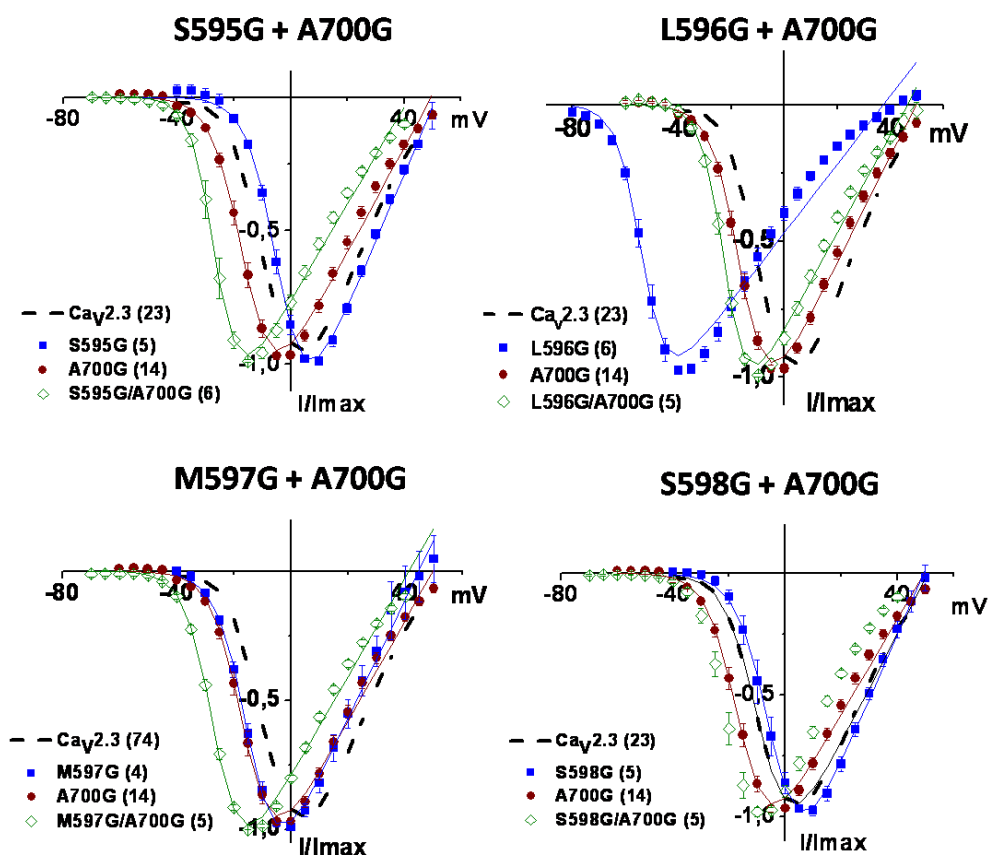
**Figure 22 : Propriétés de déactivation des mutations de la boucle IIS4-S5 de Ca<sub>v</sub>2.3.** Les mesures de constante de temps des mutations étudiées ont été effectuées en présence des sous-unités auxiliaires Ca<sub>v</sub>α2δ et Ca<sub>v</sub>β3 dans une solution de 10mM Ba<sup>2+</sup> à l'aide du protocole de déactivation (figure 17B). (A) Dépendance en voltage de la constante de déactivation. (B) Tracés électrophysiologiques obtenus par le protocole de déactivation présenté à la figure 17B.

### 3.3. Mutations doubles

L'étude de mutations doubles contenant une mutation dans la boucle IIS4-S5 et une seconde mutation dans l'hélice IIS6 devrait permettre de caractériser le niveau d'interaction entre les deux acides aminés mutés. Chaque mutation en glycine dans l'hélice IIS6 entre les résidus A700 et V704 a été couplée à une série de mutations dans la boucle IIS4-S5 pour un total de 32 mutations doubles. Il est à noter que l'analyse statistique n'a pas été effectuée pour les mutations doubles puisque l'effet observé sur celles-ci est une combinaison des effets des deux mutations simples.

### 3.3.1. Position A700

La mutation A700G a été couplée aux mutations S595G à S598G. Les résultats obtenus sont présentés au tableau 4. Toutes les mutations étudiées présentent un potentiel de mi-activation plus négatif que A700G seul, ce qui se traduit par une énergie d'activation de plus grande amplitude. Les courbes d'activation sont présentées à la figure 23. Il est intéressant de constater que les mutations S595G + A700G et L596G + A700G présentent des effets qui ne sont pas additifs.



**Figure 23 : Courbes IV des mutations doubles de A700G.** Les courants obtenus pour chaque mutation en présence des sous-unités auxiliaires  $Ca_v\alpha 2\delta$  et  $Ca_v\beta 3$  dans une solution de 10mM  $Ba^{2+}$  ont été normalisés et lissés par une équation de type Boltzmann (équation 9).

La mutation M597G + A700G présente un potentiel de mi-inactivation particulièrement négatif ( $-100 \pm 1$  mV). La mutation S595G + A700G montre une inactivation très lente, caractérisée par un courant résiduel R50 de  $0,85 \pm 0,02$ . Les constantes de temps de désactivation de ces mutations se situent à et  $2,6 \pm 0,6$  ms pour S595G + A700G,  $1,4 \pm 0,2$  ms pour L596G + A700G,  $0,9 \pm 0,1$  ms pour M597G + A700G et  $1,4 \pm 0,2$  ms pour S598G + A700G. Ces valeurs sont tout à fait semblables aux valeurs observées pour le canal de type sauvage et la mutation A700G. Toutes les mutations doubles présentent un  $\Delta G_{act}$  significativement différent des valeurs obtenues pour les mutations simples.

<b>Ca<sub>v</sub>2.3/α2δ/β3</b> <b>10 mM Ba<sup>2+</sup></b>	<b>Activation</b>		<b>Inactivation</b>	
	<b>E<sub>0.5,act</sub> (mV)</b>	<b>ΔG (kcal / mol)</b>	<b>E<sub>0.5,inact</sub> (mV)</b>	<b>R50 à 10 mV</b>
<b>Ca<sub>v</sub>2.3 témoin</b>	$-6,7 \pm 0,4$ (108)	$-1,0 \pm 0,1$	$-63,5 \pm 0,6$ (74)	$0,41 \pm 0,02$ (41)
<b>A700G</b>	$-14,1 \pm 0,9$ (10)	$-1,5 \pm 0,1$	$-80 \pm 1$ (5)	$0,69 \pm 0,01$ (10)
<b>S595G + A700G</b>	$-26 \pm 1$ (6)	$-3,8 \pm 0,4$	$-68 \pm 1$ (5)	$0,85 \pm 0,02$ (6)
<b>L596G + A700G</b>	$-22 \pm 1$ (5)	$-3,0 \pm 0,3$	$-80 \pm 1$ (5)	$0,70 \pm 0,02$ (5)
<b>M597G + A700G</b>	$-26 \pm 1$ (5)	$-3,0 \pm 0,1$	$-100 \pm 1$ (5)	$0,61 \pm 0,02$ (5)
<b>S598G + A700G</b>	$-20 \pm 1$ (5)	$-2,4 \pm 0,2$	$-86 \pm 1$ (5)	$0,61 \pm 0,01$ (5)

**Tableau 4 : Propriétés biophysiques des mutations doubles contenant A700G.** Les paramètres d'activation sont extraits à partir du protocole d'activation (figure 17A) et les paramètres d'inactivation à partir du protocole d'inactivation (figure 17C). Les expériences ont été effectuées en présence des sous-unités auxiliaires Ca<sub>v</sub>α2δ et Ca<sub>v</sub>β3. Les courants ont été enregistrés dans une solution de 10mM Ba<sup>2+</sup>.

### 3.3.2. Position I701

Lors de l'étude de l'hélice IIS6, la mutation I701G a montré un potentiel de mi-activation décalé d'environ -40 mV. Étant donné l'importance des effets observés à cette position, un nombre important de mutations doubles a été testé. Le tableau 5 présente les résultats obtenus.

Les mutations doubles effectuées à la position I701 montrent toutes d'importantes variations du potentiel de mi-activation ainsi que de l'énergie d'activation par rapport au canal de type sauvage. On note, en comparant les données des tableaux 3 et 5, que les valeurs des énergies d'activation des mutations doubles présentent un grand écart avec la somme des énergies d'activation des mutations simples dans le cas des mutations S595G + I701G, L596G + I701G et M597G + I701G (voir équation 15 et discussion).

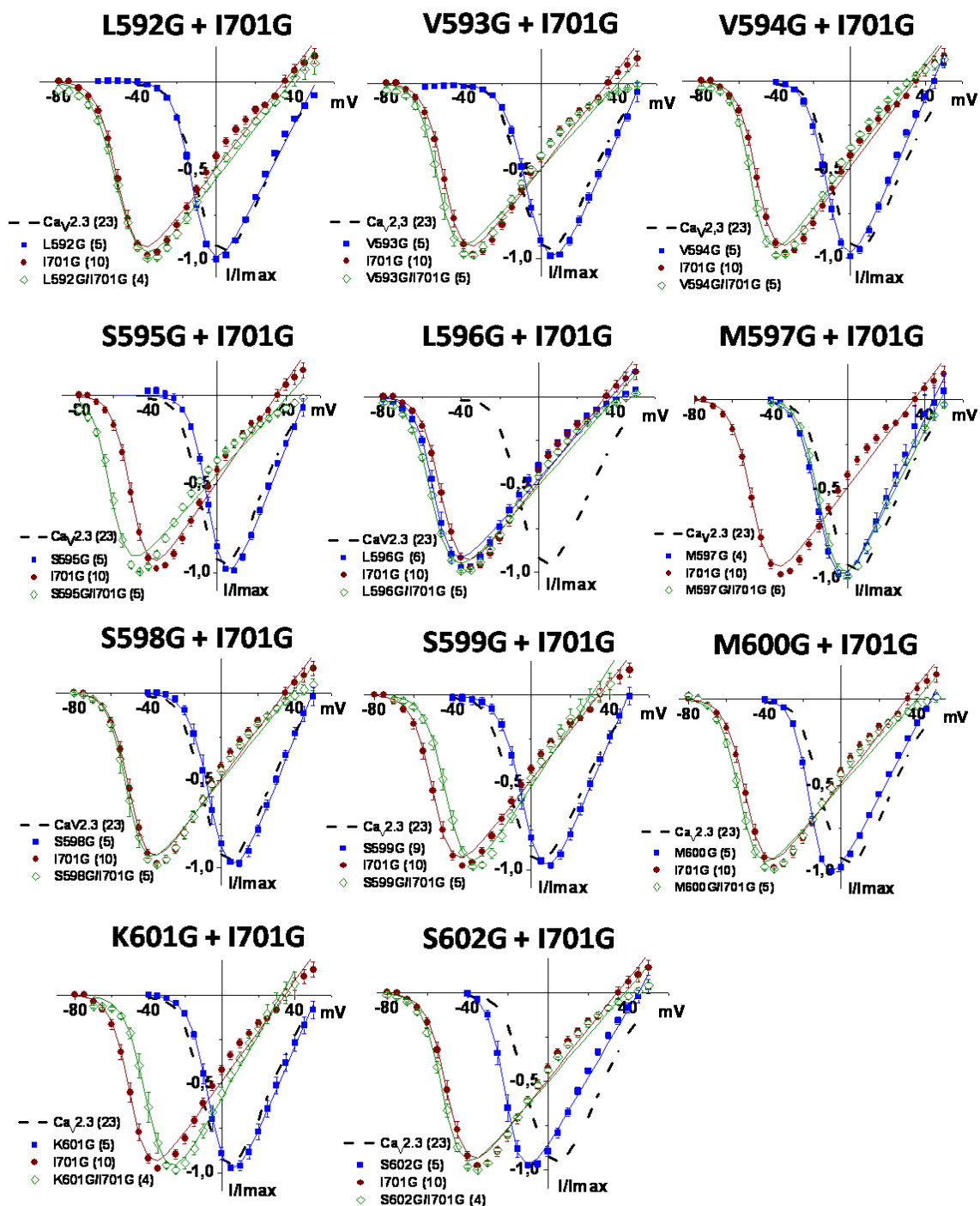
Les mutations S595G + I701G et L596G + I701G présentent des potentiels de mi-inactivation de  $-93 \pm 1$  (4) et  $-102 \pm 2$  (5) respectivement, soit des valeurs très négatives par rapport au potentiel de mi-inactivation de Ca<sub>v</sub>2.3 I701G. La valeur observée pour L596G + I701G se rapproche de celle de la mutation simple L596G. Par contre, la mutation simple S595G montre un potentiel de mi-inactivation de  $-39 \pm 1$  mV (5). Il y a donc un grand écart entre les effets observés pour les mutations simples et celui observé pour la mutation double.

Les constantes de temps de désactivation sont présentées au tableau 6. Bien que différentes de la valeur du canal sauvage, aucune des doubles mutations ne rejoint la valeur observée pour la mutation I701G.

Ca <sub>v</sub> 2.3/α2δ/β3 10 mM Ba <sup>2+</sup>	Activation		Inactivation	
	E <sub>0.5,act</sub> (mV)	ΔG (kcal / mol)	E <sub>0.5,inact</sub> (mV)	R50 à 10 mV
Ca <sub>v</sub> 2.3 témoin	-6,7 ± 0,4 (108)	-1,0 ± 0,1	-63,5 ± 0,6 (74)	0,41 ± 0,02 (41)
I701G	-45 ± 2 (24)**	-4,7 ± 0,3**	-84 ± 1 (12)**	0,82 ± 0,04 (24)**
L592G + I701G	-49 ± 1 (4)	-4,6 ± 0,5	-87 ± 1 (4)	0,90 ± 0,02 (4)
V593G + I701G	-53 ± 2 (5)	-6,6 ± 0,4	-87 ± 1 (5)	0,88 ± 0,01 (5)
V594G + I701G	-53 ± 1 (5)	-6,6 ± 0,6	-54 ± 2 (3)	0,88 ± 0,07 (5)
S595G + I701G	-61 ± 1 (5)	-7,2 ± 0,5	-93 ± 1 (4)	0,86 ± 0,01 (5)
L596G + I701G	-54,5 ± 0,5 (5)	-5,6 ± 0,3	-102 ± 2 (5)	0,87 ± 0,02 (5)
M597G + I701G	-13 ± 1 (6)	-1,5 ± 0,2	-59 ± 2 (4)	0,58 ± 0,03 (6)
S598G + I701G	-51 ± 2 (5)	-6,5 ± 0,6	-73 ± 2 (4)	0,92 ± 0,02 (5)
S599G + I701G	-42 ± 1 (6)	-4,7 ± 0,3	-69 ± 1 (4)	0,79 ± 0,06 (6)
M600G + I701G	-40 ± 2 (4)	-4,1 ± 0,5	-67 ± 1 (4)	0,89 ± 0,03 (4)
K601G + I701G	-40 ± 2 (4)	-4,1 ± 0,5	-67 ± 1 (4)	0,89 ± 0,03 (4)
S602G + I701G	-52 ± 1 (4)	-6,0 ± 0,1	-84 ± 1 (4)	0,91 ± 0,01 (4)

**Tableau 5 : Propriétés biophysiques des mutations doubles contenant I701G.** Les paramètres d'activation sont extraits à partir du protocole d'activation (figure 17A) et les paramètres d'inactivation à partir du protocole d'inactivation (figure 17C). Les expériences ont été effectuées en présence des sous-unités auxiliaires Ca<sub>v</sub>α2δ et Ca<sub>v</sub>β3. Les courants ont été enregistrés dans une solution de 10mM Ba<sup>2+</sup>.





**Figure 24 : Courbes IV des mutations doubles de I701G.** Les courants obtenus pour chaque mutation en présence des sous-unités auxiliaires  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  et  $\text{Ca}_v\beta3$  dans une solution de  $10\text{mM Ba}^{2+}$  ont été normalisés et lissés par une équation de type Boltzmann (équation 9).

<b>Ca<sub>v</sub>2.3/α2δ/β3 10 mM Ba<sup>2+</sup></b>	<b>τ<sub>deact</sub> (ms)</b>
<b>Ca<sub>v</sub>2.3 témoin</b>	1,3 ± 0,2 (10)
<b>I701G</b>	30 ± 2 (6)
<b>L592G + I701G</b>	11 ± 2 (4)
<b>V593G + I701G</b>	9 ± 1 (5)
<b>V594G + I701G</b>	11 ± 2 (5)
<b>S595G + I701G</b>	1,0 ± 0,2 (5)
<b>L596G + I701G</b>	8 ± 2 (5)
<b>M597G + I701G</b>	1,1 ± 0,1 (5)
<b>S598G + I701G</b>	7 ± 2 (5)
<b>S599G + I701G</b>	13 ± 2 (5)
<b>M600G + I701G</b>	25 ± 2 (5)
<b>K601G + I701G</b>	14 ± 3 (4)
<b>S602G + I701G</b>	20 ± 2 (4)

**Tableau 6 : Constantes de temps de désactivation des mutations doubles contenant I701G.** Les constantes de temps de désactivation ont été mesurées mutation en présence des sous-unités auxiliaires Ca<sub>v</sub>α2δ et Ca<sub>v</sub>β3 dans une solution de 10mM Ba<sup>2+</sup> à l'aide du protocole illustré à la figure 17B. Les données expérimentales ont été lissées par une équation exponentielle (équation 11).

### 3.3.3. Position A702

La mutation A702G a été couplée aux mutations V594G, S595G, L596G, M597G et S598G. Bien que toutes les mutations doubles étudiées présentent un potentiel d'activation plus petit que la valeur observée pour A702G, la mutation S595G + A702G retient l'attention par le grand écart entre la somme des énergies d'activation des mutations simples et l'énergie d'activation de la mutation double (voir section 2.5 et discussion). Les courbes IV sont présentées à la figure 25 et les propriétés biophysiques sont présentées au tableau 6.

Ca <sub>v</sub> 2.3/α2δ/β3 10 mM Ba <sup>2+</sup>	Activation		Inactivation	
	E <sub>0.5,act</sub> (mV)	ΔG (kcal / mol)	E <sub>0.5,inact</sub> (mV)	R50 à 10 mV
<b>Ca<sub>v</sub>2.3 témoin</b>	-6,7 ± 0,4 (108)	-1,0 ± 0,1	-63,5 ± 0,6 (74)	0,41 ± 0,02 (41)
<b>A702G</b>	-11 ± 1 (20)	-1,2 ± 0,1	-62 ± 1 (10)	0,67 ± 0,01 (20)
<b>V594G + A702G</b>	-14 ± 2 (6)	-1,9 ± 0,4	-50 ± 3 (6)	0,62 ± 0,03 (6)
<b>S595G + A702G</b>	-17 ± 2 (5)	-2,7 ± 0,6	-48 ± 1 (5)	0,82 ± 0,01 (5)
<b>L596G + A702G</b>	-26 ± 1 (5)	-3,6 ± 0,3	-64 ± 1 (5)	0,70 ± 0,01 (5)
<b>M597G + A702G</b>	-20 ± 1 (5)	-2,2 ± 0,1	-73 ± 1 (5)	0,54 ± 0,02 (5)
<b>S598G + A702G</b>	-17 ± 1 (5)	-1,9 ± 0,2	-63 ± 1 (5)	0,65 ± 0,01 (5)

**Tableau 7 : Propriétés biophysiques des mutations doubles contenant A702G.** Les paramètres d'activation sont extraits à partir du protocole d'activation (figure 17A) et les paramètres d'inactivation à partir du protocole d'inactivation (figure 17C). Les expériences ont été effectuées en présence des sous-unités auxiliaires Ca<sub>v</sub>α2δ et Ca<sub>v</sub>β3. Les courants ont été enregistrés dans une solution de 10mM Ba<sup>2+</sup>.

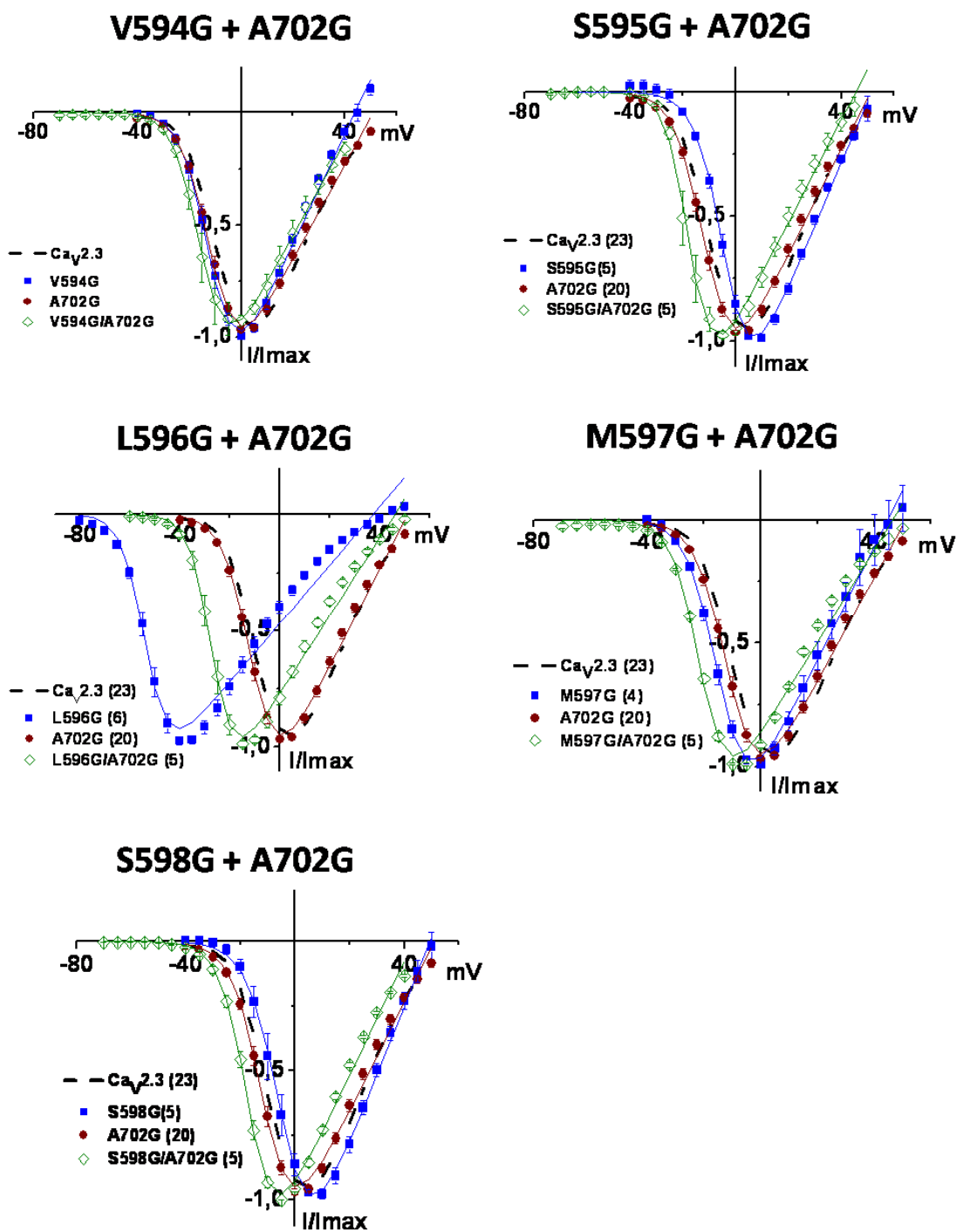


Figure 25 : Courbes IV des mutations doubles de A702G. Les courants obtenus pour chaque mutation en présence des sous-unités auxiliaires  $\text{Ca}_V\alpha 2\delta$  et  $\text{Ca}_V\beta 3$  dans une solution de  $10\text{mM Ba}^{2+}$  ont été normalisés et lissés par une équation de type Boltzmann (équation 9).

Les mutations doubles contenant la mutation A702G montrent beaucoup moins d'effet sur les propriétés biophysiques que celles effectuées à la position I701. En effet, les  $\Delta G_{act}$  ne varient que de -1,2 kcal/mol à -3,6 kcal/mol et ces mutations ne présentent aucun changement remarquable du potentiel de mi-inactivation. Les courbes IV des mutations S595G + A702G et L596G + A702G semblent montrer un effet non additif de l'énergie d'activation sur la double mutation par rapport aux mutations simples.

Les constantes de temps de désactivation observées sont de  $1,2 \pm 0,2$  ms (6) pour V594G + A702G,  $8 \pm 1$  ms (5) pour S595G + A702G,  $4,7 \pm 0,6$  ms (5) pour L596G + A702G,  $2 \pm 1$  ms (5) pour M597G + A702G et  $3,6 \pm 0,3$  ms (5) pour S598G + A702G. Ces données sont légèrement plus élevées que les constantes de temps de la protéine sauvage et de la mutation A702G, mais aucun effet n'est comparable à ce qui a été observé à la position I701.

#### **3.3.4. Positions 703 et 704**

Les mutations V703G et D704G ont été couplées aux mutations V594G, S595G, L596G, M597G et S598G. Ces mutations doubles ont montré beaucoup moins d'effets que les positions A700 à A702. En effet, tel que montré au tableau 7, les potentiels d'activation de ces mutations ne présentent que peu d'écart par rapport au potentiel d'activation de la mutation V703G ou D704G, selon le cas. Notons cependant que, dans les deux cas, le grand effet observé sur le potentiel d'activation de la mutation L596G n'est pas observé dans le cas des mutations doubles. De plus, aucune de ces mutations n'a présenté une constante de désactivation qui diffère de la protéine sauvage. Notons finalement que la protéine S595G + D704G n'a présenté aucun courant. L'anticorps commercial contre  $Ca_v2.3$  ne fonctionnant pas sur les lysats d'ovocytes, il nous est donc impossible de savoir si la protéine est produite correctement.

<b>Ca<sub>v</sub>2.3/α2δ/β3</b> <b>10 mM Ba<sup>2+</sup></b>	<b>Activation</b>		<b>Inactivation</b>	
	<b>E<sub>0.5,act</sub> (mV)</b>	<b>ΔG (kcal / mol)</b>	<b>E<sub>0.5,inact</sub> (mV)</b>	<b>R50 à 10 mV</b>
<b>Ca<sub>v</sub>2.3 témoin</b>	-6,7 ± 0,4 (108)	-1,0 ± 0,1	-63,5 ± 0,6 (74)	0,41 ± 0,02 (41)
<b>V703G</b>	-29 ± 1 (15)	-3,6 ± 0,2	-81 ± 1 (7)	0,68 ± 0,02 (15)
<b>V594G + V703G</b>	-24 ± 1 (5)	-3,0 ± 0,2	-58 ± 1 (5)	0,80 ± 0,02 (5)
<b>S595G + V703G</b>	-25 ± 1 (3)	-2,3 ± 0,1	-54 ± 3 (4)	0,90 ± 0,02 (3)
<b>L596G + V703G</b>	-25 ± 1 (5)	-3,7 ± 0,2	-72 ± 2 (5)	0,77 ± 0,01 (5)
<b>M597G + V703G</b>	-13 ± 1 (6)	-1,5 ± 0,2	-59 ± 2 (4)	0,58 ± 0,03 (6)
<b>S598G + V703G</b>	-27 ± 1 (5)	-3,7 ± 0,3	-77 ± 1 (4)	0,65 ± 0,01 (5)
<b>D704G</b>	-17,0 ± 0,4 (5)	-1,9 ± 0,1	-70,8 ± 0,9 (7)	0,60 ± 0,03 (5)
<b>V594G + D704G</b>	-18,1 ± 0,8 (5)	-2,5 ± 0,3	-62,3 ± 0,7 (5)	0,57 ± 0,04 (5)
<b>S595G + D704G</b>	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
<b>L596G + D704G</b>	-21 ± 1 (5)	-2,8 ± 0,3	-68 ± 1 (5)	0,63 ± 0,02 (5)
<b>M597G + D704G</b>	-22,5 ± 0,6 (5)	-2,4 ± 0,1	-90 ± 1 (5)	0,38 ± 0,02 (5)
<b>S598G + D704G</b>	-14 ± 1 (5)	-1,6 ± 0,2	-67,4 ± 0,7 (5)	0,35 ± 0,01 (5)

**Tableau 8 : Propriétés biophysiques des mutations doubles contenant V703G ou D704G.**

Les paramètres d'activation sont extraits à partir du protocole d'activation (figure 17A) et les paramètres d'inactivation à partir du protocole d'inactivation (figure 17C). Les expériences ont été effectuées en présence des sous-unités auxiliaires Ca<sub>v</sub>α2δ et Ca<sub>v</sub>β3. Les courants ont été enregistrés dans une solution de 10mM Ba<sup>2+</sup>.

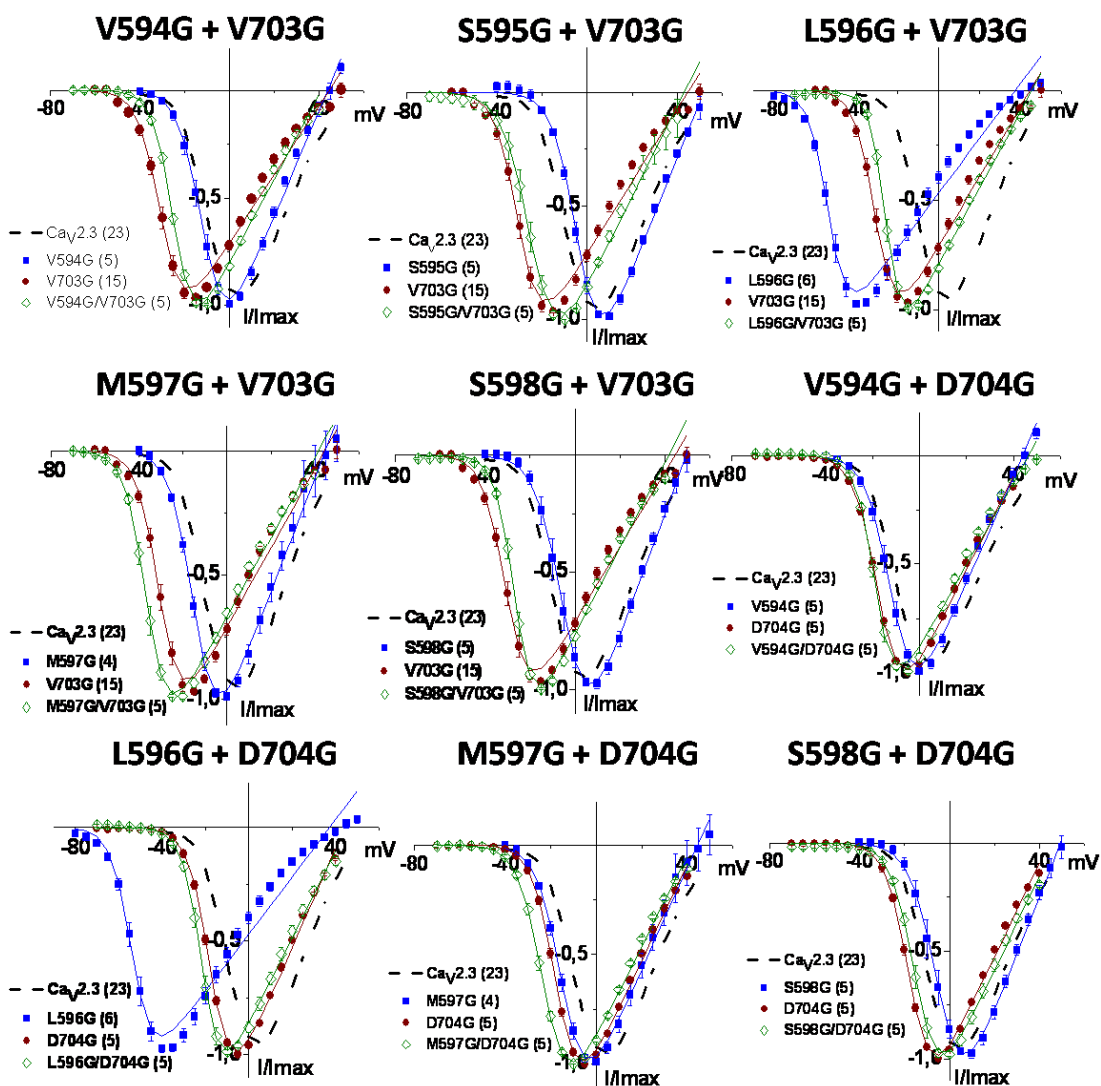


Figure 26 : Courbes IV des mutations doubles de V703G et D704G. Les courants obtenus pour chaque mutation en présence des sous-unités auxiliaires  $Ca_v\alpha_2\delta$  et  $Ca_v\beta_3$  dans une solution de  $10\text{mM Ba}^{2+}$  ont été normalisés et lissés sur une courbe de Boltzmann.

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Modélisation par homologie

Dans le but d'identifier l'interaction entre les régions S4-S5 et S6 du domaine II de  $Ca_v2.3$ , les alignements produits pour la boucle S4-S5 (figure 20) et pour l'hélice S6 (figure 14) ont été utilisés pour produire un modèle par homologie de ces deux régions à partir de la structure cristalline de Kv1.2. Un tel modèle semblait être la première étape logique vers l'identification des résidus impliqués dans l'interaction entre ces deux régions et aurait pu servir à identifier les résidus à cibler lors des expériences subséquentes en électrophysiologie.

Cependant, l'alignement de la structure primaire révèle une très faible homologie entre  $Ca_v2.3$  et Kv1.2 dans la région de la boucle S4-S5, ce qui laisse planer un fort doute sur la pertinence de la modélisation par homologie avec un canal potassique. En effet, cette technique requiert généralement une homologie de séquence minimale de 45% pour produire un résultat valable. De plus, en raison de la grande variabilité des boucles extracellulaires, il est impossible de déterminer l'orientation des hélices les unes par rapport aux autres. Il faut aussi considérer que Kv1.2 est une protéine homotétramérique, alors que  $Ca_v2.3$  forme un pseudo-tétramère, formé de quatre domaines différents.

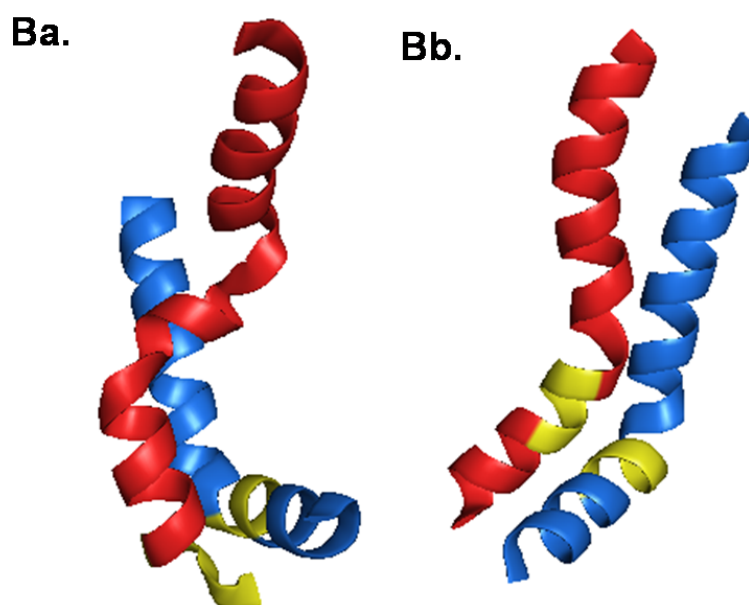
Tel qu'attendu, les résultats produits par le logiciel *Modeller* ont reflété la faible homologie entre les deux séquences. La région de la boucle S4-S5, qui présente un bon niveau de similarité avec celle de Kv1.2 contrairement à l'hélice S6 des deux canaux, a été modélisée assez facilement et ne semble pas avoir présenté de difficultés majeures à *Modeller*. En effet, les différents alignements soumis au logiciel ont tous donné une hélice parallèle au plan de la membrane, telle qu'on la retrouve dans Kv1.2. Cependant, les modèles obtenus pour l'hélice S6 du domaine II n'ont donné aucun résultat convaincant. En effet, les différents alignements soumis ont donné des structures



secondaires qui, malgré une énergie interne de même valeur, étaient complètement différentes. La figure 27 présente deux modèles obtenus après minimisation d'énergie des régions S4-S5 et S6 du domaine II de Ca<sub>v</sub>2.3 à l'aide des alignements présentés aux figures 14 et 20.

**Aa.** CaV2.3 GGVSS-**GMWSAIYFI**-VLTFLFGNYTLLNVF**LAI**-AVD  
Kv1.2 GGTKIVG-SLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNIFYFHRET

**Ab.** CaV2.3 GVSS**GMWSAIYFI**VLTFLFGNYTLLNVF**LAI**AVDNLANA  
Kv1.2 -----IVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNIFY



**Figure 27 : Modélisation par homologie de la boucle IIS4-S5 et IIS6 de Ca<sub>v</sub>2.3.** (A) Aa et Ab. Alignements des structures primaires des hélices S6 de Ca<sub>v</sub>2.3. Les boucles S4-S5 et l'hélice S6 de Ca<sub>v</sub>2.3 ont été alignées avec Kv1.2 par T-Coffee [<http://www.tcoffee.org/>]. L'alignement présenté en Aa inclut les résidus 671 à 704 tandis que l'alignement en Ab inclut les résidus 672 à 709 de Ca<sub>v</sub>2.3 (B) Modélisations par homologie avec Kv1.2 de la boucle IIS4-S5 (bleu) et de l'hélice IIS6 (rouge) de Ca<sub>v</sub>2.3 (Ba correspond à l'alignement Aa et Bb correspond à l'alignement Ab). Les alignements présentés en Aa et Ab ont été soumis à *Modeller 9v2* qui a produit et minimisé les modèles. L'alignement utilisé pour la région S4-S5 est illustré à la figure 20 et est le même pour les deux modèles. Les régions en jaunes représentent les résidus qui seraient à proximité atomique d'après les modèles, soit V594 à S598 dans IIS4-S5 et A700 à A702 dans IIS6 dans les deux modèles (résidus en caractères gras dans le panneau A).

Bien que, comme mentionné plus haut, l'hélice S6 présente une homologie au niveau de la séquence primaire très faible avec Kv1.2 et que la structure obtenue par modélisation était très sensible à l'alignement utilisé, il est très intéressant de noter les régions se trouvant à proximité atomique dans les modèles présentés à la figure 27 comportent les résidus pour lesquels les effets sont les plus importants en électrophysiologie. En effet, la majorité des mutations doubles étudiées comprenant les résidus de ces deux régions présentaient une valeur de  $\Delta G_{act}$  dont la somme était différente de la somme des valeurs de  $\Delta G_{act}$  des mutations simples. Une absence d'additivité des énergies d'activation est très souvent interprétée comme un signe que les résidus concernés sont couplés lors du mécanisme d'activation dont il est question tel qu'il est décrit à la section 2.5.

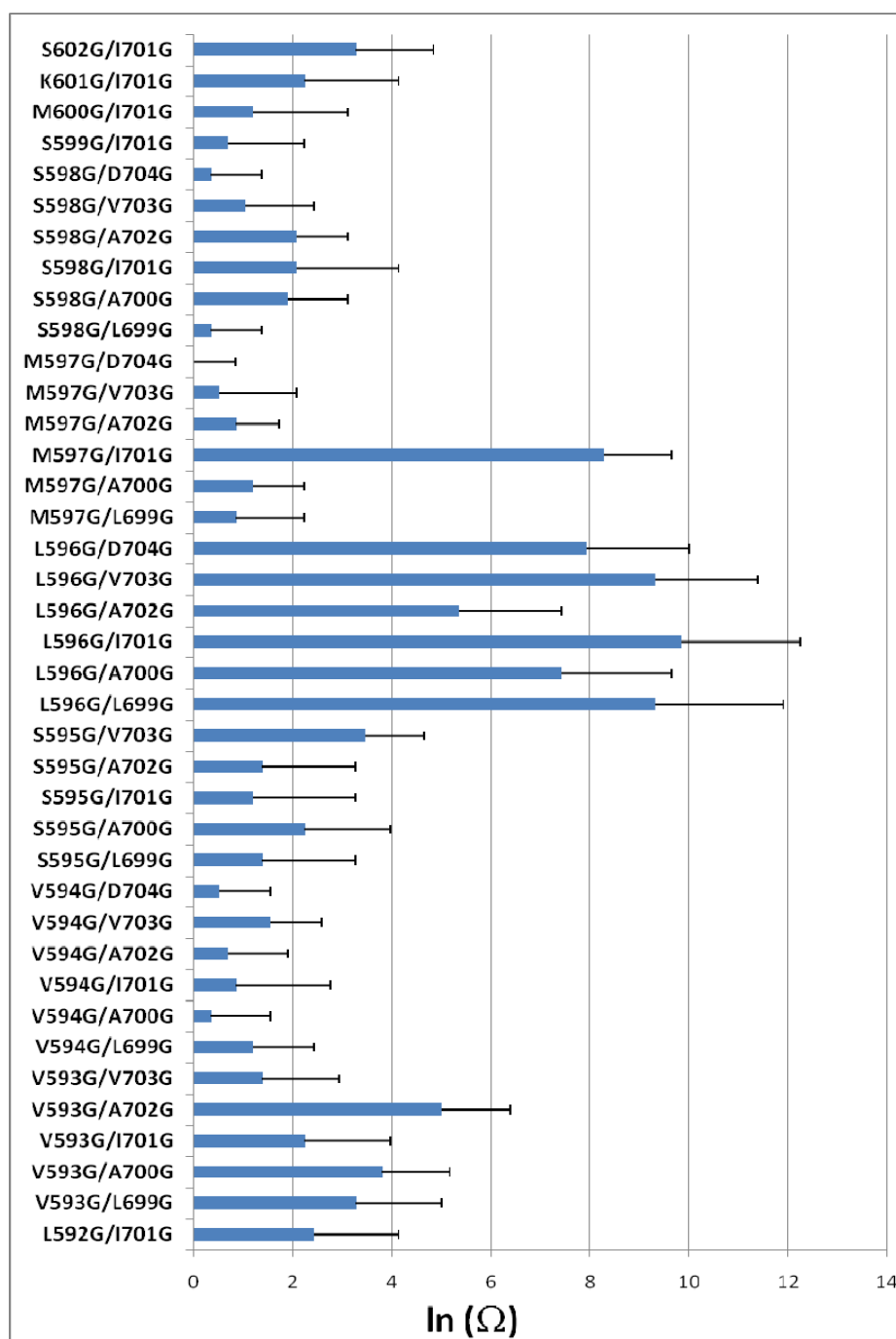
## 4.2. Analyse cyclique de doubles mutations

L'analyse cyclique de doubles mutations (« Double Mutant Cycle Analysis ») permet de caractériser le couplage entre deux résidus lors d'un changement de conformation (voir section 2.5 pour la théorie). Le coefficient de couplage  $\Omega$ , calculé par l'équation (16), a une valeur près de 1 lorsque le couplage est faible (Horovitz 1996). À l'inverse, une valeur du coefficient  $\Omega$  éloignée de 1 signifie un fort couplage entre les résidus étudiés. Puisque l'information contenue dans ce coefficient ne réside pas dans sa valeur numérique mais bien dans le rapport entre le numérateur et le dénominateur de l'équation (16), la valeur présentée est  $|\ln(\Omega)|$ , de manière à faciliter l'interprétation des résultats. Dans ce cas, une absence de couplage est représentée par une valeur nulle de  $|\ln(\Omega)|$  alors qu'une valeur différente de 0 représente un couplage entre les résidus.

#### 4.2.1. Les régions IIS4-S5 et IIS6 semblent couplées lors de l'activation de $Ca_v2.3$ .

L'analyse cyclique de mutations doubles a été effectuée en couplant les valeurs de  $\Delta G$  obtenues après mutation de la boucle S4-S5 avec les valeurs de  $\Delta G$  obtenues après mutations de l'hélice S6. La figure 28 montre les résultats obtenus pour toutes les combinaisons testées. Puisque l'ouverture du pore est vraisemblablement un processus global, où toute la protéine bouge, il est attendu que toutes les paires de mutations testées soient légèrement couplées. De plus, les importantes variations des paramètres biophysiques observés dans les mutations simples de ces deux régions semblent indiquer que celles-ci constituent des points très sensibles dans la protéine. Il n'est donc pas surprenant encore une fois d'observer un coefficient de couplage non nul dans la majorité des paires de mutations. Finalement, mentionnons que le coefficient de couplage est une fonction de quatre valeurs expérimentales. Cette complexité induit une incertitude finale relativement élevée, avec une erreur moyenne sur la valeur  $|\ln(\Omega)|$  de 1.5. Puisque, dans une distribution gaussienne, un écart du double de l'erreur moyenne correspond à un niveau de confiance de 90%, les couplages observés seront considérés significatifs s'ils dépassent de double de l'erreur moyenne sur  $|\ln(\Omega)|$ , soit une valeur de 3.

La figure 28 montre un couplage évident entre les deux régions étudiées. Effectivement, on y voit tout d'abord que le résidu L596 de la région IIS4-S5 semble être fortement couplé avec la région comprise entre les résidus L699 à D704. Qui plus est, le résidu V593 montre aussi un couplage avec cette région, malgré que celui-ci soit plus faible que pour L596. Plus précisément, les paires V593G/L699G, V593G/A700G, V593G/A702G, S595G/V703G, L596G/L699G, L596G/A700G, L596G/I701G, L596G/A702G, L596G/V703G, L596G/D704G, M597G/I701G, et S602G/I701G montrent une valeur de  $|\ln(\Omega)| > 3$ . Ces couples font majoritairement partie des régions qui sont à proximité atomiques dans la modélisation par homologie (figure 27).



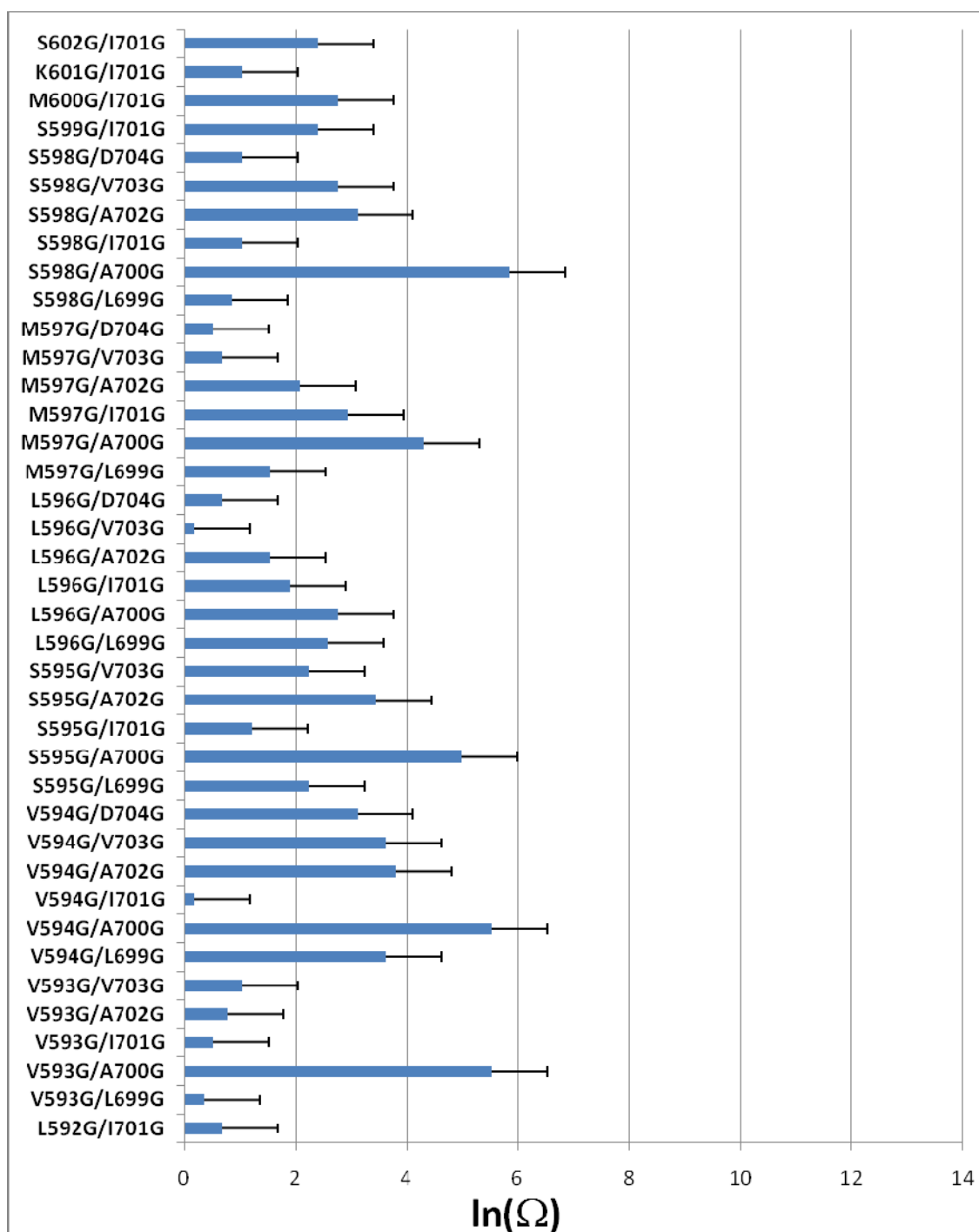
**Figure 28 : Coefficients de couplage d'activation des mutations doubles entre les régions IIS4-S5 et IIS6 de  $Ca_v2.3$ .** Les coefficients de couplage  $\Omega$  sont calculés selon l'équation (16). Une valeur nulle de  $|\ln(\Omega)|$  indique une absence de couplage. Toutes les expériences ont été effectuées en présence des sous-unités auxiliaires  $Ca_v\alpha2\delta$  et  $Ca_v\beta3$  dans une solution de 10mM  $Ba^{2+}$ . L'erreur présentée correspond à l'erreur absolue telle que calculée à la section 2.5.

On se serait toutefois attendu à une certaine périodicité hélicoïdale de sorte que les résidus de la boucle IIS4-S5 couplés à ceux de l'hélice IIS6 soient présents sur la même face de l'hélice, ce qui n'est pas tout à fait le cas. En effet, bien que les résidus de la boucle S4-S5 montrent un patron hélicoïdal, il n'en est pas ainsi pour la région S6. Tout de même, ces résultats semblent indiquer sans équivoque que les régions IIS4-S5 et IIS6 sont couplées au moins mécaniquement, sinon physiquement, lors de l'activation. De plus, ces valeurs rejoignent les valeurs observées dans plusieurs études du même types sur les canaux potassiques (Ranganathan et al. 1996), calciques (Kudrnac et al. 2009) et CNG (Kusch et al. 2010)

#### 4.2.2. Les régions IIS4-S5 et IIS6 sont moins fortement couplées lors de l'inactivation

Bien que la figure 28 suggère un couplage fonctionnel entre certains résidus des régions IIS4-S5 et IIS6, rien n'indique, à ce point, que ce couplage soit spécifique à l'activation de la protéine. Puisque dans  $Ca_v2.3$ , l'inactivation n'est pas toujours couplée à l'activation (figure 6), une série de mutations qui affecte spécifiquement l'activation du canal pourrait montrer peu ou pas de couplage lors d'une analyse des propriétés d'inactivation. Pour tester cette hypothèse, le même type d'analyse a été effectué sur les propriétés de d'inactivation de  $Ca_v2.3$ . L'énergie d'inactivation de la protéine peut être calculée à partir de l'équation (13). Il est donc possible de calculer un coefficient de couplage pour l'inactivation, nommé  $\Omega_{inact}$ , à l'aide de l'équation (16) en y insérant les énergies d'inactivation. Cette valeur a été calculée pour chaque couple de mutations présenté à la figure 28. Encore une fois, deux résidus seront considérés comme couplés si  $|\ln(\Omega_{inact})| > 3$ . La figure 29 montre les coefficients de couplage lors de l'inactivation pour tous les couples de mutations testés.

La figure 29 montre que les mutations sur les régions IIS4-S5 et IIS6 ont beaucoup moins d'effet sur l'inactivation de  $Ca_v2.3$  que sur son activation. En effet, on y remarque que, bien que certaines paires de mutations montrent un couplage significatif, les valeurs observées sont plus faibles que dans le cas de l'activation. L'inactivation de  $Ca_v2.3$  peut se faire à partir de l'état ouvert comme tous les canaux  $Ca_v$  mais aussi à partir de l'état fermé (figure 6). Ces deux mécanismes sont donc parfois découplés, à savoir qu'un changement sur le mécanisme d'activation peut ne pas avoir d'effet sur l'inactivation. Selon les résultats obtenus, il semblerait que les résidus des deux régions étudiées interviennent dans le passage de l'état ouvert à l'état inactivé. On note aussi que les valeurs les plus élevées de  $|\ln(\Omega_{inact})|$  pour l'inactivation sont centrées autour de A700.

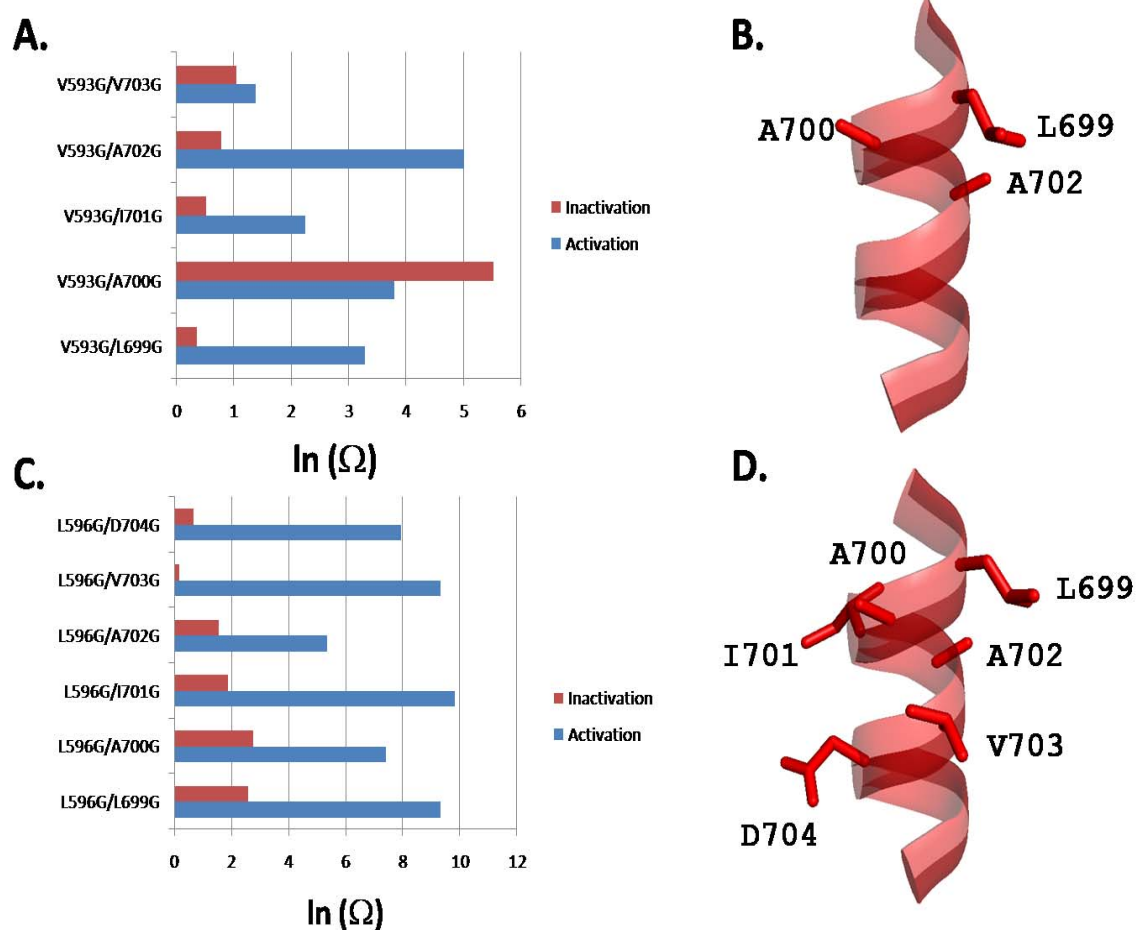


**Figure 29 : Coefficients de couplage d'inactivation des mutations doubles entre les régions IIS4-S5 et IIS6 de  $Ca_v2.3$ .** Les coefficients de couplage sont calculés selon l'équation (16). Une valeur nulle de  $|\ln(\Omega)|$  indique une absence de couplage. Toutes les expériences ont été effectuées en présence des sous-unités auxiliaires  $Ca_v\alpha2\delta$  et  $Ca_v\beta3$  dans une solution de 10mM  $Ba^{2+}$ . L'erreur présentée correspond à l'erreur absolue telle que calculée à la section 2.5.

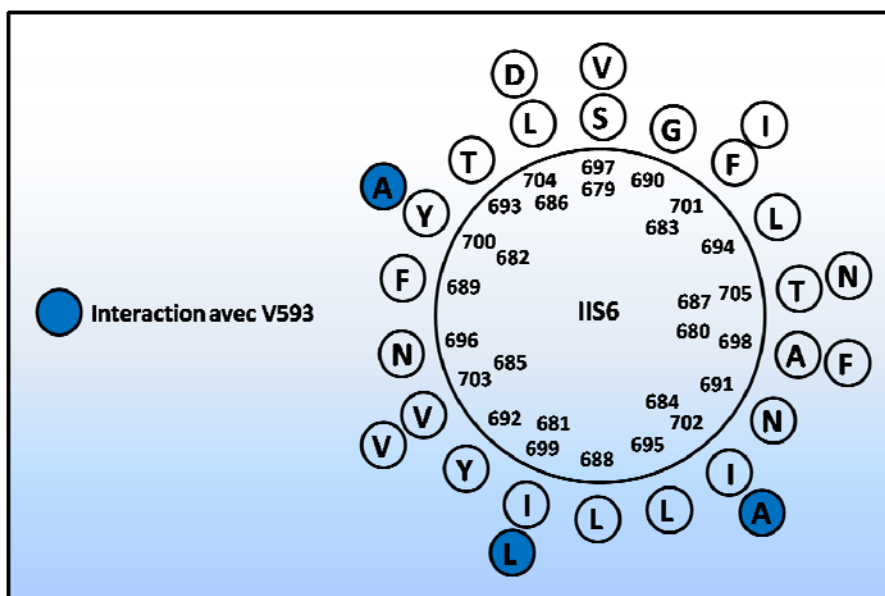
### **4.2.3. Les résidus V593 et L596 sont fortement couplés à l'hélice IIS6 lors de l'activation de Ca<sub>v</sub>2.3.**

Tel que montré à la section 4.2.1, les positions 593 et 596 présentent les coefficients de couplage les plus élevés dans l'hélice S4-S5. En effet, comme le suggère la figure 30, le résidu V593 serait couplé avec les résidus L699, A700, et A702 de l'hélice S6. De son côté, le résidu L596 semble être couplé avec tous les résidus de l'hélice S6 entre L699 et D704. Ce résultat confirme le rôle important présumé pour la boucle intracellulaire S4-S5 lors de l'activation de la protéine, mais amène un questionnement sur la nature du couplage qui relie le mouvement de l'hélice S4-S5 et le mouvement présumé de S6. En effet, la structure cristalline de Kv1.2 montre que cette région a la forme d'une hélice  $\alpha$ . Or, si un modèle de couplage purement mécanique s'applique, les résidus interagissant avec la boucle S4-S5 devraient être espacés de 2 à 3 positions, majoritairement 3, puisque, dans une hélice  $\alpha$ , les acides aminés dont la chaîne latérale projette dans la même direction sont généralement séparés par 3 résidus. Ce n'est cependant pas le cas pour les interactions observées avec les résidus V593 et L596 (voir figure 30). En effet, en observant les résidus interagissant avec V593, on remarque que bien que les résidus L699 et A702 pourraient projeter leurs chaînes latérales dans la même direction, la chaîne latérale de A700 projetterait à l'opposé de l'hélice. La figure 31 montre donc qu'en assumant que la région IIS4-S5 prend la forme d'une hélice comme dans les canaux Kv, les résidus L699, A700 et A702, qui semblent tous interagir avec I701, ne peuvent pas tous projeter vers l'hélice S6 dans une conformation donnée. La situation est d'autant plus complexe pour le résidu L596. En effet, comme le montre la figure 32, les résidus de l'hélice S6 qui montrent une interaction avec cette leucine sont situés de tous les côtés de l'hélice.

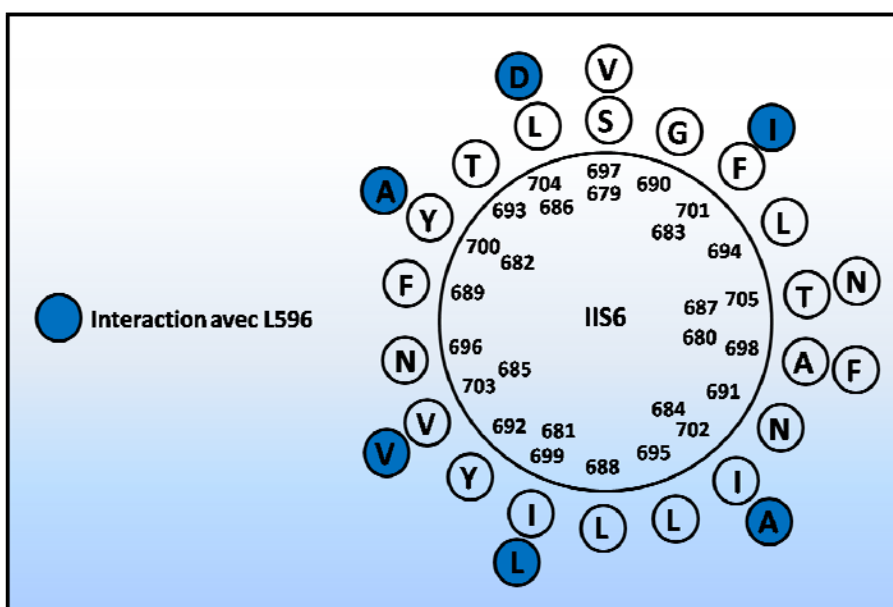




**Figure 30 : Coefficients de couplage d'activation des mutations doubles entre la région IIS6 et les résidus V593 et L596 de  $Ca_v2.3$ .** (A) et (C). Les coefficients de couplage sont calculés selon l'équation (16). Une valeur nulle de  $|\ln(\Omega)|$  indique une absence de couplage. Toutes les expériences ont été effectuées en présence des sous-unités auxiliaires  $Ca_v\alpha2\delta$  et  $Ca_v\beta3$  dans une solution de 10mM  $Ba^{2+}$ . (B) et (D). Modélisation de l'hélice IIS6 à l'aide de Modeller 9v2 (alignement présenté à la figure 14). Les résidus L699, A700 et A702 montrent un couplage avec V593 (panneau B). Les résidus L699 à D704 montrent un couplage avec L596 (panneau D)



**Figure 31 : Vue supérieure du couplage du résidu V593 avec le segment IIS6 en projection hélicoïdale.** La vue supérieure de l'hélice IIS6 montre les résidus de ce segment en assumant une conformation en hélice  $\alpha$ . Les résidus affichant un coefficient de couplage significatif avec le résidu V593 de IIS4-S5 sont en bleu. Bien que les résidus L699 et A702 semblent être du même côté de l'hélice, le résidu A700 est à l'opposé.



**Figure 32 : Vue supérieure du segment IIS6 en projection hélicoïdale.** La vue supérieure de l'hélice IIS6 montre les résidus de ce segment en assumant une conformation en hélice  $\alpha$ . Les résidus affichant un coefficient de couplage significatif avec le résidu L596 de IIS4-S5 sont en bleu.

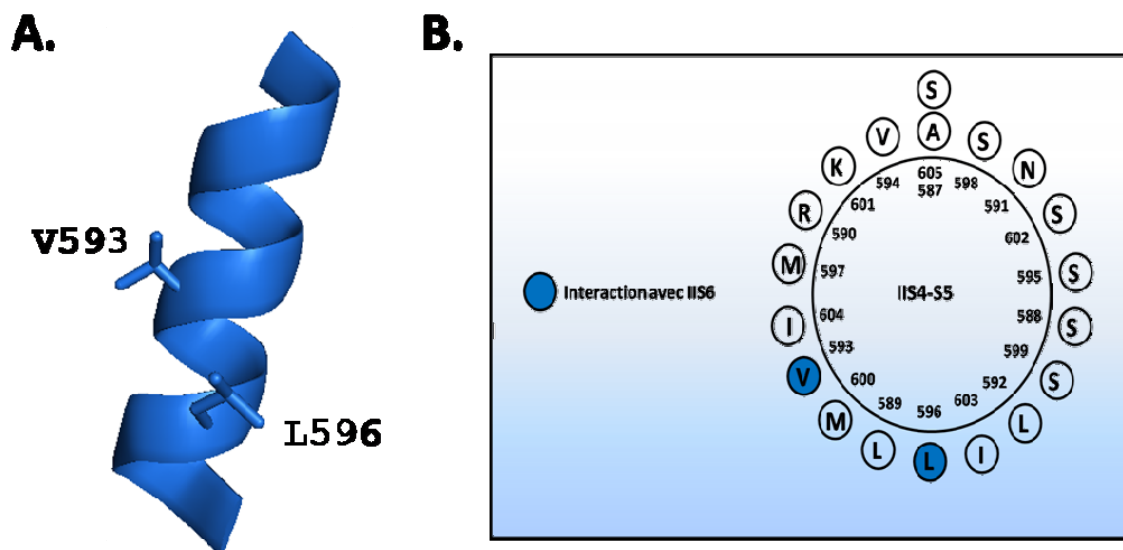
Cette différence pourrait être expliquée de plusieurs façons. Tout d'abord, il est hautement probable que le couplage observé ne soit pas purement mécanique, mais bien fonctionnel. Dans un tel cas, les chaînes latérales n'auraient pas nécessairement à se toucher pour être couplées dans notre analyse. Cette explication est sans doute la plus probable, étant donné que les données observées sont à l'échelle macroscopique. Aussi, une solution triviale pourrait être que la région IIS6 de Ca<sub>v</sub>2.3 n'adopte pas une conformation hélicoïdale, ce qui expliquerait que les chaînes latérales de plusieurs acides aminés successifs projettent vers l'hélice IIS4-S5. Cette hypothèse a été testée en soumettant la séquence de la boucle IIS6 au serveur « PredictProtein » (<http://www.predictprotein.org>) qui permet de prédire, en fonction de la séquence soumise, la structure secondaire à partir de la séquence primaire (Rost et al. 1993; Rost et al. 1996). Or, le résultat prédit à 84.21% une structure en hélice  $\alpha$ . Étant donné cette prédiction et le fait que la structure cristalline de Kv1.2 montre clairement que cette région a une structure hélicoïdale, cette première hypothèse ne semble pas expliquer les résultats obtenus. Il est cependant à noter que les résidus L699 à A702, qui montrent le plus fort degré de couplage, sont alignés avec le motif PVPIV de Kv1.2. Or, la structure cristalline de Kv1.2 montre que l'hélice S6 se plie à cet endroit. Il serait donc possible que cette région du segment S6 ne respecte pas tout à fait une structure hélicoïdale, ce qui expliquerait nos résultats. De plus, il faut considérer le fait que les acides aminés de la protéine sauvage ont été remplacés par des glycines pour effectuer l'analyse cyclique de double mutations. Ces substitutions pourraient aussi déstabiliser la structure secondaire prédite, ce qui expliquerait les résultats obtenus.

Les résultats présentés à la figure 30 pourraient aussi être expliqués en introduisant un mouvement de rotation d'une des deux régions pendant le passage de l'état fermé à l'état ouvert. En effet, bien que les résidus couplés selon les résultats présentés ne projettent pas tous les uns vers les autres dans les conformations fermées et ouvertes de la protéine, il serait possible que,

pendant le changement de conformation de la protéine, ceux-ci viennent en contact. Le modèle cinétique présenté à la figure 6 est un modèle minimal, qui ne présente que quatre états conformationnels de la protéine. Or, un changement de conformation fait généralement intervenir plusieurs états intermédiaires entre les états discernables dans nos expériences. Il serait donc possible que, pendant le passage de l'état fermé initial à l'état ouvert final, un mouvement de rotation d'une des hélices ait pour cause que les couples de résidus qui interagissent selon les résultats présentés projettent leurs chaînes latérales dans le même axe dans des états intermédiaires différents. Puisque les résultats expérimentaux reflètent la résultante de ces transitions intermédiaires, le résultat final ne respecterait pas le phénotype attendu dans le cas d'une hélice  $\alpha$ .

#### **4.2.4. La boucle IIS4-S5 montre un patron de couplage hélicoïdal avec l'hélice IIS6 lors de l'activation de $Ca_v2.3$ .**

Bien que le patron de couplage présent dans l'hélice IIS6 ne montre pas de structure hélicoïdale, la situation semble différente pour la boucle IIS4-S5. En effet, tel que montré à la figure 32, les résidus V593 et L596 semblent couplés avec les résidus de la région IIS6. Ce résultat, qui indique un couplage entre les régions IIS4-S5 et S6, semble encore une fois démontrer que la boucle IIS4-S5 participe à l'activation de  $Ca_v2.3$ . Ceci dit, contrairement aux observations faites du côté de la région IIS6, les résultats obtenus pour la boucle S4-S5 sont compatibles avec une structure hélicoïdale. En effet, tel que montré à la figure 32, en assumant une forme hélicoïdale de la boucle IIS4-S5, les résidus V593 et L596 projettent du même côté de l'hélice, et pourraient donc être exposés à l'hélice IIS6, tel qu'il en est le cas dans la structure cristalline du canal potassique Kv1.2 (Long et al. 2005b).



**Figure 33 : Structure hélicoïdale des résidus de la boucle IIS4-S5 couplés avec la région IIS6.** (A). Modélisation de l'hélice IIS4-S5 à l'aide de Modeller 9v2 (alignement présenté à la figure 20). Les résidus V593 et L596 montrent un couplage avec l'hélice IIS6. (B). La vue de haut montre les résidus du segment IIS4-S5 en assumant une conformation en hélice  $\alpha$ . Les résidus affichant un coefficient de couplage significatif avec la région IIS4-S5 sont en bleu. Ces résidus semblent être positionnés du même de l'hélice.

## 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le projet présenté avait pour but de caractériser les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'activation de  $Ca_v2.3$ . D'après la structure cristalline de  $Kv1.2$ , dans les canaux potassiques  $Kv$  le mouvement du senseur au voltage S4 est relié au déplacement de l'hélice S6 et donc à l'ouverture du pore par l'entremise de la boucle intracellulaire S4-S5 qui déplace mécaniquement l'hélice S6 (Long et al. 2005b) dans un mécanisme nommé couplage électromécanique par l'équipe de MacKinnon. Tout comme leurs homologues potassiques, les canaux calciques  $Ca_v$  contiennent quatre hélices S4 qui présentent un motif d'acides aminés chargés positivement qui agissent comme senseur de voltage. Ces canaux sont aussi semblables aux canaux  $Kv$  par la région qui forme le pore. Par homologie avec les canaux potassiques, il a été proposé que l'hélice S6 agisse comme porte d'activation pour permettre ou inhiber le passage des ions. Les données recueillies par notre laboratoire appuient cette hypothèse. Cependant, en absence de structure cristalline, le lien entre le mouvement de l'hélice S4 et l'ouverture du pore par l'hélice S6 n'a pas encore été identifié dans les canaux  $Ca_v$ . Pour tenter de résoudre ce problème, et par analogie avec les autres canaux membres de la famille des canaux ioniques à 6 segments transmembranaires, il a été proposé que la boucle intracellulaire S4-S5 occupe ce rôle, tel qu'observé dans les canaux  $Kv$ .

Pour tester cette hypothèse, une série de mutations simples en glycine a été effectuée dans la boucle IIS4-S5 et l'hélice IIS6 de  $Ca_v2.3$ . L'impact de ces mutations sur les propriétés biophysiques du canal a permis de mettre en évidence l'importance de ces régions dans l'activation de  $Ca_v2.3$ . En effet, certaines mutations ponctuelles (1 / 2312 acides aminés) en glycine dans ces deux régions ont causé d'importantes modulations des propriétés d'activation ( $> 20$  mV). Citons comme exemples la mutation L596G dans la boucle IIS4-S5 qui présente un potentiel de mi-activation  $-53 \pm 1$  mV (6) et la mutation I701G dans l'hélice IIS6 qui présente un potentiel de mi-activation de  $-45 \pm 2$  mV (24), des déplacements de l'ordre de  $-40$  mV par rapport au canal de type sauvage.

Ces observations indiquent clairement l'importance de ces régions dans l'activation de  $Ca_v2.3$ .

Bien que les résultats obtenus avec les mutations simples en glycine suggèrent un rôle de la boucle IIS4-S5 dans l'activation de la protéine, ceux-ci ne permettraient pas de déterminer si cette boucle interagit avec l'hélice IIS6 pendant l'ouverture du canal. Pour répondre à cette question, une série de mutations doubles, contenant une première mutation en glycine dans la boucle IIS4-S5 et une seconde dans l'hélice IIS6, a été produite et testée. Ces mutations ont été analysées selon la méthode d'analyse cyclique de mutations doubles. Cette méthode d'analyse introduit un coefficient de couplage  $\Omega$ , calculé par l'équation 16, qui caractérise le niveau d'interaction entre deux résidus lors d'un changement de conformation. Ce coefficient a été calculé pour toutes les mutations doubles. Cette étude a permis d'identifier de nombreuses paires de résidus qui seraient couplés lors de l'activation. En effet, les paires de résidus V593G/L699G, V593G/A700G, V593G/A702G, S595G/V703G L596G/L699G, L596G/A700G, L596G/I701G, L596G/A702G, L596G/V703G, L596G/D704G, M597G/I701G, et S602G/I701G ont affiché un coefficient de couplage significatif calculés à partir des énergies d'activation, indiquant qu'ils seraient couplés lors de l'activation du canal.

Afin de vérifier si ce couplage est spécifique au mécanisme d'activation, les coefficients de couplage ont été calculés à partir des énergies d'inactivation. Tel qu'il est montré à la figure 29, certaines paires de résidu présentent un couplage significatif pour le mécanisme d'inactivation, bien que la majorité des paires identifiées pour l'activation ne montrent pas de couplage durant l'inactivation. Ce résultat concorde avec les observations faites selon lesquelles  $Ca_v2.3$  peut s'inactiver à partir des états fermé et ouvert (Patil et al. 1998), signifiant un couplage partiel entre l'activation et l'inactivation.

La prédiction des paires de résidus qui seraient couplés ne correspond pas la nature  $\alpha$ -hélicoïdale prédite pour la région IIS6 dans  $Ca_v2.3$ . En effet, la boucle IIS6 semble, selon l'algorithme utilisé par *PredictProtein*, adopter la

forme d'une hélice  $\alpha$ . Cette hypothèse est renforcée par la structure cristalline de Kv1.2 dans laquelle le segment S6 est clairement hélicoïdal. Or, les effets observés dans les mutations doubles contenant V593 ou L596 montrent que ces résidus seraient couplés avec des résidus qui ne seraient pas tous positionnés du même côté de l'hélice IIS6 (figure 31-32). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette observation. Tout d'abord, l'analyse cyclique de mutations doubles n'indique pas si le couplage est de nature physique ou électrique. Il serait donc possible, si le couplage entre deux résidus n'est pas purement physique, que ceux-ci projettent leurs chaînes latérales dans deux directions différentes. De plus, la structure hélicoïdale de l'hélice S6 de Kv1.2 est cassée au motif PVPVIV qui est aligné avec la région étudiée de Cav2.3. Cette perturbation possible de la structure secondaire pourrait être aussi présente dans Cav2.3 et expliquer nos observations. Cependant, le modèle moléculaire de l'hélice S6 obtenu par homologie avec Kv1.2 ne prédit pas de cassure dans Cav2.3. De plus, nous avons effectué cette étude en mutant les résidus concernés en glycine. Ce changement de chaîne latérale pourrait aussi perturber la structure secondaire de la protéine, expliquant ainsi les résultats obtenus dans l'hélice IIS6. Finalement, ces observations pourraient être expliquées par l'existence d'états intermédiaires pendant la transition C – O parmi lesquels le segment S4-S5 effectue une rotation, ce qui aurait comme résultat global une exposition de toutes les faces de l'hélice au segment IIS6. Cette hypothèse n'a cependant pas été vérifiée à ce jour et un couplage entre les deux régions qui ne serait pas purement physique demeure nettement plus probable.

Malgré tout, les résultats obtenus montrent clairement que les variations d'énergies d'activation, par rapport à la protéine de type sauvage, des mutations doubles mentionnées plus hauts sont significativement différentes de la somme des variations d'énergies d'activation des mutations simples correspondantes. Cette absence d'additivité de l'énergie d'activation est généralement interprétée comme étant le signe d'un couplage fort entre les



deux résidus étudiés. Ces valeurs se traduisent aussi en une série de coefficients de couplage de valeur  $\ln(\Omega) > 3$  qui suggèrent fortement un couplage entre ces résidus. Nous concluons donc, suite à l'étude effectuée sur le domaine II, que les segments IIS4-S5 et IIS6 sont couplés lors de l'activation de  $Ca_v2.3$ , tel qu'il en est le cas lors de l'activation des canaux potassiques de type Kv.

Bien que le couplage entre IIS4-S5 et S6 soit fortement suggéré par nos observations, celles-ci ne parviennent pas à caractériser exhaustivement l'interaction entre ces deux régions. Il sera nécessaire de faire appel à un plus grand éventail de techniques expérimentales dans le but d'identifier les déterminants moléculaires de l'interaction entre ces deux régions. En effet, bien que les mesures effectuées en électrophysiologie par la technique de voltage imposé à deux électrodes ont permis de mettre de l'avant le couplage entre ces deux segments, cette approche n'a pas permis d'identifier avec précision le rôle de chaque résidu impliqué dans cette interaction.

Il est aussi important de mentionner que notre étude n'a été effectuée que sur le domaine II de  $Ca_v2.3$ . Les résidus K212, S213, I214 (domaine I), D1279, C1280, V1281 (domaine III) et W1597, T1598, F1599 (domaine IV) sont alignés avec les résidus V594 à L596 du domaine II. Ces résidus seront couplés avec les résidus V349 (domaine I), L1420 (domaine III), A1719 et V1720 (domaine IV) qui ont été caractérisés en 2007 par notre laboratoire et qui présentent tous une variation significative du potentiel d'activation (Raybaud et al. 2007). Bien que l'observation des effets les plus importants dans le domaine II indique que celui-ci joue probablement le plus grand rôle dans l'ouverture du canal, il sera nécessaire de caractériser cette interaction dans les autres domaines de  $Ca_v2.3$  afin de pouvoir proposer un modèle d'activation global pour ce canal.

La proximité atomique de ces deux segments pourrait aussi être étudiée par la formation de ponts disulfures entre ceux-ci. En effet, bien que nos observations suggèrent fortement un couplage entre ces régions, rien n'indique que celles-ci sont à proximité atomique. En effet, il serait possible que ces

deux régions soient couplées sans nécessairement être près l'une de l'autre, tel le senseur au voltage en S4 et l'hélice S6. Pour déterminer la proximité atomique, il serait possible d'insérer des cystéines dans les deux hélices. Si celles-ci sont à proximité, un pont disulfure devrait se former entre les deux cystéines et celui-ci devrait modifier la fonction observée en électrophysiologie. Bien que cette technique ait été abondamment utilisée pour étudier le couplage électromécanique chez les canaux potassiques, la situation n'est pas aussi simple lorsqu'il s'agit des canaux  $Ca_v$ . En effet, puisque les canaux potassiques sont des homotétramères, les cystéines insérées en S4-S5 et en S6 sont présentes dans les quatre domaines de la protéine. Si ces cystéines réagissent ensemble, le mouvement des quatre hélices S6 est alors perturbé. Les canaux  $Ca_v$  sont, de leur côté, composés de quatre domaines différents. L'insertion d'une paire de cystéine dans un des domaines aura alors un effet beaucoup moins important que dans les canaux potassiques. Tout d'abord, il est possible que les domaines interagissent entre eux, de manière qu'une paire de cystéine dans le même domaine ne bloquerait pas nécessairement le mouvement d'une hélice S6. En effet, même si un pont disulfure réussit à bloquer une de ces hélices, il n'en reste pas moins que les trois autres domaines pourront encore s'ouvrir. Il se pourrait donc que le canal arrive tout de même à s'ouvrir, si l'ouverture n'est pas concertée. De plus, il faut tenir compte du fait que  $Ca_v2.3$  contient de nombreuses cystéines endogènes. Il serait donc difficile d'éliminer la possibilité que les cystéines insérées forment des liens avec les cystéines déjà présentes dans la protéine. Des tentatives de ce genre pour  $Ca_v1.2$  n'ont pas donné les résultats escomptés.

Il serait intéressant, dans un premier temps, de refaire cette étude en étudiant cette fois le courant de « gating ». En effet, cette mesure serait plus précise que la valeur de  $E_{0.5,act}$  obtenue à partir du lissage de la courbe IV globale. Des mesures préliminaires ont été effectuées sur le canal sauvage et la mutation I701G. Celles-ci montrent un décalage de la charge  $Q/Q_{max}$  de l'ordre de -20 mV par rapport au canal sauvage. Cette technique permettra de caractériser

avec plus de précisions les effets des diverses mutations sur l'énergie d'activation de la protéine.

## 6. BIBLIOGRAPHIE

- Arikkath, J. and K. P. Campbell (2003).** Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13(3): 298-307.
- Armstrong, C. M. (1966).** Time course of TEA(+)-induced anomalous rectification in squid giant axons. *J Gen Physiol* 50(2): 491-503.
- Armstrong, C. M. and F. Bezanilla (1977).** Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* 70(5): 567-590.
- Barhanin, J., T. Coppola, A. Schmid, M. Borsotto and M. Lazdunski (1987).** The calcium channel antagonists receptor from rabbit skeletal muscle. Reconstitution after purification and subunit characterization. *Eur J Biochem* 164(3): 525-531.
- Barrett, C. F. and R. W. Tsien (2008).** The Timothy syndrome mutation differentially affects voltage- and calcium-dependent inactivation of CaV1.2 L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6): 2157-2162.
- Beam, K. G., C. M. Knudson and J. A. Powell (1986).** A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells. *Nature* 320(6058): 168-170.
- Bernatchez, G., L. Berrou, Z. Benakezouh, J. Ducay and L. Parent (2001).** Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the Ca(V)2.3 channel. *Biochim Biophys Acta* 1514(2): 217-229.
- Berridge, M. J. (1997).** Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* 200(Pt 2): 315-319.
- Berrou, L., H. Klein, G. Bernatchez and L. Parent (2002).** A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in Ca(V)2.3 calcium channels. *Biophys J* 83(3): 1429-1442.
- Bezanilla, F. (2000).** The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 80(2): 555-592.
- Bezanilla, F. (2002).** Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 120(4): 465-473.

- Bezanilla, F. (2005).** Voltage-gated ion channels. *IEEE Trans Nanobioscience* 4(1): 34-48.
- Bezanilla, F. and C. M. Armstrong (1977).** Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol* 70(5): 549-566.
- Bezanilla, F. and E. Stefani (1998).** Gating Currents. *Methods Enzymol* 293: 331-352.
- Bichet, D., V. Cornet, S. Geib, E. Carlier, S. Volsen, T. Hoshi, Y. Mori and M. De Waard (2000).** The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25(1): 177-190.
- Borsotto, M., J. Barhanin, R. I. Norman and M. Lazdunski (1984).** Purification of the dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel from skeletal muscle transverse tubules using (+) [3H]PN 200-110. *Biochem Biophys Res Commun* 122(3): 1357-1366.
- Bourinet, E., T. W. Soong, K. Sutton, S. Slaymaker, E. Mathews, A. Monteil, G. W. Zamponi, J. Nargeot and T. P. Snutch (1999).** Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 2(5): 407-415.
- Brice, N. L., N. S. Berrow, V. Campbell, K. M. Page, K. Brickley, I. Tedder and A. C. Dolphin (1997).** Importance of the different beta subunits in the membrane expression of the alpha1A and alpha2 calcium channel subunits: studies using a depolarization-sensitive alpha1A antibody. *Eur J Neurosci* 9(4): 749-759.
- Carbone, E. and H. D. Lux (1984a).** A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys J* 46(3): 413-418.
- Carbone, E. and H. D. Lux (1984b).** A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310(5977): 501-502.
- Catterall, W. A. (1986).** Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem* 55: 953-985.
- Catterall, W. A. (1996).** Molecular properties of sodium and calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 28(3): 219-230.

- Catterall, W. A., J. Striessnig, T. P. Snutch and E. Perez-Reyes (2003).** International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* 55(4): 579-581.
- Chen, L. Q., V. Santarelli, R. Horn and R. G. Kallen (1996).** A unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels. *J Gen Physiol* 108(6): 549-556.
- Chien, A. J., K. M. Carr, R. E. Shirokov, E. Rios and M. M. Hosey (1996).** Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel beta2a subunit and effects on channel function. *J Biol Chem* 271(43): 26465-26468.
- Choi, K. L., C. Mossman, J. Aube and G. Yellen (1993).** The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron* 10(3): 533-541.
- Clapham, D. E. (2003).** TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426(6966): 517-524.
- Dafi, O., L. Berrou, Y. Dodier, A. Raybaud, R. Sauve and L. Parent (2004).** Negatively charged residues in the N-terminal of the AID helix confer slow voltage dependent inactivation gating to CaV1.2. *Biophys J* 87(5): 3181-3192.
- de Leon, M., Y. Wang, L. Jones, E. Perez-Reyes, X. Wei, T. W. Soong, T. P. Snutch and D. T. Yue (1995).** Essential Ca(2+)-binding motif for Ca(2+)-sensitive inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 270(5241): 1502-1506.
- del Camino, D., M. Holmgren, Y. Liu and G. Yellen (2000).** Blocker protection in the pore of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel and its structural implications. *Nature* 403(6767): 321-325.
- Ding, S. and R. Horn (2002).** Tail end of the s6 segment: role in permeation in shaker potassium channels. *J Gen Physiol* 120(1): 87-97.
- Ding, S. and R. Horn (2003).** Effect of S6 tail mutations on charge movement in Shaker potassium channels. *Biophys J* 84(1): 295-305.
- Dolmetsch, R. (2003).** Excitation-transcription coupling: signaling by ion channels to the nucleus. *Sci STKE* 2003(166): PE4.

- Dong, Z., P. Saikumar, J. M. Weinberg and M. A. Venkatachalam (2006).** Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol* 1: 405-434.
- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon (1998).** The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280(5360): 69-77.
- Ertel, E. A., K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien and W. A. Catterall (2000).** Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25(3): 533-535.
- Eswar, N., B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Y. Shen, U. Pieper and A. Sali (2007).** Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 2: Unit 2 9*.
- Fatt, P. and B. L. Ginsborg (1958a).** The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. *J Physiol* 142(3): 516-543.
- Fatt, P. and B. L. Ginsborg (1958b).** The production of regenerative responses in crayfish muscle fibres by the action of calcium, strontium and barium. *J Physiol* 140(2): 59-60P.
- Favre, I., E. Moczydlowski and L. Schild (1996).** On the structural basis for ionic selectivity among Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> in the voltage-gated sodium channel. *Biophys J* 71(6): 3110-3125.
- Fiser, A., R. K. Do and A. Sali (2000).** Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci* 9(9): 1753-1773.
- Frazier, C. J., J. R. Serrano, E. G. George, X. Yu, A. Viswanathan, E. Perez-Reyes and S. W. Jones (2001).** Gating kinetics of the alpha1I T-type calcium channel. *J Gen Physiol* 118(5): 457-470.
- Geib, S., G. Sandoz, V. Cornet, K. Mabrouk, O. Fund-Saunier, D. Bichet, M. Villaz, T. Hoshi, J. M. Sabatier and M. De Waard (2002).** The interaction between the I-II loop and the III-IV loop of Cav2.1 contributes to voltage-dependent inactivation in a beta<sup>-</sup>-dependent manner. *J Biol Chem* 277(12): 10003-10013.

- Gomez-Ospina, N., F. Tsuruta, O. Barreto-Chang, L. Hu and R. Dolmetsch (2006).** The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)<sub>1.2</sub> encodes a transcription factor. *Cell* 127(3): 591-606.
- Guy, H. R. and P. Seetharamulu (1986).** Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(2): 508-512.
- Hagiwara, S. and K. I. Naka (1964).** THE INITIATION OF SPIKE POTENTIAL IN BARNACLE MUSCLE FIBERS UNDER LOW INTRACELLULAR CA<sup>++</sup>. *J Gen Physiol* 48: 141-162.
- Hagiwara, S., S. Ozawa and O. Sand (1975).** Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 65(5): 617-644.
- Hamid, J., J. B. Peloquin, A. Monteil and G. W. Zamponi (2006).** Determinants of the differential gating properties of Cav3.1 and Cav3.3 T-type channels: a role of domain IV? *Neuroscience* 143(3): 717-728.
- Hansen, J. P., R. S. Chen, J. K. Larsen, P. J. Chu, D. M. Janes, K. E. Weis and P. M. Best (2004).** Calcium channel gamma6 subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current. *J Mol Cell Cardiol* 37(6): 1147-1158.
- Hatakeyama, S., M. Wakamori, M. Ino, N. Miyamoto, E. Takahashi, T. Yoshinaga, K. Sawada, K. Imoto, I. Tanaka, T. Yoshizawa, Y. Nishizawa, Y. Mori, T. Niidome and S. Shoji (2001).** Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha(1B) subunit of N-type Ca(2+) channels. *Neuroreport* 12(11): 2423-2427.
- Heinemann, S. H., H. Terlau, W. Stuhmer, K. Imoto and S. Numa (1992).** Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356(6368): 441-443.
- Hemara-Wahanui, A., S. Berjukow, C. I. Hope, P. K. Dearden, S. B. Wu, J. Wilson-Wheeler, D. M. Sharp, P. Lundon-Treweek, G. M. Clover, J. C. Hoda, J. Striessnig, R. Marksteiner, S. Hering and M. A. Maw (2005).** A CACNA1F mutation identified in an X-linked retinal disorder shifts the voltage dependence of Cav1.4 channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(21): 7553-7558.
- Hering, S., S. Beyl, A. Stary, M. Kudrnac, A. Hohaus, H. R. Guy and E. Timin (2008).** Pore stability and gating in voltage-activated calcium channels. *Channels (Austin)* 2(2).



- Hille, B. (2001).** Ion Channels of Excitable Membranes. Sunderland, MA.
- Hockerman, G. H., B. Z. Peterson, B. D. Johnson and W. A. Catterall (1997).** Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 361-396.
- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952).** A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117(4): 500-544.
- Hohaus, A., S. Beyl, M. Kudrnac, S. Berjukow, E. N. Timin, R. Marksteiner, M. A. Maw and S. Hering (2005).** Structural determinants of L-type channel activation in segment IIS6 revealed by a retinal disorder. *J Biol Chem* 280(46): 38471-38477.
- Holmgren, M., K. S. Shin and G. Yellen (1998).** The activation gate of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel can be trapped in the open state by an intersubunit metal bridge. *Neuron* 21(3): 617-621.
- Horovitz, A. (1996).** Double-mutant cycles: a powerful tool for analyzing protein structure and function. *Fold Des* 1(6): R121-126.
- Huber, I., E. Wappl, A. Herzog, J. Mitterdorfer, H. Glossmann, T. Langer and J. Striessnig (2000).** Conserved Ca<sup>2+</sup>-antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity dihydropyridine-binding domain. *Biochem J* 347 Pt 3: 829-836.
- Ino, M., T. Yoshinaga, M. Wakamori, N. Miyamoto, E. Takahashi, J. Sonoda, T. Kagaya, T. Oki, T. Nagasu, Y. Nishizawa, I. Tanaka, K. Imoto, S. Aizawa, S. Koch, A. Schwartz, T. Niidome, K. Sawada and Y. Mori (2001).** Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the alpha 1B subunit (Cav 2.2) of N-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9): 5323-5328.
- Islas, L. D. and F. J. Sigworth (1999).** Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels. *J Gen Physiol* 114(5): 723-742.
- Jarvis, S. E. and G. W. Zamponi (2001).** Interactions between presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex. *Trends Pharmacol Sci* 22(10): 519-525.

- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chait and R. MacKinnon (2002).** Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417(6888): 515-522.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait and R. MacKinnon (2003a).** X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423(6935): 33-41.
- Jiang, Y., V. Ruta, J. Chen, A. Lee and R. MacKinnon (2003b).** The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423(6935): 42-48.
- Jing, X., D. Q. Li, C. S. Olofsson, A. Salehi, V. V. Surve, J. Caballero, R. Ivarsson, I. Lundquist, A. Pereverzev, T. Schneider, P. Rorsman and E. Renstrom (2005).** CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest* 115(1): 146-154.
- Jun, K., E. S. Piedras-Renteria, S. M. Smith, D. B. Wheeler, S. B. Lee, T. G. Lee, H. Chin, M. E. Adams, R. H. Scheller, R. W. Tsien and H. S. Shin (1999).** Ablation of P/Q-type Ca(2<sup>+</sup>) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 15245-15250.
- Kaneko, S., C. B. Cooper, N. Nishioka, H. Yamasaki, A. Suzuki, S. E. Jarvis, A. Akaike, M. Satoh and G. W. Zamponi (2002).** Identification and characterization of novel human Ca(v)2.2 (alpha 1B) calcium channel variants lacking the synaptic protein interaction site. *J Neurosci* 22(1): 82-92.
- Klugbauer, N., E. Marais and F. Hofmann (2003).** Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr* 35(6): 639-647.
- Kostyuk, P. G. (1990).** Calcium channels in cellular membranes. *J Mol Neurosci* 2(3): 123-141.
- Kraus, R. L., M. J. Sinnegger, H. Glossmann, S. Hering and J. Striessnig (1998).** Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca<sup>2+</sup> channel kinetics. *J Biol Chem* 273(10): 5586-5590.
- Kraus, R. L., M. J. Sinnegger, A. Koschak, H. Glossmann, S. Stenirri, P. Carrera and J. Striessnig (2000).** Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca(2<sup>+</sup>) channel kinetics. *J Biol Chem* 275(13): 9239-9243.

- Kudrnac, M., S. Beyl, A. Hohaus, A. Stary, T. Peterbauer, E. Timin and S. Hering (2009).** Coupled and independent contributions of residues in IS6 and IIS6 to activation gating of CaV1.2. *J Biol Chem* 284(18): 12276-12284.
- Kukuljan, M., P. Labarca and R. Latorre (1995).** Molecular determinants of ion conduction and inactivation in K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol* 268(3 Pt 1): C535-556.
- Kuo, A., J. M. Gulbis, J. F. Antcliff, T. Rahman, E. D. Lowe, J. Zimmer, J. Cuthbertson, F. M. Ashcroft, T. Ezaki and D. A. Doyle (2003).** Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300(5627): 1922-1926.
- Kurejova, M., L. Lacinova, M. Pavlovicova, M. Eschbach and N. Klugbauer (2007).** The effect of the outermost basic residues in the S4 segments of the Ca(V)3.1 T-type calcium channel on channel gating. *Pflugers Arch* 455(3): 527-539.
- Kusch, J., T. Zimmer, J. Holschuh, C. Biskup, E. Schulz, V. Nache and K. Benndorf (2010).** Role of the S4-S5 Linker in CNG Channel Activation. *Biophys J* 99(8): 2488-2496.
- Lacinova, L. (2005).** Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1: 1-78.
- Lacinova, L., N. Klugbauer and F. Hofmann (2002).** Gating of the expressed Cav3.1 calcium channel. *FEBS Lett* 531(2): 235-240.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, D. M. Moss and J. M. Thornton (1993).** PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J App Cryst* 26: 283-291.
- Laskowski, R. A., J. A. Rullmann, M. W. MacArthur, R. Kaptein and J. M. Thornton (1996).** AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 8(4): 477-486.
- Ledwell, J. L. and R. W. Aldrich (1999).** Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J Gen Physiol* 113(3): 389-414.

- Leroy, J., M. W. Richards, A. J. Butcher, M. Nieto-Rostro, W. S. Pratt, A. Davies and A. C. Dolphin (2005).** Interaction via a key tryptophan in the I-II linker of N-type calcium channels is required for beta1 but not for palmitoylated beta2, implicating an additional binding site in the regulation of channel voltage-dependent properties. *J Neurosci* 25(30): 6984-6996.
- Li, J., L. Stevens, N. Klugbauer and D. Wray (2004).** Roles of molecular regions in determining differences between voltage dependence of activation of CaV3.1 and CaV1.2 calcium channels. *J Biol Chem* 279(26): 26858-26867.
- Liu, Y., M. Holmgren, M. E. Jurman and G. Yellen (1997).** Gated access to the pore of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 19(1): 175-184.
- Long, S. B., E. B. Campbell and R. Mackinnon (2005a).** Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 309(5736): 897-903.
- Long, S. B., E. B. Campbell and R. Mackinnon (2005b).** Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309(5736): 903-908.
- Lopez, G. A., Y. N. Jan and L. Y. Jan (1994).** Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K<sup>+</sup> channel comprises part of the pore. *Nature* 367(6459): 179-182.
- Lu, Z., A. M. Klem and Y. Ramu (2001).** Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413(6858): 809-813.
- Lu, Z., A. M. Klem and Y. Ramu (2002).** Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol* 120(5): 663-676.
- Lu, Z. J., A. Pereverzev, H. L. Liu, M. Weiergraber, M. Henry, A. Krieger, N. Smyth, J. Hescheler and T. Schneider (2004).** Arrhythmia in isolated prenatal hearts after ablation of the Cav2.3 (alpha1E) subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell Physiol Biochem* 14(1-2): 11-22.
- Mansergh, F., N. C. Orton, J. P. Vessey, M. R. Lalonde, W. K. Stell, F. Tremblay, S. Barnes, D. E. Rancourt and N. T. Bech-Hansen (2005).** Mutation of the calcium channel gene *Cacna1f* disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina. *Hum Mol Genet* 14(20): 3035-3046.

- Marks, T. N. and S. W. Jones (1992).** Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line. An allosteric model for calcium channel activation and dihydropyridine agonist action. *J Gen Physiol* 99(3): 367-390.
- Marti-Renom, M. A., A. C. Stuart, A. Fiser, R. Sanchez, F. Melo and A. Sali (2000).** Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 291-325.
- McCormack, K., M. A. Tanouye, L. E. Iverson, J. W. Lin, M. Ramaswami, T. McCormack, J. T. Campanelli, M. K. Mathew and B. Rudy (1991).** A role for hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of Shaker K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2931-2935.
- McKeown, L., P. Robinson and O. T. Jones (2006).** Molecular basis of inherited calcium channelopathies: role of mutations in pore-forming subunits. *Acta Pharmacol Sin* 27(7): 799-812.
- Meyers, M. B., T. S. Puri, A. J. Chien, T. Gao, P. H. Hsu, M. M. Hosey and G. I. Fishman (1998).** Sorcin associates with the pore-forming subunit of voltage-dependent L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 273(30): 18930-18935.
- Nakai, J., B. A. Adams, K. Imoto and K. G. Beam (1994).** Critical roles of the S3 segment and S3-S4 linker of repeat I in activation of L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(3): 1014-1018.
- Parent, L. and M. Gopalakrishnan (1995a).** 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., M. Gopalakrishnan, A. E. Lacerda, X. Wei and E. Perez-Reyes (1995b).** Voltage-dependent inactivation in a cardiac-skeletal chimeric calcium channel. *FEBS Lett* 360(2): 144-150.
- Parent, L., T. Schneider, C. P. Moore and D. Talwar (1997).** Subunit regulation of the human brain alpha 1E calcium channel. *J Membr Biol* 160(2): 127-140.
- Pathak, M., L. Kurtz, F. Tombola and E. Isacoff (2005).** The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel. *J Gen Physiol* 125(1): 57-69.

- Patil, P. G., D. L. Brody and D. T. Yue (1998).** Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron* 20(5): 1027-1038.
- Perez-Reyes, E., L. L. Cribbs, A. Daud, A. E. Lacerda, J. Barclay, M. P. Williamson, M. Fox, M. Rees and J. H. Lee (1998).** Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391(6670): 896-900.
- Peterson, B. Z., B. D. Johnson, G. H. Hockerman, M. Acheson, T. Scheuer and W. A. Catterall (1997).** Analysis of the dihydropyridine receptor site of L-type calcium channels by alanine-scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 272(30): 18752-18758.
- Platzer, J., J. Engel, A. Schrott-Fischer, K. Stephan, S. Bova, H. Chen, H. Zheng and J. Striessnig (2000).** Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell* 102(1): 89-97.
- Qin, N., D. Platano, R. Olcese, J. L. Costantin, E. Stefani and L. Birnbaumer (1998).** Unique regulatory properties of the type 2a Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit caused by palmitoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4690-4695.
- Qin, N., S. Yagel, M. L. Momplaisir, E. E. Codd and M. R. D'Andrea (2002).** Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Mol Pharmacol* 62(3): 485-496.
- Randall, A. and C. D. Benham (1999).** Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Mol Cell Neurosci* 14(4-5): 255-272.
- Randall, A. and R. W. Tsien (1995).** Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15(4): 2995-3012.
- Ranganathan, R., J. H. Lewis and R. MacKinnon (1996).** Spatial localization of the K<sup>+</sup> channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* 16(1): 131-139.
- Raybaud, A., E. E. Baspinar, F. Dionne, Y. Dodier, R. Sauve and L. Parent (2007).** The role of distal S6 hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of CaV2.3 channels. *J Biol Chem* 282(38): 27944-27952.

- Raybaud, A., Y. Dodier, P. Bissonnette, M. Simoes, D. G. Bichet, R. Sauve and L. Parent (2006).** The role of the GX9GX3G motif in the gating of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 281(51): 39424-39436.
- Rhoads, A. R. and F. Friedberg (1997).** Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J* 11(5): 331-340.
- Richard, S., P. Lorente and J. Nargeot (1999).** Les hauts et les bas des courants calciques dans le développement de l'insuffisance cardiaque et le paradoxe des stratégies thérapeutiques *Médecine sciences* 15(3): 329-337.
- Rosenhouse-Dantsker, A. and D. E. Logothetis (2006).** New roles for a key glycine and its neighboring residue in potassium channel gating. *Biophys J* 91(8): 2860-2873.
- Rost, B., P. Fariselli and R. Casadio (1996).** Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* 5(8): 1704-1718.
- Rost, B. and C. Sander (1993).** Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* 232(2): 584-599.
- Rousset, M., T. Cens, S. Restituto, C. Barrere, J. L. Black, 3rd, M. W. McEnery and P. Charnet (2001).** Functional roles of gamma2, gamma3 and gamma4, three new Ca<sup>2+</sup> channel subunits, in P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 532(Pt 3): 583-593.
- Ruta, V., J. Chen and R. MacKinnon (2005).** Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Cell* 123(3): 463-475.
- Sali, A. and T. L. Blundell (1993).** Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234(3): 779-815.
- Salt, T. E. and S. A. Eaton (1996).** Functions of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in sensory transmission in the mammalian thalamus. *Prog Neurobiol* 48(1): 55-72.
- Sandoz, G., D. Bichet, V. Cornet, Y. Mori, R. Felix and M. De Waard (2001).** Distinct properties and differential beta subunit regulation of two C-terminal isoforms of the P/Q-type Ca(2+)-channel alpha(1A) subunit. *Eur J Neurosci* 14(6): 987-997.

- Sanguinetti, M. C. and Q. P. Xu (1999).** Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus oocytes*. *J Physiol* 514 ( Pt 3): 667-675.
- Schoppa, N. E. and F. J. Sigworth (1998).** Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels. *J Gen Physiol* 111(2): 313-342.
- Seisenberger, C., V. Specht, A. Welling, J. Platzner, A. Pfeifer, S. Kuhbandner, J. Striessnig, N. Klugbauer, R. Feil and F. Hofmann (2000).** Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* 275(50): 39193-39199.
- Sharp, A. H., J. L. Black, 3rd, S. J. Dubel, S. Sundarraj, J. P. Shen, A. M. Yunker, T. D. Copeland and M. W. McEnery (2001).** Biochemical and anatomical evidence for specialized voltage-dependent calcium channel gamma isoform expression in the epileptic and ataxic mouse, stargazer. *Neuroscience* 105(3): 599-617.
- Sharp, A. H. and K. P. Campbell (1989).** Characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor using subunit-specific polyclonal antibodies. Evidence for a 32,000-Da subunit. *J Biol Chem* 264(5): 2816-2825.
- Sigworth, F. J. (1994).** Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 27(1): 1-40.
- Slesinger, P. A., Y. N. Jan and L. Y. Jan (1993).** The S4-S5 loop contributes to the ion-selective pore of potassium channels. *Neuron* 11(4): 739-749.
- Smith-Maxwell, C. J., J. L. Ledwell and R. W. Aldrich (1998).** Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol* 111(3): 399-420.
- Soldatov, N. M., R. D. Zuhlke, A. Bouron and H. Reuter (1997).** Molecular structures involved in L-type calcium channel inactivation. Role of the carboxyl-terminal region encoded by exons 40-42 in alpha1C subunit in the kinetics and Ca<sup>2+</sup> dependence of inactivation. *J Biol Chem* 272(6): 3560-3566.
- Spaetgens, R. L. and G. W. Zamponi (1999).** Multiple structural domains contribute to voltage-dependent inactivation of rat brain alpha(1E) calcium channels. *J Biol Chem* 274(32): 22428-22436.



- Splawski, I., K. W. Timothy, N. Decher, P. Kumar, F. B. Sachse, A. H. Beggs, M. C. Sanguinetti and M. T. Keating (2005).** Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(23): 8089-8096; discussion 8086-8088.
- Splawski, I., K. W. Timothy, L. M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C. Napolitano, P. J. Schwartz, R. M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S. G. Priori, M. C. Sanguinetti and M. T. Keating (2004).** Ca(V)<sub>1.2</sub> calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119(1): 19-31.
- Stephens, G. J., K. M. Page, Y. Bogdanov and A. C. Dolphin (2000).** The alpha1B Ca<sup>2+</sup> channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J Physiol* 525 Pt 2: 377-390.
- Stotz, S. C., J. Hamid, R. L. Spaetgens, S. E. Jarvis and G. W. Zamponi (2000).** Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism? *J Biol Chem* 275(32): 24575-24582.
- Striessnig, J., K. Moosburger, A. Goll, D. R. Ferry and H. Glossmann (1986).** Stereoselective photoaffinity labelling of the purified 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent calcium channel. *Eur J Biochem* 161(3): 603-609.
- Sutton, K. G., J. E. McRory, H. Guthrie, T. H. Murphy and T. P. Snutch (1999).** P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A. *Nature* 401(6755): 800-804.
- Swartz, K. J. (2004).** Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 5(12): 905-916.
- Takahashi, M. and W. A. Catterall (1987a).** Identification of an alpha subunit of dihydropyridine-sensitive brain calcium channels. *Science* 236(4797): 88-91.
- Takahashi, M., M. J. Seagar, J. F. Jones, B. F. Reber and W. A. Catterall (1987b).** Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15): 5478-5482.
- Tanabe, T., B. A. Adams, S. Numa and K. G. Beam (1991).** Repeat I of the dihydropyridine receptor is critical in determining calcium channel activation kinetics. *Nature* 352(6338): 800-803.

- Tombola, F., M. M. Pathak and E. Y. Isacoff (2006).** How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 23-52.
- Van Petegem, F., F. C. Chatelain and D. L. Minor, Jr. (2005).** Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex. *Nat Struct Mol Biol* 12(12): 1108-1115.
- Van Petegem, F., K. A. Clark, F. C. Chatelain and D. L. Minor, Jr. (2004).** Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 429(6992): 671-675.
- Van Petegem, F., K. E. Duderstadt, K. A. Clark, M. Wang and D. L. Minor, Jr. (2008).** Alanine-scanning mutagenesis defines a conserved energetic hotspot in the CaV $\alpha$ 1 AID-CaV $\beta$  interaction site that is critical for channel modulation. *Structure* 16(2): 280-294.
- Vennekens, R., T. Voets, R. J. Bindels, G. Droogmans and B. Nilius (2002).** Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium* 31(6): 253-264.
- Walker, D. and M. De Waard (1998).** Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels: role in channel function. *Trends Neurosci* 21(4): 148-154.
- Wolf, M., A. Eberhart, H. Glossmann, J. Striessnig and N. Grigorieff (2003).** Visualization of the domain structure of an L-type Ca<sup>2+</sup> channel using electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* 332(1): 171-182.
- Yellen, G. (1998).** The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys* 31: 239-295.
- Zagotta, W. N. and R. W. Aldrich (1990).** Voltage-dependent gating of Shaker A-type potassium channels in *Drosophila* muscle. *J Gen Physiol* 95(1): 29-60.
- Zagotta, W. N., T. Hoshi and R. W. Aldrich (1994).** Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J Gen Physiol* 103(2): 321-362.
- Zhang, J. F., P. T. Ellinor, R. W. Aldrich and R. W. Tsien (1994).** Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 372(6501): 97-100.

- Zhang, Z., Y. He, D. Tuteja, D. Xu, V. Timofeyev, Q. Zhang, K. A. Glatter, Y. Xu, H. S. Shin, R. Low and N. Chiamvimonvat (2005).** Functional roles of Cav1.3(alpha1D) calcium channels in atria: insights gained from gene-targeted null mutant mice. *Circulation* 112(13): 1936-1944.
- Zhao, Y., V. Yarov-Yarovoy, T. Scheuer and W. A. Catterall (2004).** A gating hinge in Na<sup>+</sup> channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron* 41(6): 859-865.
- Zhen, X. G., C. Xie, A. Fitzmaurice, C. E. Schoonover, E. T. Orenstein and J. Yang (2005).** Functional architecture of the inner pore of a voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel. *J Gen Physiol* 126(3): 193-204.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, K. Deisseroth, R. W. Tsien and H. Reuter (1999).** Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399(6732): 159-162.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, R. W. Tsien and H. Reuter (2000).** Ca<sup>2+</sup>-sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(alpha)1C subunit. *J Biol Chem* 275(28): 21121-21129.
- Zuhlke, R. D. and H. Reuter (1998).** Ca<sup>2+</sup>-sensitive inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 3287-3294.